



Hidrolisis asam dan enzimatis pati ubi jalar (*Ipomoea batatas*) menjadi glukosa sebagai substrat fermentasi etanol

NASRULLOH, LILY SURAYYA EKA PUTRI[♥], ABDUL HARIS

*Nasrulloh, Putri LSE, Haris A. 2013. Hydrolysis of acid and enzymatic of starch of sweet potato (Ipomoea batatas) becomes glucose as substrate of ethanol fermentation. Bioteknologi 10: 51-59. The necessity of fuel oil in Indonesia was increased, while the energy resources were decreased. This condition made government find the alternative energy environmentally friendly and renewable that can substitute fossil energy. The study about the utility of amylolytic microorganism, especially in mold for acidic and enzymatic hydrolysis on starch of sweet potatoes to become sugar. The acidic hydrolysis used 25 mL HCl 0.5 N and the enzymatic hydrolysis used mold of *Aspergillus flavus*, *A. niger* and the combination of both. The data were analyzed by using One-Way Analysis of Variance. The results showed that the highest rate of sugar reduction by *A. niger* was 12.61% (b/v). The highest ethanol obtained with value of 46.37% (v/v) for 72 hours after fermentation.*

♥ Alamat korespondensi:

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta. Jl. Ir. H. Djuanda No. 95, Ciputat, Tangerang Selatan 15412, Banten, Indonesia. ♥email: lsurayya@yahoo.com

Manuskrip diterima: 16 Juni 2013.
Revisi disetujui: 14 November 2013.

Keywords: Ethanol, fermentation, hydrolysis, *Ipomoea batatas*, starch, sweet potatoes

*Nasrulloh, Putri LSE, Haris A. 2013. Hidrolisis asam dan enzimatis pati ubi jalar (Ipomoea batatas) menjadi glukosa sebagai substrat fermentasi etanol. Bioteknologi 10: 51-59. Kebutuhan bahan bakar minyak di Indonesia semakin meningkat, sedangkan sumber energi justru semakin menurun. Kondisi tersebut membuat pemerintah untuk mencari energi alternatif yang ramah lingkungan dan terbarukan sebagai pengganti energi fosil. Penelitian ini mengkaji tentang kegunaan mikroorganisme amilolitik, khususnya pada cendawan untuk hidrolisis asam dan enzim pada pati ubi jalar menjadi gula reduksi. Hidrolisis asam dilakukan dengan menggunakan 25 mL HCl 0,5 N dan hidrolisis enzimatis menggunakan cendawan *Aspergillus flavus*, *A. niger*, dan kombinasi keduanya. Data dianalisis dengan menggunakan *One-Way Analysis of Varians*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar gula reduksi tertinggi oleh *A. niger* yaitu sebesar 12,61% (b/v). Etanol tertinggi diperoleh sebesar 46,37% (v/v) pada waktu fermentasi 72 jam.*

Kata kunci: Etanol, fermentasi, hidrolisis, *Ipomoea batatas*, pati, ubi jalar

PENDAHULUAN

Saat ini perkembangan pembangunan terjadi di berbagai bidang, diantaranya bidang transportasi. Kemajuan infrastruktur dan sarana transportasi mendorong konsumsi masyarakat terhadap Bahan Bakar Minyak (BBM) mengalami peningkatan, sedangkan produksi di dalam negeri tidak mencukupi. Menurut Direktur Pemasaran PT. Pertamina (Persero), kapasitas kilang Pertamina hanya sekitar 1,03 juta kiloliter per tahun, sedangkan kebutuhan BBM nasional sekitar 1,4 juta kiloliter per tahun. Kondisi tersebut mengakibatkan pemerintah harus

mengimpor BBM untuk memenuhi kebutuhan (Faisal 2009). Dengan harga minyak dunia yang sangat tinggi, impor BBM sangat menguras devisa negara. Pemerintah terus berupaya mencari solusi untuk meringankan beban tersebut dengan mencari sumber-sumber bahan bakar alternatif nonfosil yang dapat diperbaharui sebagai pengganti BBM. Sumber-sumber BBM alternatif tersebut diharapkan juga dapat mengurangi dampak polusi udara yang diakibatkan adanya penggunaan BBM. Salah satu sumber energi alternatif yang mengarah kepada tujuan tersebut adalah bioetanol (Hadi et al. 2006).

Bioetanol adalah etanol yang dibuat dari biomassa yang mengandung komponen pati atau selulosa melalui proses biologi. Etanol dapat dibuat secara kimiawi melalui proses hidrasi zat etilen, sedangkan secara biologi atau fermentasi yaitu dengan merekayasa produk dari biomassa (tanaman). Biomassa yang dapat digunakan sebagai bahan baku bioetanol antara lain bahan yang mengandung pati, gula, dan selulosa (Prihandana et al. 2007).

Salah satu bahan yang mengandung pati yang cukup potensial untuk pembuatan bioetanol yaitu ubi jalar. Ubi jalar dapat dibudidayakan di berbagai tempat, seperti di dataran rendah dan dataran tinggi. Menurut Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (2008), produktivitas rata-rata ubi jalar nasional sebesar 12 ton/ha (Hasyim dan Yusuf 2008). Selain produktivitasnya yang cukup tinggi, ubi jalar juga mengandung pati (22,4%) yang berpotensi sebagai sumber bahan baku etanol. Hal ini memungkinkan ubi jalar untuk dapat digunakan sebagai bahan baku industri berbasis pati (Damarjati dan Widowati 1994).

