

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penelitian Terdahulu

Ampas tebu yang digunakan oleh Maryana *et al* (2014), yaitu yang sudah dipotong dengan ukuran 40 *mesh*. Kemudian, 250 g ampas tebu dimasukkan kedalam reaktor 12 L dan menambahkan 3 L NaOH dengan perbandingan 1:12. Konsentrasi NaOH yang digunakan adalah 1 N dan 2 N dengan menggunakan suhu 100 °C. Vasiasi waktu yang digunakan pada NaOH 1 N yaitu 15 menit, 30 menit dan 45 menit. Sedangkan untuk NaOH 2 N selama 40 menit. Karakteristik dari limbah ampas tebu sebelum dan sesudah pretreatment dilakukan analisis dengan menggunakan *X-ray Diffraction* dan *Fourir Transform Infra Red Spectrometer*. Dan menghasilkan kadar lignin terendah 7.16% dengan menggunakan konsentrasi NaOH 1 N selama 30 menit.

Penelitian dengan bahan baku ampas tebu dengan melakukan *pretreatment* menghasilkan ampas tebu hingga menjadi bubuk yang kemudian, menggunakan hidrolisis termal dengan mencampur akuades dengan konsentrasi tepung ampas tebu masing-masing sebesar 2,94, 3,85 dan 4,76% dengan massa total 4000 gram. Kemudian, dimasukkan dalam wadah hidrolisis yang sudah didesain khusus masing-masing pada suhu 135, 150, dan 165 °C dengan durasi 1, 1,5 dan 2 jam hingga berbentuk *slurry*. Kemudian, hasil hidrolisis di fermentasi dengan ragi sebanyak 5% dari massa substrat dan urea sebanyak 0,05% dari massa yang akan difermentasi dan didiamkan selama 12 jam dalam keadaan anaerob. Setelah itu, sampel di murnikan dengan proses distilasi pada suhu 75 °C dengan menggunakan *rotary vacuum pump*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *yield* glukosa meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi tepung ampas tebu, suhu dan waktu hidrolisis. Namun, *yield* glukosa meningkat pada waktu hidrolisis 1 hingga 1,5 jam kemudian menurun pada waktu hidrolisis 1,5 hingga 2 jam (Irvan *et al.*, 2015).

Untuk menghasilkan kadar etanol dari ampas tebu yang terdelignifikasi alkali dengan menggunakan NaOH 1% pada suhu 121°C selama 60 menit. Dengan tujuan agar mengetahui konsentrasi enzim dan waktu inkubasi yang optimum untuk memproduksi etanol dari ampas tebu. Kemudian, proses sakarifikasi dan fermentasi serentak dilakukan menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan enzim selulase komersial (*Meicellase*) dengan konsentrasi 10-50 fpu/g berat kering ampas tebu. SSF dilakukan pada suhu 38°C, 130 rpm selama 72 jam. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi etanol tertinggi (22.64 g/L) dan rendemen tertinggi (29.18% per g berat kering ampas tebu) dihasilkan pada konsentrasi enzim 50 fpu/g berat kering ampas tebu setelah 72 jam SSF (Oktaviani *et al.*, 2016).

Bioetanol memiliki sifat fisik yang berwujud cairan, tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar. Dari sifat fisik bioetanol yang kurang praktis maka peneliti melakukan perubahan menjadi bioetanol padat agar aman dalam penyimpanan dan lebih luas pemanfaatnya dengan tujuan mengetahui kemampuan ampas tebu sebagai alternatif pada pembuatan bioetanol padat, mengetahui kecenderungan hubungan antara waktu fermentasi dengan kadar etanol pada proses fermentasi, mengetahui pengaruh berat zat pematid dengan rasio bioetanol terhadap laju pembakarannya. Hasil penelitian menyatakan bahwa ampas tebu dapat dijadikan bahan bakar alternatif (bioetanol) karena dalam proses fermentasi dihasil ke-6 kadar etanol yang dihasilkan sebesar 96,8% sehingga mencapai SNI 7390:2008 tentang Bioetanol Terdenaturasi untuk Gasohol dan pengaruh zat pematid sebesar 200 gr dalam etanol 100 gr juga berpengaruh dalam memperlambat lama waktu pembakaran sehingga laju pembakaran yang dihasilkan lebih kecil senilai 74,44 gr/menit (Dyani & Rosariawari, 2021).

