



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

**TUGAS AKHIR**

**disajikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Ahli  
Mada Program Studi Teknik Kimia**

**oleh  
Ratih Ciptasari  
5511312018**

**PROGRAM STUDI TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNIK  
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG  
2015**

## PERSETUJUAN PEMBIMBING

Nama mahasiswa : Ratih Ciptasari

NIM : 5511312018

### Tugas Akhir

Judul: Pembuatan Etanol dari Limbah Kulit Jeruk Bali: Hidrolisis Menggunakan  
Selulase dan Fermentasi dengan *Yeast*

telah disetujui oleh Pembimbing untuk diajukan ke Panitia sidang tugas akhir

Pembimbing



Dr. Megawati, S.T., M.T.  
NIP. 197211062006042001

## PENGESAHAN KELULUSAN

### Tugas akhir

Judul: Pembuatan Etanol dari Limbah Kulit Jeruk Bali: Hidrolisis  
Menggunakan Selulase dan Fermentasi dengan *Yeast*

oleh: Ratih Ciptasari  
5511312018

telah dipertahankan dalam sidang ujian Akhir Program Studi Teknik Kimia  
Fakultas Teknik Universitas Negeri Semarang, dan disahkan pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 13 Mei 2015

Dekan,

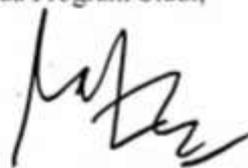


  
Dr. Muhammad Harlanu, M.Pd.  
NIP. 196602151991021001

Penguji

  
Rr. Dewi Artanti Putri, S.T.,M.T.  
NIP. 198711192014042002

Ketua Program Studi,

  
Dr. Ratna Dewi Kusumaningtyas, S.T.,M.T.  
NIP. 197603112000122001

Pembimbing,

  
Dr. Megawati, S.T.,M.T.  
NIP. 197211062006042001

## **MOTTO DAN PERSEMBAHAN**

### **MOTTO**

“Lupakan masa lalu, lakukan yang sekarang untuk menghadapi masa depan”

“Where there is a will, there is a way”

“Man Jadda Wajada”

### **PERSEMBAHAN**

“Dalam setiap perjalanan ku, ada orang-orang yang selalu menggandeng tanganku untuk menyemangatiku”

Kupersembahkan karyaku ini untuk:

- \* Allah Subhanahuwata'ala.
- \* Untuk mamak dan bapakku tercinta (Rodhiyah dan Suroto) yang senantiasa menemani, menyemangati, dan mendukungku hingga aku seperti ini, serta menjadi motivasi untuk perjalananku.
- \* Untuk kakak-kakakku Lutfi, Imam dan Bayu yang telah menyayangi ku dan selalu mengerti kemauanku.
- \* Untuk keluarga besarku.
- \* Untuk masku tersayang Wildan Syaeful Barqi yang selalu sabar mengingatkan dan menyemangati saat aku lengah dan putus asa.
- \* Untuk teman kosku (Riris dan Inggit) dan ibu kosku.
- \* Untuk keluargaku Guguslatih Teknik Racana Wijaya. Terimakasih untuk semuanya.
- \* Untuk sahabat seperjuanganku Teknik Kimia D3 dan Teknik Kimia S1.
- \* Untuk seluruh dosen Teknik Kimia Universitas Negeri Semarang yang telah membimbingku selama ini.
- \* Untuk almamaterku tercinta

Semoga karya ku ini menjadi sebuah kenangan indah diantara kita 😊

## INTISARI

Ciptasari, Ratih. 2015. *Pembuatan Etanol dari Limbah Kulit Jeruk Bali: Hidrolisis Menggunakan Selulase dan Fermentasi dengan Yeast*. Tugas Akhir. Program Studi Teknik Kimia D3, Fakultas Teknik, Universitas Negeri Semarang, Pembimbing Dr. Megawati, S.T., M.T.

Kebutuhan bahan bakar semakin meningkat seiring dengan peningkatan jumlah populasi dan aktivitas manusia. Oleh karena itu dibutuhkan sumber energi alternatif dengan bahan dasar yang terdapat di Indonesia dan belum dimanfaatkan. Salah satu alternatif pengganti bahan bakar minyak adalah bioetanol. Bioetanol merupakan etanol yang berasal dari sumber hayati. Bioetanol bersumber dari gula sederhana, amilum dan selulosa.

Jeruk bali merupakan tanaman buah yang mengandung banyak komponen nutrisi yang terkandung di dalamnya. Selama ini hampir 50% kulit jeruk bali belum sepenuhnya dimanfaatkan. Salah satu kandungan kulit jeruk adalah karbohidrat, selulosa, dan glukosa. Selulosa yang terkandung dalam kulit jeruk sebesar 5,36%. Sedangkan dalam kulit jeruk bali memiliki kandungan selulosa yang hampir sama dengan kulit jeruk, yaitu  $\pm 5,36\%$ . Selulosa dalam kulit jeruk bali dapat dimanfaatkan sebagai bioetanol dengan melalui proses hidrolisis, fermentasi dan distilasi. Dalam penelitian ini memanfaatkan kembali kulit jeruk bali yang telah diekstrak atsiri dan pektinnya pada penelitian terdahulu. Pemanfaatan limbah kulit jeruk bali tersebut adalah untuk membuktikan bahwa limbah kulit jeruk bali yang telah diambil atsiri dan pektinnya masih dapat dimanfaatkan lagi.

Pada percobaan, selulosa dalam kulit jeruk bali dihidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim selulosa dengan variasi penambahan enzim 3, 5, 7 dan 9 ml. Konsentrasi gula dalam hidrolisat diuji dengan metode titrasi fehling dan menghasilkan konsentrasi gula maksimal sebesar 0,0163 M pada variasi penambahan enzim 9 ml. Setelah itu, dilakukan fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae/yeast* selama 5 hari. Larutan etanol hasil fermentasi dipisahkan dari residu, kemudian etanol dipisahkan dari larutan dengan distilasi pada suhu 90°C. Hasil optimum kadar etanol diperoleh pada variasi penambahan enzim 7 ml dan 9 ml, yaitu sebesar 40,298% dengan densitas etanol 0,95048 g/ml.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol dapat dihasilkan dari limbah kulit jeruk bali melalui proses hidrolisis menggunakan enzim selulase, fermentasi dengan *yeast* dan distilasi, menghasilkan kadar etanol tertinggi sebesar 40,298%. Semakin banyak katalis enzim yang ditambahkan maka semakin tinggi konsentrasi gula dan semakin besar kadar etanol yang terbentuk pada waktu yang sama.

**Kata kunci:** etanol, fermentasi, hidrolisis, selulosa

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir dengan lancar dan tepat waktu.

Keberhasilan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan dan dukungan semua pihak terkait. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Ratna Dewi Kusumaningtyas S.T., M.T. selaku Ketua Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Negeri Semarang.
2. Ibu Dr. Megawati, S.T., M.T. selaku Dosen Pembimbing.
3. Ibu Rr. Dewi Artanti Putri, S.T., M.T. selaku Dosen Penguji.
4. Bapak Danang S. selaku Laboran di Laboratorium Teknik Kimia.
5. Seluruh Dosen Prodi Teknik Kimia Universitas Negeri Semarang.
6. Orang tua yang telah memberikan doa restu, motivasi serta dorongan dan bimbingan untuk meraih cita-cita penulis.
7. Wildan Syaeful Barqi yang telah menemani disaat suka dan duka.
8. Teman-teman Teknik Kimia D3 2012 yang telah membantu atas terselesainya Tugas Akhir dengan lancar.
9. Pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu pelaksanaan Tugas Akhir sampai laporan selesai.

Penulis menyadari bahwa laporan masih jauh dari sempurna. Penulis mengharapkan saran dan kritik yang sifatnya membangun, sehingga dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Semarang, Mei 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERSETUJUAN PEMBIMBING.....	ii
PENGESAHAN KELULUSAN.....	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN.....	iv
INTISARI.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I        PENDAHULUAN.....	1
1.1    Latar Belakang.....	1
1.2    Permasalahan.....	3
1.3    Tujuan.....	3
1.4    Manfaat.....	3
BAB II        TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1    Jeruk bali.....	4
2. 1.1    Klasifikasi ilmiah.....	5
2. 1.2    Kandungan kulit jeruk bali.....	5
2.2    Selulosa.....	6
2.3    Gula Reduksi.....	7
2.4    Bioenergi.....	8

2.5	Bioetanol.....	10
2.5.1	Bahan-Bahan yang Dapat Dibuat Etanol.....	10
2.6	Hidrolisis.....	11
2.6.1	Hidrolisis Menggunakan Enzim (Hidrolisis Enzimatis).....	13
2.6.2	Enzim.....	14
2.6.3	<i>Aspergillus niger</i> .....	15
2.6.4	Pengaruh Katalis Terhadap Reaksi.....	16
2.7	Fermentasi.....	17
2.8	Distilasi.....	21
2.8.1	Jenis-Jenis Distilasi.....	22
<b>BAB III</b>	<b>PROSEDUR KERJA.....</b>	<b>24</b>
3.1	Alat.....	24
3.2	Rangkaian Alat.....	25
3.2.1	Rangkaian alat analisis gula menggunakan titrasi fehling.....	25
3.2.2	Rangkaian alat fermentasi.....	25
3.2.3	Rangkaian alat distilasi.....	26
3.3	Bahan.....	26
3.4	Cara kerja.....	27
3.4.1	Preparasi Bahan.....	27
3.4.2	Inokulasi <i>Aspergillus niger</i> .....	27
3.4.3	Pembuatan Enzim.....	28
3.4.4	Proses Hidrolisis Enzimatis.....	29
3.4.5	Menghitung Konsentrasi Gula.....	29
3.4.6	Fermentasi Hidrolisat.....	30
3.4.7	Distilasi.....	31
3.4.8	Menguji Distilat yang Diperoleh.....	31

BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1	Preparasi Bahan.....	32
4.2	Inokulasi.....	33
4.3	Pembuatan Enzim.....	34
4.4	Hidrolisis.....	38
4.4.1	Hubungan Volume Katalis Enzim dengan Konsentrasi Gula yang Dihasilkan.....	39
4.5	Fermentasi.....	40
4.6	Distilasi.....	41
BAB V	SIMPULAN DAN SARAN.....	44
5.1	Simpulan.....	44
5.2	Saran.....	44
	DAFTAR PUSTAKA.....	45
	LAMPIRAN.....	49