Menurut Judoamidjojo (1990), dalam produksi bioetanol, pati harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi molekul-molekul yang sederhana atau monomer-monomer glukosa. Hidrolisis pati dapat dilakukan dengan menggunakan katalisator asam, kombinasi asam dan enzim, serta kombinasi enzim dengan enzim. Hidrolisis dengan katalisator enzim dapat dilakukan dengan memanfaatkan enzim dari mikroorganisme. Enzim dari mikroorganisme lebih banyak digunakan dibandingkan enzim yang berasal dari tanaman atau hewan, karena mikroorganisme dapat berkembang biak dengan cepat, pertumbuhannya relatif mudah diatur, dan enzim dihasilkan dalam jumlah besar sehingga lebih ekonomis apabila digunakan untuk tujuan industri. Selain itu, enzim yang berasal dari mikroorganisme lebih stabil dibandingkan enzim sejenis yang berasal dari tanaman atau hewan, serta produksi enzim mikroorganisme biasanya lebih mudah dengan prosedur yang lebih sederhana dibandingkan enzim dari tanaman atau hewan (Judoamidjojo et al. 1989).

Aspergillus flavus dan *A. niger* merupakan jenis cendawan yang mampu menghidrolisis pati dengan memanfaatkan enzim ekstraseluler yang dihasilkan. Menurut Sani et al. (1992), *A. flavus* merupakan kapang penghasil enzim amilase pada substrat pati ubi kayu. *Aspergillus niger* mampu menghasilkan enzim ekstraseluler

berupa glukoamilase. Enzim tersebut dapat memecah polisakarida seperti pati pada ikatan 1,4 dan 1,6 dengan menghasilkan glukosa (Darwis dan Sukara 1990).

Pada penelitian sebelumnya, hidrolisis pati ubi jalar menjadi gula dapat dilakukan dengan difermentasi menggunakan HCl 0,034 N pada suhu 154°C selama 24 menit (Azhar dan Hamdy 1981 dalam Pambayun 1996). Menurut Yusak (2003), penambahan 25 mL HCl 0,5 N dengan waktu hidrolisis 2 jam memberikan hasil yang terbaik pada pembuatan sirup glukosa dari pati ubi jalar.

Semakin baik hasil hidrolisis diharapkan semakin besar etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi. Dengan demikian, dalam fermentasi perlu diketahui waktu terbaik fermentasi, sehingga etanol yang dihasilkan dapat optimal.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui (i) perbedaan hasil hidrolisis pati menjadi gula pereduksi dengan penambahan HCl 0,5 N, HCl 0,5 N dengan isolat *A. flavus*, HCl 0,5 N dengan isolat *A. niger*, HCl 0,5 N dengan isolat *A. flavus* dan *A. niger*, serta (ii) waktu fermentasi untuk menghasilkan kadar etanol yang optimal.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Juli 2008 hingga Juni 2009 di Laboratorium Proses PPPTMGB (Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi) LEMIGAS Kebayoran Lama, Jakarta Selatan.

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu umbi ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.), khamir *Saccharomyces cerevisiae* BLCC (Biotechnology Lemigas Culture Collection) 0278, kapang *Aspergillus flavus* UICC (University Indonesia Culture Collection) 372 dan *Aspergillus niger* UICC 371, HCl (asam klorida), akuades, medium PDA dan PDB, alkohol, pereaksi Nelson Somogyi, pereaksi Anthrone, dekstrosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amonium sulfat), Na_2CO_3 (natrium karbonat), pepton, kain kasa, dan kertas saring.

Sementara itu, alat yang digunakan meliputi fermentor (erlenmeyer 500 mL), *shaker*, gelas piala, labu ukur, labu didih, gelas ukur, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, pipet volumetrik, termometer, timbangan analitik, pH-meter, oven, penangas air, inkubator, hemasitometer *Neubauer*, spektrofotometer *Genesys 10*,

vakumfest 250 dan 500 mL, vakum RS-8, filter Zneitz, destilator, autoklaf, piknometer, serta seperangkat alat kromatografi gas FID Agilent Technologies 7890A Hewlett Packard.

Cara kerja

Pembuatan media PDA dan PDB

Media PDA dibuat dari umbi kentang yang telah dibersihkan. Umbi kentang ditimbang sebanyak 150 g dan dipotong dadu kemudian direbus dalam 300 mL air. Setelah direbus, air rebusan kentang disaring dan ditambahkan akuades hingga 500 mL. Larutan yang diperoleh kemudian ditambahkan 10 g dekstrosa dan 7,5 g agar, dan dipanaskan hingga homogen. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Adapun pada media PDB tidak ditambahkan agar.

Peremajaan isolat khamir dan kapang

Kultur isolat khamir (*S. cerevisiae*) dan isolat kapang (*A. flavus* dan *A. niger*) masing-masing diambil 1 ose dan diinokulasikan ke media PDA miring. Kultur diinkubasi selama 1 hari untuk khamir dan 7 hari untuk kapang.

Pembuatan inokulum isolat khamir

Kultur stok khamir yang telah diremajakan diisolasi ke media 150 mL PDB dengan mengambil 1 ose. Media tersebut diinkubasi pada suhu ruang dan diagitasi pada kecepatan 120 rpm, untuk pertumbuhan khamir setiap 4 jam sekali dihitung jumlah selnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Perhitungan jumlah koloni khamir dilakukan dengan menggunakan metode cawan hitung. Suspensi sel yang diharapkan yaitu 10^6 sel/mL.

