

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM CITRUS FRUIT (*Citrus* sp) WASTE BY ACID HYDROLYSIS AND FERMENTATION USING *Saccharomyces cerevisiae*

Citra Andini¹, Edwi Mahajoen², Ratna Setyaningsih³

^{1,2,3}Departement of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Sebelas Maret University, Surakarta.

ABSTRAK

One of the promising biofuel is bioethanol which can be produced from agricultural waste cellulosic biomass such as citrus fruit waste. Bioethanol can be derived from citrus fruit waste that is rarely used. Cellulose contained in citrus fruit waste can be converted into ethanol through a process of chemical and biological. Sulfuric acid (H_2SO_4) can be used in hydrolysis of cellulose material in citrus fruit waste to produce sugars and batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* can be used to convert sugars into bioethanol. The purpose of this research were to determine the highest reducing sugar from acid hydrolysis with different acid concentration levels of 0, 3, 7, and 10% and to know the highest levels of bioethanol and optimum incubation time. Extracts made from citrus fruit waste without peel. Citrus fruits were hydrolyse using a variation of 1 M H_2SO_4 acid concentration of 0, 3, 7, and 10 % to produce reducing sugars. Reducing sugars were analyzed using the Nelson Somogyi method. The optimum reducing sugar is used for fermentation by yeast *Saccharomyces cerevisiae* using a variation of the long incubation days 0, 2, 4, 6, 8 and bioethanol purified by distillation method. Acid hydrolysis resulted reduction sugar 3,5%, at an optimum concentration of 3% is used for fermentation by yeast *S. cerevisiae*. The highest level of fermentation time of 6 days produced bioethanol having the content 9,75% .

Kata Kunci : *Bioethanol, Citrus Acid Waste, Saccharomyces Cerevisiae, Fermentation* .

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).

Di pasar-pasar tradisional banyak dijumpai sampah-sampah dari sayuran, buah hingga bahan-bahan lain dikarenakan sudah tidak layak jual atau sudah busuk, salah satunya limbah buah jeruk. Selain dari pasar-pasar tradisional, sampah buah jeruk yang timbul akibat gagal panen belum dimanfaatkan sama sekali dikarenakan adanya serangan hama pada wilayah perkebunan jeruk milik petani. Sampah buah jeruk dari pasar buah dicampur dengan sampah organik lain dapat dijadikan kompos. Pembuatan kompos dari sampah jeruk ini kurang efektif, karena sampah jeruk memiliki pH 4, yang menyebabkan bakteri pendegradasi sampah tidak dapat bekerja secara maksimal karena bakteri bekerja optimum pada pH 5,5-8 (Sutanto, 2002).

Selulosa merupakan suatu turunan karbohidrat yang tersusun atas unit-unit glukosa yang dihubungkan dengan ikatan β -1,4-glikosidik. Melalui proses hidrolisis, selulosa potensial diubah menjadi glukosa yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Selulosa yang terdapat pada sari buah jeruk sebesar 0,52 gram per 50 ml. Sedangkan dinding sel buah jeruk mempunyai kandungan selulosa 25-35%, hemiselulosa 50-60%, pektin, protein dan lemak (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. Maka dari itu berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan limbah buah jeruk untuk dikonversi menjadi sumber energi alternatif, yaitu Bioetanol (Shofiyanto, 2008).

Pembuatan bioetanol dari limbah buah jeruk ini melalui dua tahap yaitu proses hidrolisis asam yang kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi. Proses hidrolisis dilakukan untuk mengubah selulosa dari limbah buah jeruk menjadi glukosa. Hidrolisis dengan asam akan memutuskan ikatan



polisakarida dan sekaligus memasukkan elemen H₂O. Fermentasi etanol merupakan proses pembuatan alkohol dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme. Untuk fermentasi etanol skala komersial sebagian besar dilakukan oleh khamir, salah satunya *Saccharomyces cerevisiae* sedangkan skala kecil bisa dilakukan oleh bakteri, salah satunya *Zymomonas mobilis* untuk menghasilkan etanol (Yudoamijoyo dkk., 1992). *S. cerevisiae* mempunyai kelebihan yaitu lebih cepat pertumbuhan selnya dan mudah menguraikan glukosa, fruktosa, dan sukrosa untuk memproduksi etanol tetapi juga memiliki beberapa kekurangan di antaranya adalah tidak tahan dengan suhu tinggi dan etanol yang dihasilkan *Z. mobilis* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan *S. cerevisiae*, diantaranya lebih toleran terhadap suhu, pH rendah, serta tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi (Zhang et al., 2010). Proses fermentasi etanol ini dilakukan secara anaerob, yaitu mengubah glukosa menjadi alkohol tanpa adanya oksigen tetapi dalam pembuatan starter dibutuhkan suasana aerob oksigen diperlukan untuk pembiakan sel (Hikmiyati dkk., 2008).

