

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI**

#### **A. Tinjauan Pustaka**

Bioetanol merupakan salah satu jenis *biofuel* yang berasal dari biomassa yang mengandung gula, pati, dan selulosa. Namun, saat ini masih banyak produsen yang menggunakan bahan baku yang mengandung gula dan pati yang bersumber dari bahan pangan dan hal ini akan berdampak negatif bagi penyediaan kebutuhan pangan. Untuk menghindari hal tersebut, maka perlu dicari bahan baku yang berasal dari limbah agroindustri yang mengandung selulosa (Gomez dan Kwanchai, 1995). Penelitian bioetanol yang berasal dari bahan baku berselulosa telah banyak dilakukan, salah satunya dilakukan oleh Novia dkk. (2014) dimana jerami padi yang mempunyai kandungan selulosa 39% menghasilkan bioetanol 5,7%.

Bahan baku lain yang memiliki kandungan selulosa adalah kulit durian. Menurut Jana L. dkk. (2010), kulit durian mempunyai kandungan selulosa 60,45%; hemiselulosa 13,09%, lignin 15,45%, dan abu 4,35%. Bahan pembuatan bioetanol dari bahan yang mengandung lignin membutuhkan proses delignifikasi. Penelitian yang dilakukan oleh Dwi Ana dkk. (2015) menunjukkan kulit durian yang didelegnifikasi akan meningkatkan kadar selulosanya dari 27,5% menjadi 69,5% dan nantinya akan berpengaruh terhadap proses hidrolisis dan fermentasi.

Pembuatan bioetanol dilakukan melalui proses hidrolisis dan fermentasi. Metode yang dapat digunakan untuk pembuatan bioetanol diantaranya metode *separated hydrolysis and fermentation* (SHF) dan hidrolisis dan fermentasi serentak

(HSF). Dalam metode SHF proses hidrolisis dan fermentasinya dilakukan secara terpisah sehingga setiap prosesnya akan mendapatkan kondisi optimum (Hgren dkk, 2007). Namun, menurut Dahnum dkk. (2015), metode ini memiliki kelemahan seperti penggunaan dua wadah yang berbeda, waktu proses yang lebih lama, perlunya netralisasi jika menggunakan asam untuk hidrolisis, dan laju produksi yang rendah. Metode HFS hadir untuk mengatasi kelemahan teknologi sebelumnya (SHF) yaitu dengan menggabungkan proses hidrolisis dan fermentasi secara serentak menggunakan campuran enzim dan jamur. Keuntungan metode HFS adalah proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan dalam satu wadah sehingga dapat berlangsung secara efisien. Proses hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh *yeast* (Samsuri dkk., 2007). Penelitian Deliana dkk. (2014) menghasilkan kadar 4,74% bioetanol dengan metode SHF dan 6,05% bioetanol dengan metode HFS. Dari penelitian ini metode HFS lebih baik dari pada metode SHF.

Pembuatan bioetanol membutuhkan enzim agar menghasilkan produk yang diinginkan (Song dkk., 2018). *Trichoderma viride* merupakan kapang yang dapat memproduksi enzim selulase (Enari, 1983). Enzim selulase yang dihasilkan merupakan enzim yang paling efisien untuk hidrolisis secara sempurna selulosa menjadi komponen gula monomer yang merupakan gula fermentasi (Mood dkk., 2013). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang sangat potensial untuk fermentasi etanol karena memiliki daya konversi menjadi etanol sangat tinggi, metabolismenya sudah diketahui, metabolit utama berupa etanol, karbondioksida, dan air serta sedikit menghasilkan metabolit lainnya (Kristina, 2012). Penelitian

milik Azis dan Selvina (2018) membuat bioetanol menggunakan limbah alginat yang menggunakan jamur *Tricoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode SSF menghasilkan kadar etanol sebesar 5,13% dengan waktu optimal tiga hari dan pH optimal 4,2.

Berdasarkan berbagai uraian di atas, keterbaruan penelitian ini adalah bahan dasar pembuatan bioetanol menggunakan kulit durian. Metode yang digunakan adalah hidrolisis dan fermentasi serentak (HFS). Pemisahan etanol dan air dilakukan dengan destilasi sederhana dan penentuan kadar bioetanol menggunakan alat kromatografi gas.

## **B. Landasan Teori**

### **1. Buah Durian**

Buah durian (*Durio zibethinus* Murr.) merupakan buah tropis yang banyak tumbuh di Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, dan Thailand. Ciri-ciri buahnya, bentuknya bulat atau oval dengan aroma rasa, baunya khas dan banyak disukai masyarakat Indonesia (Violet Hatta, 2007). Buah durian merupakan buah asli Indonesia yang menempati urutan ke-4 buah nasional dengan produksi tidak merata sepanjang tahun (Chaerul Novita, 2013). Berikut adalah taksonomi tanaman durian (Mr. Alfredo T. Corpuz dkk., 2007):

Kingdom: *Plantae*

Subkingdom: *Tracheobionta*

Divisio: *Magnoliophyta*

Class: *Magnoliopsida*

Subclass: *Dilleniidae*

Ordo: *Malvales*

Famili: *Bombacaceae*

Genus: *Durio*

Spesies: *Durio zibethinus* Murr.)

Berdasarkan data BPS (2020), produksi buah durian nasional pada tahun 2020 mencapai 1,13 juta ton. Menurut Widhi dan Minarni (2010), kandungan daging buah durian yaitu hanya 20-35%, sedangkan bijinya 5-15%, dan sisanya berupa kulit 60-75%. Dari literatur, dapat dihitung jumlah kulit durian yang diproduksi pada 2020 yaitu sebesar 678-848 ribu ton. Untuk itu dibutuhkan pemikiran lebih lanjut untuk mengatasi limbah kulit durian yang tinggi dengan meningkatkan nilai tambah bagi limbah kulit durian sehingga dapat termanfaatkan (Wahyono, 2009).

## 2. Bioetanol

Bioetanol merupakan etanol yang dibuat dengan cara fermentasi biomassa yang memiliki kandungan gula, pati, dan tanaman berselulosa (Voulda D. Loupatty, 2014). Etanol memiliki rumus kimia  $C_2H_5OH$  dan termasuk dalam kelompok alkohol dan banyak digunakan untuk berbagai keperluan. Pada umumnya etanol diproduksi melalui proses fermentasi dengan bantuan mikroorganisme (Samsuri dkk., 2007).