Variasi sampel yang digunakan adalah volume larutan sari tongkol jagung dan ampas tebu dengan perbandingan A (100%:0%), B (50%:50%) dan C (0%:100%). Proses pretreatment menggunakan NaOH 0,1 M selama 1 jam. Selanjutnya, dilakukan proses hidrolisis dengan menambahkan asam klorida (HCl) 0,4 N kedalam larutan sampai pH antara 4-5 dan difermentasi menggunakan ragi roti sebanyak 7,5 gram selama 5 hari. Bioetanol dari limbah tongkol jagung dan ampas

tebu dengan karakteristik optimum terdapat pada sampel bioetanol C yaitu ampas tebu yaitu dengan nilai kadar etanol 95% dan pH 7,4. Hal ini dikarenakan, ampas tebu memiliki potensi sebagai bahan baku lignoselulotik yang dapat digunakan untuk menghasilkan bioetanol karena mengandung kadar gula tinggi. Semakin tinggi kandungan gula yang terdapat pada han baku maka semakin baik bioetanol yang dihasilkan (Ananda *et al.*, 2023).

Tabel 2. 1. Penelitian Terdahulu

No	Peneliti (tahun)	Tujuan	Hasil	Perbedaan
1	(Maryana <i>et al.</i> , 2014)	Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi alkali pretreatment dalam komposisi bahan kimia dan struktur dari limbah ampas tebu	Hasil penelitian menunjukkan kadar lignin terendah 7.16% dengan menggunakan treatment NaOH 1N selama 30 menit.	- Proses fermentasi yang dilakukan - proses hidrolisis yang dilakukan
2	(Irvan <i>et al.</i> , 2015)	Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi tepung ampas tebu, suhu dan waktu hidrolisis terhadap <i>yield</i> glukosa dan perolehan	Hasil penelitian menunjukkan bahwa <i>yield</i> glukosa meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi tepung	- Proses hidrolisis yang dilakukan - Proses pretreatment yang digunakan

No	Peneliti (tahun)	Tujuan	Hasil	Perbedaan
		kadar glukosa dari proses <i>recycle vinasse</i>	ampas tebu, suhu dan waktu hidrolisis	- Proses fermentasi yang digunakan
3	(Oktaviani <i>et al.</i> , 2016).	Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi enzim dan waktu inkubasi optimum untuk memproduksi etanol dari ampas tebu terdelignifikasi alkali melalui proses sakarifikasi dan fermentasi serentak (SSF)	Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi etanol tertinggi (22.64 g/L) dan rendemen tertinggi (29.18% per g berat kering ampas tebu) dihasilkan pada konsentrasi enzim 50 fpu/g berat kering ampas tebu setelah 72 jam SSF.	- Proses hidrolisis yang dilakukan - Bahan fermentasi yang digunakan
4	(Dyani & Rosariawari, 2021)	Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ampas tebu sebagai alternatif pada pembuatan bioethanol padat, mengetahui	Hasil penelitian ini menyatakan bahwa ampas tebu dapat dijadikan bahan bakar alternatif (biethanol) karena dalam proses fermentasi di hari ke-6 kadar etanol	- Hasil akhir produk - Proses hidrolisis yang dilakukan - Proses fermentasi

No	Peneliti (tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
		Kecenderungan hubungan antara waktu fermentasi dengan kadar etanol pada proses fermentasi, mengetahui pengaruh berat zat pematat dengan rasio bietanol terhadap laju pembakaran	Kadar etanol yang dihasilkan sebesar 98,8% sehingga mencapai SNI 7390:2008 dan pengaruh zat pematat sebesar 200 gr dalam etanol 100 gr juga berpengaruh dalm memperlambat lama waktu pemakaran sehingga laju pembakaran yang dihasilkan lebih kecil senilai 74.44 gr/menit	yang dilakukan
5	(Ananda <i>et al.</i> , 2023)	Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui karakteristik bioetanol dengan variasi volume larutan dari limbah tongkol jagung dan ampas tebu agar dihasilkan	Hasil dari penelitian ini adalah karakteristik optimum terdapat pada sampel bioetanol C yaitu ampas tebu dengan nilai kadar etanol, nilai kadar air, nilai kalor, dan pH yang	- Proses pretreatment bahan baku yang digunakan - Proses hidrolisis yang digunakan

No	Peneliti (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
----	------------------	--------	-------	---------

