

PEMBUATAN ETANOL DARI LIMBAH KULIT JERUK BALI: HIDROLISIS MENGGUNAKAN SELULASE DAN FERMENTASI DENGAN YEAST

Megawati* dan Ratih Ciptasari

Prodi Teknik Kimia, Fakultas Teknik,
Universitas Negeri Semarang
Fakultas Teknik, Kampus Unnes, Kel. Sekaran, Kec. Gunungpati,
Semarang, Jawa tengah 50229.

*Email penulis: megawati@mail.unnes.ac.id; megawatie@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui proses pembuatan etanol dari limbah kulit jeruk bali, pengaruh penambahan enzim terhadap konsentrasi gula reduksi, dan kadar etanol yang dihasilkan. Pada penelitian ini, selulosa dalam kulit jeruk bali dihidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim selulase dengan variasi penambahan volum enzim, yaitu 3, 5, 7, dan 9 mL. Konsentrasi gula dalam hidrolisat diuji dengan metode titrasi Fehling. Setelah itu, hidrolisat difermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* selama 5 hari. Larutan bioetanol hasil fermentasi dipisahkan dari residunya, kemudian etanol dipisahkan dari larutan dengan distilasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol dapat dihasilkan dari limbah kulit jeruk bali melalui proses hidrolisis, fermentasi, dan distilasi. Semakin banyak katalis enzim yang ditambahkan maka semakin tinggi konsentrasi gula hasil hidrolisis dan semakin besar kadar etanol yang terbentuk sebagai hasil fermentasi. Konsentrasi gula maksimal yang diperoleh sebesar 0,016 mol/L pada variasi penambahan enzim 9 mL dan kadar etanol optimumnya sebesar 40,30%, dengan densitas etanol 0,95 g/mL.

Kata Kunci: etanol, fermentasi dengan yeast, hidrolisis dengan enzim, kulit jeruk

1. PENDAHULUAN

Kebutuhan bahan bakar semakin meningkat seiring dengan peningkatan jumlah populasi dan aktivitas manusia. Pada tahun 2008, tingkat kebutuhan Bahan Bakar Minyak (BBM) di Indonesia mencapai 1,3 juta barrel per hari. Di sisi lain, produksi BBM nasional hanya sebesar 900 ribu barrel per hari. Oleh karena itu dibutuhkan sumber energi alternatif yang bahan dasarnya banyak terdapat di Indonesia dan belum dimanfaatkan (Hambali dkk., 2008). Salah satu alternatif pengganti BBM adalah bioetanol. Bioetanol merupakan etanol yang berasal dari sumber hayati. Bioetanol bersumber dari gula sederhana, amilum dan selulosa (Ardian dkk., 2007).

Jeruk bali merupakan tanaman buah yang mengandung banyak komponen nutrisi yang terkandung di dalamnya. Sebagian besar komponen jeruk bali terletak pada kulitnya, di antaranya terdapat senyawa alkaloid, flavonoid, likopen, vitamin C, serta yang paling dominan adalah pektin dan tanin. Selama ini hampir 50% kulit jeruk bali belum sepenuhnya dimanfaatkan (Menteri Pertanian RI, 2010). Selain kandungan tersebut kulit jeruk juga mengandung karbohidrat, selulosa, dan glukosa (Poetranto, 2012).

Selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun atas unit β -D-glukopironosa yang terikat satu sama lain dengan ikatan glikosida (Sjostrom, 1981). Melalui proses hidrolisis, selulosa potensial diubah menjadi glukosa yang mempunyai nilai ekonomi tinggi (Kadarisma dkk., 2010). Perubahan selulosa menjadi glukosa merupakan tahap yang strategis karena glukosa dibutuhkan untuk berbagai keperluan. Glukosa dapat difermentasi lebih lanjut menjadi asam organik dan etanol (Shofiyanto, 2008).