Bioetanol digunakan sebagai pengganti BBM tergantung dari tingkat kemurniannya. Bioetanol dengan tingkat kemurnian 95-99% dapat menggantikan bensin, dan bioetanol dengan tingkat kemurnian 40% dapat menggantikan minyak tanah (Rahmawati, 2010). Menurut Karisma (2015), alasan digunakan bioetanol sebagai bahan bakar karena menghasilkan gas  $CO_2$  13% lebih rendah dibandingkan

premium dan menurunkan kadar emisi gas rumah kaca sampai 80% dari hasil pembakarannya.

### 3. Delignifikasi

Pada pembuatan bioetanol bahan yang memiliki kandungan lignin perlu dilakukan *pretreatment* (delignifikasi), yaitu menghilangkan kandungan lignin untuk diperoleh gula sederhana (Perdana, 2011). Delignifikasi bertujuan membuka kristalin selulosa agar lebih mudah dihidrolisis dengan enzim yang memecah polimer polisakarida dan monomer gula serta menghilangkan kandungan ligninnya. Delignifikasi juga dilakukan untuk meningkatkan jumlah dan kecepatan hidrolisis selulosa (Gayang, 2013).

Delignifikasi dapat dilakukan dengan natrium hidroksida (NaOH). Kelebihan menggunakan NaOH adalah ion  $\text{OH}^-$  dalam NaOH akan memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion  $\text{Na}^+$  akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Garam fenolat bersifat mudah larut dalam pelarut polar, hal ini ditandai dengan warna hitam pada larutan yang disebut lindi hitam (Maswati B. dkk., 2016).

Lignin adalah senyawa kompleks yang tersusun dari unit fenilpropana yang terikat di dalam struktur tiga dimensi dan merupakan material paling kuat di dalam lignoselulosa. Lignin mengandung karbon yang relatif tinggi sehingga kuat terhadap degradasi, oleh karena itu lignin harus dipecah agar selulosa dan hemiselulosa dapat dihidrolisis (Maswati B. dkk., 2016).

Selulosa merupakan salah satu komponen utama dari lignoselulosa yang terdiri dari unit monomer D-glukosa yang terikat pada ikatan 1,4-glikosidik

(Anindyawati, 2009). Selulosa adalah zat penyusun tanaman yang terdapat pada sel. Kadar selulosa dan hemiselulosa pada tanaman pakan yang muda mencapai 40% dan apabila tanaman makin tua proporsi selulosa dan hemiselulosa makin bertambah (Tillman dkk., 1989).

Hemiselulosa merupakan kelompok polisakarida dengan berat molekul rendah. Jumlah hemiselulosa biasanya antara 15-30% dari berat kering bahan lignoselulosa. Hemiselulosa mengikat serat selulosa membentuk mikrofibril serta berikatan silang dengan lignin membentuk jaringan kompleks dan memberikan struktur yang kuat (Suparjo, 2008). Jaringan kompleks tersebut adalah lignoselulosa.

#### 4. Enzim Selulase

Produk bioteknologi yang menarik perhatian karena peranannya dalam berbagai bidang, terutama bidang industri adalah enzim. Salah satu enzim yang berpotensi adalah selulase. Enzim selulase dapat diaplikasikan dalam industri tekstil, detergen, kertas, makanan, dan berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia (Maria Bintang, 2010).

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang memiliki beberapa kelebihan, diantaranya mampu menghidrolisis substrat-substrat bermassa molekul tinggi, relatif stabil, rendemen yang dihasilkan tinggi, dan lebih mudah dipanen. Enzim selulase akan dilepaskan oleh sel pada media tumbuh, sebagai respon adanya substrat selulosa pada medianya (Laila Karmila, 2003). Enzim selulase bekerja spesifik untuk mengubah selulosa menjadi glukosa dimana prosesnya melalui tiga tahap. Tahap pertama enzim endoselulase memecah ikatan kristal selulosa yang



semula berikatan silang menjadi ikatan rantai lurus. Tahap kedua yaitu enzim eksoselulase yang memecah selulosa berantai lurus menjadi selobiosa yaitu senyawa yang terdiri dari dua molekul glukosa. Tahap terakhir yaitu enzim selobiose yang mengubah selobiosa menjadi molekul-molekul glukosa (T. Handoko dkk., 2012).

Produksi enzim selulase yang dikomersialkan menggunakan kapang atau bakteri. Kapang yang menghasilkan enzim selulase adalah *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, dan lain sebagainya, sedangkan bakteri yang menghasilkan enzim selulase adalah *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, dan *Bacillus* (Karisma, 2015). Salah satu kapang yang cukup baik untuk memproduksi enzim selulase adalah *Trichoderma viride*.

*Trichoderma viride* adalah kapang berfilamen yang dikenal sebagai organisme selulolitik dan menghasilkan enzim selulolitik, termasuk enzim endoglukonase, selobiohidrolase, dan  $\beta$ -glukosidase (Daecon, 1997). Kelebihan *Trichoderma viride* selain menghasilkan enzim selulolitik, juga menghasilkan xyloglukanolitik (Tribak dkk, 2002) yang berfungsi mempermudah enzim selulolitik dalam memecah selulosa.

##### 5. Hidrolisis dan fermentasi serentak (HFS)

Proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak sering disebut hidrolisis dan fermentasi serentak (HFS). Proses ini pertama kali dikenalkan oleh Takagi dkk. (1977) yang berhasil mengkombinasikan enzim selulase dan khamir *Saccharomyces cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol secara serentak dalam satu reaktor dan waktu yang bersamaan. Keuntungan

dari proses ini yaitu selulosa yang terkonversi menjadi glukosa tidak kembali menjadi selulosa karena langsung difermentasi menjadi etanol. Selain itu dengan menggunakan satu reaktor akan mengurangi biaya peralatan sehingga prosesnya akan berjalan dengan lebih efisien (Samsuri dkk., 2007).