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Potensi Energi Terbarukan di Indonesia.....	9
Tabel 4.1 Hubungan Antara Densitas dan Kadar Etanol.....	42
Tabel 4.2. Kadar Etanol Hasil Interpolasi.....	43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Molekul Selulosa.....	7
Gambar 2.2 Reaksi Pada Uji Fehling.....	8
Gambar 2.3 Jalur Konversi Biomassa Menjadi Bioenergi.....	9
Gambar 2.4 Diagram Profil Energi dari Reaksi Tanpa dan dengan Katalis.....	17
Gambar 3.1 Rangkaian Alat Titrasi Fehling.....	25
Gambar 3.2 Rangkaian Alat Fermentasi.....	25
Gambar 3.3 Rangkaian Alat Distilasi.....	26
Gambar 4.1 Serbuk Kulit Jeruk Bali.....	33
Gambar 4.2 Hasil Inokulasi <i>Aspergillus niger</i> pada Media Agar.....	34
Gambar 4.3 Suspensi <i>Aspergillus niger</i> dalam Media Cair.....	35
Gambar 4.4 Media Padat yang Ditumbuhi Jamur <i>Aspergillus niger</i> .....	37
Gambar 4.5 Enzim Hasil Ekstraksi.....	37
Gambar 4.6 Hasil Hidrolisis Kulit Jeruk Bali Menggunakan Selulase.....	38
Gambar 4.7 Endapan Merah Bata Hasil Titrasi Sampel Hidrolisis.....	39
Gambar 4.8 Hubungan Volum Katalis Enzim yang Ditambahkan dengan Konsentrasi Gula yang Dihasilkan.....	40
Gambar 4.9 Cairan Hasil Fermentasi.....	41
Gambar 4.10 Etanol Hasil Distilasi.....	42
Gambar 4.11 Hubungan Konsentrasi Gula Reduksi dengan Kadar Etanol.....	43

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Preparasi Bahan.....	49
Lampiran 2. Skema Kerja Inokulasi <i>Aspergillus niger</i> .....	49
Lampiran 3. Skema Kerja Pembuatan Enzim.....	51
Lampiran 4. Skema Kerja Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatik.....	54
Lampiran 5. Skema Kerja Analisis Kadar Gula dalam Hidrolisat.....	55
Lampiran 6. Skema Kerja Fermentasi.....	57
Lampiran 7. Skema Kerja Distilasi.....	58
Lampiran 8. Skema Kerja Uji Distilat yang Dihasilkan.....	59
Lampiran 9. Analisis Data.....	60

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

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 termanfaatkan (Hambali dkk., 2008). Salah satu alternatif pengganti bahan bakar minyak 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. Selama ini hampir 50% kulit jeruk bali belum sepenuhnya termanfaatkan (Menteri Pertanian RI, 2010). Salah satu kandungan kulit jeruk adalah karbohidrat, selulosa, dan glukosa (Poetranto, 2012). Selulosa yang terkandung dalam kulit jeruk sebesar 5,36% (Ichwani, 2013). Sedangkan dalam kulit jeruk bali memiliki kandungan selulosa yang hampir sama dengan kulit jeruk, yaitu  $\pm 5,36\%$ . Selulosa dalam kulit jeruk bali dapat dimanfaatkan sebagai bioetanol dengan melalui proses hidrolisis, fermentasi dan distilasi. Dalam penelitian ini memanfaatkan kembali kulit jeruk bali yang telah diekstrak atsiri dan pektinnya pada penelitian terdahulu. Pemanfaatan limbah kulit jeruk bali tersebut adalah untuk membuktikan bahwa limbah kulit jeruk bali yang telah diambil atsiri dan pektinnya masih dapat dimanfaatkan lagi. Selain kandungan selulosa, kulit jeruk memiliki senyawa alkaloid, flavonoid, likopen, vitamin C, serta yang paling dominan adalah pektin dan tanin.

Selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun atas unit  $\beta$ -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 et al., 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. Tujuan penambahan katalisator adalah 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). Dengan kata lain, pada waktu yang sama, akan memperoleh konversi yang lebih tinggi.

## 1.2 Permasalahan

Berdasarkan latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana cara membuat etanol dari kulit buah jeruk bali sebagai bahan bakar alternatif?
2. Bagaimana pengaruh volum enzim terhadap konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis?
3. Bagaimana hubungan konsentrasi gula reduksi terhadap kadar etanol yang dihasilkan pada proses fermentasi?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari tugas akhir ini adalah:

1. Memproduksi etanol dari limbah kulit jeruk bali.
2. Mengkaji pengaruh konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis selulosa dalam kulit jeruk bali dengan penambahan volum enzim yang berbeda.
3. Mengkaji hubungan konsentrasi gula reduksi terhadap kadar etanol yang didapatkan dari hasil fermentasi.

## 1.4 Manfaat

Manfaat yang didapat diberikan dari tugas akhir ini adalah:

1. Meningkatkan nilai ekonomis limbah kulit jeruk bali dengan membuatnya menjadi etanol.
2. Mendapatkan etanol dari limbah kulit jeruk bali dengan proses hidrolisis menggunakan enzim selulase, fermentasi dengan *yeast* dan distilasi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Jeruk Bali**

Jeruk bali (*Citrus maxima*) 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. Produksi jeruk bali di berbagai daerah di Indonesia mencapai 110.000 ton pertahunnya dan hampir 50% kulit jeruk yang dihasilkan belum dimanfaatkan (Suhendra, 2013). Jeruk bali merupakan jenis tanaman jeruk yang memiliki tinggi sampai lebih dari 5 m, cabang-cabangnya banyak. Letak daun tersebar (*folia sparsa*). Daun merupakan daun tunggal, tangkai daun bersayap sempit. Letak bunga terdapat pada ketiak daun, memiliki bau yang harum. Jumlah bunga untuk setiap tandannya antara 5-15, serta tajuk bunga 5 sampai 7 lembar berwarna putih. Jenis buah berbentuk bulat, diameter sampai 10-20 cm, berkulit tipis, berwarna hijau yang akan menjadi kuning jika matang, rasanya manis sedikit asam dan kelat. Bentuk bijinya agak pipih, bulat telur sungsang.

Ketinggian tempat yang sesuai untuk tanaman ini yaitu dataran rendah sampai 700 m di atas permukaan laut. Sedangkan yang ditanam di atas ketinggian tersebut rasa buahnya lebih asam. Suhu optimum yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya berkisar antara 25-30°C. Sedangkan sinar matahari harus penuh agar produksinya optimum. Tanah yang disukai tanaman jeruk ialah jenis tanah gembur dan subur. Kedalaman air tanahnya tidak lebih dari 1,5 m pada musim kemarau dan tidak kurang dari 0,5 m pada musim hujan. Tanah tidak boleh tergenang air karena akar akan mudah terserang penyakit. Curah hujan yang cocok berkisar antara 1.000-1.200 mm per tahun dengan kelembapan udara 50-85%.

### 2.1.1 Klasifikasi Ilmiah

Klasifikasi ilmiah tumbuhan jeruk bali adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i> (tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (berpembuluh)
Superdivisio	: <i>Spermatophyta</i> (menghasilkan biji)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (berkeping dua/dikotil)
Sub-kelas	: <i>Rosidae</i>
Ordo	: <i>Sapindales</i>
Familia	: <i>Rutaceae</i> (suku jeruk-jerukan)
Genus	: <i>Citrus</i>
Spesies	: <i>Citrus maxima</i>

### 2.1.2 Kandungan Kulit Jeruk Bali

Jeruk bali mengandung vitamin B, provitamin A, vitamin B1, B2, dan asam folat. Setiap 100 g jeruk bali mengandung 53 kkal energi, protein 0,6 g, lemak 0,2 g, karbohidrat 12,2 g, retinol 125 mg, kalsium 23 mg, dan fosfor 27 mg. Kandungan lain seperti flavonoid, pektin, dan *lycopene* menjadikan buah ini semakin kaya akan zat-zat yang bermanfaat bagi kesehatan (Yanuarta, 2007). Seperti jeruk lain, jeruk bali adalah sumber vitamin C (43 mg dalam 100 g bagian) dan sangat baik sebagai sumber antioksidan (Effendi, 2011).

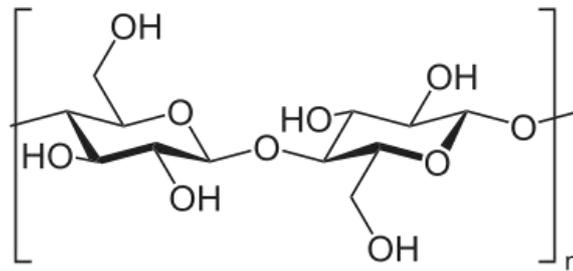
Bagian dalam kulit buah jeruk bali yang berwarna putih (albedo) dapat dijadikan makanan, seperti manisan, selain itu dapat dibuat menjadi alkohol dan juga diekstrak kandungan pektin di dalamnya. Selulosa yang terkandung dalam kulit jeruk sebesar 5,36% (Ichwani, 2013). Sedangkan dalam kulit jeruk bali memiliki kandungan selulosa yang hampir sama dengan kulit jeruk, yaitu  $\pm$  5,36%, sehingga dapat direduksi menjadi gula dan difermentasi menghasilkan alkohol yang dapat digunakan sebagai bahan bakar alternatif.

## 2.2 Selulosa

Selulosa adalah polimer glukosa yang membentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia maupun mekanis. Di alam, biasanya selulosa berasosiasi dengan polisakarida lain seperti hemiselulosa atau lignin membentuk kerangka utama dinding sel tumbuhan (Holtzaple, 1993).

Kebanyakan selulosa berasosiasi dengan lignin sehingga sering disebut sebagai lignoselulosa. Selulosa, hemiselulosa dan lignin dihasilkan dari proses fotosintesis. Pada saat yang sama, komponen-komponen utama penyusun tanaman ini diuraikan oleh aktifitas mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme mampu menghidrolisis selulosa untuk digunakan sebagai sumber energi, seperti bakteri dan fungi (Enari, 1983). Rantai selulosa terdiri dari satuan glukosa anhidrida yang saling berikatan melalui atom karbon pertama dan keempat. Ikatan yang terjadi adalah ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik.

Selulosa merupakan suatu turunan karbohidrat yang tersusun atas unit-unit glukosa yang dihubungkan dengan ikatan  $\beta$ -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 g per 50 ml. Sedangkan dinding sel buah jeruk mempunyai kandungan selulosa 25-35%, hemiselulosa 50-60%, pektin, protein dan lemak (Kadarisma dkk., 2010). Menurut Sjostrom (1981), selulosa merupakan homopolisakarida yang tersusun atas unit  $\beta$ -D-glukopironosa yang terikat satu sama lain dengan ikatan glikosida. Selulosa dalam kulit jeruk bali mengandung  $\pm 5,36\%$ . Dalam Gambar 2.1 menunjukkan struktur molekul dari selulosa dalam keadaan suhu dan tekanan standar.



Gambar 2.1. Struktur Molekul Selulosa

Sumber : [http://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Cellulose\\_Sessel.svg](http://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Cellulose_Sessel.svg)

Selulosa dapat dikonversi menjadi produk-produk bernilai ekonomi yang lebih tinggi seperti glukosa, etanol dan pakan ternak dengan jalan menghidrolisis selulosa dengan bantuan selulase sebagai biokatalisator atau dengan hidrolisis secara asam/basa (Ariestaningtyas, 1991).

### 2.3 Gula Reduksi

Gula pereduksi merupakan golongan gula (karbohidrat) yang dapat mereduksi senyawa-senyawa penerima elektron, contohnya adalah glukosa dan fruktosa. Ujung dari suatu gula pereduksi adalah ujung yang mengandung gugus aldehida atau keton bebas. Semua monosakarida (fruktosa, galaktosa dan glukosa) dan disakarida (laktosa dan maltosa), kecuali sukrosa dan pati (polisakarida) termasuk sebagai gula pereduksi (Lehninger, 1982). Kadar gula reduksi dapat dihitung dengan beberapa cara yaitu uji Luff Schoorl, uji Polarografi, uji Anthron, uji Lane Eynon, dan uji fehling.