Hidrolisis merupakan reaksi kimia yang memecah molekul menjadi dua bagian dengan penambahan molekul air (H_2O), dengan tujuan untuk mengkonversi polisakarida menjadi monomer-monomer sederhana. Proses ini bertujuan memecah ikatan lignin, menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan (Sun and Cheng, 2002). Rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Selain itu, hemiselulosa turut terurai menjadi senyawa gula sederhana: glukosa, galaktosa, manosa, heksosa, pentosa, *xilosa* dan arabinosa (Mosier, 2005).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis, salah satunya adalah konsentrasi katalis (Joeh, 1998; Groggins, 1998). Enzim merupakan katalis yang dapat digunakan dalam proses

hidrolisis untuk memperbesar kecepatan reaksi. Jadi semakin banyak jumlah katalisator yang dipakai makin cepat reaksi hidrolisis (Riza dan Salimatul, 2009). Pada reaksi enzimatik, semakin banyak enzim yang ditambahkan pada proses hidrolisis maka semakin singkat waktu yang dibutuhkan untuk memperoleh konversi yang sama (Levenspiel, 1972). Berdasarkan masalah tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menghasilkan etanol dari limbah kulit jeruk bali dengan metode hidrolisis enzimatik dan fermentasi.

2. METODE PENELITIAN

1.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit jeruk bali, *yeast*, aquades, urea, NaOH, HCl, sukrosa/gula pasir, monohidrat glukosa, KH_2PO_4 , *Aspergillus niger*, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, indikator universal, kertas saring, fehling A dan B, bubuk agar instan, vitamin B kompleks dan kapas. Pada penelitian ini variabel yang dipelajari adalah volum enzim pada proses hidrolisis.

1.2. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah *oven*, *blender*, spatula, timbangan, ayakan 40 mesh, gelas arloji, *beaker glass* 250 mL, kompor listrik, pengaduk kaca, cawan petri, tabung reaksi dan rak tabung reaksi, kawat, penangas spiritus, inkubator, autoklaf, gelas ukur 10 dan 100 mL, pipet tetes, *shaker*, corong kaca, plastik, karet, *aluminium foil*, erlenmeyer 125 mL, buret 50 mL, statif dan klem, pipet ukur 25 mL, *ball filter*, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, tabung fermentasi/*fermenter*, labu distilasi 250 mL, kondensor *libieg*, seperangkat selang dan pompa, adaptor, termometer 200°C, mortar porselen dan piknometer 2 mL.

1.3. Pelaksanaan Penelitian

Limbah kulit jeruk bali perlu dipersiapkan dengan cara mengeringkannya menggunakan *oven*, menghaluskannya menggunakan *blender*, dan mengayaknya dengan ukuran 40 mesh. *Aspergillus niger* sebelum digunakan dikembangkan terlebih dahulu pada media padat agar dalam tabung reaksi. Pembuatan enzim meliputi 3 tahapan kerja, yaitu menyiapkan inokulum, memproduksi enzim dan pengambilan enzim. Tahap penyiapan inokulum diawali dengan membuat media cair dengan melarutkan sukrosa 12,5% (b/v), urea 0,25% (b/v), dan KH_2PO_4 0,2% (b/v) dalam 100 mL aquades. Mengatur pH hingga 3. Kemudian mengambil biakan *Aspergillus niger* dalam media agar dengan kawat dan mencelupkannya pada media cair hingga tampak keruh. Menutup media cair dengan *aluminium foil* dan menginkubasi pada suhu $\pm 30^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Produksi enzim dimulai dengan mencampurkan 20 g serbuk kulit jeruk bali dengan urea 0,03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g, KH_2PO_4 0,0023 g dan 80 mL aquades. Mengatur pH hingga 5 lalu mensterilkannya dalam autoklaf pada suhu 120°C selama 15 menit. Media didinginkan dan ditambahkan suspensi spora *Aspergillus niger* dalam media cair sebanyak 10 mL. Media diinkubasi pada suhu $\pm 30^\circ\text{C}$ selama 96 jam. Tahap pengambilan enzim dilakukan dengan mengekstrak hasil fermentasi media dengan aquadest sebanyak 100 mL dan di-shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 1 jam. Memisahkan campuran dengan kertas saring. Menyimpan enzim yang diperoleh dalam lemari pendingin.