#### 6. *Saccharomyces cerevisiae*

Salah satu jenis khamir yang biasa dipakai untuk produksi alkohol secara fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir ini merupakan khamir yang paling penting pada proses fermentasi utama dan akhir, karena mampu memfermentasi secara spontan dan memproduksi alkohol dengan konsentrasi tinggi (Rahmawati, 2010). *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim invertase dan zymase yang berperan dalam produksi etanol. Invertase berfungsi memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dan zymase berfungsi memecah glukosa menjadi alkohol dan karbondioksida (Hartono dan H. Paggara, 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* memiliki sifat fermentatif kuat, dapat hidup dalam kondisi aerob dan anaerob, stabil dan seragam serta pertumbuhannya cepat dalam proses fermentasi sehingga proses fermentasi berlangsung secara cepat dan mampu memproduksi etanol dengan jumlah yang banyak (Buckle, 1987). Menurut Sassner dkk. (2008), *Saccharomyces cerevisiae* memerlukan suhu 28-30° C dan pH 4,0-5,5 agar dapat tumbuh dengan baik.

#### 7. Destilasi

Destilasi merupakan cara pemisahan zat cair dari campurannya berdasarkan perbedaan titik didihnya atau kemampuan zat untuk menguap (Kusumo dkk, 2017). Zat cair dipanaskan hingga titik didihnya serta mengalirkan uap ke dalam alat



pendingin (kondensor) dan mengumpulkan hasil pengembunan sebagai destilat atau zat cair hasil destilasi (Arif dkk, 2016). Menurut Fattimura dkk, (2014) destilasi dapat dibedakan menjadi beberapa macam, yaitu:

- a. Destilasi sederhana, proses destilasi berlangsung jika campuran dipanaskan dan sebagian komponen menguap naik dan didinginkan sampai mengembun di dinding kondensor.
  - b. Destilasi fraksional yaitu proses destilasi yang komponen-komponennya secara bertingkat diuapkan dan diembunkan
  - c. Destilasi vakum merupakan destilasi yang dilakukan dengan cara cairan diuapkan pada tekanan rendah.
  - d. Destilasi uap, destilasi ini dilakukan untuk memisahkan komponen campuran pada temperatur lebih rendah dari titik didih normalnya.
  - e. Destilasi azeotrop, yaitu destilasi dengan menguapkan zat cair tanpa perubahan komposisi.
  - f. Destilasi ekstraktif, destilasi ini mirip dengan destilasi azeotrop dalam hal penambahan senyawa lain untuk mempermudah proses pemisahan.
8. Kromatografi Gas

Kromatografi adalah suatu tehnik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen dalam fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa gas atau cairan dan fasa diamnya dapat berupa cairan atau padatan. Fasa gerak berupa gas biasa disebut kromatografi gas. Kegunaan dari kromatografi gas untuk mengidentifikasi semua jenis senyawa organik yang mudah menguap dan juga digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu

campuran (McNair dan Miller, 2009). Analisis kuantitatif dengan kromatografi gas menggunakan metode standar internal, hal ini dikarenakan terdapat ketidakpastian yang disebabkan injeksi sampel dan kecepatan aliran. Metode ini seringkali digunakan pada sampel yang tidak sesuai atau tidak mungkin diinjeksi langsung pada kromatografi gas (Hidayat dkk., 2015).

### C. Hipotesis Penelitian

Bioetanol dihasilkan dari proses hidrolisis biomassa yang mengandung pati, gula, dan selulosa menjadi glukosa yang kemudian difermentasi menjadi etanol. Salah satu biomassa yang mengandung selulosa adalah kulit durian (Mulyono dkk., 2011). Menurut Violet Hatta (2007), kulit durian memiliki komposisi selulosa (50-60%), lignin (5%), dan pati (5%). Tahap pembuatan bioetanol melalui tiga tahap utama yaitu delignifikasi, hidrolisis, dan fermentasi. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode HFS (hidrolisis dan fermentasi serentak) yaitu proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak. Menurut Novia dkk. (2014), waktu fermentasi yang lebih lama pada metode SSF dapat meningkatkan kadar bioetanol yang dihasilkan. Lamanya waktu fermentasi menjadikan *yeast Saccharomyces cerevisiae* memaksimalkan pembentukan bioetanol.

**Hipotesis 1: Apabila kulit durian mengandung selulosa, lignin, dan pati maka kulit durian dapat dijadikan bahan dasar pembuatan bioetanol. Hal ini dapat dibuktikan dengan melakukan analisis kualitatif bioetanol yang dihasilkan menggunakan uji kalium dikromat.**

**Hipotesis 2: Apabila waktu fermentasi semakin lama maka kadar bioetanol hasil fermentasi dengan metode SSF akan semakin tinggi. Hal ini dapat dibuktikan dengan melakukan analisis kadar bioetanol yang dihasilkan dengan variasi lama waktu fermentasi.**



## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta untuk proses preparasi dan fermentasi sedangkan untuk proses analisa di UPT Laboratorium Terpadu Universitas Negeri Surakarta Solo. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juli 2022-Desember 2022.

### **B. Alat-alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, blender, kertas pH universal, tabung reaksi, oven, erlenmeyer, seperangkat alat destilasi, kawat ose, bunsen spirtus, gelas beaker, inkubator, kertas saring, neraca analitik, corong, dan kromatografi gas (Thermoscientific Trace 1310).

### **C. Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit durian bagian dalam, kentang, NaOH, etanol 96%, urea, glukosa, akuades, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pa, K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>, HCl 1M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, pepton, buffer sitrat pH 5, isolat murni *Trichoderma viride*, isolat murni *Saccharomyces cerevisiae*, dan *yeast extract*.

### **D. Cara Kerja Penelitian**

#### **1. Preparasi Sampel**

Kulit durian diambil bagian dalamnya dan dibersihkan. Kulit durian yang bersih dipotong-potong, dijemur selama 5 hari, dan dioven pada suhu 60° C selama

4 jam. Kulit durian yang sudah kering diblender hingga halus dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh dan didapatkan serbuk kulit durian (Maswati B. dkk., 2016).