		Dihasilkan bioetanol dengan kadar tertinggi	Dan pH yang masing-masing yaitu 95%, 7,6%, 3546,86 kkal/kg dan 7,4.	
6	(Moeksin <i>et al.</i> , 2015)	Mengetahui waktu untuk proses hidrolisis dengan adanya penambahan enzim glukoamilase serta mengetahui waktu optimum untuk melakukan fermentasi cucian air beras.	Hasil penelitian ini menyatakan bahwa - Waktu hidrolisa yang lama dan penambahan enzim glukoamilase sebagai katalis dalam proses hidrolisa air cucian beras dapat meningkatkan kadar glukosa yaitu pada 3%(v/v) penambahan enzim glukamilase dan 6 jam hidrolisa menghasilkan kadar glukosa 93,02 mg/L	<ul style="list-style-type: none"> - Bahan yang digunakan - Proses hidrolisis yang digunakan - Proses fermentasi yang dilakukan

No	Peneliti (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
			<ul style="list-style-type: none"> - Waktu optimum fermentasi cucian air beras adalah 4 hari yang menghasilkan kadar etanol 11,177% 	
7	(Putu <i>et al.</i> , 2020)	Mengetahui konsentrasi optimum asam klorida (HCl) dan waktu optimum hidrolisis serat sabut kelapa untuk memperoleh kadar glukosa yang maksimal	<p>Hasil penelitian ini menyatakan bahwa :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Didapatkan bahwa perolehan hasil glukosa tertinggi pada waktu 90 menit sebesar 1,44% sedangkan pada menit 120 terjadi penurunan hasil glukosa menjadi 1,30%. <p>Perbedaan perolehan kadar hasil glukosa pada perbedaan variasi waktu ini</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proses hidrolisis yang digunakan - Bahan baku yang digunakan untuk membuat bioetanol

No	Penerbit (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
			<p>menunjukkan bahwa semakin lama waktu hidrolisis dan semakin lama waktu kontak yang terjadi antara asam dan sabut kelapa tidak sepenuhnya meningkatkan hasil hidrolisis sabut kelapa</p> <p>- Proses hidrolisis menggunakan katalis asam memang menghasilkan kadar glukosa sedikit lebih kecil dibandingkan menggunakan enzim. Hal ini disebabkan oleh asam bersifat tidak spesifik</p>	

No	Penerbit (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
			dan memotong secara acak ikatan glikosidik sehingga akan menghasilkan gula yang tidak seragam	
8	(Utari <i>et al.</i> , 2024)	<ul style="list-style-type: none"> - Mengetahui pengaruh waktu fermentasi terhadap karakteristik bioetanol berbasis limbah ampas tebu - Mengetahui waktu fermentasi optimum agar dihasilkan bioetanol dengan karakteristik yang memenuhi SNI 7390:2012 	Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi nilai kadar air pada sampel. Semakin lama waktu fermentasi maka nilai kalor semakin naik hingga batas waktu optimalnya maka nilai kalor akan menurun. Semakin lama waktu fermentasi berlangsung, nilai pengukuran pH akan semakin menurun. Setiap mikroorganisme memiliki pH pertumbuhan	<ul style="list-style-type: none"> - Durasi waktu fermentasi - Proses hidrolisis yang digunakan

No	Penerbit (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
			Minimal, maksimal dan optimal.	
9	(Nurjanah <i>et al.</i> , 2021)	Mengetahui pengaruh adanya pretreatment terhadap proses fermentasi ampas tebu	<ul style="list-style-type: none"> - Penggunaan bahan baku dari kuit buah-buahan yaitu kulit pisang, kulit nanas, kulit jeruk, dan kulit delima yang mengandung banyak glukosa, hemiselulosa, dan lignin dapat dijadikan alternatif dalam pembuatan bioethanol. - Penelitian ini menunjukkan bahwa hasil 	<ul style="list-style-type: none"> - Bahan yang digunakan - Proses pretreatment yang dilakukan - Proses fermentasi yang digunakan

No	Peneliti (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
			Bioetanol dari ampas tebu sebesar 88% w/v dengan <i>pretreatment</i> alkali metode hidrolisis dan fermentasi anaerob melalui enzim <i>Kluyveromyces marxianus</i> dan <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	
10	(Ketut Sari, 2019)	Mengetahui proses hidrolisis terbaik pada rumput gajah dan volume terbaik	Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa jumlah unsur pembentuk bioetanol (selulosa, glukosa dan pati) rata-rata sebesar 48,055%, ini berarti jika seluruhnya bisa terhidrolisis dan terfermentasi secara sempurna diperoleh etanol dalam jumlah yang besar. Dalam 100 gram rumput gajah dapat dihasilkan minimal etanol sebesar 48,055 gram,	<ul style="list-style-type: none"> - Bahan baku yang digunakan - Proses <i>pretreatment</i> yang dilakukan

No	Penerbit (Tahun)	Tujuan	Hasil	Pembeda
			Jika desitas etanol 0,98 g/ml, maka volume etanol makin tinggi yaitu sebesar 49,046 mL. Dalam 1 kg rumput gajah dapat dihasilkan etanol sebesar 0,49 liter.	