Hidrolisis kulit jeruk dilakukan dengan mencampurkan 10 g serbuk kulit jeruk bali dengan 100 mL aquades dan mengatur pH sekitar 4-5. Kemudian memanaskan bubur kulit jeruk bali dalam autoklaf pada suhu 100 °C selama 30 menit. Bubur didinginkan dan ditambahkan enzim selulase sebanyak 3, 5, 7 dan 9 mL dan ditutup rapat. Hidrolisis dilakukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 160 rpm selama 9 jam. Konsentrasi gula hasil hidrolisis diukur menggunakan metode fehling dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

Fermentasi gula dalam hidrolisat diawali dengan menambahkan 4 g *yeast* ke dalam bubur kulit jeruk hasil hidrolisis, kemudian mengaduknya sampai homogen. Setelah itu, campuran dimasukkan ke dalam tabung fermentasi. Setelah 5 hari, filtrat dipisahkan dari residunya dengan penyaringan. Untuk memperoleh etanol, filtrat tersebut didistilasi pada suhu 90 °C. Distilat yang diperoleh diukur volum dan densitasnya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pembuatan enzim ada tiga tahap yang dilakukan, yaitu penyiapan inokulum, produksi enzim, dan pengambilan enzim. Tahap awal dalam pembuatan enzim adalah penyiapan inokulum. Dalam tahap ini, inokulum hasil inokulasi disiapkan dalam media cair. Media cair dibuat dengan melarutkan gula pasir, urea, dan KH_2PO_4 . Penambahan gula pasir pada medium cair bertujuan untuk menyuplai karbon dan energi untuk pertumbuhan inokulum, juga sebagai unsur utama dalam pembentukan sel (Safaria dkk., 2013), urea sebagai sumber nitrogen. Pemilihan urea sebagai sumber nitrogen dikarenakan urea merupakan sumber nitrogen yang optimum (Narasimha dkk., 2006). Penambahan KH_2PO_4 bertujuan untuk menyuplai fosfat bagi pertumbuhan mikroorganisme, jika terjadi kontaminan ion logam tertentu, maka dengan adanya fosfat dapat memberikan keuntungan (Gandjar, 2006). Dalam penyiapan inokulum, jamur *Aspergillus niger* hidup dengan nutrisi yang ditambahkan, hal ini di tandai dengan adanya bercak warna hitam di atas permukaan media cair tersebut.

Tahap selanjutnya dalam pembuatan enzim adalah tahap produksi enzim. Produksi enzim selulase merupakan tahap enzim dihasilkan dari proses fermentasi sabut kelapa akibat dari metabolisme *Aspergillus niger* (Safaria dkk., 2013). Dalam tahap ini substrat yang digunakan adalah limbah kulit jeruk bali. Pemilihan substrat kulit jeruk bali dikarenakan agar enzim yang dihasilkan sesuai yang dibutuhkan untuk proses selanjutnya yaitu enzim selulase. *Aspergillus niger* akan menghasilkan enzim yang sesuai dengan kandungan dalam substratnya, kulit jeruk mengandung selulosa sehingga *Aspergillus niger* akan menghasilkan enzim selulase untuk memecah selulosa. Pembuatan enzim dilakukan dengan mencampurkan serbuk kulit jeruk bali dengan urea, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 . Dalam tahap ini urea ditambahkan sebagai sumber nitrogen, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai sumber magnesium yang berfungsi sebagai kofaktor dalam mengatur enzim yang terlibat dalam reaksi (Gandjar, 2006) dan pengendapan senyawa-senyawa kimia yang dapat mengganggu pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* (Taufik, 1992). Kemudian aquades ditambahkan untuk membantu menghomogenkan antara bahan-bahan yang telah dicampurkan sebelumnya. Setelah campuran merata, dilakukan pengaturan pH. Diukur pH awal dan diatur hingga pH 5 untuk *Aspergillus niger* (Harfinda, 2011). pH dalam pertumbuhan fungi sangat penting, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai sesuatu substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu. Umumnya menyenangi pH di bawah 7 (Gandjar, 2006).

Media yang telah memiliki pH 5 kemudian disterilkan untuk menghilangkan kontaminan yang dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger* saat fermentasi. Setelah itu didinginkan dan diinkubasi untuk untuk menstabilkan suhu pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam media. Dalam percobaan, suhu inkubasi adalah 30°C (Seftian dkk., 2012) karena itu merupakan salah satu suhu tumbuh *Aspergillus niger*. Tahap akhir dalam pembuatan enzim adalah pengambilan enzim. Penambahan aquades bertujuan untuk melarutkan enzim yang terdapat dalam media padat. Setelah itu disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan enzim dan residunya.