Berdasar latar belakang yang telah diuraikan di atas penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gula reduksi optimum yang terbentuk dari hasil hidrolisis asam H₂SO₄ 1 M dengan 4 konsentrasi yang berbeda yaitu 0, 3, 7, 10 % kemudian untuk mengetahui lama waktu optimum pada saat inkubasi agar menghasilkan kadar bioetanol yang tinggi serta mengetahui kadar bioetanol yang tinggi pada proses fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan selama 3 bulan yaitu pada bulan November 2012 sampai bulan Januari 2013. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam serta Sub Laboratorium Biologi UPT Laboratorium Pusat Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, haemocytometer improve neubauer, seperangkat alat hidrolisis, alat fermentasi, dan alat untuk destilasi. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Limbah buah jeruk dari Pasar Gede Surakarta, Asam H₂SO₄ 1M, Aquades, Reagen Nelson-somogyi, Reagen Arsenomolybdat, media Yeast Extract Potato Dextrose Broth (YEPDB), media Yeast Extract Potato Dextrose Agar (YEPDA), khamir *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 7,75 x 10⁷ per ml.

Adapun cara kerja adalah sebagai berikut

1. Persiapan Bahan Baku

Sampel limbah buah jeruk dikupas tanpa kulit kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan dari kotoran, kemudian ditimbang dan ditambahkan aquades dengan perbandingan aquades: limbah buah jeruk (3 : 1) v/v, dihaluskan dengan diblender, dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL (Zhang., 2010). Selanjutnya ekstrak limbah buah jeruk digunakan untuk proses hidrolisis.

2. Proses Hidrolisis Asam

Ekstrak limbah buah jeruk diambil dan katalis asam sesuai variabel yang dilakukan yaitu H₂SO₄ 1 M ditambahkan dengan perbandingan volume 0%, 3%, 7%, 10%. v/v hingga total larutan. Kemudian ekstrak limbah buah jeruk yang sudah dicampur dengan H₂SO₄ dimasukkan ke dalam labu hidrolisis dan hidrolisis dilakukan dengan suhu 100 oC selama 4 jam. Setelah itu larutan hasil hidrolisis disaring dan filtrat diambil untuk dianalisis kadar glukosanya dengan metode Nelson- somogyi.

3. Proses Fermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae*

Substrat diambil dari proses hidrolisis sebanyak 500 ml dan ditambahkan NaOH 1 N dan diukur pHnya. Kemudian substrat disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan hingga suhu ruang. Kemudian khamir *Saccharomyces cerevisiae* dimasukkan. Botol fermentasi ditutup hingga rapat dan gas dialirkan ke dalam botol lain yang berisi air. Fermentasi sesuai dengan variabel waktu fermentasi yaitu 0, 2, 4, 6, dan 8 hari dengan suhu fermentasi 30°C. Substrat disaring dan diambil untuk proses destilasi.

4. Proses Destilasi

Hasil proses fermentasi dipisahkan dengan cara disaring dan dimasukkan ke dalam labu dasar bulat kemudian didestilasi selama ± 5 jam (Ardi, 2009). Etanol yang disaring masih



bercampur air. Campuran air dan etanol dipanaskan pada suhu 78oC atau setara titik didih etanol. Pada suhu itu etanol lebih dahulu menguap dan dialirkan melalui pipa yang terendam air sehingga terkondensasi dan kembali menjadi etanol cair dan diukur.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) untuk mengetahui beda nyata di antara perlakuan yaitu gula reduksi yang paling optimum pada saat hidrolisis dan untuk mengetahui lama waktu inkubasi yang optimum pada saat fermentasi. Setelah diketahui beda ada beda nyata kemudian uji lanjut menggunakan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf uji 5 %

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kadar gula reduksi dari substrat limbah buah jeruk (*Citrus sp*) dengan proses hidrolisis menggunakan H_2SO_4

Tabel 1. Kadar Gula Reduksi Pada Perbedaan Konsentrasi Asam H_2SO_4 1M

Konsentrasi Asam H_2SO_4 1 M (%)	Konsentrasi gula reduksi (%)
0	2,25 ^a
3	3,50 ^b
7	4,00 ^b
10	3,00 ^{ab}

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu kolom menyatakan tidak berbeda nyata dengan taraf signifikan 5% ($\alpha = 0,05$).