2.2 Ampas Tebu

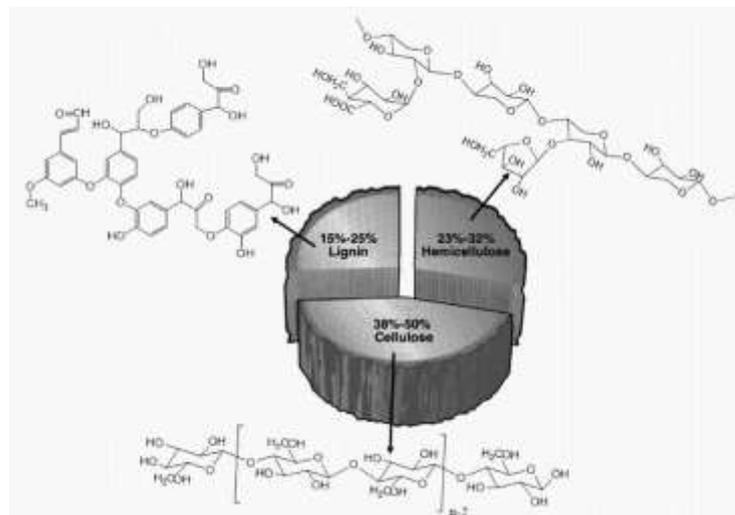
Ampas tebu adalah residu serat yang tersisa dari hasil produksi pengolahan tebu. Sebagian besar ampas tebu mengandung substrat lignoselulostik potensial untuk produksi bioetanol, karena mengandung kandungan gula tinggi, dapat diperbaharui, murah, dan banyak tersedia. (Irvan *et al.*, 2015).

Ampas tebu adalah residu atau limbah yang tersisa setelah proses ekstraksi sari dari batang tebu. Ketika tebu diperas untuk menghasilkan jus atau sari yang kemudian diolah menjadi gula atau produk lain, sisa serat tanaman yang tidak terpakai disebut sebagai ampas tebu. Ampas ini umumnya terdiri dari serat-serat kasar yang kaya akan komponen lignoselulosa, yang terdiri dari tiga komponen utama: selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Siddiq, 2024). Ampas tebu merupakan bahan lignoselulosa yang memiliki potensi besar untuk digunakan sebagai bahan baku produksi bioetanol, bahan bakar terbarukan yang dihasilkan dari fermentasi bahan organik. Proses konversi lignoselulosa menjadi bioetanol melibatkan beberapa tahapan, termasuk pretreatment (seperti hidrolisis basa menggunakan NaOH), fermentasi, dan distilasi (Leko *et al.*, 2021).

Bahan lignoselulosa merupakan substansi yang kompleks karena terdiri dari campuran polimer karbohidrat (*cellulose* dan *hemicellulose*), lignin dan senyawa-

senyawa yang larut dalam air (abu). Ampas tebu memiliki komponen nya sendiri yaitu:

- Selulosa : polimer glukosa yang membentuk dinding sel tanaman. Selulosa terdiri dari molekul glukosa beta-D. Glukosa ini terhubung satu sama lain melalui ikatan glikosidik beta-1,4, membentuk rantai panjang yang memberi selulosa kekuatan dan stabilitas. Ikatan ini membuat selulosa menjadi serat yang kuat dan tahan terhadap banyak jenis dekomposisi
- Hemiselulosa: polimer yang terdiri dari berbagai jenis kandunganmonosakarida atau senyawa gula sederhana.
- Lignin: polimer fenolik yang memberikan kekuatan dan kekakuan pada dinding sel tanaman



Gambar 2. 1 Struktur Ampas Tebu

Dari komponen yang terpenting untuk dikonversi menjadi produk yang berbasis lignoselulosa adalah polisakaridanya. Namun, lignin dengan struktur yang sangat kuat menjadi penghambat dalam konversi polisakaridanya menjadi produk lain. Oleh karena itu banyak riset dibidang biomass yang terus mengembangkan upaya untuk mendegradasi lignin tersebut (Trisakti & br Silitonga, 2015).