## **2. Delignifikasi**

Serbuk kulit durian direndam dalam NaOH 0,5 N 1/10 (b/v) selama 24 jam, disaring dan dicuci menggunakan akuades sampai pH netral (diuji dengan kertas pH universal) kemudian dikeringkan dalam oven selama 2 jam pada suhu 100° C (Maswati B. dkk., 2016).

## **3. Kultur *Tricoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*.**

Isolat murni *Tricoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* berasal dari Pusat Studi Pangan Dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Kultur *Tricoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* diawali pembuatan media PDA dengan cara merebus dan memotong kentang kemudian air rebusan kentang ditambahkan 1,2 gram glukosa dan 0,55 gram agar lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan didiamkan selama 24 jam dengan posisi miring. Selanjutnya media PDA disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit

## **4. Penyiapan Inokulum dari *Tricoderma viride***

Tahap awal pembuatan inokulum dari *Tricoderma viride* adalah pembuatan media cair, media ini terdiri dari 1 gram glukosa, 0,8813 gram *nutrient broth* (NB), dan ditambahkan akuades sampai 100 mL, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan pH media cair diatur menjadi pH 5 dengan menambahkan HCl 1M. Kawat ose dicelupkan ke dalam etanol 96% lalu dipanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah. Selanjutnya kultur *Tricoderma viride* diambil dengan

menggunakan kawat ose lalu dicelupkan beberapa saat pada media cair sampai tampak keruh. Media cair ditutup dengan kapas dan diletakkan pada *shaker* selama 48 jam dengan kecepatan 130 rpm (Maswati B. dkk., 2016).

## 5. Pembuatan Enzim Selulase

Pembuatan enzim selulase diawali dengan pembuatan media cair yang dimasukkan pada erlenmeyer 250 mL, media ini terdiri dari 0,03 g urea; 0,0023 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,005 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 80 mL akuades; dan 20 g serbuk kulit durian, kemudian pH media cair diatur hingga pH 5 dengan menambahkan HCl 1M, lalu media cair disterilisasi didalam autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Media yang telah disterilkan kemudian didinginkan, kemudian ditambahkan inokulum *Trichoderma viride* sebanyak 10 mL pada media tersebut (Novia dkk., 2014). Media diinkubasi pada suhu kamar selama 8 hari, hal ini mengacu kepada penelitian Wahyuningtyas, P, dkk (2013), bahwa aktivitas optimum enzim selulase dari *Trichoderma viride* diperoleh pada hari ke-8. Selanjutnya proses pemanenan enzim dilakukan dengan sentrifugasi. Enzim di dalam erlenmeyer dicampurkan dengan 100 mL larutan 1% *twenn 80* kemudian disaring menggunakan kertas saring dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit, sehingga diperoleh ekstrak kasar enzim selulase.

## 6. Pembuatan Bioetanol

Tahap awal pembuatan bioetanol adalah persiapan inokulum dari *Saccharomyces cerevisiae* yang diawali pembuatan media inokulumnya. Media sebanyak 1L terdiri dari 10 g glukosa; 1 gram *yeast extract*; 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ; dan akuades yang dimasukkan ke dalam erlenmeyer



500 mL lalu ditambahkan kultur *Saccharomyces cerevisiae* dari media PDA, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam menggunakan inkubator (Firmansyah I., 2009).

Pembuatan bioetanol mengacu pada penelitian Khoirunnisah dkk. (2013) yang diawali pembuatan media cair proses hidrolisis dan fermentasi serentak (HFS), media ini sebanyak 80 mL terdiri dari 2 g serbuk kulit durian; 1 g ekstrak ragi; 2 g pepton; dan buffer sitrat 0,05 M pH 5, lalu disterilisasi pada suhu 121° C selama 20 menit menggunakan autoklaf. Media yang telah steril–didinginkan, kemudian ditambah 20 mL enzim selulase dan 20 mL inokulum *Saccharomyces cerevisiae*, lalu diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37° selama 3, 5, 7, dan 10 hari.

## **7. Pemisahan Bioetanol**

Proses ini mengacu pada penelitian Khoirunnisah dkk. (2013) dimana pemisahan bioetanol menggunakan seperangkat alat destilasi dan penentuan kadar bioetanol menggunakan kromatografi gas. Jenis kromatografi yang digunakan Thermoscientific Trace 1310 Gas Chromatography stationary phase: PEG-20M packed capillary column 0.25 mm x 30 m gas carrier: Nitrogen fuel gas: hidrogen dan air. Proses uji yang dilakukan adalah sampel dalam bentuk cair diinjeksikan ke dalam gas inert sebagai fase gerak atau gas pembawa. Sampel akan melalui kolom kemas atau kapiler sehingga komponen akan dapat dipisahkan berdasarkan kemampuan komponen untuk terdistribusi diantara fase gerak dan diam. Detektor yang digunakan adalah FID (*flame inisation detector*) dengan suhu *detector* 150 °C, suhu *injector* 150 °C dan volume sampel yang diinjeksikan 1 µL hasil kromatogram GC destilat hasil fermentasi glukosa digunakan untuk menghitung kadar bioetanol

yang dihasilkan dari setiap variasi waktu dengan cara membandingkan kromatogram sampel dengan etanol standar.



## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

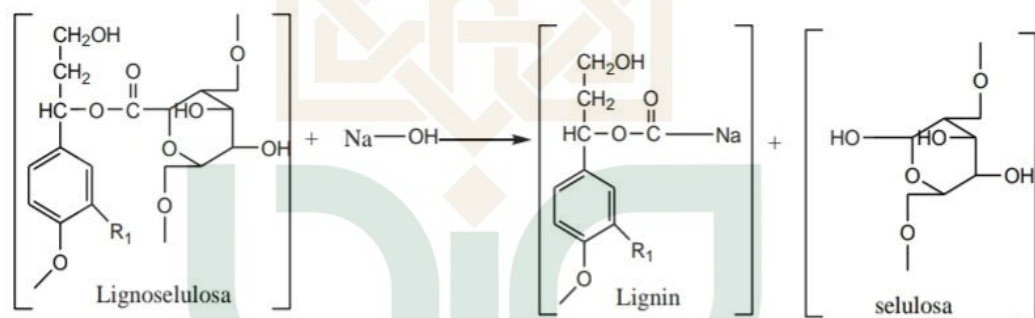
### **A. Preparasi Sampel**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, tahap awal yaitu preparasi bahan berupa kulit durian bagian dalam dengan tujuan agar kulit durian terbebas dari mikroba dan menghilangkan kadar airnya yang ditandai dengan tidak adanya bintik-bintik putih pada kulit durian dan adanya perubahan warna dari putih menjadi putih kecoklatan. Pengambilan kulit durian bagian dalam dikarenakan teksturnya yang lunak dan mudah untuk diolah. Selanjutnya pengovenan untuk mengurangi kadar airnya serta memudahkan proses pengayakan hal ini dikarenakan semakin sedikit kadar air akan memudahkan serbuk kulit durian pada saat diayak. Pengayakan bertujuan menyamakan ukuran dan memudahkan tahap degradasi selulosa menjadi glukosa (Karisma, 2015).