Uji fehling merupakan salah satu cara menghitung konsentrasi gula. Dalam perhitungan konsentrasi gula dengan cara uji fehling, digunakan pereaksi fehling. Pereaksi ini dapat direduksi selain oleh karbohidrat yang mempunyai sifat mereduksi, juga dapat direduksi oleh reduktor lain. Pereaksi fehling terdiri atas dua larutan yaitu larutan fehling A dan larutan fehling B. Larutan fehling A adalah larutan  $\text{CuSO}_4$  dalam air, sedangkan larutan fehling B adalah larutan garam K-Natartrat dan NaOH dalam air. Kedua macam larutan ini disimpan terpisah dan baru dicampur menjelang digunakan untuk memeriksa suatu karbohidrat. Dalam

pereaksi ini ion  $\text{Cu}^{2+}$  direduksi menjadi ion  $\text{Cu}^+$  yang dalam suasana basa akan diendapkan sebagai  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Dengan larutan glukosa 1%, pereaksi fehling menghasilkan endapan merah bata, sedangkan apabila digunakan larutan yang lebih encer misalnya larutan glukosa 0,1%, endapan yang terjadi berwarna hijau kekuningan (Poedjiadi.A, 2006). Reaksi identifikasi gula dengan uji fehling dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Reaksi pada Uji Fehling

Sumber: <https://monruw.files.wordpress.com/2010/03/uji-fehling.jpg>

## 2.4 Bioenergi

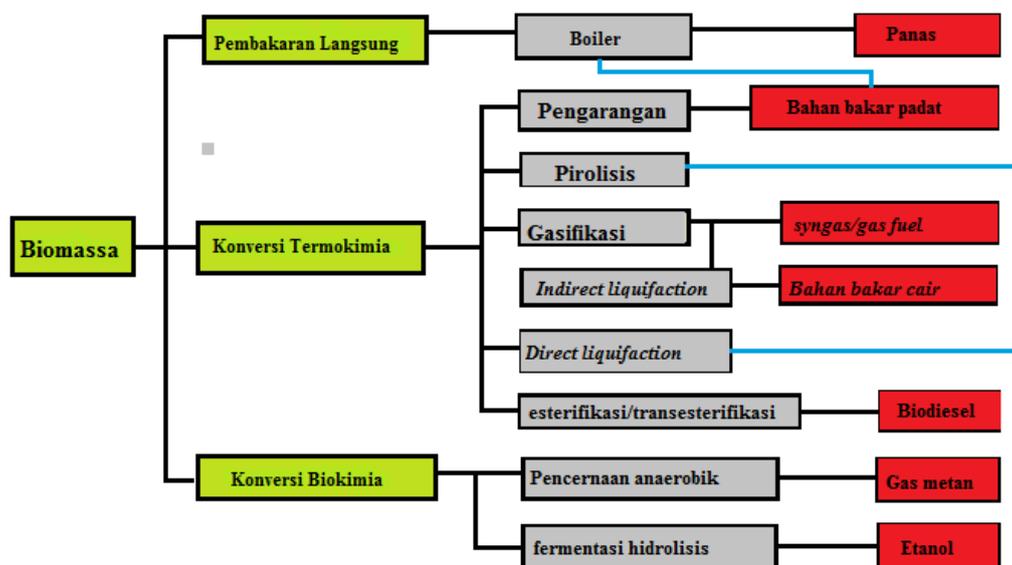
Bioenergi adalah energi alternatif yang berasal dari sumber-sumber biologis. Penggunaan bioenergi memiliki keunggulan dalam hal meningkatkan kualitas lingkungan serta mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil. Salah satu bentuk bioenergi yang terus dikembangkan dewasa ini adalah *biofuel*, yakni sumber energi yang dihasilkan dari biomassa, meliputi biodiesel, bioetanol dan *biooil*. Biomassa yang umum digunakan sebagai sumber biofuel adalah berasal dari tanaman. Kelebihan bioenergi, selain bisa diperbaharui, adalah bersifat ramah lingkungan, dapat terurai, mampu mengeliminasi efek rumah kaca, dan kontinuitas bahan bakunya terjamin (Hambali dkk., 2007). Pada Tabel 2.1 menunjukkan potensi energi terbarukan di Indonesia menurut Direktorat Jenderal Listrik dan Pemanfaatan Energi tahun 2004.

Tabel 2.1. Potensi Energi Terbarukan di Indonesia

Jenis Sumber Energi	Potensi	Kapasitas Terpasang
Hidro	75,67 GW	4200 MW
Mikrohidro	712 MW	206 MW
<i>Geothermal</i>	27 MW	807 MW
Biomassa	49,81 GW	302,4 MW
Surya	4,8 kW/m <sup>2</sup> /hari	6 MW
Angin	3-6 m/detik	0,6 MW

Sumber : Direktorat Jenderal Listrik dan Pemanfaatan Energi, 2004

Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, bioenergi bertransformasi menjadi bentuk yang lebih modern. Bioenergi yang kita kenal saat ini ada dua bentuk, yaitu tradisional dan modern. Bioenergi tradisional yang sering kita jumpai yaitu kayu bakar, sedangkan bioenergi yang lebih modern di antaranya bioetanol, biodiesel, PPO (*Pure Plant Oil*), minyak bakar dan biogas. Jalur konversi biomassa menjadi berbagai jenis bioenergi ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Jalur Konversi Biomassa Menjadi Berbagai Jenis Bioenergi

Sumber: Hambali dkk., 2007

## 2.5 Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang dibuat dari biomassa yang mengandung komponen pati atau selulosa, seperti singkong dan tetes tebu. Dalam dunia industri, etanol umumnya digunakan sebagai bahan baku industri turunan alkohol, campuran untuk minuman keras serta bahan baku farmasi dan kosmetik. Berdasarkan kadar alkoholnya, etanol dibagi menjadi tiga *grade* sebagai berikut:

- a. *Grade* Industri dengan kadar alkohol 90-94%
- b. Netral dengan kadar alkohol 96-99%, umumnya digunakan untuk minuman keras atau bahan baku farmasi.
- c. *Grade* bahan bakar dengan kadar alkohol diatas 99,5% (Hambali dkk., 2007)

### 2.5.1 Bahan-Bahan yang Dapat Dibuat Etanol

Indonesia memiliki bahan baku untuk memproduksi etanol. Tanaman yang berpotensi menghasilkan etanol yang sangat melimpah di antaranya nira, tanaman berpati ataupun tanaman berselulosa. Bahan baku yang dapat dibuat etanol di antaranya:

- a. Bahan yang mengandung glukosa  
Bahan ini ada pada tetes tebu/*molasse*, nira aren, nira kelapa, nira tebu, sari buah-buahan dan lain-lain.
- b. Bahan yang mengandung pati/karbohidrat  
Bahan ini terdapat pada umbi-umbian seperti sagu, singkong, ketela, gaplek, ubi jalar, talas, ganyong, jagung dan lain-lain.
- c. Bahan yang mengandung selulosa  
Selulosa terdapat dalam serat seperti serat kayu, serat tandan kosong kelapa sawit, serat pisang, serat nanas, ampas tebu dan lain-lain (UKM, 2009).

Biomassa adalah bahan organik yang dihasilkan melalui proses fotosintetik, baik berupa produk maupun buangan. Contoh biomassa antara lain

adalah tanaman, pepohonan, rumput, ubi, limbah pertanian, limbah hutan, tinja dan kotoran ternak. Selulosa merupakan salah satu biomassa yang melimpah yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan. Agar biomassa bisa digunakan sebagai bahan bakar maka diperlukan teknologi untuk mengkonversinya. Secara umum teknologi konversi biomassa menjadi bahan bakar dapat dibedakan menjadi tiga yaitu pembakaran langsung, konversi termokimiawi dan konversi biokimiawi.

Pemanfaatan biomassa sebagai sumber energi salah satunya dengan cara biokimiawi. Proses yang termasuk ke dalam proses biokimia adalah hidrolisis, fermentasi dan *an-aerobic digestion*. Proses pembuatan etanol dari biomassa tergolong dalam konversi biokimiawi. Biomassa yang kaya dengan karbohidrat atau glukosa dapat difermentasi sehingga terurai menjadi etanol dan CO<sub>2</sub>. Akan tetapi, karbohidrat harus mengalami penguraian (hidrolisa) terlebih dahulu menjadi glukosa. Etanol hasil fermentasi pada umumnya mempunyai kadar air yang tinggi dan tidak sesuai untuk pemanfaatannya sebagai bahan bakar pengganti bensin. Etanol ini harus didistilasi sedemikian rupa mencapai kadar etanol di atas 99.5% (Fadilah, 2014).

## **2.6 Hidrolisis**

Hidrolisis merupakan proses pemecahan polisakarida di dalam biomassa lignoselulosa, yaitu selulosa dan hemiselulosa menjadi monomer gula penyusunnya. Pada hidrolisis sempurna selulosa akan menghasilkan glukosa, sedangkan hemiselulosa menghasilkan beberapa monomer gula pentose (C<sub>5</sub>) dan heksosa (C<sub>6</sub>) (Seftian dkk., 2012). Hemiselulosa turut terurai menjadi senyawa gula sederhana: glukosa, galaktosa, manosa, heksosa, pentosa, *xilosa* dan arabinosa (Mosier, 2005).

Dalam kondisi normal hanya beberapa reaksi hidrolisis yang dapat terjadi antara air dengan komponen organik. Penambahan asam, basa, atau enzim umumnya dilakukan untuk membuat reaksi hidrolisis dapat terjadi pada kondisi penambahan air tidak memberikan efek hidrolisis. Asam, basa maupun enzim dalam reaksi hidrolisis disebut sebagai katalis, yakni zat yang dapat mempercepat

terjadinya reaksi (Lowry, 1987). Terdapat berbagai macam metode hidrolisis untuk bahan-bahan lignoselulosa, hidrolisis dengan asam dan hidrolisis enzimatis merupakan dua metode utama yang banyak digunakan khususnya untuk bahan-bahan lignoselulosa dari limbah pertanian dan potongan-potongan kayu (Mussantto dan Roberto, 2004). Hidrolisis selulosa dengan asam dibedakan menjadi dua yaitu hidrolisis dengan asam pekat dan asam encer.

Hidrolisis enzimatis yaitu hidrolisis dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu. Hidrolisa selulosa secara enzimatis memberi *yield* etanol sedikit lebih tinggi dibandingkan metode hidrolisis dengan asam (Palmqvist dan Hahn-Hägerdal, 2000). Namun proses enzimatis tersebut merupakan proses yang paling mahal. Proses *recycle* dan *recovery* enzim selulose diperlukan untuk menekan tingginya biaya produksi (Iranmahboob et al., 2002; Szczodrak dan Fiedurek, 1996). Ditinjau secara proses, hidrolisis secara enzimatis kurang praktis sehingga tidak cocok untuk skala kecil karena agak sulit diterapkan kepada masyarakat umum, selain itu investasi yang diperlukan besar. Namun bila akan diproduksi dengan skala/industri besar yang mensyaratkan kemurnian tinggi, proses secara enzimatis lebih disarankan. Rantai bahan dipotong secara spesifik sehingga kemurnian produk tinggi (Anonim 2, 2015).