Pengolahan ampas tebu menjadi produk bernilai tambah, seperti bioetanol, menghadapi tantangan teknis, terutama karena kandungan lignin yang tinggi, yang membuat proses konversi menjadi lebih kompleks. Oleh karena itu, berbagai

metode pengolahan seperti hidrolisis asam atau basa dikembangkan untuk memecah lignin dan mempermudah akses enzim ke selulosa dan hemiselulosa. Secara keseluruhan, ampas tebu merupakan sumber daya yang melimpah, terutama di daerah penghasil tebu, dan memiliki potensi besar untuk dimanfaatkan dalam berbagai industri, terutama dalam produksi energi terbarukan seperti bioetanol (Rahimah, 2015).

2.3 Bioetanol

Bioetanol merupakan cairan hasil dari proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat (selulosa) menggunakan bantuan mikroba. Produksi bioetanol dari tanaman yang mengandung selulosa, dilakukan melalui proses konversi lignoselulosa menjadi selulosa dengan beberapa metode diantaranya dengan hidrolisis fisik, kimia, dan biologi. Bioetanol merupakan bahan bakar alternatif yang memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi CO₂ hingga 18%. Bioetanol (C₂H₅OH) merupakan senyawa etanol yang didapatkan dari rekayasa biomassa (tanaman) yang mengandung komponen gula, pati, maupun selulosa melalui proses biologis (enzimatik dan fermentasi). Tumbuhan yang potensial untuk menghasilkan bioetanol antara lain tanaman yang memiliki kadar karbohidrat tinggi, seperti tebu, nira, aren, sorgum, ubi kayu, jambu mete (limbah jambu mete), garut, batang pisang, ubi jalar, jagung, bonggol jagung, jerami, dan bagasse (ampas tebu) (Ananda *et al.*, 2023).

Bioetanol adalah jenis bahan bakar terbarukan yang dihasilkan melalui proses fermentasi bahan-bahan organik yang mengandung gula atau pati, seperti tanaman biji-bijian, tebu, jagung, dan limbah biomassa seperti ampas tebu. Secara kimia, bioetanol adalah etanol (C₂H₅OH), suatu senyawa alkohol yang juga dikenal sebagai etil alkohol (Tysara, 2023). Bioetanol dapat dihasilkan dari berbagai sumber yang mengandung gula atau pati, seperti tebu, jagung, singkong, dan buah-buahan. Ampas tebu juga bisa digunakan setelah diolah menjadi gula sederhana. Salah satu keunggulan utama bioetanol adalah kemampuannya untuk mengurangi emisi gas rumah kaca dibandingkan dengan bensin. Pembakaran bioetanol

menghasilkan CO₂ yang seimbang dengan CO₂ yang diserap tanaman saat tumbuh, menjadikannya lebih ramah lingkungan (Finaka, 2018).

Sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) 7390:2022 tentang Bioetanol terdenaturasi untuk gasohol standar ini menetapkan persyaratan mutu dan metode uji bioetanol untuk gasohol dan hanya berlaku untuk bioetanol yang akan digunakan sebagai bahan bakar motor bensin yaitu sebagai komponen campuran bahan bakar bensin pada kendaraan bermotor atau motor bensin lainnya seperti pada tabel berikut (Badan Standarisasi Nasional (SNI), 2022).

Tabel 2. 2 Parameter Syarat Uji Bioetanol SNI 7390:2022

No	Parameter Uji	Satuan, min/maks	Persyaratan
1	Kadar Etanol (Purity)	%-v, min.	99,5
2	Kadar Metanol	%-v, maks.	0,5
3	Kadar Air	%-v, maks.	0,3
4	Kandungan Aldehid (Sebagai Asetaldehid)	%-v, maks.	0,005
	Kandungan Eter (Sebagai Dietil Eter)	%-v, maks.	0,05
5	Kadar tembaga (Cu)	mg/kg, maks.	0,1
6	Keasaman sebagai asam asetat	%-v, maks	0,005%
7	Tampakan		Jernih dan terang, tidak ada endapan dan kotoran
8	Kadar Besi (Fe)	mg/l, maks	0,1
9	Kadar Natrium (Na)	mg/l, maks.	0,1

Untuk melakukan pengujian kadar bioetanol pada suatu larutan dapat menggunakan alat kromatografi gas dan alkoholmeter. Hasil uji dari kedua alat tersebut tidak menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan dalam pengukuran kadar bioetanol, sehingga metode kromatografi gas dan alkoholmeter dapat

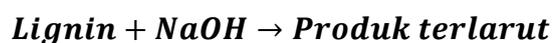
digunakan sebagai alternatif yang baik dalam menentukan kadar bioetanol (Hermanto, 2021).