Pada pengolahan data statistik analisis varian (ANOVA) dan Duncan's Multiple Range test, analisis menunjukkan tidak ada beda nyata yang signifikan antara kadar gula reduksi pada konsentrasi asam 3% dan 7% karena toleransi pemberian konsentrasi asam H_2SO_4 1M terhadap perlakuan tidak banyak. Berdasarkan hasil statistik dengan taraf signifikan 5% pada pemberian asam H_2SO_4 1M 3 dan 7 % tidak beda nyata kadarnya sebesar 3,5 % dan 4 % . Sesuai dengan hipotesis bahwa limbah buah jeruk dihidrolisis dengan asam H_2SO_4 1M dapat menghasilkan kadar gula reduksi yang optimum pada konsentrasi asam yang rendah yaitu 3% .

Pada penelitian ini kadar gula reduksi yang optimum yaitu dari proses hidrolisis menggunakan asam H_2SO_4 1M 3 % sebesar 3,50 % karena hasil gula reduksi paling optimum yang akan dilanjutkan pada proses fermentasi untuk menghasilkan etanol. Pada konsentrasi asam 3% optimum atau dianggap yang terbaik karena pada saat 0% menghasilkan sangat rendah sekali disebabkan substrat buah limbah jeruk tidak dipengaruhi oleh asam sama sekali jadi glukosa yang terbentuk tidak maksimal. Sedangkan untuk konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 10 % terjadi proses pembakaran selulosa disebabkan asam yang terlalu tinggi sehingga selulosa yang diubah menjadi glukosa menjadi sedikit dan pada akhirnya banyak yang membentuk gula non pereduksi lainnya selain itu komponen lain seperti hemiselulosa dan lignin yang masih terdapat pada fraksi selulosa juga ikut terhidrolisis membentuk gula-gula non pereduksi. Asam bersifat tidak spesifik dan memotong secara acak ikatan glikosidik sehingga akan menghasilkan gula yang tidak seragam (monosakarida, disakarida atau oligosakarida). Hal ini sesuai dengan pernyataan Olsson dan Hahn-Hägerdal (1996), bahwa perlakuan asam pada suhu tinggi dan konsentrasi tinggi terhadap bahan lignoselulosik akan



menyebabkan pembentukan dan pelepasan komponennya. Hidrolisis selulosa akan menghasilkan glukosa yang sedikit sedangkan hemiselulosa akan menghasilkan xilosa, manosa, asam asetat, galaktosa dan glukosa. Penggunaan asam H_2SO_4 diencerkan sebesar 1 M ini dikarenakan pada proses hidrolisis akan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan asam pekat pada proses hidrolisis. Kondisi terbaik proses hidrolisis dengan asam H_2SO_4 1 M menghasilkan gula reduksi dengan kadar 3,5 % . Kondisi terbaik ini dipilih untuk proses fermentasi.

B. Produksi Bioetanol dengan fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan Pemurnian dengan Destilasi.

Setelah bioetanol diperoleh dengan cara proses fermentasi menggunakan bahan hayati dan difermentasi dengan menggunakan khamir *S. cerevisiae*. Bioetanol dari penelitian ini menggunakan limbah buah jeruk (*Citrus sp*) difermentasi dengan khamir *S. cerevisiae* dilakukan dalam variasi lama waktu 0, 2, 4, 6, dan 8. Setelah difermentasi etanol dimurnikan dengan metode destilasi. Untuk pengukuran kadar etanol dilakukan dengan metode AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Metode AOAC ini merupakan metode yang menggunakan pengukuran berat jenis dengan alat piknometer.