### **B. Delignifikasi**

Delignifikasi merupakan proses menghilangkan lignin pada lignoselulosa yang terkandung dalam serbuk kulit durian dan bertujuan untuk membuka kristalin selulosa agar lebih mudah dihidrolisis serta meningkatkan kecepatan hidrolisisnya (F. Gayang, 2013). Bahan-bahan lignoselulosa pada umumnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin. Adanya senyawa lignin inilah yang menyebabkan bahan-bahan sulit untuk dihidrolisis (Iranmahboob dkk, 2002), sehingga perlu dilakukan delignifikasi. Delignifikasi dilakukan untuk menghilangkan lignin dalam kulit durian sehingga lignin akan keluar menjadi nitrolignin (Effendi dkk, 2018).

Menurut Erningsih dkk (2011), delignifikasi dapat meningkatkan pembentukan gula dengan hidrolisis enzimatik, menghindari degradasi atau hilangnya karbohidrat, menghindari terbentuknya produk samping yang akan mengganggu proses hidrolisis. Mekanisme pemutusan lignin menggunakan NaOH disajikan pada gambar 4.1. Gambar 4.1 menunjukkan reaksi pemisahan lignin dengan bantuan larutan NaOH, yang mana ion  $\text{OH}^-$  dalam NaOH akan memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion  $\text{Na}^+$  akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat.



Gambar 4. 1 Mekanisme pemutusan lignin menggunakan NaOH pada proses delignifikasi. Ion  $\text{OH}^-$  dalam NaOH akan memutuskan ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion  $\text{Na}^+$  akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat.

Delignifikasi menggunakan larutan NaOH 0,5 N dengan perbandingan 1/10 (b/v), diperoleh hasil berupa berkurangnya berat sampel dari 100 gram serbuk kulit durian menjadi 65,34 gram serbuk selulosa dan terjadi perubahan warna menjadi hitam kemerahan yang berarti kandungan lignin yang terdapat pada serbuk kulit durian telah hilang sehingga didapatkan selulosa yang akan digunakan untuk proses hidrolisis dan fermentasi (Novia dkk, 2013). Menurut Julfana dkk (2007), lignin yang terlarut ditandai dengan warna coklat kehitaman pada larutan hal ini

dikarenakan adanya gugus kromofor yaitu, etilena dan karbonil, serta gugus ausokrom yaitu, alkoksil dan hidroksil yang berfungsi meningkatkan intensitas warna. Larutan NaOH digunakan karena dapat merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa manfaatnya yaitu meningkatkan pembentukan glukosa dengan hidrolisis enzimatik (Selviza S. dkk, 2013). Glukosa menjadi bahan utama pembentukan bioetanol sehingga semakin banyak glukosa yang terbentuk akan menghasilkan bioetanol yang maksimum.

Delignifikasi dapat dilakukan menggunakan asam atau basa, namun delignifikasi menggunakan asam memiliki kelemahan yaitu masalah korosif yang ditimbulkan dan dapat meninggalkan masalah pencemaran lingkungan (F. Gayang, 2013). Delignifikasi yang paling banyak digunakan adalah basa seperti NaOH, KOH, dan  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Dari ketiga basa tersebut yang paling baik digunakan adalah NaOH hal ini karena ion  $\text{OH}^-$  dalam NaOH akan memutuskan ikatan dasar struktur lignin dan ion  $\text{Na}^+$  akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat yang mudah larut pada pelarut polar. Lignin yang terlarut ditandai dengan warna hitam (*black liquor*) (B. Maswati dkk, 2016).

### **C. Produksi Enzim**

Pada penelitian ini enzim selulase diproduksi dari kapang *Trichoderma viride*. Pembuatan enzim memerlukan substrat yang mengandung pati dan selulosa salah satunya serbuk kulit durian yang telah didelignifikasi, hal ini didasarkan pada potensi kandungan kimia pada serbuk kulit durian serta aplikasi enzim nantinya sebagai biokatalis pada proses HFS. Pada tahap ini pembuatan enzim diawali dengan pembuatan inokulum *Trichoderma viride* yang telah diinkubasi selama 2

hari. Pembuatan inokulum bertujuan agar fase lag pada pertumbuhan kapang terlewat sehingga kapang melewati fase adaptasi dan dapat tumbuh di media yang baru.

Produksi enzim selulase memerlukan masa inkubasi selama 8 hari, hal ini mengacu pada penelitian Wahyuningtiyas P. dkk (2013), bahwa aktivitas optimum enzim selulase diperoleh pada hari ke-8. Enzim hasil inkubasi kemudian dilarutkan pada larutan *tween 80* untuk pemanenan. Menurut Wahyuningtiyas P. dkk (2013) larutan *tween 80* digunakan untuk mengikat enzim agar memudahkan proses pemanenan serta memisahkan enzim dari substratnya, sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim selulase.

#### **D. Pembuatan Bioetanol**

Pada penelitian ini proses pembuatan bioetanol menggunakan metode hidrolisis dan fermentasi serentak (HFS) yaitu proses hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak. Proses ini diawali dari pembuatan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diinkubasi selama 1 hari. Inokulum bertujuan untuk melewati fase adaptasi pertumbuhan kapang *Saccharomyces cerevisiae* sehingga kapang dapat tumbuh di media baru. Selanjutnya pembuatan media HFS yang sebelumnya telah disterilisasi menggunakan autoklaf agar media steril dari kontaminan, kemudian ditambahkan enzim selulase dan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* untuk memecah selulosa menjadi glukosa.