2.4 Hidrolisis Basa (Natrium Hidoksida)

Hidrolisis Basa (Natrium Hidoksida) adalah proses kimia di mana senyawa organik dipecah menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana melalui reaksi dengan basa, dalam hal ini natrium hidroksida (NaOH). Proses ini sering digunakan dalam berbagai aplikasi industri, termasuk dalam pengolahan biomassa untuk produksi bioetanol. Hidrolisis basa sangat efektif dalam mengurangi kandungan lignin dalam biomassa, yang merupakan salah satu penghalang utama dalam konversi biomassa menjadi bioetanol (Andriani, 2023).

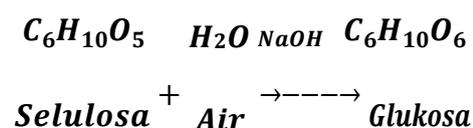
Hidrolisis adalah suatu proses antara reaktan dengan air agar suatu senyawa pecah terurai. Pada proses hidrolisis dengan menggunakan bahan baku ampas tebu, proses yang dilibatkan yaitu dengan pemecahan komponen ampas tebu menjadi bentuk yang lebih sederhana menggunakan air dan bantuan asam ataupun basa. Dalam penggunaan basa dapat dilakukan dengan natrium hidroksida untuk merombak struktur kompleks dalam ampas tebu dengan mengdegradasi kadar lignin dalam ampas tebu menjadi senyawa yang lebih kecil proses ini disebut depolimerisasi.

Reaksi Hidrolisis penguraian kadar lignin :



Gambar 2. 2. Reaksi depolimerisasi

Pada fase ini proses tersebut disebut alkali pretreatment. Dari hasil hidrolisis tersebut menghasilkan kadar selulosa yang kemudian dipecah menjadi glukosa (Febriyati *et al.*, 2016).



Gambar 2. 3 Reaksi Pemecahan Selulosa menjadi Glukosa

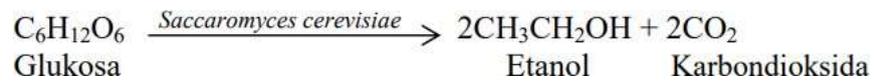
Karena sifat Natrium Hidroksida (NaOH) yang mudah larut dalam air dan pada hidrolisis basa NaOH akan melepaskan kalor yang berfungsi untuk menghilangkan atau membersihkan zat-zat dan kotoran-kotoran yang melekat pada serat ampas tebu. Waktu perendaman alkali NaOH juga dapat meningkatkan sifat mekanik serat dan mempengaruhi komposisi kimia pada serat (Kusmiran & Suwandi, 2020).

2.5 Fermentasi

Fermentasi adalah proses biokimia di mana mikroorganisme, seperti ragi, bakteri, atau kapang, mengubah bahan organik, terutama gula, menjadi energi, gas, atau senyawa organik lain dalam kondisi anaerob (tanpa oksigen). Fermentasi adalah salah satu metode tertua yang digunakan manusia untuk mengawetkan dan memproses makanan, serta untuk menghasilkan minuman beralkohol. Selain itu, fermentasi juga digunakan dalam berbagai proses industri, termasuk produksi bioetanol sebagai bahan bakar terbarukan. (Qothrunnada, 2022).

Salah satu proses untuk menghasilkan bioetanol adalah dengan proses fermentasi. Adapun proses penguraian senyawa organik yang berfungsi untuk menghasilkan energi juga terjadinya proses perubahan substrat atau bahan baku menjadi sebuah produk oleh mikroba dalam kondisi anaerob adalah sebuah proses dari fermentasi. Fermentasi juga merupakan penerapan metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang dapat bernilai tinggi, seperti asam organik, protein sel tunggal, antibiotika, dan biopolimer. Proses fermentasi ini telah lama dilakukan secara tradisional dan dihasilkan produk untuk dikonsumsi manusia seperti tape, tuak, *wine*, tempe dan lain-lain (Anonymous, 2014).