Pembuatan inokulum isolat kapang

Sebanyak 10 mL akuades steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung spora isolat kapang berumur 7 hari yang telah diremajakan. Spora diluruhkan dengan ose dan dihitung jumlahnya dengan menggunakan hemasitometer, suspensi spora yang diharapkan yaitu 10^6 spora/mL.

Jumlah spora = $\frac{\text{Rerata jumlah spora} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{Volume hemasitometer (0,1 mm} \times \text{0,0025 mm}^2)}$

$$\text{Rata-rata jumlah spora} = \frac{R_1 + R_2 + R_3}{3}$$

Keterangan:

0,1 mm = kedalaman kamar hitung

0,0025 mm² = luas kamar hitung

R₁ = jumlah spora hitung 1

R₂ = jumlah spora hitung 2

R₃ = jumlah spora hitung 3

Preparasi media pati ubi jalar

Pati ubi jalar dibuat dari 1000 g umbi yang sudah tua dan dalam kondisi baik. Umbi dibersihkan dan dikupas kulitnya. Umbi ubi jalar kemudian dicuci, dikeringkan, dan diparut atau dihaluskan. Umbi hasil parutan ditambahkan air dengan perbandingan 1:1 (1000 g umbi : 1000 mL akuades), kemudian diremas dan disaring. Larutan hasil penyaringan dibiarkan mengendap dalam wadah selama 24 jam. Air hasil endapan dibuang dan filtrat pati dipanaskan hingga kering di dalam oven.

Hidrolisis pati dengan asam dan enzim

Larutan pati dibuat dengan menimbang 12,5 g pati ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) yang dilarutkan dengan 100 mL akuades, kemudian ditambahkan 0,5 N HCl sebanyak 25 mL (Yusak 2003). Larutan kemudian dihidrolisis pada suhu 115°C selama 1 jam pada tekanan 1 atm. Larutan diangkat, didinginkan, dan dinetralisasi dengan Na₂CO₃ 10%. Kadar gula reduksi dan gula total dianalisis untuk hidrolisis asam.

Dalam hidrolisis dengan enzim, masing-masing larutan hasil hidrolisis asam (± 135 mL) ditambahkan 10% (v/v) isolat *A. flavus*, *A. niger*, dan kombinasi keduanya. Hidrolisis dilakukan pada suhu ruang selama 72 jam dengan agitasi 120 rpm. Larutan hasil hidrolisis dianalisis kadar gula reduksinya. Larutan hidrolisis dengan kadar gula pereduksi tertinggi dianalisis juga kadar gula totalnya.

Penentuan kadar gula pereduksi dengan metode Nelson Somogyi

Larutan standar dibuat dengan menimbang 10 mg glukosa yang dilarutkan dalam 100 mL akuades (100 ppm). Dari larutan glukosa standar tersebut dilakukan 5 pengenceran, sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Lima tabung reaksi disiapkan dan masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar dan disiapkan satu tabung berisi akuades sebagai blanko. Masing-masing tabung ditambahkan 1 mL pereaksi Nelson kemudian semua tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Semua tabung diambil dan didinginkan dalam gelas piala yang berisi air. Tabung yang telah dingin, ditambahkan 1 mL pereaksi Arsenomolybdat dan digojog hingga endapan Cu₂O larut kembali.

Setelah semua endapan Cu_2O larut sempurna, ditambahkan 7 mL akuades dan digojog hingga homogen. Masing-masing larutan dihitung OD (*optical density*) pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar yang dibuat menunjukkan hubungan antara absorban dan konsentrasi glukosa.

Penentuan gula pereduksi pada sampel dilakukan dengan mengambil 1 mL sampel yang telah diencerkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian sampel ditambahkan 1 mL pereaksi Nelson dan diperlakukan seperti pada saat tahap penyiapan kurva standar. Jumlah gula pereduksi dapat ditentukan berdasarkan OD larutan sampel dan kurva standar larutan glukosa (Sudarmadji et al. 1997).

Penentuan gula total berdasarkan Metode Anthrone

Pembuatan kurva standar gula total dilakukan dengan cara menimbang 0,2 g glukosa standar yang dilarutkan dengan akuades hingga volume 100 mL (2000 ppm). Larutan kemudian diencerkan dengan akuades sehingga memiliki konsentrasi 40, 80, 120, 160, dan 200 ppm. Selain itu dibuat juga larutan blanko dari akuades. Masing-masing larutan diambil 1 mL dan ditambahkan 5 mL pereaksi Anthrone, selanjutnya ditutup dan dicampur hingga merata. Larutan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 12 menit. Setelah itu, larutan diangkat dan didinginkan dalam gelas piala yang berisi air. Nilai absorpsi dihitung pada panjang gelombang 630 nm kemudian dibuat hubungan antara absorban dengan konsentrasi glukosa.

Penetapan gula total pada sampel dilakukan dengan mengambil 1 mL sampel yang telah diencerkan ke dalam tabung reaksi dan dilakukan dengan cara yang sama seperti pada pembuatan kurva standar dan ditentukan konsentrasi gula total dalam sampel (Apriyantono 1989).