Hidrolisis dengan asam adalah hidrolisis dengan bantuan asam sebagai katalis. Beberapa asam yang umum digunakan untuk hidrolisis asam antara lain adalah asam sulfat ( $H_2SO_4$ ), asam perklorat, dan HCl. Dalam hidrolisis dengan asam, dibedakan menjadi hidrolisis dengan asam pekat dan hidrolisis dengan asam encer. Hidrolisis dengan asam pekat menghasilkan gula yang tinggi (90% dari hasil teoritik) dibandingkan dengan hidrolisis dengan asam encer, dan dengan demikian akan menghasilkan etanol yang lebih tinggi (Hamelinck dkk., 2005). Hidrolisis dengan asam dapat dilakukan pada suhu rendah. Namun demikian, konsentrasi asam yang digunakan sangat tinggi (30–70%). Proses ini juga sangat korosif karena adanya pengenceran dan pemanasan asam. Proses ini membutuhkan peralatan metal yang mahal atau dibuat secara khusus. *Recovery* asam juga membutuhkan energi yang besar. Di sisi lain, jika menggunakan asam sulfat, dibutuhkan proses netralisasi yang menghasilkan limbah *gypsum*/kapur

yang sangat banyak. Dampak lingkungan yang kurang baik dari proses ini membatasi penggunaan asam perklorat dalam proses ini. Hidrolisis dengan asam pekat juga membutuhkan biaya investasi dan pemeliharaan yang tinggi, hal ini mengurangi ketertarikan untuk komersialisasi proses ini (Taherzadeh & Karimi, 2007). Investasi relatif lebih kecil. Rantai bahan dipotong secara acak sehingga kemurnian produk (Anonim 2, 2015).

Sedangkan hidrolisis dengan asam encer memiliki kelebihan dalam perawatan, yaitu lebih murah dibandingkan dengan hidrolisis asam pekat dikarenakan konsentrasi asam yang digunakan lebih rendah sehingga korositafitasnya juga lebih rendah. Kelemahan dari hidrolisis dengan asam encer adalah degradasi gula hasil di dalam reaksi hidrolisis dan pembentukan produk samping yang tidak diinginkan. Degradasi gula dan produk samping ini tidak hanya akan mengurangi hasil panen gula, tetapi produk samping juga dapat menghambat pembentukan ethanol pada tahap fermentasi selanjutnya. Beberapa senyawa inhibitor yang dapat terbentuk selama proses hidrolisis dengan asam encer adalah furfural, *5-hydroxymethylfurfural* (HMF), asam levulinik (*levulinic acid*), asam asetat (*acetic acid*), asam format (*formic acid*), asam uronat (*uronic acid*), asam 4-hydroxybenzoic, asam vanilik (*vanilic acid*), vanillin, *phenol*, cinnamaldehyde, formaldehida (*formaldehyde*), dan beberapa senyawa lain (Taherzadeh & Karimi, 2007).

### **2.6.1 Hidrolisis Menggunakan Ezim (Hidrolisis Enzimatis)**

Aplikasi hidrolisis menggunakan enzim secara sederhana dilakukan dengan mengganti tahap hidrolisis asam dengan tahap hidrolisis enzim selulosa. Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis dengan asam, antara lain: tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih rendah (suhu rendah), berpotensi memberikan hasil yang tinggi dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif. Beberapa kelemahan dari hidrolisis enzimatis antara lain adalah membutuhkan waktu yang lebih lama, dan kerja enzim dihambat oleh produk. Di

sisi lain harga enzim saat ini lebih mahal daripada asam sulfat, namun demikian pengembangan terus dilakukan untuk menurunkan biaya dan meningkatkan efisiensi hidrolisis maupun fermentasi (Isroi, 2008).

Enzim yang dapat digunakan dalam proses hidrolisis enzimatis diantaranya amilase, protease, pektinase, dan selulase. Setiap enzim memiliki peranan yang berbeda-beda. Enzim amilase membantu dalam memecah amilum menjadi gula sederhana seperti glukosa dan maltosa, enzim protease memecah protein menjadi molekul yang lebih sederhana, enzim pektinase membantu dalam proses degradasi pektin dan enzim selulase membantu memecah selulosa menjadi gula sederhana. Setiap enzim memiliki pH optimum yang khas. Enzim protease seperti pepsin bekerja pada kisaran pH yang rendah, karena enzim ini terdapat dalam cairan lambung dimana kondisi pH optimumnya adalah 2 (Pratama dkk., 2013). Menurut penelitian Safaria dkk (2013), kondisi optimum pH yang menghasilkan gula terbesar adalah pH 5 untuk enzim selulase. Kondisi pH optimum unit aktivitas enzim selulase berkisar pada pH 4,5-6,5 (Susilawati, 2002). Sedangkan untuk suhu optimum pada enzim amilase adalah 37°C dan pH optimum berkisar antara 6,8–7 (Pratama dkk., 2013).

### **2.6.2 Enzim**

Enzim digunakan dalam sebagian besar sektor industri, terutama industri makanan. Selain itu, enzim juga digunakan dalam industri deterjen, farmasi, dan tekstil. Lebih dari 2000 enzim telah diisolasi, tetapi hanya 14 enzim yang diproduksi secara komersial. Kebanyakan dari enzim ini adalah hidrolase, misalnya amilase, protease, pektinase, dan selulase. Enzim penting lainnya adalah glukosa isomerase dan glukosa oksidase. Alasan digunakannya enzim dalam industri adalah enzim mempunyai kelebihan antara lain:

- a. Kemampuan katalitik yang tinggi, mencapai 10<sup>9</sup>-10<sup>12</sup> kali laju reaksi non-aktivitas enzim
- b. Spesifikasi substrat yang tinggi
- c. Reaksi dapat dilakukan pada kondisi yang lunak, yaitu pada tekanan dan temperatur rendah (Fowler, 1988)

Ada tiga sumber enzim, yaitu dari hewan, tumbuhan, dan sel mikroba. Dahulu hewan dan tumbuhan merupakan sumber enzim tradisional, namun dengan berkembangnya ilmu bioteknologi, masa depan terletak pada sistem mikrobial. Tak dapat dipungkiri bahwa sebagian besar sumber enzim dalam skala industri adalah mikroorganisme.

Pemanfaatan limbah berlignoselulosa dengan menggunakan jasa mikroorganisme dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi bahan berlignoselulosa menjadi fraksi penyusunnya. Enzim selulase adalah enzim yang bisa mengurai selulosa menjadi glukosa, setelah diurai bisa difermentasikan menjadi etanol. Enzim selulase yang dapat merombak bahan berlignoselulosa berupa jerami atau serat. Produksi komersial selulase pada umumnya menggunakan fungi atau bakteri yang telah diisolasi. Meskipun banyak mikroorganisme yang dapat mendegradasi selulosa, hanya beberapa mikroorganisme yang memproduksi selulase dalam jumlah yang signifikan yang mampu menghidrolisis kristal selulosa. Fungi adalah mikroorganisme utama yang dapat memproduksi selulase, meskipun beberapa bakteri dan *actinomycetes* telah dilaporkan juga menghasilkan aktivitas selulase. Fungi berfilamen seperti *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* adalah penghasil enzim selulase secara komersial. Fungi tersebut sangat efisien dalam memproduksi enzim selulase (Eprint, 2006). Dalam Penelitian ini digunakan *Aspergillus niger* sebagai penghasil enzim selulase.

### ***2.6.3 Aspergillus niger***

*Aspergillus niger* merupakan fungi dari filum *ascomycetes* yang berfilamen, mempunyai bulu dasar berwarna putih atau kuning pada media Agar *Dextrosa* kentang (PDA) dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam. *Aspergillus niger* digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat dan pembuatan beberapa enzim seperti selulase, amilase, pektinase, dan amiloglukosidase. *Aspergillus niger* memerlukan mineral  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , urea,  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  untuk menghasilkan enzim selulase (Anonim 1, 2015).

Ciri-ciri umum dari *Aspergillus niger* antara lain:

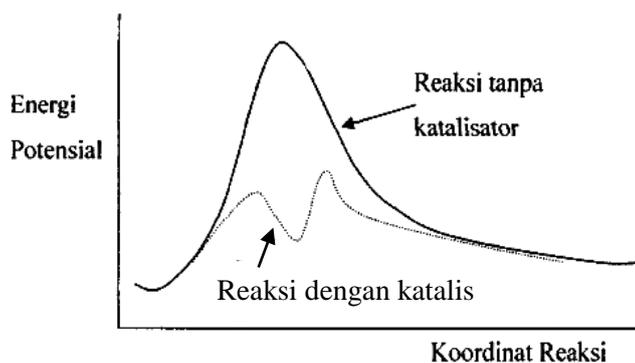
- a. Warna konidia hitam kelam atau hitam kecoklatan dan berbentuk bulat.
- b. Bersifat termofilik, tidak terganggu pertumbuhannya karena adanya peningkatan suhu.
- c. Dapat hidup dalam kelembaban nisbi 80 (Gandjar, 2006).
- d. Dapat menguraikan benzoat dengan hidroksilasi menggunakan enzim benzoat-4 hidroksilase menjadi 4-hidroksibenzoat.
- e. Memiliki enzim 4-hidroksibenzoat hidroksilase yang dapat menghidrolisis 4-hidroksibenzoat menjadi 3,4-dihidroksi benzoat.
- f. Natrium & formalin dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger*.
- g. Dapat hidup dalam spons (*spons Hyrtios Proteus*) (Osterhage 2001).
- h. Dapat merusak bahan pangan yang dikeringkan atau bahan makanan yang memiliki kadar garam tinggi.
- i. Dapat mengakumulasi asam sitrat.

#### **2.6.4 Pengaruh Katalis Terhadap Reaksi**

Peningkatan produk hasil reaksi yang dilakukan melalui peningkatan temperatur, kadang-kadang tidak efektif, karena mungkin saja hasil yang diharapkan tidak stabil pada temperatur tinggi. Beberapa penemuan pada awal abad 19 menunjukkan ada sejumlah reaksi yang kecepatan reaksinya dipengaruhi oleh adanya substansi yang tidak mengalami perubahan sampai akhir proses, contohnya konversi pati menjadi gula yang dipengaruhi oleh asam atau dekomposisi amoniak dan alkohol dengan adanya logam platinum. Substansi tersebut oleh Berzelius (1836) disebut sebagai katalisator. Oswald (1902) mendefinisikan katalis sebagai suatu substansi yang mengubah laju suatu reaksi kimia tanpa terdapat sebagai produk akhir reaksi. Walaupun menurut definisi jumlah katalisator tidak berubah pada akhir reaksi, tetapi tidak berlaku anggapan bahwa katalisator tidak mengawali jalannya reaksi selama reaksi berlangsung.

Katalisator tidak mengalami perubahan pada akhir reaksi, karena itu tidak memberikan energi ke dalam sistem, tetapi katalis akan memberikan mekanisme

reaksi alternatif dengan energi pengaktifan yang lebih rendah dibandingkan dengan reaksi tanpa katalis, sehingga adanya katalis akan meningkatkan laju reaksi. Gambar 2.4 menunjukkan diagram profil energi dari reaksi tanpa dan dengan katalis.