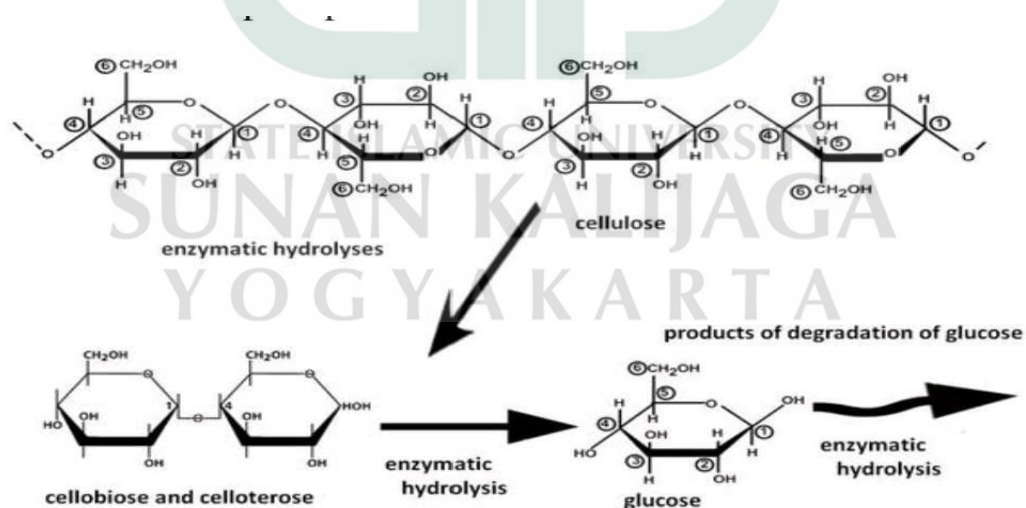
Enzim selulase mengubah selulosa menjadi glukosa melalui tiga tahap. Tahap pertama enzim endoselulase memecah ikatan kristal pada selulosa yang



semula ikatan silang menjadi ikatan rantai lurus. Tahap kedua yaitu enzim selulase tipe-ekso memecah selulosa berantai lurus menjadi selobiosa yaitu senyawa yang mengandung dua molekul glukosa. Terakhir yaitu enzim selobiose yang mengubah selobiosa menjadi glukosa (Kamila L., 2003). Degradasi selulosa menjadi glukosa melibatkan kompleks enzim selulase spesifik, yaitu endo-1,4- $\beta$ -D-glukanase (endoselulase), ekso-1,4- $\beta$ -D-glukanase (selobiohidrolase), dan  $\beta$ -glukosidase (selobiase) (Ikram dkk, 2005). Menurut Lynd dkk (2002), mekanisme pemotongan rantai ikatan oleh enzim selulase sangat kompleks karena melibatkan sinergitas kerja 3 komponen yaitu:

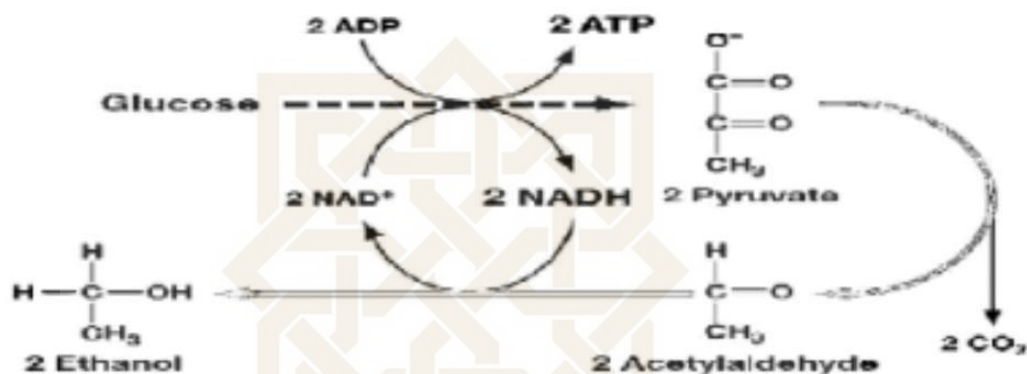
- 1) Enzim endoselulase berperan memecah ikatan 1,4  $\beta$ -glikosida pada selulosa
- 2) Enzim eksoglukanase berperan mengubah selulosa menjadi selobiosa
- 3) Enzim selobiase berperan mengubah selobiosa menjadi glukosa

Mekanisme reaksi selulosa menjadi glukosa dapat dilihat pada gambar 4.2:



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi selulosa menjadi glukosa. Reaksi ini diawali enzim endoselulase berperan memecah ikatan 1,4  $\beta$ -glikosida pada selulosa, dilanjutkan enzim eksoglukanase berperan mengubah selulosa menjadi selobiosa kemudian enzim selobiase berperan mengubah selobiosa menjadi glukosa.

Glukosa yang dihasilkan selanjutnya dipecah menjadi bioetanol dan CO<sub>2</sub> dengan bantuan inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Mekanisme reaksi glukosa menjadi bioetanol dapat dilihat pada gambar 4.3:



Gambar 4. 3 Mekanisme reaksi peerubahan glukosa menjadi bioetanol. Reaksi ini diaawali dengan hidrolisis glukosa menjadi piruvat, dilanjutkan pelepasan karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) membentuk asetaldehid, kemudian diubah menjadi etanol

Glukosa hasil hidrolisis terlebih dahulu menjadi piruvat melalui 10 tahapan glikolisis. Piruvat dengan bantuan enzim piruvat dekarboksilase melepaskan karbondioksida (CO<sub>2</sub>) menghasilkan asetaldehid. Asetaldehid dibantu enzim dehidrogenase diubah menjadi bioetanol.