Fermentasi etanol

Medium fermentasi dengan volume ± 148 mL dan kadar gula pereduksi tertinggi hasil hidrolisis asam dan enzim difiltrasi dan ditambahkan 1% (b/v) pepton dan 4% (b/v) amonium sulfat sebagai nutrisi (Holila 2007). Setelah itu, medium diatur pH-nya menjadi 4,6-4,8, kemudian medium ditambahkan isolat khamir *S. cerevisiae* sebanyak 10% (v/v). Fermentasi pada suhu ruang dilakukn secara anaerob selama 72 jam. Hasil fermentasi selanjutnya dianalisis kadar etanolnya pada jam

ke-24, 48, dan 72 jam untuk masing-masing fermentor yang berbeda.

Distilasi

Larutan hasil fermentasi sebanyak ± 165 mL dimasukkan ke dalam labu didih dan dididihkan pada rentang suhu 78-100°C. Cairan hasil distilasi ditampung dan dianalisis kadar etanolnya dengan metode berat jenis.

Analisis kadar etanol berdasarkan Metode Berat Jenis

Piknometer kosong didinginkan dalam lemari pendingin hingga suhu tera 15°C kemudian ditimbang. Piknometer kosong kemudian diisi dengan akuades, didinginkan pada suhu 15°C, dan ditimbang. Langkah yang sama dilakukan pada sampel dengan mengganti akuades dengan cairan hasil destilasi (Mardoni dan Tjandrawati 2005).

Perhitungan berat jenis etanol ditentukan berdasarkan rumus berikut:

$$\frac{\text{Berat Piknometer Kosong} + \text{Sampel} - \text{Berat Piknometer Kosong}}{\text{Berat Piknometer Kosong} + \text{Akuades} - \text{Berat Piknometer Kosong}}$$

Berat jenis yang terukur selanjutnya dikonversikan pada tabel konversi berat jenis etanol pada suhu 15°C.

Dehidrasi

Dehidrasi dilakukan dengan menambahkan CaO pada destilat etanol (± 20 mL) dengan perbandingan 1:4 (CaO:etanol), kemudian didiamkan selama 24 jam (Prihandana et al. 2007).

Analisis kadar etanol dengan Metode Kromatografi Gas

Kondisi operasi kromatografi gas FID yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut.

Program temperatur kolom. Jenis kolom nonpolar *polydimethylsiloxane*, panjang kolom 150 m, temperatur awal 60°C, waktu penahanan awal 15 menit, laju program 30°C/menit, temperatur akhir 250°C/menit, waktu penahanan akhir 23 menit.

Injektor. Temperatur 300°C, *split rasio* 200:1, ukuran contoh yang diinjeksikan 0,1-0,5 μL .

Detektor. Tipe FID, temperatur 300°C, gas bahan bakar = hidrogen, gas pembakar = udara, gas penambahan = nitrogen, gas pembawa = helium, kecepatan linier rata-rata 21-24 cm/detik.

Larutan standar etanol dibuat dengan cara melarutkan etanol 96% dengan metanol 0,1% dan n-heptan 3,9%. Larutan dibuat sebanyak 1 mL.

Kurva standar dan larutan sampel diinjeksikan ke dalam kolom sebanyak 0,1-0,5 μ L.

Analisis data

Data hasil percobaan hidrolisis pati ubi jalar dianalisis berdasarkan Rancangan Acak Lengkap satu arah dengan satu perlakuan yaitu metode hidrolisis dengan 3 kali ulangan. Rancangan percobaan untuk metode hidrolisis yaitu:

I : hidrolisis menggunakan HCl 0,5 N 25 mL

II : hidrolisis menggunakan HCl 0,5 N 25 mL dengan isolat *A. flavus*

III : hidrolisis menggunakan HCl 0,5 N 25 mL dengan isolat *A. niger*

IV : hidrolisis menggunakan HCl 0,5 N dengan isolat *A. flavus* dan *A. niger*

Nilai signifikansi ditentukan pada taraf 5%. Nilai signifikansi ($P < 0,05$) menunjukkan bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima, atau sebaliknya jika nilai signifikansi ($P > 0,05$) maka H_0 diterima dan H_1 ditolak.

H_0 : Tidak terdapat perbedaan hasil hidrolisis pati menjadi gula pereduksi dengan memanfaatkan enzim dari isolat *A. niger*, *A. flavus*, dan kombinasi keduanya.

H_1 : Terdapat perbedaan hasil hidrolisis pati menjadi gula pereduksi dengan memanfaatkan enzim dari isolat *A. niger*, *A. flavus*, dan kombinasi keduanya.

Pada data hasil fermentasi etanol juga dianalisis berdasarkan Rancangan Acak Lengkap satu arah dengan satu perlakuan yaitu waktu fermentasi (24, 48, dan 72 jam) dengan 3 kali ulangan. Nilai signifikansi ditentukan pada taraf 5%. Nilai signifikansi ($P < 0,05$) menunjukkan bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima, atau sebaliknya jika nilai signifikansi ($P > 0,05$) maka H_0 diterima dan H_1 ditolak.

H_0 : Waktu fermentasi tidak mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan.

H_1 : Waktu fermentasi mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan.

Pada data statistik hasil hidrolisis asam dan enzim serta data hasil fermentasi, apabila terdapat perbedaan nyata maka dilakukan uji lanjut Duncan pada taraf 5% untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pati uji jalar

Pati ubi jalar yang dibuat dari umbi ubi jalar merupakan salah satu substrat yang dapat

digunakan dalam pembuatan etanol selain substrat bergula dan berselulosa. Umbi ubi jalar sebanyak 1000 g dapat menghasilkan pati ± 140 g. Pati yang dihasilkan bertekstur halus dan berwarna putih (Gambar 1).