Gambar 2.4. Diagram Profil Energi dari Reaksi Tanpa dan dengan Katalis

Sumber: Makalah Pengaruh Katalisator Terhadap Laju Reaksi (Endang, 2002)

Dalam hidrolisis enzimatis, enzim digunakan sebagai katalisator dalam berjalannya proses hidrolisis. Penambahan enzim dalam proses hidrolisis mempengaruhi konversi produk hidrolisis, dimana semakin banyak enzim yang ditambahkan pada proses hidrolisis maka semakin singkat waktu yang dibutuhkan untuk memperoleh konversi yang sama (Levenspiel, 1972). Dengan kata lain, pada waktu yang sama, akan memperoleh konversi yang lebih tinggi. (Firdausi dkk., 2013).

## 2.7 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perubahan-perubahan kimia dalam suatu substrat organik yang dapat berlangsung karena aksi katalisator biokimia, yaitu enzim yang dihasilkan oleh mikrobia-mikrobia tertentu. (Tjokroadikoesoemo, 1986). Fermentasi berasal dari kata latin "*fervere*" yang berarti mendidih yang menunjukkan adanya aktivitas pada ekstrak buah-buahan atau larutan malt biji-bijian. Kelihatan seperti mendidih karena terbentuknya gelembung-gelembung  $\text{CO}_2$  akibat dari proses katabolisme secara anaerobik dari gula yang ada dalam ekstrak (Retno Wijayanto & Tri Wuri Hadayani, 2008).

Fermentasi dibagi menjadi 3, yakni:

1. Fermentasi permukaan
2. Sistem fermentasi cair
3. Sistem fermentasi padat (Retno Wijayanto & Tri Wuri Hadayani, 2008)

Dalam pembuatan enzim untuk proses hidrolisis enzimatis dilakukan dengan fermentasi padat. Enzim yang dihasilkan melalui proses sistem fermentasi padat baik yang belum dimurnikan atau yang dimurnikan secara parsial dapat diaplikasikan di industri (seperti pektinase digunakan untuk klarifikasi jus buah, *alpha amylase* untuk sakarifikasi pati).

Sistem fermentasi padat umumnya diidentikkan dengan pertumbuhan mikroorganisme dalam partikel pada substrat dalam berbagai variasi kadar air. Substrat padat bertindak sebagai sumber karbon, nitrogen, mineral, dan faktor-faktor penunjang pertumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menyerap air, untuk pertumbuhan mikroba (Tanyildizi dkk, 2007). Mikroorganisme yang tumbuh melalui sistem fermentasi padat berada pada kondisi pertumbuhan di bawah habitat alaminya, mikroorganisme tersebut dapat menghasilkan enzim dan metabolisme yang lebih efisien dibandingkan dengan sistem fermentasi cair.

Sistem fermentasi padat memiliki lebih banyak manfaat dibandingkan dengan sistem fermentasi cair, diantaranya tingkat produktivitasnya tinggi, tekniknya sederhana, biaya investasi rendah, kebutuhan energi rendah, jumlah air yang dibuang sedikit, *recovery* produknya lebih baik, dan busa yang terbentuk sedikit. Sistem fermentasi padat ini dilaporkan lebih cocok digunakan di negara-negara berkembang. Manfaat lain dari sistem fermentasi padat adalah murah dan substratnya mudah didapat, seperti produk pertanian dan industri makanan (Tanyildizi dkk, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pertumbuhan fungi pada saat fermentasi:

- a. Konsentrasi substrat

Substrat merupakan sumber nutrisi utama bagi fungi. Nutrien-nutrien baru dapat dimanfaatkan sesudah fungi mengekskresi enzim-enzim ekstraselular yang dapat mengurai senyawa-senyawa kompleks dari substrat tersebut menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Indrawati Gandjar, 2006).

b. Sumber nitrogen

Bahan yang banyak sebagai sumber nitrogen adalah ammonium nitrat, ammonium sulfat, dan urea. Nitrogen diperlukan dalam proses fermentasi karena dapat mempengaruhi aktivitas dari *Aspergillus niger*. Pada proses fermentasi untuk menghasilkan enzim selulase sumber nitrogen yang optimal adalah urea (Narasimha dkk, 2006).

c. Fosfat

Kebutuhan fosfat dalam proses pertumbuhan fungi tidak banyak dijelaskan tetapi keseimbangan antara mangan, seng, dan fosfat merupakan salah satu faktor penentu dalam beberapa kasus dimana terjadi kontaminasi ion logam tertentu maka adanya fosfat dapat memberikan keuntungan (Indrawati Gandjar, 2006).

d. Magnesium

Magnesium berfungsi sebagai kofaktor dalam mengatur jumlah enzim yang terlibat dalam reaksi. Dalam sel konsentrasi optimal dari penambahan magnesium adalah 0,002-0,0025% (Gandjar, 2006).

e. Aerasi

Dalam media fermentasi padat, aerasi diatur dengan cara memperhatikan pori-pori bahan yang difermentasikan (Gandjar, 2006). Aerasi berfungsi untuk mempertahankan kondisi aerobik untuk desorpsi CO<sub>2</sub>, mengatur temperatur substrat, dan mengatur kadar air (Prior dkk, 1980). Aerasi yang diberikan juga membantu menghilangkan sebagian panas yang dihasilkan sehingga temperatur dapat dipertahankan pada temperatur optimal untuk produksi enzim (Darwis dkk, 1995). Tingkat aerasi optimal yang diberikan dipengaruhi oleh sifat mikroorganisme yang digunakan. Tingkat O<sub>2</sub> yang dibutuhkan untuk sintesis produk, jumlah panas metabolik yang harus dihilangkan dari bahan, ketebalan lapisan substrat, tingkat CO<sub>2</sub>, dan metabolit-metabolit lain yang mudah menguap

harus dihilangkan, dan tingkat ruang udara yang tersedia di dalam substrat (Lonsane dkk, 1985).

f. pH

pH substrat sangat penting untuk pertumbuhan fungi, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai suatu substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu. Umumnya fungi menyukai pH di bawah 7. Jenis-jenis khamir tertentu bahkan tumbuh pada pH yang cukup rendah, yaitu pH 4,5–5,5. Pengaturan pH sangat penting dalam industri agar fungi yang ditumbuhkan menghasilkan produk yang optimal, misalnya pada produksi asam sitrat, produksi enzim, produksi antibiotik, dan juga untuk mencegah pembusukan bahan pangan (Gandjar, 2006).

g. Temperatur inkubasi

Berdasarkan kisaran suhu lingkungan yang baik untuk pertumbuhan, fungi dapat dikelompokkan sebagai fungi psikrofil, mesofil, dan termofil. Pengetahuan tentang kisaran temperatur pertumbuhan suatu fungi sangat penting, terutama bila isolat-isolat tertentu akan digunakan di industri. Misalnya, fungi yang termofil atau termotoleran (*Candida tropicalis*, *Paecilomyces variotii*, dan *Mucor miehei*), dapat memberikan produk yang optimal meskipun terjadi peningkatan temperatur, karena metabolisme fungsinya, sehingga industri tidak memerlukan penambahan alat pendingin (Gandjar, 2006).

h. Makanan

Semua mikroorganisme memerlukan nutrisi yang akan menyediakan:

- 1) Energi biasanya diperoleh dari substansi yang mengandung karbon.
- 2) Nitrogen untuk sintesis protein. Salah satu contoh sumber nitrogen yang dapat digunakan adalah urea.
- 3) Mineral yang dipergunakan mikroorganisme salah satunya adalah asam fosfat yang dapat diambil dari pupuk NPK.
- 4) Vitamin, sebagian besar sumber karbon dan nitrogen alami sudah mengandung semua atau beberapa vitamin yang dibutuhkan mikroorganisme. (Gaman, 1992).

Dalam fermentasi gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis enzimatis digunakan metode fermentasi cair, yaitu fermentasi gula. Fermentasi gula oleh ragi, misalnya *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan etil alkohol (etanol) dan CO<sub>2</sub> melalui reaksi sebagai berikut:



Glukosa

etanol (Winarno, 1984)

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 pertumbuhannya 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, 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).

## 2.8 Distilasi

Distilasi adalah suatu proses penguapan dan pengembunan kembali, yang dimaksudkan untuk memisahkan campuran dua atau lebih zat cair ke dalam fraksi-fraksinya berdasarkan perbedaan titik didih. Pada umumnya, pemisahan hasil fermentasi glukosa/dektrosa menggunakan sistem uap-cairan, dan terdiri dari komponen-komponen tertentu yang mudah tercampur. Umumnya distilasi berlangsung pada tekanan atmosfer, contoh dalam hal ini adalah sistem alkohol

air, yang pada tekanan atmosfer memiliki titik didih sebesar  $78,6^{\circ}\text{C}$ . (Tjokroadikoesoemo, 1986).

### 2.8.1 Jenis-Jenis Distilasi

#### a. Distilasi Sederhana

Distilasi sederhana atau distilasi biasa adalah teknik pemisahan kimia untuk memisahkan dua atau lebih komponen yang memiliki perbedaan titik didih yang jauh. Suatu campuran dapat dipisahkan dengan distilasi biasa ini untuk memperoleh senyawa murni. Senyawa yang terdapat dalam campuran akan menguap saat mencapai titik didih masing-masing (Walangare, 2013).

#### b. Distilasi Fraksionasi (Bertingkat)

Sama prinsipnya dengan distilasi sederhana, hanya distilasi bertingkat ini memiliki rangkaian alat kondensor yang lebih baik, sehingga mampu memisahkan dua komponen yang memiliki perbedaan titik didih yang berdekatan. Untuk memisahkan dua jenis cairan yang sama mudah menguap dapat dilakukan dengan distilasi bertingkat. Distilasi bertingkat adalah suatu proses distilasi berulang. Proses berulang ini terjadi pada kolom fraksional. Kolom fraksional terdiri atas beberapa plat dimana pada setiap plat terjadi pengembunan. Uap yang naik plat yang lebih tinggi lebih banyak mengandung cairan yang lebih atsiri (mudah menguap) sedangkan cairan yang kurang atsiri lebih banyak kondensat (Walangare, 2013).

#### c. Distilasi *Azeotrop*

Memisahkan campuran *azeotrop* (campuran dua atau lebih komponen yang sulit di pisahkan), biasanya dalam prosesnya digunakan senyawa lain yang dapat memecah ikatan *azeotrop* tersebut atau dengan menggunakan tekanan tinggi (Walangare, 2013).

#### d. Distilasi Uap

Untuk memurnikan zat / senyawa cair yang tidak larut dalam air, dan titik didihnya cukup tinggi, sedangkan sebelum zat cair tersebut mencapai titik didihnya, zat cair sudah terurai, teroksidasi atau mengalami reaksi perubahan

(rearrangement), maka zat cair tersebut tidak dapat dimurnikan secara distilasi sederhana atau distilasi bertingkat, melainkan harus didistilasi dengan distilasi uap. Distilasi uap adalah istilah yang secara umum digunakan untuk distilasi campuran air dengan senyawa yang tidak larut dalam air, dengan cara mengalirkan uap air ke dalam campuran sehingga bagian yang dapat menguap berubah menjadi uap pada temperature yang lebih rendah dari pada dengan pemanasan langsung. Untuk distilasi uap, labu yang berisi senyawa yang akan dimurnikan dihubungkan dengan labu pembangkit uap. Uap air yang dialirkan ke dalam labu yang berisi senyawa yang akan dimurnikan, dimaksudkan untuk menurunkan titik didih senyawa tersebut, karena titik didih suatu campuran lebih rendah dari pada titik didih komponen-komponennya (Walangare, 2013).

e. Distilasi Vakum

Memisahkan dua komponen yang titik didihnya sangat tinggi, metode yang digunakan adalah dengan menurunkan tekanan permukaan lebih rendah dari 1 atm, sehingga titik didihnya juga menjadi rendah, dalam prosesnya suhu yang digunakan untuk mendistilasinya tidak perlu terlalu tinggi (Walangare, 2013).