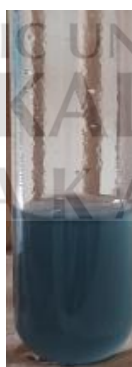
Proses selanjutnya yaitu destilasi yang bertujuan untuk memisahkan bioetanol dari pelarut lainnya. Destilasi yang digunakan yaitu destilasi sederhana. Menurut H. Asri S. (2016), etanol menguap pada suhu 76-82°C, lebih rendah dari titik didih air, sehingga penguapan etanol relatif lebih mudah. Semua hasil fermentasi didestilasi pada suhu 75-82°C selama 1-1,5 jam dan menghasilkan cairan tidak berwarna, jernih dan berbau menyengat.

### E. Analisis Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan untuk memastikan adanya bioetanol dalam sampel. Uji dilakukan dengan mereaksikan  $K_2CrO_4$  dalam tabung reaksi yang ditambahkan  $H_2SO_4$  pekat. Hasil positif ditandai dengan berubahnya warna larutan dari kuning menjadi hijau kebiruan, hal ini karena alkohol teroksidasi menjadi asetaldehid (aldehid) dan  $Cr^{6+}$  yang berwarna kuning tereduksi menjadi  $Cr^{3+}$  yang berwarna biru (Sania dkk, 2015). Reaksi yang terjadi:



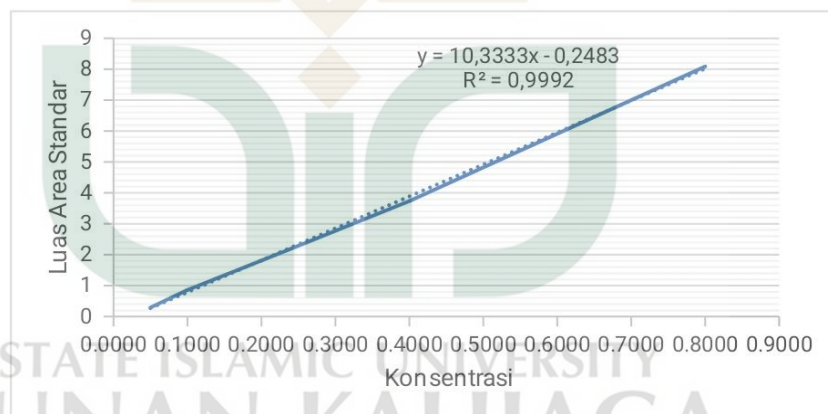
Hasil destilasi diuji menggunakan kalium dikromat untuk mengetahui adanya bioetanol, dengan ditandai dengan perubahan warna dari kuning menjadi biru. Namun, tidak semua variasi hasil fermentasi diuji karena jumlah destilat yang sedikit. Uji kualitatif hanya dilakukan pada destilat hasil fermentasi 3 hari dan hasil warnanya ditunjukkan pada gambar 4. 4, hasilnya berwarna biru yang berarti destilat tersebut positif mengandung bioetanol.



Gambar 4. 4 Uji kalium dikromat dari larutan fermentasi menghasilkan warna biru, hal ini karena alkohol teroksidasi menjadi asetaldehid (aldehid) dan  $Cr^{6+}$  yang berwarna kuning tereduksi menjadi  $Cr^{3+}$  yang berwarna biru. Warna biru menunjukkan adanya etanol pada larutan fermentasi.

## F. Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif bertujuan untuk menentukan kadar (%) bioetanol yang dihasilkan pada setiap variasi masa fermentasi dengan menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Standar etanol yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi mempunyai konsentrasi 0,05%; 0,1%; 0,2 %; 0,4 %; dan 0,8% dimana dari kurva kalibrasi akan didapatkan persamaan regresi yang berguna untuk menentukan kadar bioetanol pada setiap variasi. Kurva kalibrasi yang dihasilkan seperti pada gambar 4. 5 dan dari kurva kalibrasi dihasilkan persamaan regresi  $y = 10,3333x - 0,2483$ .



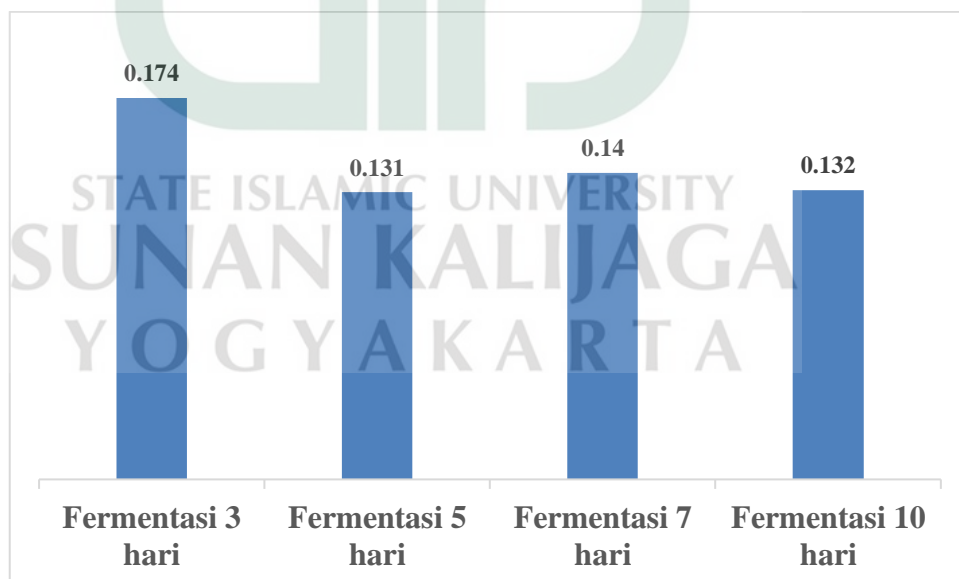
Gambar 4. 5 Kurva kalibrasi etanol, diperoleh dari pengujian kadar etanol murni dan dihasilkan persamaan regresi  $y = 10,333x - 0,2483$ .

Larutan hasil fermentasi dengan variasi 3,5,7, dan 10 hari yang telah didestilasi dianalisis menggunakan kromatografi gas dan dihasilkan pada tabel berikut:

Tabel 4. 1 Hasil uji kromatografi gas didapatkan luas area berbeda. Semakin besar luas area yang terbentuk, kadar bioetanol yang dihasilkan semakin meningkat.