Pada pembuatan etanol, pati akan dihidrolisis terlebih dahulu diantaranya dengan katalis asam, kombinasi asam dan enzim, serta kombinasi enzim dengan enzim (Judoamidjojo 1990). Hidrolisis pati akan menghasilkan monomer glukosa atau gula pereduksi.

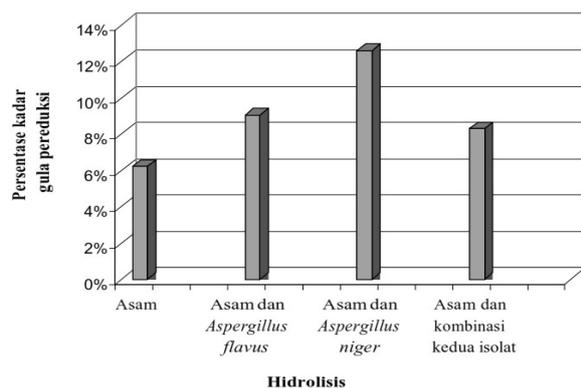
Kadar gula pereduksi dengan Metode Nelson Somogyi

Kadar gula pereduksi hidrolisis asam apabila dibandingkan dengan hidrolisis asam dan enzimatis menunjukkan adanya perbedaan. Kadar gula pereduksi hasil hidrolisis asam dengan menggunakan HCl 0,5 N sebesar 6,20%, sedangkan kadar gula pereduksi hasil hidrolisis asam HCl 0,5 N dan enzimatis dengan menggunakan isolat mengalami peningkatan seperti yang disajikan pada Gambar 2.

Hidrolisis asam terjadi secara acak, sedangkan pada hidrolisis dengan enzim reaksi hidrolisis yang terjadi dapat beragam dengan tingkat konversi yang lebih tinggi dan reaksi yang spesifik (Judoamidjojo et al. 1989). Enzim α -amilase bekerja dengan memutus ikatan karbon α -1,4, sedangkan enzim glukamilase memutus ikatan karbon α -1,4 dan α -1,6 pada titik percabangan. Peningkatan kadar gula pereduksi pada hidrolisis enzim disebabkan oleh adanya proses yang berkelanjutan pemecahan molekul pati oleh enzim amilolitik dari isolat *A. flavus* dan *A. niger*.



Gambar 1. Pati ubi jalar



Gambar 2. Pengaruh hidrolisis dan jenis isolat terhadap kadar gula pereduksi

Kadar gula pereduksi tertinggi pada hidrolisis asam dan enzimatis diperoleh pada hidrolisis enzimatis dengan menggunakan isolat *A. niger* sebesar 12,61%, kemudian *A. flavus* sebesar 9,04% dan kombinasi kedua isolat sebesar 8,30%. Tingginya kadar gula pereduksi yang dihasilkan dengan menggunakan isolat *A. niger* dikarenakan produktivitas enzim ekstraseluler dari isolat tersebut yaitu α -amilase terus mengalami peningkatan selama periode 72 jam pada suhu perlakuan (suhu ruang). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Nandakumar et al. (1994) yang mengemukakan bahwa peningkatan produksi α -amilase dari isolat *A. niger* yang ditanam dari substrat bekatul gandum secara perlahan-lahan terjadi selama periode 72 jam pada suhu ruang.

Selain produktivitas dalam menghasilkan enzim α -amilase yang cukup tinggi, isolat yang digunakan diduga juga mampu menghasilkan enzim amilolitik lainnya, yaitu enzim glukoamilase (Darwis dan Sukara 1990). Enzim mampu memecah polisakarida seperti pati pada ikatan karbon α -1,4 dan α -1,6 dan menghasilkan glukosa. Menurut Astuty (1991), *A. niger* juga menghasilkan enzim pektin depolimerase. Gabungan antara glukoamilase dengan pektin depolimerase mampu menurunkan viskositas pati serta meningkatkan proses sakarifikasi dari pati.

Sinergisme kerja enzim dari isolat *A. niger* mengakibatkan tingginya kadar gula pereduksi hasil hidrolisis asam dan enzim. Sinergisme antara enzim glukoamilase dan pektin depolimerase diduga terjadi juga antara enzim α -amilase dengan glukoamilase yang dihasilkan oleh *A. niger*. Proses sinergisme terjadi mula-mula glukoamilase menghidrolisis bagian permukaan granula, kemudian pada bagian dalam dihidrolisis oleh enzim α -amilase dengan

menghasilkan senyawa oligosakarida dan dekstrin. Dua senyawa tersebut selanjutnya berperan sebagai substrat glukoamilase (Fuji et al. 1988). Sinergisme kerja enzim tersebut diduga hanya terjadi pada mikroorganisme tunggal, sehingga kadar gula pereduksi yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan mikroorganisme kombinasi.

Kadar gula pereduksi hidrolisis asam dan enzimatis terendah diperoleh pada hidrolisis enzimatis dengan kombinasi kedua isolat yaitu sebesar 8,30%. Hal ini terjadi akibat adanya persaingan mendapatkan nutrisi pada kedua isolat untuk tumbuh. Persaingan tersebut mengakibatkan gangguan pada pertumbuhan dan metabolisme isolat, sehingga hasil gula pereduksi dari kombinasi isolat menurun.