Sebelum proses fermentasi oleh *S. cerevisiae* pada substrat hasil hidrolisis disesuaikan dahulu pH nya kemudian setelah itu inokulum dimasukkan dalam tabung fermentor yang berisi substrat limbah buah jeruk (*Citrus sp*) hasil hidrolisis. Setelah itu konsentrasi etanol diamati dengan variasi waktu hari ke 0, 2, 4, 6, dan 8. Pada hari ke nol fermentasi langsung diukur kadar etanol untuk hari ke 0 dengan menggunakan metode destilasi. Metode destilasi ini untuk memisahkan etanol berdasar titik didih. Titik didih etanol murni $78^{\circ}C$ dan untuk air $100^{\circ}C$. Pada titik didih tersebut akan terjadi penguapan etanol dan melalui kondensasi akan dihasilkan etanol dengan waktu satu kali uji 2-3 jam. Pengukuran dengan metode destilasi ini dilakukan selanjutnya sampai pengamatan hari ke-8. Setelah itu kadar bioetanol diukur dengan metode pengukuran kadar etanol AOAC (*Association of Official Analytical Chemistry*) dan dianalisis menggunakan Tabel AOAC .

Pada hari ke-0 kadar etanol masih sangat sedikit, yaitu berkisar 0 % karena mikroorganisme belum bekerja secara optimal. Untuk hari ke- 2 dan ke-4 belum memperlihatkan hasil yang baik karena mikroorganisme masih dalam proses adaptasi dan waktu fermentasi belum terlalu lama. Dan yang terakhir pada hari ke-8 hasil kadar etanol menunjukkan penurunan karena mikroorganisme nutrisinya mulai berkurang sehingga tidak bisa bekerja secara optimal lagi (Tabel 2). Setelah dianalisis dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) dilanjutkan uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf uji 5 % terdapat beda nyata pada saat pengukuran dari hari ke 0 sampai hari ke-8.

Tabel 2. Kadar bioetanol setelah proses fermentasi dengan *S. cerevisiae*.

Lama Waktu Fermentasi (Hari)	Kadar Etanol (%)
0	0,00 ^a
2	1,75 ^b
4	3,75 ^c
6	9,75 ^c
8	6,00 ^d

*)analisis statistik menunjukkan berbeda nyata dengan taraf signifikan 5%($\alpha=0,05$).

Hasil etanol tinggi dipengaruhi oleh waktu, yaitu semakin lama waktu fermentasi, maka semakin tinggi kadar etanol yang dihasilkan. Waktu yang terbaik untuk proses fermentasi, yaitu 6 hari, karena lama fermentasi dipengaruhi kerja gula reduksi dengan mikroorganisme yang digunakan bekerja optimal dan suhu fermentasi.



Kadar etanol tertinggi yang dihasilkan dari proses fermentasi substrat limbah buah jeruk (*Citrus* sp) oleh *S. cerevisiae* pada penelitian ini adalah 9,75 %. Kadar etanol yang dihasilkan ini termasuk etanol dalam kadar rendah. Hal ini disebabkan etanol yang dihasilkan dari fermentasi menggunakan khamir *S.cerevisiae* dengan curah (batch) memiliki kadar yang rendah. Menurut Sukandar D (2009), bioetanol hasil fermentasi memiliki kadar yang rendah yaitu sekitar 5-20%. Apabila konsentrasi etanol yang dihasilkan melebihi 15% maka etanol akan merusak dinding sel sehingga mikroorganisme mati. Selain itu *S. cerevisiae* menggunakan jalur EMP (*Embeden Meyerhoff Parnas*) untuk memfermentasi glukosa menjadi etanol pada kondisi netral atau sedikit asam dan anerob. Pada kondisi mikroaerofil, *S. cerevisiae* mampu merespirasi 10% glukosa menjadi CO₂ sehingga fermentasi etanol oleh *S. cerevisiae*, sehingga menghasilkan etanol kurang dari 50% (Purwoko, 2007).

Pada proses fermentasi oleh khamir *S. cerevisiae* atau juga bisa menggunakan bakteri, contohnya *Z. mobilis*, gula akan dikonversi menjadi etanol dan gas karbondioksida, seperti pada penelitian Muslihah (2011). Fermentasi limbah buah jeruk oleh *Z. mobilis* dengan hidrolisis enzim menghasilkan bioetanol akhir dengan kadar 9%, 10%, dan 11,45%. Bioetanol murni yang dihasilkan kurang dari 20% tergolong rendah, karena dari satu molekul glukosa akan terbentuk dua molekul alkohol dan karbondioksida. Jika pada bakteri *Z. mobilis* konsentrasi glukosa yang terlalu tinggi akan menghambat pembentukan alkohol sebab glukosa dengan kadar tinggi menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme terhambat sehingga kadar alkohol yang dihasilkan sedikit.