## BAB III

### PROSEDUR KERJA

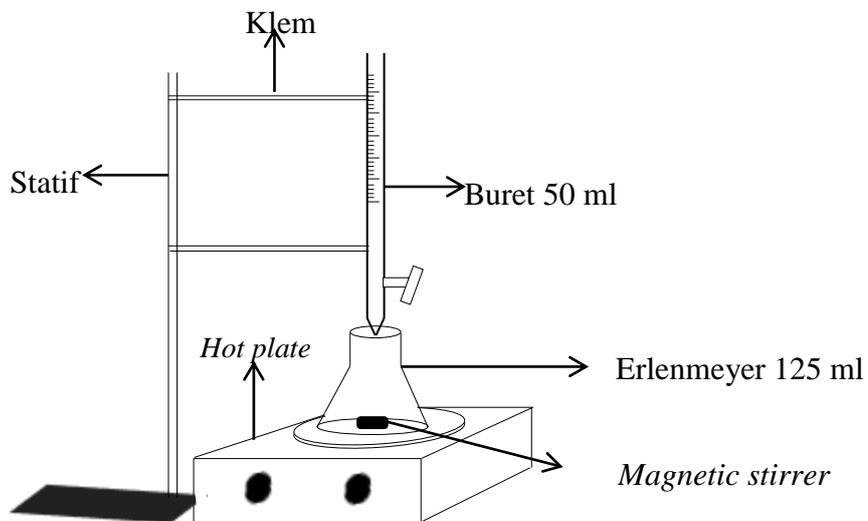
#### 3.1 Alat

- a. *Oven*
- b. *Blender*
- c. Spatula
- d. Timbangan
- e. Ayakan 40 mesh
- f. Gelas arloji
- g. *Beaker glass* 250 ml
- h. Kompor listrik
- i. Pengaduk kaca
- j. Cawan petri
- k. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
- l. Kawat
- m. Penangas spirtus
- n. Inkubator
- o. Autoklaf
- p. Gelas ukur 10 dan 100 ml
- q. Pipet tetes
- r. Shaker
- s. Corong kaca
- t. Plastik, karet dan *aluminium foil*
- u. *Erlenmeyer* 125 ml
- v. *Buret* 50 ml
- w. Statif dan klem
- x. Pipet ukur 25 ml
- y. *Ball filer*
- z. *Hot plate dan Magnetic stirrer*
- aa. Tabung fermentasi/fermenter
- bb. Labu distilasi 250 ml
- cc. Kondensor libik
- dd. Seperangkat selang dan pompa
- ee. Adaptor
- ff. Termometer 200°C
- gg. *Mortar porselen*
- hh. Piknometer 2 ml

## 3.2 Rangkaian Alat

### 3.2.1 Rangkaian alat analisis gula menggunakan titrasi fehling

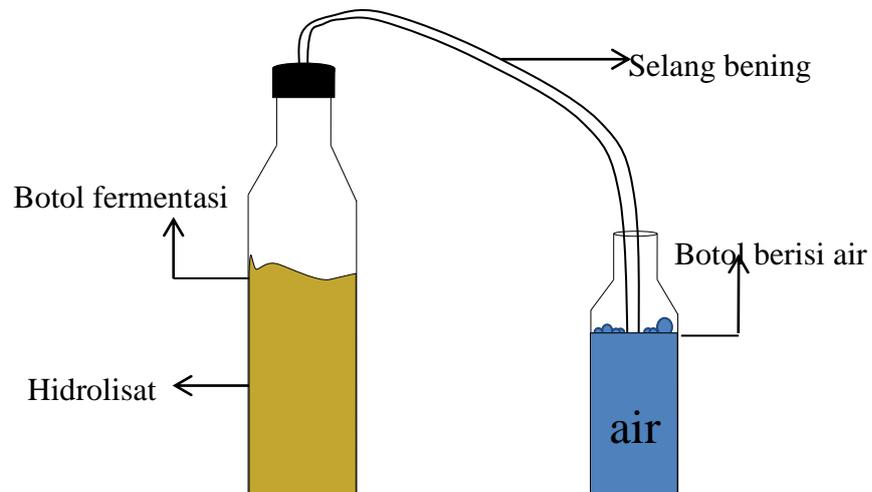
Rangkaian alat untuk titrasi fehling dalam perhitungan konsentrasi gula reduksi dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Rangkaian Alat Titrasi Fehling

### 3.2.2 Rangkaian alat fermentasi

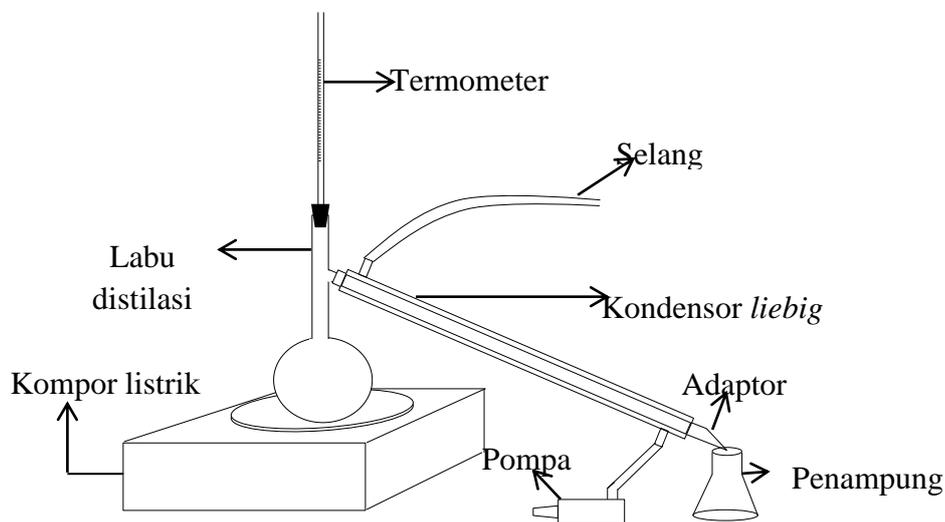
Rangkaian alat fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Rangkaian Alat Fermentasi

### 3.2.3 Rangkaian alat distilasi

Rangkaian alat distilasi dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Rangkaian Alat Distilasi

### 3.3 Bahan

- a. Limbah kulit jeruk bali
- b. *Yeast*
- c. Aquades
- d. Urea
- e. NaOH
- f. HCl
- g. Sukrosa/gula pasir
- h. Monohidrat glukosa
- i.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- j. *Aspergillus Niger*
- k.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- l. Indikator universal
- m. Kertas saring
- n. Fehling A dan B
- o. Bubuk agar instan
- p. Vitamin B kompleks
- q. Kapas

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Preparasi Bahan

Dalam tahap preparasi bahan, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Mengeringkan dan menghaluskan limbah kulit jeruk bali.
- b. Mengayak serbuk kulit jeruk bali dengan menggunakan ayakan 40 *mesh* untuk menyamakan ukuran.

#### 3.4.2 Inokulasi *Aspergillus niger*

Dalam tahap inokulasi, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Mensterilkan tabung reaksi dalam autoklaf pada suhu 120°C selama 20 menit.
- b. Mendidihkan air bersih sebanyak 100 ml.
- c. Melarutkan 10 g gula pasir, 5 g bubuk agar instan, dan 1 butir vitamin B kompleks yang sebelumnya telah dihaluskan sampai homogen.
- d. Menuangkan adonan agar dalam tabung reaksi yang telah disterilkan sebanyak 1/3 volume tabung reaksi, segel dengan rapat menggunakan kapas.
- e. Memiringkan dan mendinginkan adonan agar dalam tabung reaksi.
- f. Membakar kawat dengan penangas spirtus hingga berwarna merah dan mendinginkan kawat dengan mengibas-ibaskan ke udara.
- g. Mengambil *Aspergillus niger* dari media lama dengan ujung kawat.
- h. Memindahkan *Aspergillus niger* ke dalam media agar dengan cara menggoreskan secara zig-zag.
- i. Menyegel kembali media dan menyimpan hasil inokulasi pada suhu ruang.
- j. Menyimpan hasil inokulasi yang telah tumbuh pada almari pendingin.

### 3.4.3 Pembuatan Enzim

Dalam tahap pembuatan enzim, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

#### a. Penyiapan Inokulum

- 1) Membuat 100 ml media cair (media cair ini terdiri dari sukrosa 12,5% (b/v), Urea 0,25 % (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 % (b/v) dengan melarutkan ke dalam 100 ml aquades).
- 2) Mengatur pH media cair dengan menambahkan HCl hingga pH 3.
- 3) Mencilupkan ujung kawat ose ke dalam etanol lalu memanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah.
- 4) Mengambil biakan *Aspergillus niger* dari media agar dengan menggunakan kawat lalu mencelupkan beberapa saat pada media cair hingga tampak keruh.
- 5) Menutup media cair dengan *aluminium foil* dan menginkubasi media pada suhu  $\pm 30^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

#### b. Memproduksi Enzim

- 1) Menimbang 20 gram serbuk kulit jeruk bali memasukkan ke dalam *beaker glass* 250 ml dan menambahkan nutrisi urea 0,03 gr,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0023 gr.
- 2) Menambahkan 80 ml aquadest ke dalam media tersebut
- 3) Mengatur pH hingga pH 5 lalu mensterilkan media dalam *autoclave* pada suhu  $120^\circ\text{C}$  selama 15 menit.
- 4) Mendinginkan media yang telah disterilkan.
- 5) Menambahkan suspensi spora *Aspergillus niger* sebanyak 10 ml pada media tersebut.
- 6) Menginkubasi media pada suhu  $\pm 30^\circ\text{C}$  dengan waktu fermentasi 96 jam

**c. Pengambilan Enzim**

- 1) Mengekstrak hasil fermentasi dengan aquadest sebanyak 100 ml kemudian menshaker pada *rotari shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 1 jam
- 2) Memisahkan cairan hasil fermentasi dengan menggunakan kertas saring.
- 3) Menyimpan enzim yang diperoleh dalam lemari pendingin dan siap digunakan.

**3.4.4 Proses Hidrolisis Enzimatis**

Dalam tahap hidrolisis enzimatis, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:.

- a. Memasukkan 10 gram serbuk kulit jeruk bali ke dalam *erlenmeyer* 125 ml lalu menambahkan 100 ml aquades dan mengatur pH 4–5.
- b. Kemudian memanaskan bubur dalam *autoclave* pada suhu 100°C selama 30 menit.
- c. Mendinginkan bubur kulit jeruk bali.
- d. Menambahkan enzim selulase sebanyak 3, 5, 7 dan 9 ml (sesuai perlakuan) ke dalam bubur kulit jeruk bali tersebut lalu menutup rapat dengan plastik dan karet.
- e. Kemudian menshaker campuran pada *rotary shaker* 160 rpm selama 9 jam.