Pada hidrolisis asam dan enzimatis dengan isolat *A. flavus*, kadar gula pereduksi yang dihasilkan sebesar 9,04%. Apabila dibandingkan dengan *A. niger*, kadar gula pereduksi yang dihasilkan masih rendah. Hal ini diduga disebabkan oleh kemampuan produksi dan aktivitas enzim α -amilase untuk merombak pati menjadi gula dari isolat *A. flavus* kurang optimal dibandingkan enzim α -amilase dan glukoamilase yang dihasilkan *A. niger*. Aktivitas enzim glukoamilase dari isolat *A. niger* lebih optimal dibandingkan α -amilase dari isolat *A. niger* dikarenakan enzim glukoamilase tidak hanya dapat memutus ikatan α -1,4 tetapi juga memutus ikatan α -1,6 pada titik percabangan pati.

Hasil uji statistik pada perlakuan hidrolisis dengan memanfaatkan asam dan enzim dari isolat yang berbeda menunjukkan nilai signifikansi ($P < 0,05$) atau terdapat perbedaan yang nyata terhadap kadar gula pereduksi yang dihasilkan. Dari hasil uji lanjut Duncan juga diketahui bahwa setiap perlakuan berbeda nyata, dimana perlakuan pada hidrolisis dengan menggunakan isolat *A. niger* menghasilkan nilai tertinggi dibandingkan perlakuan yang lainnya.

Kadar gula total Metode Anthrone

Hidrolisis pati ubi jalar pada penelitian ini meliputi hidrolisis asam dan hidrolisis pati dengan asam dan enzim. Hidrolisis asam berlangsung pada suhu tinggi dan pemberian katalis (asam klorida) dengan konsentrasi rendah yaitu 0,5 N. Asam berperan dalam memecah molekul pati secara acak dan menghasilkan sakarida berantai pendek (Whistler et al. 1982 dalam Ega 2002). Pada hidrolisis asam dan enzim, hasil hidrolisis asam kemudian dihidrolisis

dengan enzim yang berasal dari isolat kapang amilolitik.

Hidrolisis pati ubi jalar dengan menggunakan asam klorida 0,5 N sebanyak 25 mL mampu menghasilkan kadar gula total sebesar 72.027,95 ppm (7,20%). Kadar gula total hasil hidrolisis asam lebih rendah dibandingkan kadar gula total hidrolisis asam dan enzim. Kadar gula total hasil hidrolisis asam dan enzim sebesar 92.523,42 ppm (9,25%).

Peningkatan kadar gula total pada hidrolisis asam dan enzim disebabkan oleh terjadinya proses degradasi berkelanjutan dari molekul pati dengan bantuan enzim yang berasal dari isolat *A. niger*. Enzim amilolitik yang dihasilkan dari isolat *A. niger* yaitu α -amilase dan glukoamilase yang berperan dalam pemecahan molekul pati ubi jalar.

Enzim α -amilase berperan dalam menghidrolisis ikatan α -1,4 secara acak di bagian dalam molekul, baik pada amilosa maupun amilopektin. Hasil hidrolisis α -amilase akan menghasilkan dekstrin, dekstrin selanjutnya dipotong-potong menjadi glukosa, maltosa, maltotriosa, dan ikatan lain yang lebih panjang (Melliawati et al. 2006).

Enzim glukoamilase, atau sering disebut amiloglukosidase atau α -1,4-glukano glukohidrolase, merupakan enzim ekstraseluler yang mampu menghidrolisis ikatan α -1,4 pada rantai amilosa, amilopektin, glikogen, dan pullulan. Enzim glukoamilase juga mampu menguraikan ikatan α -1,6 pada titik percabangan meskipun dengan laju yang lebih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa pati dapat diuraikan secara sempurna menjadi glukosa (Melliawati et al. 2006).

Fermentasi etanol

Fermentasi dilakukan pada kondisi anaerob fakultatif dengan menggunakan khamir *S. cerevisiae* dengan substrat hasil hidrolisis dengan kadar gula pereduksi tertinggi yaitu sebesar 12,61%. Enzim invertase dan zimase yang dihasilkan oleh khamir *S. cerevisiae* akan merubah gula pereduksi menjadi etanol dan karbondioksida melalui jalur *Embden Mayerhof Parnas* (Judoamidjojo 1990). *Saccharomyces cerevisiae* yang diinokulasikan pada medium fermentasi hasil hidrolisis paling optimal dilakukan saat fase log pertumbuhan yaitu jam ke-10 (Gambar 3).

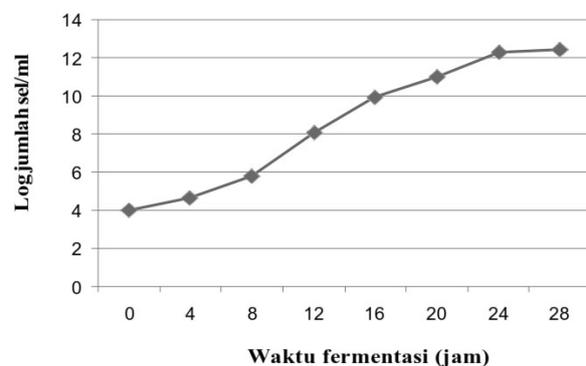
Kadar etanol yang dihasilkan dari fermentasi oleh khamir diukur melalui metode berat jenis

dan juga kromatografi gas untuk mengetahui tingkat kemurniannya.