Faktor keberhasilan fermentasi sangat dipengaruhi oleh interaksi antarsubstrat dengan mikroorganisme. Mikroorganisme membutuhkan energi yang berasal dari nutrisi, mineral, dan zat lain yang terdapat di dalam substrat. Sehingga mikroorganisme harus mampu tumbuh pada substrat dan mudah beradaptasi dengan lingkungan (Rahmawati, 2006). Salah satu faktor yang mempengaruhi hasil etanol adalah kandungan karbohidrat pada substrat. Pada penelitian menggunakan substrat limbah buah jeruk yang mempunyai kadar karbohidrat rata-rata 11,0 mg per 100 gram buah, ini tidak terlalu tinggi karbohidratnya. Hal ini didukung dengan adanya penelitian lain oleh Oyeleke and Jibrin (2009), bahwa volume etanol dari kulit jagung lebih tinggi daripada kulit padi-padian, karena kulit jagung lebih banyak mengandung karbohidrat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa hasil dari hidrolisis H₂SO₄ 1 M 3% terhadap limbah buah jeruk (*Citrus* sp) menghasilkan gula reduksi optimum dengan kadar 3,5% . Setelah dihidrolisis kemudian difermentasi diperoleh hasil kadar etanol tertinggi pada proses fermentasi menggunakan *S. cerevisiae*, yaitu 9,75% dengan lama inkubasi optimum selama 6 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis of The Association of Agriculture Chemist A.O.A.C*, Washington D.C.
- Ardi, W.R. 2009. *Pemurnian Etanol dari fermentasi tape ubi kayu (manihot utilissima) (kajian suhu dan lama waktu destilasi)*. Skripsi. Universitas Brawijaya Malang. Fakultas Teknologi Pertanian Malang, Malang.
- Hambali, E., S. Mjadalipah, A.H. Tambunan, A.W. Pattiwiri, dan Hendroko.2007. *Teknologi Bioenergi*. Agromedia Jakarta.
- Hikmiyati, N.dan Sandrie N.Y , 2008. *Pembuatan Bioetanol Dari Limbah Kulit Singkong Melalui Proses Hidrolisis Asam Dan Enzimatis*. Jurnal Jurusan Teknik Kimia. Univeristas Diponegoro, Semarang.
- Muslihah S. 2011. *Pengaruh pH kdan konsentrasi Zymomonas mobilis untuk produksi etanol dari sampah buah jeruk*. Jurnal teknik lingkungan. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya
- Olsson L., dan Hahn-Hagerdal B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 312-331.



- Oyeleke, S.B. and N.M. Jibrin, 2009. Production of bioethanol from guinea corn husk and millet husk. *African Journal of Microbiology*, 3(4): 147-152.
- Purwoko, Tjahjadi. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Rahmawati, D. 2006. *Uji Kemampuan Fermentasi Star Haploid (Saccharomyces cerevisiae) Hasil rekayasa pada Cairan Buah Belimbing Manis (Averhoa carambola)*. Skripsi. FKIP Biologi UNS, Surakarta.
- Shofiyanto, M.E. 2008. *Hidrolisis Tongkol Jagung oleh Bakteri Selulolitik untuk produksi Bioetanol dalam Kultur Campuran*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Bogor.
- Sukandar D, 2008. Konversi Pati Ganyong (Canna edulis) Menjadi Bioetanol Melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi. *Jurnal Biodiversitas*, 9(1).
- Sutanto, R., 2002. *Pertanian Organik: Menuju pertanian efektif dan Berkelanjutan*. Yogyakarta.
- Yudoamidjojo, M., A.A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Edisi 1 cetakan 1. Rajawali Press, Jakarta.
- Zhang et al. 2010. Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. *African J Biotech* 9(28):4504-4509.

DISKUSI

Penanya 1: Ahmad Najib

Pertanyaan :

Mengapa yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah buah jeruk? Mengapa bukan kulit jeruknya saja?

Jawaban:

Limbah buah jeruk lebih mudah didapatkan dari pasar atau industri, dan lebih mudah menggunakan limbah buah jeruk daripada kulitnya.