**3.4.5 Menghitung Konsentrasi Gula**

Dalam tahap menghitung konsentrasi gula, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

**a. Standarisasi Larutan Fehling**

- 1) Membuat larutan gula standar dengan konsentrasi tertentu.
- 2) Menghitung konsentrasi larutan gula.
- 3) Mengambil 5 ml fehling A dan 5 ml fehling B ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 20 ml aquades dalam erlenmeyer.

- 4) Menitrasi larutan fehling (A+B+aquades) dengan larutan gula standar dalam kondisi mendidih dan diaduk.
- 5) Kesetimbangan tercapai ketika larutan fehling menjadi bening dan terbentuk endapan merah bata.
- 6) Mengulangi titrasi sebanyak 3 kali.

**b. Menghitung Konsentrasi Gula Hidrolisat**

- 1) Mengambil cairan hasil hidrolisis (hidrolisat) sebanyak 10 ml.
- 2) Encerkan hidrolisat dengan 100 ml aquades.
- 3) Mengatur pH larutan sampel hingga netral.
- 4) Mengambil 5 ml fehling A dan 5 ml fehling B ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 20 ml aquades dalam erlenmeyer.
- 5) Menitrasi larutan fehling (A+B+aquades) dengan larutan larutan sampel dalam kondisi mendidih dan diaduk.
- 6) Kesetimbangan tercapai ketika larutan fehling menjadi bening dan terbentuk endapan merah bata.
- 7) Mengulangi titrasi sebanyak 3 kali

**3.4.6 Fermentasi Hidrolisat**

Dalam tahap fermentasi hidrolisat, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Menambahkan bubuk kulit jeruk bali yang telah dihidrolisis dengan 4 g *yeast* dan mengaduk sampai homogen.
- b. Setelah itu memasukkan bubuk ke dalam tabung fermentasi dengan memasukkan ujung selang ke dalam air agar tidak terjadi kontak langsung dengan udara.
- c. Selanjutnya menfermentasi bubuk selama 5 hari.
- d. Memisahkan larutan dari residu sehingga diperoleh filtrat.

### **3.4.7 Distilasi**

Dalam tahap distilasi, langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Merangkai alat distilasi.
- b. Memasukkan filtrat ke dalam labu distilasi dalam rangkaian.
- c. Mendistilasi filtrat dalam labu dengan suhu  $90^{\circ}\text{C}$  hingga tidak ada tetesan kembali.
- d. Mengukur distilat yang diperoleh.

### **3.4.8 Menguji distilat yang diperoleh**

Dalam tahap menguji distilat yang diperoleh, uji yang dilakukan adalah uji densitas. Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- 1) Mengkalibrasi piknometer untuk mendapatkan volum piknometer sebenarnya.
- 2) Menimbang piknometer kosong untuk mendapatkan massa piknometer kosong.
- 3) Mengisi piknometer dengan distilat, kemudian menimbang untuk mendapatkan massa piknometer dan isi.
- 4) Menghitung densitas distilat.

## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Simpulan

- a. Pembuatan etanol dari limbah kulit jeruk bali dapat dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu tahap preparasi bahan, inokulasi, pembuatan enzim, hidrolisis enzimatis, fermentasi dan distilasi. Enzim selulase dari jamur *Aspergillus niger* dapat digunakan untuk menghidrolisis kulit jeruk bali.
- b. Variasi penambahan enzim mempengaruhi konversi gula reduksi yang dihasilkan. Konversi gula reduksi terbesar diperoleh pada penambahan volum enzim 9 ml yaitu 0,016 M. Semakin banyak penambahan volum enzim, konversi gula reduksi semakin meningkat pada waktu yang sama.
- c. Konsentrasi gula reduksi berbanding lurus dengan kadar etanol. Semakin besar konsentrasi gula reduksi, semakin meningkat kadar etanol yang diperoleh. Pada percobaan, dengan fermentasi selama 5 hari, etanol yang diperoleh mempunyai kadar 40,298% v/v.

#### 5.2 Saran

1. Variasi rasio bahan perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap hasil gula reduksi.
2. Variasi jenis mikroorganisme dalam pembuatan enzim selulase untuk mengetahui kualitasnya pada hidrolisis kulit jeruk bali.
3. Lignin dalam kulit jeruk bali sebaiknya dihilangkan untuk memaksimalkan proses hidrolisis.
4. Volum enzim yang dipakai perlu dicoba lebih dari 10 ml agar gula reduksi yang dihasilkan meningkat.

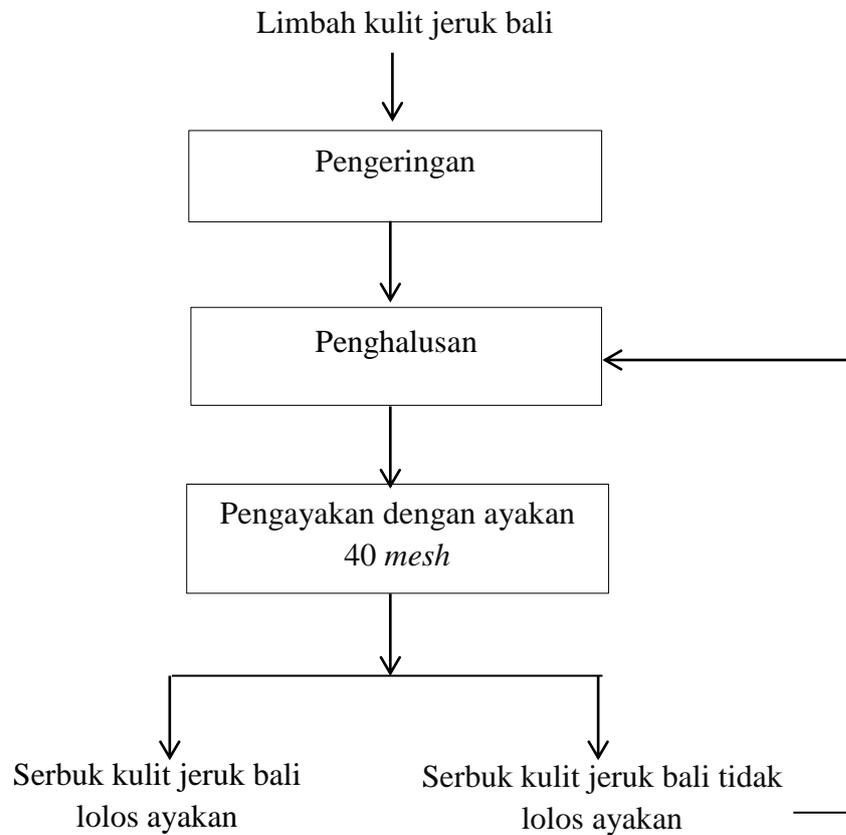
## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim 1. 2015. *Aspergillus niger*. [http://id.wikipedia.org/wiki/Aspergillus\\_niger](http://id.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger). Diakses pada 24 Maret 2015 pukul 12.53 WIB.
- Anonim 2. 2015. *Hidrolisa Pati*. <http://matekim.blogspot.com/2010/05/hidrlisa-pati.html>. Diakses pada 28 April 2015 pukul 20.55 WIB.
- Ardian, N. D., Endah, R. D. dan Sperisa, D. 2007. *Pengaruh Kondisi Fermentasi terhadap Yield Etanol pada Pembuatan Bioetanol dari Pati Garut*. Jurnal Gema Teknik, 2, pp. 1.
- Bonjour, J. P. 1991. *Biotin*. In: Handbook of Vitamins. Marcel Dekker, Inc New York, page: 393-427.
- Darwis , A. A., Illah, S., Tun T. I. dan Safriani. 1995. *Kajian Kondisi Fermentasi pada Produksi Selulase dari Limbah Kelapa Sawit (Tandan Kosong dan Sabut) oleh Neurospora sitophila*. Jurnal Teknologi Industri Pertanian Vol. 5 (3) 199-207.
- 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.
- Hambali, E., S. Mujdalipah, A. H. Tambunan, A. W. Pattiwiri dan Hendroko. 2007. *Teknologi Bioenergi*. Agromedia Jakarta.
- 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.

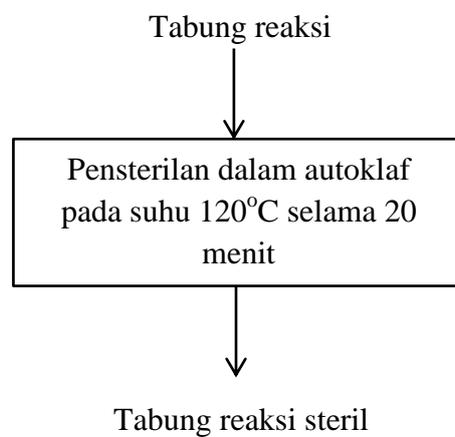
- Ichwani, R. 2013. *Pemanfaatan Limbah Kulit Jeruk Keprok (Citrus Reticulata Blanco Syn) Sebagai Bahan Penguat Nanokertas Selulosa Bakteri Dari Air Kelapa*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara.
- Isroi. 2008. *Potensi Biomassa Lignoselulosa di Indonesia Sebagai Bahan Baku Bioetanol: Tandan Kosong Kelapa Sawit*. Online di <http://isroi.wordpress.com>. Diakses pada 21 April 2015 pukul 12.10 WIB.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Suhartono MT, penerjemah. Jakarta: Erlangga.
- Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiartman, S. dan Rama K. S. V. 1985. *Engineering Aspects of Solid State Fermentation*. *Enzyme Microb. Tech.* Vol. 7:258-265.
- Menteri Pertanian RI. 2010. *Tanaman Jeruk Bali di Indonesia*. Ayunda, Vol 1 No 7:43-36.
- Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolia, V., Subbosh, C. M. dan Rajashekar, R. B. 2006. *Nutrien Effects on Production of Cellulolytic Enzymes by Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (5), pp. 472-476.
- Osvaldo, Z. S., Panca, P. S. dan Faizal, M. 2012. *Pengaruh Konsentrasi Asam Dan Waktu Pada Proses Hidrolisis dan Fermentasi Pembuatan Bioetanol dari Alang-Alang*. Fakultas Teknik Universitas Sriwijaya. *Jurnal Teknik Kimia* ;No. 2;Hal. 52-62.
- Poetranto, F. H. 2012. *Limbah Kulit Jeruk Manis Sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol*. Skripsi. Universitas Pembangunan Negeri "VETERAN" Jatim. Surabaya.
- Pratama, A. P., Meilani A., Jeanne, I. L. F. H., Mohamad, A., Roscha, A. dan Ana R. J. 2013. *Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktifitas Enzim*. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Syarif Hidayatullah. Jakarta.