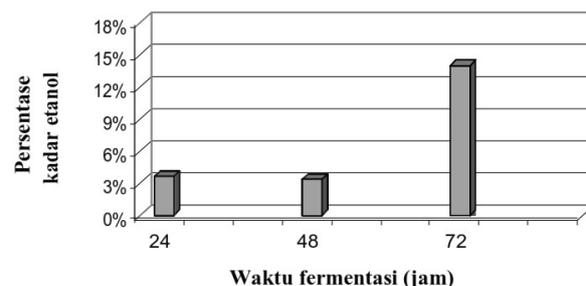
Penentuan kadar etanol dengan Metode Berat Jenis

Medium hasil fermentasi sebanyak ± 165 mL didistilasi pada rentang suhu 78-100°C dan hanya diperoleh 12-25 mL destilat. Dengan demikian, etanol yang dihasilkan hanya sebesar 12,12% dari medium fermentasi. Kadar etanol yang terukur dengan perlakuan waktu fermentasi menunjukkan hasil yang berbeda. Kadar etanol tertinggi diperoleh pada waktu fermentasi 72 jam yaitu sebesar 14% (Gambar 4).

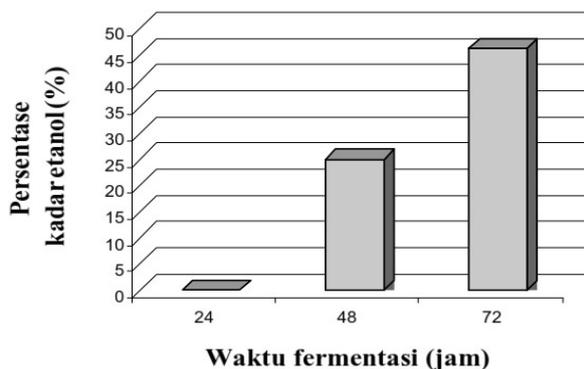
Kadar etanol yang cukup tinggi pada fermentasi selama 72 jam akibat aktivitas khamir *S. cerevisiae* dalam memfermentasi sudah berlangsung sempurna dan baik. Menurut Reed et al. (1982) bahwa kadar etanol yang baik dihasilkan pada waktu fermentasi selama 50-72 jam pada suhu 25-30°C. Kadar gula pereduksi sebesar 12,61% pada fermentasi dan suhu ruang bagi khamir cukup optimal untuk menghasilkan etanol. Menurut Frazier dan Westhoff (1978), kadar gula yang optimum untuk fermentasi berkisar antara 10-18% dengan suhu optimum antara 25-30°C.



Gambar 3. Kurva tumbuh *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 4. Pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar etanol berat jenis



Gambar 5. Pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar etanol kromatografi gas

Kadar etanol terendah diperoleh pada waktu fermentasi 48 jam yaitu sebesar 3,33% dan 24 jam yaitu sebesar 3,66%. Kadar etanol yang diperoleh tergolong rendah, dikarenakan khamir *S. cerevisiae* baru mulai memperbanyak diri dengan memanfaatkan glukosa hasil hidrolisis. Pada waktu fermentasi 48-72 jam, proses pembentukan etanol oleh enzim invertase dan zimase dari *S. cerevisiae* terus mengalami peningkatan. Kondisi tersebut menyebabkan kadar etanol dengan fermentasi selama 72 jam lebih tinggi dibandingkan kadar etanol fermentasi selama 24 dan 48 jam. Menurut Jusfah (1989) bahwa pada awal fermentasi, khamir akan terlebih dahulu memanfaatkan gula untuk tumbuh dan memperbanyak diri. Kadar etanol tertinggi pada waktu fermentasi 72 jam juga diperoleh pada penelitian Mohamad dan Hasan (2008) dengan menggunakan substrat kulit ubi kayu yaitu sebesar 6,33%. Demikian juga halnya dengan penelitian Jusfah (1989) yang memfermentasi batang pisang menjadi etanol, dari penelitian tersebut diperoleh kadar etanol tertinggi pada waktu fermentasi selama 72 jam.

Hasil uji statistik dengan perlakuan waktu fermentasi 24, 48, dan 72 jam menunjukkan nilai signifikansi ($P < 0,05$) atau terdapat perbedaan yang nyata terhadap kadar etanol yang dihasilkan. Pada uji lanjut Duncan diketahui bahwa antar perlakuan berbeda nyata, dimana perlakuan fermentasi selama 72 jam menunjukkan nilai tertinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Penentuan kadar etanol dengan Metode Kromatografi Gas

Etanol yang dihasilkan terlebih dahulu dilakukan proses dehidrasi dengan penambahan kapur tohor. Dari hasil dehidrasi tersebut hanya

dihasilkan 1-2 mL destilat dari ± 60 mL destilat pada setiap perlakuan waktu fermentasi yang berbeda. Hasil analisis etanol dengan metode kromatografi gas menunjukkan perbedaan kadar etanol untuk waktu fermentasi 24, 48, dan 72 jam (Gambar 5).