Fermentasi dapat menggunakan bahan nabati yang mengandung komponen kimia dari golongan karbohidrat yaitu seperti pati, amilum, serat, selulosa dan lainnya dengan mikroorganisme seperti kapang, khamir ataupun bakteri dengan proses konversi komponen kimia tersebut menjadi glukosa yang kemudian didestilasi menjadi cairan kimia yang disebut etanol. Persamaan reaksi fermentasinya:



Gambar 2. 4 Reaksi Fermentasi

Pada fase tersebut glukosa diubah secara simultan menjadi biomassa, etanol dan CO₂ (Anonymous, 2018).

Dalam melakukan fermentasi terdapat beberapa faktor yang dapat memengaruhi proses fermentasi atau pertumbuhan mikroorganisme, salah satunya adalah rentang waktu, karena dalam pembuatan bietanol, rentang waktu dapat mempengaruhi kadar yang dihasilkan (Nurul *et al.*, 2021).

2.6 Destilasi

Destilasi adalah teknik pemisahan untuk memisahkan dua atau lebih komponen zat cair yang memiliki perbedaan titik didih yang jauh. Selain perbedaan titik didih, juga perbedaan kevolatilan, yaitu kecenderungan sebuah zat untuk menjadi gas. Destilasi ini dilakukan pada tekanan atmosfer yang normal. Aplikasi destilasi sederhana digunakan untuk memisahkan campuran air dan alkohol (Wahyudi *et al.*, 2017).

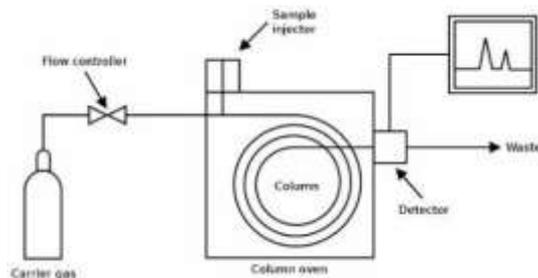
Destilasi merupakan salah satu metode pemisahan campuran yang berdasarkan perbedaan tingkat volalitas pada suhu dan tekanan tertentu. Destilasi merupakan proses fisika dan tidak terjadi adanya reaksi kimia selama proses berlangsung. Dasar utama pemisahan dengan cara destilasi adalah perbedaan titik didih pada tekanan tertentu. Proses destilasi melibatkan suatu penguapan campuran dan diikuti dengan proses pendinginan dan pengembunan. Pada skala laboratorium, destilasi dilakukan sekali jalan. Maksud dari sekali jalan yaitu komposisi campuran dipisahkan menjadi komponen fraksi yang diurutkan berdasarkan volatilitas, dimana zat yang paling volatil akan dipisahkan terlebih dahulu. Kemudian zat yang tidak volatil akan tersisa pada bagian paling bawah (Wahyudi *et al.*, 2018).

Destilasi adalah operasi pemisahan komponen-komponen cair dari suatu campuran fase cair, khususnya yang mempunyai titik didih dan tekanan uap yang cukup besar. Perbedaan tekanan uap tersebut akan menyebabkan fase cairnya mempunyai komposisi yang perbedaannya cukup signifikan. Fase uap mengandung lebih banyak komponen yang memiliki tekanan uap rendah, sedangkan fase cair lebih banyak mengandung komponen yang memiliki tekanan uap tinggi. Ada empat jenis destilasi yang sudah digunakan secara umum yaitu, destilasi sederhana, destilasi fraksionasi, distilasi uap dan distilasi vakum (Maici, 2017).

Destilasi sederhana adalah teknik pemisahan kimia untuk memisahkan dua atau lebih komponen yang memiliki perbedaan titik didih yang jauh. Suatu campuran dapat dipisahkan dengan destilasi biasa ini untuk memperoleh senyawa murninya. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam campuran akan menguap pada saat mencapai titik didih masing-masing (Subagyo & Simanjuntak, 2019).

2.7 Kromatografi Gas

Kromatografi gas adalah teknik analisis laboratorium yang digunakan untuk memisahkan dan menganalisis senyawa-senyawa dalam campuran gas. Dalam analisis bioetanol, analisis menggunakan kromatografi gas diperlukan untuk mengetahui komposisi dan konsentrasi bioetanol serta komponen lainnya yang terdapat dalam sample (Rizaline, 2018).