Variasi	Waktu Retensi (Min)	Area [pA*]
N1 (3 hari)	2,062	0,112
N2 (5 hari)	2,067	0,022
N3 (7 hari)	2,065	0,041
N4 (10 hari)	2,060	0,024

Hasil luas area uji kromatografi gas dapat menentukan kadar bioetanol yang dihasilkan dari proses fermentasi. Dengan menggunakan persamaan kurva kalibrasi standar dan perhitungan seperti yang terdapat pada lampiran. Kadar bioetanol yang dihasilkan pada setiap variasi waktu fermentasi 3, 5, 7, dan 10 hari dapat dilihat pada gambar 4. 4. berikut ini:



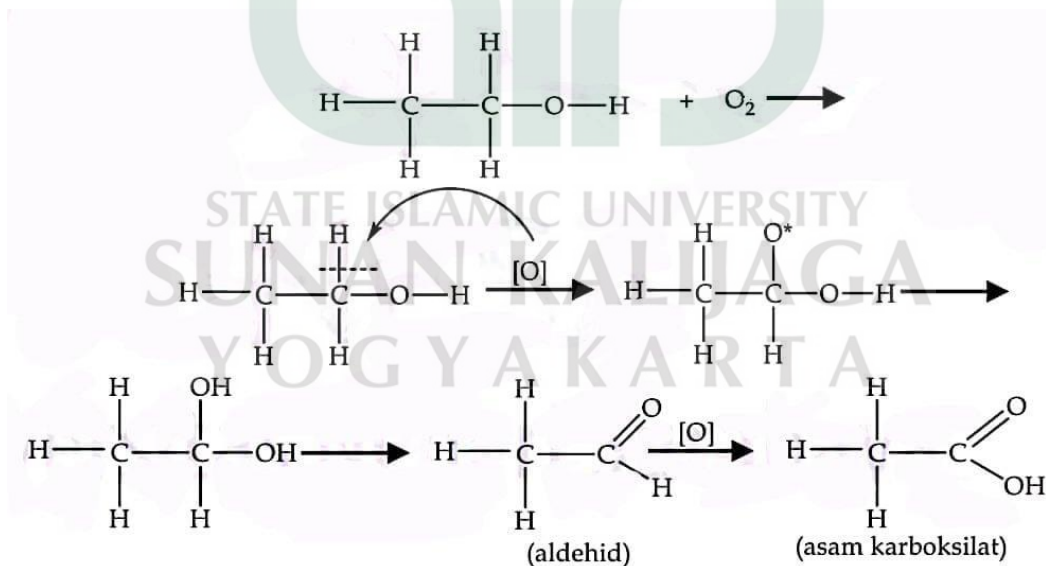
Gambar 4. 6 Pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar bioethanol. Semakin lama waktu fermentasi kadar bioetanol yang dihasilkan semakin meningkat. Kadar tertinggi diperoleh pada hari ke-3 dengan kadar 0,174 % v/v.

Berdasarkan uji kuantitatif yang telah dilakukan, pada gambar 4. 6 terlihat bahwa kadar bioetanol kulit durian dengan variasi waktu fermentasi 3, 5, 7, dan 10 hari, kadar tertinggi terdapat pada destilasi hasil fermentasi 3 hari sebesar 0,174% dan kadar destilasi hasil fermentasi 5, 7, dan 10 berturut-turut sebesar 0,131%, 0,140%, dan 0,132%. Jika dilihat dari waktu fermentasinya setelah melewati waktu fermentasi 3 hari kadar bioetanol yang dihasilkan mengalami penurunan, hal ini dikarenakan proses fermentasi yang terlalu lama sehingga menghasilkan senyawa-senyawa asam organik seperti asam asetat, asam karbamat, asam format, dan CO<sub>2</sub> yang merupakan senyawa samping hasil fermentasi bioetanol sehingga senyawa-senyawa ini akan menghentikan kinerja enzim invertase yang berfungsi memecah glukosa menjadi bioetanol dari inokulum *Saccharomyces cerevisiae* (Khoirunnisah dkk, 2013). Hal ini juga sesuai dengan fase pertumbuhan sel yang terbagi menjadi beberapa tahap yaitu: tahap pertama fase lag (fase adaptasi), tahap kedua fase eksponensial (pertumbuhan berlangsung cepat), tahap ketiga fase stasioner (pertumbuhan tetap), dan tahap terakhir fase kematian (pertumbuhan semakin lambat sampai sel mati) (Lee, 1992). Dalam penelitian ini Fase lag terlewati, hal ini dikarenakan penggunaan inokulum yang mampu melewati fase lag. Fase eksponensial dan stasioner juga terlewati dikarenakan waktu fermentasi yang lama hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh M. Samsuri dkk (2017), dimana kadar bioetanol yang dihasilkan dari variasi waktu fermentasi 24, 48, dan 72 jam cenderung naik dan pada waktu fermentasi 96 jam mengalami penurunan. Dan fase kematian ditunjukkan pada gambar 4. 6 dimana kadar bioetanol mengalami penurunan hal ini dikarenakan substrat yang dikonversi menjadi produk



oleh inokulum *Saccharomyces cerevisiae* telah habis dan bioetanol yang dihasilkan teroksidasi menjadi asetaldehid (aldehid) dan asam asetat (asam karboksilat) jika teroksidasi lebih lanjut. Reaksi oksidasi bioetanol disajikan dalam gambar 4. 7.

Gambar 4. 7 menjelaskan bahwa bioetanol yang bereaksi dengan oksigen menyebabkan terputusnya atom H, sehingga menyebabkan atom O bersifat radikal. Atom O\* yang berikatan dengan atom C alfa menyebabkan terbentuknya dua gugus alkohol (-OH) pada struktur molekulnya. Adanya 2 gugus alkohol (-OH) menyebabkan struktur tersebut tidak stabil. Ketidakstabilan menyebabkan struktur melepaskan gugus H<sub>2</sub>O dan membentuk aldehid. Aldehid teroksidasi lebih lanjut membentuk asam asetat. Oksigen yang masuk ke dalam strukturnya akan berikatan dengan atom H yang tidak memiliki pasangan sehingga membentuk asam asetat (asam karboksilat) (Dias dkk, 2020).



Gambar 4. 7 Mekanisme reaksi oksidasi bioetanol (Fessenden dan Fessenden, 1989)