Kadar etanol yang dihasilkan pada waktu fermentasi 24 jam hanya sebesar 0,08%. Pada waktu fermentasi 48 jam dihasilkan etanol sebesar 25,07% dan fermentasi 72 jam sebesar 46,17%. Kadar etanol yang tinggi pada waktu fermentasi 72 jam diduga disebabkan proses fermentasi sudah berlangsung sempurna, sedangkan waktu fermentasi 24 dan 48 jam belum sempurna, karena pada awal fermentasi tersebut khamir baru mulai memanfaatkan glukosa hasil hidrolisis untuk tumbuh dan memperbanyak diri (Jusfah 1989). Sementara itu, kadar etanol hasil kromatografi gas lebih tinggi dan murni dibandingkan kadar etanol berat jenis, hal ini dikarenakan proses dehidrasi mampu mengikat molekul air.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan hasil hidrolisis pati menjadi gula pereduksi dengan memanfaatkan enzim dari isolat *A. flavus*, *A. niger*, dan kombinasi kedua isolat. Gula pereduksi tertinggi diperoleh pada hidrolisis asam dan enzim dengan isolat *A. niger* yaitu sebesar 12,61%. Waktu fermentasi mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan dengan kadar etanol tertinggi dihasilkan pada fermentasi 72 jam yaitu sebesar 46,17%.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL et al. 1989. Petunjuk laboratorium analisis pangan. Departemen Direktorat Jenderal Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi-IPB, Bogor.
- Astuty ED. 1991. Fermentasi Alkohol Kulit Buah Pisang (*Musa sapientum* Lamb.) dengan Berbagai Jenis Inokulum. [Tesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Damardjati DS, Widowati S. 1994. Pemanfaatan ubi jalar dalam program diversifikasi guna mensukseskan swasembada pangan. Balai Penelitian Tanaman Pangan 3: 1-25.
- Darwis AA, Sukara E. 1990. Isolasi, purifikasi dan karakterisasi enzim. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ega L. 2002. Kajian Sifat Fisik dan Kimia serta Pola Hidrolisis Pati Ubi Jalar Jenis Unggul secara Enzimatis dan Asam. [Tesis]. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Faisal A. 2009. Pertamina Impor 40 Persen Kebutuhan BBM

- Nasional. www.republika.co.id. [18 Agustus 2009].
- Frazier WC, Westhoff WC. 1978. Food microbiology. McGraw Hill, Publishing Co. Ltd., New Delhi, India.
- Fuji M, Homma T, Taniguchi M. 1988. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules. *Biotechnol Bioeng* 32: 910-915.
- Hadi PU, Djulin A, Zakaria AK et al. 2006. Prospek pengembangan sumber energi alternatif (biofuel): Fokus pada jarak pagar. Seminar Hasil Penelitian Tugas Akhir: Pusat Analisis Sosial Ekonomi dan Kebijakan Pertanian Badan penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian, Bogor.
- Hasyim A, Yusuf M. 2008. Diversifikasi produk ubi jalar sebagai bahan pangan substitusi beras. www.litbang.deptan.co.id. [18 Agustus 2009].
- Holila D. 2007. Konversi Pati Ganyong (*Canna edulis* Ker.) Menjadi Bioetanol melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi. [Skripsi]. Program Studi Kimia, Universitas Islam Negeri syarif Hidayatullah Jakarta, Jakarta.
- Judoamidjojo M. 1990. Teknologi fermentasi. IPB-Press, Bogor.
- Judoamidjojo RM, Said EG, Hartanto L. 1989. Biokonversi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi-IPB, Bogor.
- Jusfah J. 1989. Pemanfaatan limbah batang pisang sebagai bahan baku pembuatan alkohol secara fermentasi. Laporan Penelitian Universitas Andalas, Padang.
- Mardoni, Tjandrawati MMY. 2005. Perbandingan metode kromatografi gas dan berat jenis pada penetapan kadar etanol dalam minuman anggur. Laporan Penelitian. Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma.
- Melliawati R, Suherman RS, Subardjo B. 2006. Pengkajian kapang endofit dari Taman Nasional Gunung Halimun sebagai penghasil glucoamilase. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati* 12: 19-25.
- Mohamad E, Hasan H. 2008. Pemanfaatan kulit ubi kayu untuk pembuatan alkohol dengan cara fermentasi. Laporan Penelitian. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo.
- Nandakumar MP, Thakur MS, Raghavarao KSMS et al. 1994. Mechanism of solid particle degradation by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem* 29: 545-551.
- Pambayun R. 1996. Fermentasi Etanol pada Ubi Talas Liar (*Colocasia esculenta* (L) Schott.) tanpa Pemanasan oleh *S. fibuligera* FNCC 3027 & *S. cerevisiae* FNCC 3004. [Tesis]. Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Prihandana R, Noerwijati K, Gamawati P et al. 2007. Bioetanol ubi kayu bahan bakar masa depan. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Reed SI et al. 1982. Preliminary characterization of the transcriptional and translational products of the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle gene CDC28. *Mol Cell Biol* 2(4): 412-425.
- Sani A, Awe FA, Akinyanju JA. 1992. Amylase synthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* grown on cassava peel. *J Ind Microbiol* 10: 55-59.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 1997. Prosedur analisis untuk bahan makanan dan pertanian. Liberty, Yogyakarta.
- Yusak Y. 2003. Pengaruh variasi volume HCl 0,5 N dan waktu hidrolisa terhadap mutu sirup pada pembuatan sirup glukosa dari pati ubi jalar (*Ipomoea batatas* L., *Sin batatas edulis choisy*). *Jurnal Sains Kimia* 7(2): 69-73.