3.1 Proses Hidrolisis Enzimatis

Proses hidrolisis sudah dilakukan menggunakan katalis berupa enzim yang telah diekstrak dari substrat yang sama dengan bahan yang akan dihidrolisis. Pemilihan enzim sebagai katalis dikarenakan sifat enzim yang memiliki spesifikasi substrat yang tinggi, maksudnya enzim akan menguraikan komponen khusus/komponen yang sesuai dengan fungsi enzim tersebut. Misalnya, enzim selulase menguraikan selulosa menjadi gula sederhana. Selain itu, reaksi menggunakan enzim selulase juga dapat dilakukan pada kondisi yang lunak, yaitu pada tekanan dan temperatur yang rendah (Fowler, 1998).

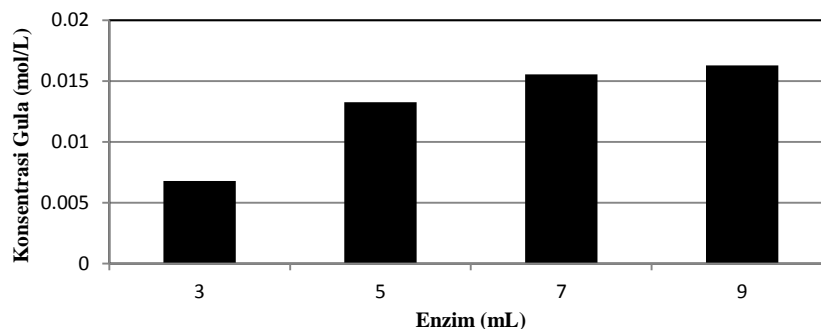
Hidrolisis kulit jeruk bali dilakukan dengan mencampurkan aquades ke dalam serbuk kulit jeruk bali. Bubur yang terbentuk kemudian diatur pH menjadi 5. Tujuan pengaturan pH 5 supaya enzim selulase bekerja optimum, sehingga menghasilkan konsentrasi glukosa tertinggi (Safaria dkk., 2013). Setelah pH bubur 5, selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 100°C selama 30 menit. Bubur steril kemudian didinginkan dan selanjutnya di tambahkan enzim dengan variabel volume yaitu 3, 5, 7, dan 9 mL. Campuran bubur dan enzim di *shaker* untuk membantu meratakan enzim dalam menghidrolisis bubur kulit jeruk bali.

Hasil hidrolisis dihitung konsentrasi gula reduksi dengan menggunakan metode titrasi Fehling. Titrasi Fehling dilakukan dalam keadaan mendidih. Tujuan pemanasan dalam reaksi

adalah agar gugus aldehida pada sampel terbongkar ikatannya dan dapat bereaksi dengan ion OH⁻ dari fehling B membentuk asam karboksilat. Cu₂O (endapan merah bata) yang terbentuk merupakan hasil sampingan dari reaksi pembentukan asam karboksilat (Anonim, 2015). Konsentrasi larutan fehling sebesar 0,01083 M.

3.2 Hubungan Volume Katalis Enzim dengan Konsentrasi Gula yang Dihasilkan

Hasil hidrolisis menunjukkan bahwa konsentrasi gula meningkat karena volum enzim yang ditambahkan semakin banyak. Pada penambahan volum enzim sebanyak 3 sampai 9 mL, konsentrasi gula meningkat dari 0,00678 menjadi 0,0163 mol/L. Masing-masing nilai peningkatan konsentrasi gula disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan volum enzim dengan konsentrasi gula pada hidrolisis kulit jeruk

Pada Gambar 1 terlihat bahwa tampak adanya hubungan antara volum enzim dengan konsentrasi gula, yaitu semakin banyak enzim yang ditambahkan maka semakin tinggi konsentrasi gula yang dihasilkan pada waktu yang sama. Konversi gula yang terbesar yaitu pada konsentrasi 0,0163 mol/L dengan variabel enzim yang ditambahkan 9 mL. Dalam hal ini sesuai dengan percobaan yang dilakukan Firdausi dkk. (2013), bahwa semakin banyak enzim yang ditambahkan maka semakin rendah energi aktivasi, sehingga konversi yang dihasilkan semakin tinggi dalam waktu yang sama.