Gambar 2. 5 Skema Kromatografi Gas

Teknik pemisahan yang digunakan dalam menganalisis campuran senyawa yang dapat menguap tanpa mengurai. Dalam kromatografi gas, campuran senyawa dipisahkan berdasarkan perbedaan titik didih dan interaksi dengan fase stasioner dalam kromatografi. Komponen campuran tersebut akan keluar dari kolom pada

waktu yang tidak bersamaan, yang disebut waktu retensi. Hasil analisis kromatografi gas untuk kadar etanol dan metanol dalam sampel memungkinkan pemisahan dan identifikasi komponen berdasarkan inteksi kedua zat tersebut dengan fase stasioner atau fase ketika laju pertumbuhan sama dengan laju kematian mikroba, sehingga hasil dari jumlah mikroba secara keseluruhan akan tetap dan fase gerak (Savchuk *et al.*, 2020).

2.7.1 Kadar Etanol

Pada hasil analisis kadar etanol dengan menggunakan kromatografi gas hasil akan terlihat sebagai puncak dengan waktu retensi etanol yaitu sekitar 1 – 3 menit, tergantung pada kondisi kolom dan gas pembawa yang digunakan. Kadar etanol biasanya dinyatakan dalam persentase atau ppm (*part per million*). Hasil dapat menunjukkan konsentrasi etanol yang diukur dari area puncak dalam kromatogram, dibandingkan dengan standar kalibrasi. Hasil analisis dapat menunjukkan kadar etanol sebesar 95% dalam suatu sampel (Sisco & Robinson, 2020).

Kadar etanol mengacu pada konsentrasi atau persentase etanol (C_2H_5OH) yang terdapat dalam suatu campuran atau larutan, seperti minuman beralkohol, bahan bakar bioetanol, atau produk fermentasi lainnya. Kadar etanol diukur untuk menentukan kualitas, kemurnian, atau potensi penggunaannya. Kadar etanol biasanya dinyatakan dalam bentuk persentase volume (volume/volume atau %v/v), yang menunjukkan jumlah etanol dalam setiap 100 unit volume larutan (Rivki *et al.*, 2014).

2.7.2 Kadar Metanol

Ada hasil analisis kadar metanol dengan menggunakan kromatografi gas hasil akan terlihat dengan hasil waktu retensi kurang lebih di bawah waktu 1 menit. Kadar metanol juga dinyatakan dalam persentase yang sama dengan kadar etanol, yang membedakan hanya kadar pada metanol dengan menggunakan kromatografi gas yaitu sebesar 0,1% dalam sampel yang sama untuk pengukurannya (Dias *et al.*, 2020).

Kadar metanol mengacu pada konsentrasi atau jumlah metanol (CH_3OH) yang terdapat dalam suatu larutan atau campuran, biasanya dinyatakan dalam bentuk persentase volume (% v/v) atau dalam satuan lain seperti ppm (parts per million). Metanol adalah alkohol sederhana yang beracun dan mudah terbakar, sering digunakan dalam berbagai industri, tetapi keberadaannya dalam produk konsumsi, seperti minuman beralkohol atau bioetanol, harus dikendalikan dengan sangat ketat karena sifatnya yang berbahaya. Kadar metanol diukur untuk memastikan bahwa konsentrasinya berada di bawah ambang batas yang aman, terutama dalam produk yang mungkin dikonsumsi oleh manusia atau digunakan sebagai bahan bakar (Dewi, 2018).

2.8 Kadar Air

Kadar air adalah persentase atau jumlah air yang terkandung dalam suatu bahan atau produk, biasanya dinyatakan sebagai persentase massa (% w/w) atau persentase volume (% v/v). Kadar air merupakan parameter penting yang mempengaruhi sifat fisik, kualitas, dan stabilitas banyak produk, termasuk makanan, bahan kimia, bahan bakar, dan produk farmasi. Dalam bahan bakar seperti bioetanol, kadar air yang tinggi dapat mengurangi efisiensi pembakaran dan menyebabkan masalah korosi pada mesin. Oleh karena itu, kadar air yang rendah sangat diinginkan (Prasetyo *et al.*, 2019).

Kadar air dalam bioetanol dapat mempengaruhi dalam kemudahan bahan bakar untuk menyala, kecepatan proses pembakaran dan kecepatan penjalaran api, jika kadar air dalam bioetanol tidak sesuai dengan nilai syarat mutu bioetanol, maka bioetanol gagal pengujian (Muhaji, 2021). Nilai syarat mutu kadar air dalam SNI 7390:2022 adalah 0,3 %-v, maks. Pengukuran uji dapat dilakukan dengan menghitung berat awal hasil fermentasi dikurangi berat akhir setelah didestilasi dibagi dengan berat awal (Sulaiman, 2021).