3.3 Fermentasi dan Distilasi

Fermentasi dilakukan selama 5 hari karena pada percobaan yang dilakukan oleh Seftian dkk. (2012) didapatkan kadar etanol yang optimum. Hidrolisat yang telah difermentasi membentuk 2 lapisan, lapisan atas berwarna coklat dan lapisan dibawahnya berwarna hijau kecoklatan. Hal ini menunjukkan bahwa hidrolisat bagian bawah belum terfermentasi oleh *yeast*. Setelah fermentasi berlangsung selama 5 hari, residu padat dipisahkan dan selanjutnya didistilasi untuk mendapatkan etanolnya. Pemisahan etanol dari campuran dilakukan pada suhu 90°C. Distilat yang diperoleh dari hasil hidrolisis pada menggunakan enzim dengan volum dari 3 sampai 9 mL sebanyak 3,6 meningkat menjadi 4 mL etanol dengan kadarnya yang berbeda-beda. Kadar etanol dihitung menggunakan interpolasi data hubungan densitas dengan kadar etanol (lihat Tabel 1). Adapun nilai masing-masing densitas etanol berturut-turut dari variasi volum enzim 3, 5, 7, dan 9 mL adalah 0,963; 0,955; 0,95; dan 0,95 g/mL. Hasil perhitungan kadar etanol hasil interpolasi data dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 1. Hubungan antara densitas dan kadar etanol

% volum	Densitas (g/mL)
20	0,97518
25	0,97008
30	0,96452
35	0,95821
40	0,95097
45	0,94277

Sumber: <http://prakkimor3a.blogspot.com/2012/09/menentukan-kadar-etanol.html>

Tabel 2. Kadar etanol hasil interpolasi

Variasi enzim (mL)	Densitas (g/mL)	Kadar etanol (%)
3	0,96304	31,173
5	0,95467	37,446
7	0,95048	40,298
9	0,95048	40,298

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian yang telah dilakukan inimenunjukkan bahwa pembuatan etanol dari limbah kulit jeruk dapat dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu hidrolisis enzimatis menggunakan selulase, fermentasi menggunakan *yeast*, dan distilasi. Variasi penambahan volum enzim mempengaruhi konversi gula reduksi yang dihasilkan. Konversi gula reduksi terbesar diperoleh pada penambahan katalis enzim 9 mL, yaitu 0,0163 mol/L. Semakin banyak penambahan volum enzim, konversi gula reduksi semakin meningkat. Konsentrasi gula reduksi berbanding lurus dengan kadar etanol, semakin besar konsentrasi gula reduksi, semakin meningkat kadar etanol yang diperoleh. Etanol yang diperoleh dari hasil distilasi mempunyai kadar 40,3 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, (2015), *Hidrolisa Pati*. <http://matekim.blogspot.com/2010/05/hidrlisa-pati.html>. Diakses pada 28 April 2015 pukul 20.55 WIB.
- Firdausi, N. Z., Nugraha, B. S. dan Hargono, (2013), *Pemanfaatan Pati Singkong Karet (Manihot Glaziovii) Untuk Produksi Bioetanol Fuel Grade Melalui Proses Distilasi-Dehidrasi Menggunakan Zeolit Alam*, Fakultas Teknik, Universitas diponegoro.
- Fowler, M. W., (1988), *Enzyme Technology in Biotechnology For Engineers, Biological System in Technological Processes*, Edited: Scragg, A. H., John Wiley & Sons, New York.
- Gandjar, I., (2006), *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Harfinda, E. M., (2011), *Pengaruh Kadar Air, pH, dan Waktu Fermentasi Terhadap Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus niger ada Ampas Sagu*. Skripsi. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Menteri Pertanian RI, (2010), *Tanaman Jeruk Bali di Indonesia*. Ayunda, Vol 1 No 7:43-36.
- Poetranto, F. H., (2012), *Limbah Kulit Jeruk Manis Sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol*, Skripsi, Universitas Pembangunan Negeri "VETERAN" Jatim, Surabaya.
- Safaria, S., Nora, I. dan Titin, A. Z., (2013), *Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari Aspergillus niger dan Trichoderma Reesei dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa*, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura.
- Seftian, D., Ferdinand, A. dan Faizal, M., (2012), *Pembuatan Etanol dari Kulit Pisang Menggunakan Metode Hidrolisis Enzimatik dan Fermentasi*, Jurnal Teknik Kimia No. 1; Hal 10-16.
- Taufik, E., (1992), *Fermentasi Media Padat Kulit Buah Coklat oleh Aspergillus niger untuk Produksi Pertinase*, Disertasi, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bandung. *Thermomyces Lanuginosus Xylanases*, Helsinki University of Technology, Department of Chemical Technology.