- Prior, B. A., Du Preez, J. C. dan Rein, P.W. 1990. *Environmental Parameters di dalam Solid State Cultivation*. Elsevier. London.
- Sa'adah, Z., Noviana, I. S. dan Abdullah. 2012. *Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus niger Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat*. Teknik Kimia. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.
- 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.
- Shofiyanto, M. E. 2008. *Hidrolisis Tongkol Jagung oleh Bakteri Selulolitik untuk produksi Bioetanol dalam Kultur Campuran*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Bogor.
- Suhendra, H. 2013. *Buah Lokal: Pamelon, Jeruk Asli Indonesia yang Terabaikan*. [Http://industri.bisnis.com/read/20130710/99/149975/buah-lokal-pamelon-jeruk-asli-indonesia-yang-terabaikan](http://industri.bisnis.com/read/20130710/99/149975/buah-lokal-pamelon-jeruk-asli-indonesia-yang-terabaikan) diakses pada 23 Maret 2015 pukul 10.34 WIB.
- 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.
- Tim Dosen Praktikum Teknologi Bioproses. 2015. *Petunjuk Praktikum Teknologi Bioproses*. Prodi Teknik Kimia Unnes. Semarang
- Tjokroadikoesoemo, S. 1986. *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- UKM, B. 2009. *Bahan Bakar Nabati (Bioetanol)*. Khalifah Niaga Lantabura: Yogyakarta.

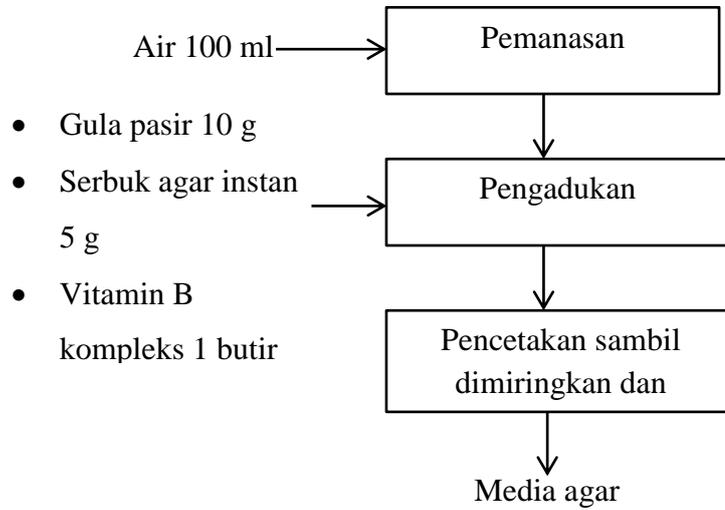
- Walangare, K. B. A., Lumenta, A. S. M., Wuwung, J. O. dan Sugiarto, B. A. 2013. *Rancang Bangun Alat Konversi Air Laut Menjadi Air Minum Dengan Proses Distilasi Sederhana Menggunakan Pemanas Elektrik*. e-Jurnal Teknik Elektro dan Komputer; Hal 1-11.
- Widjajanti dan Endang. 2005. *Pengaruh Katalisator Terhadap Laju Reaksi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Yogyakarta.

**Lampiran 1. Skema Kerja Preparasi Bahan****Lampiran 2. Skema Kerja Inokulasi *Aspergillus niger***

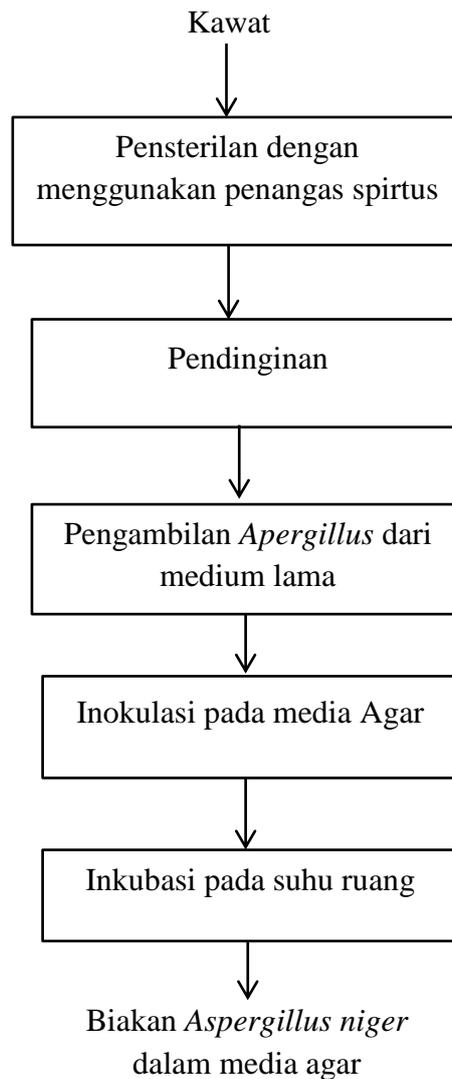
- **Sterilisasi alat**



- **Pembuatan Media**

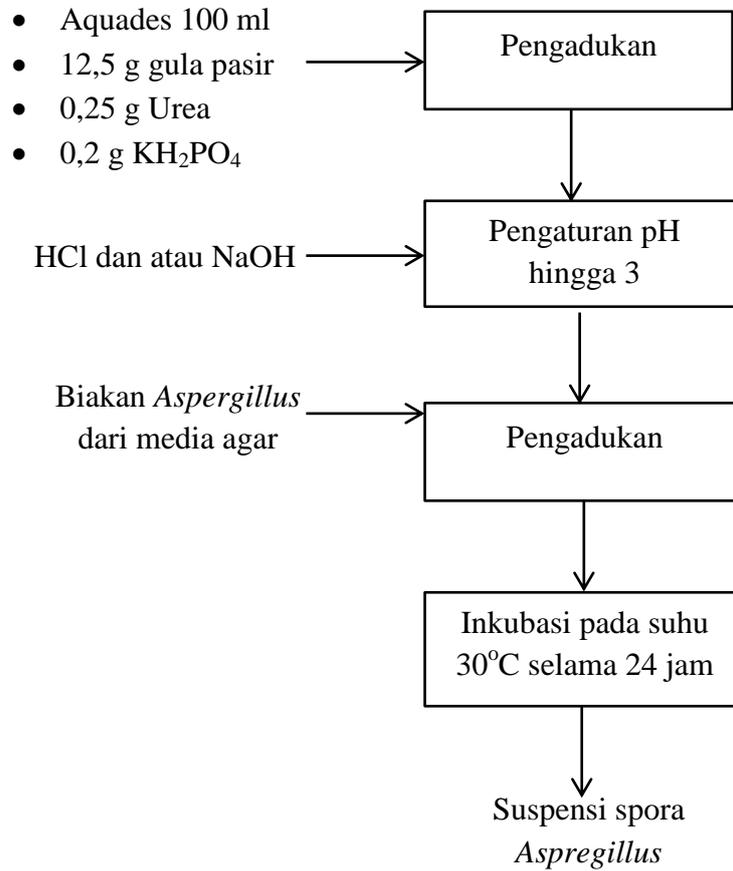


- **Inokulasi *Aspergillus niger***

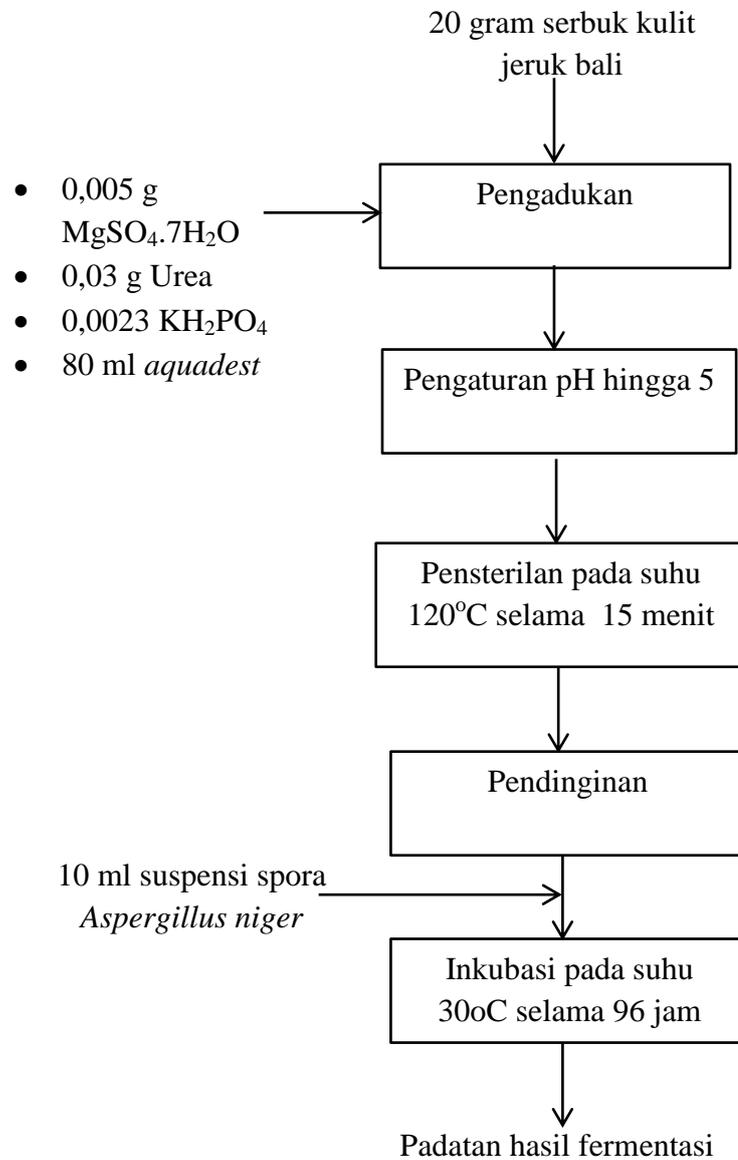


### Lampiran 3. Skema Kerja Pembuatan Enzim

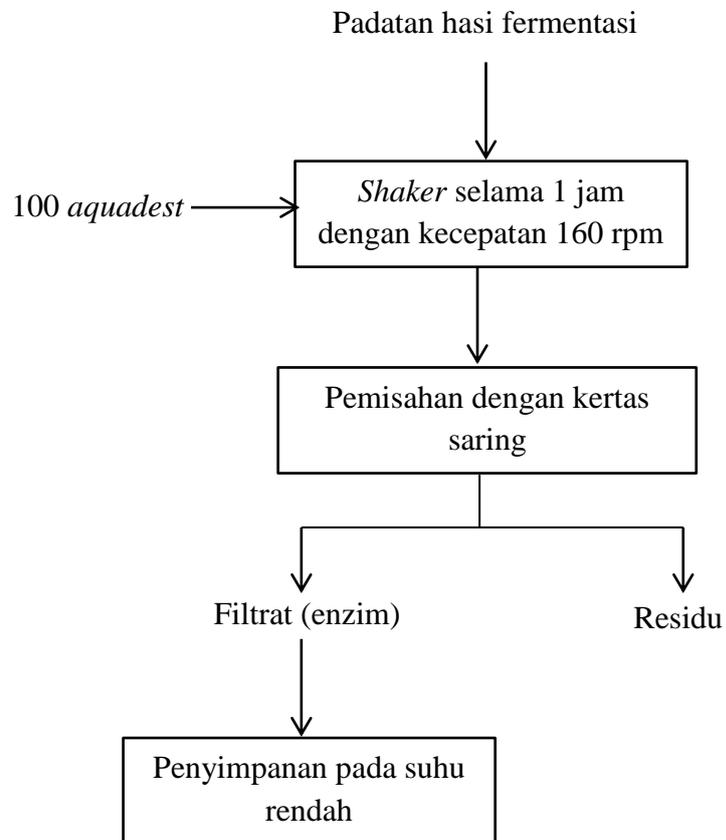
- **Penyiapan inokulum**

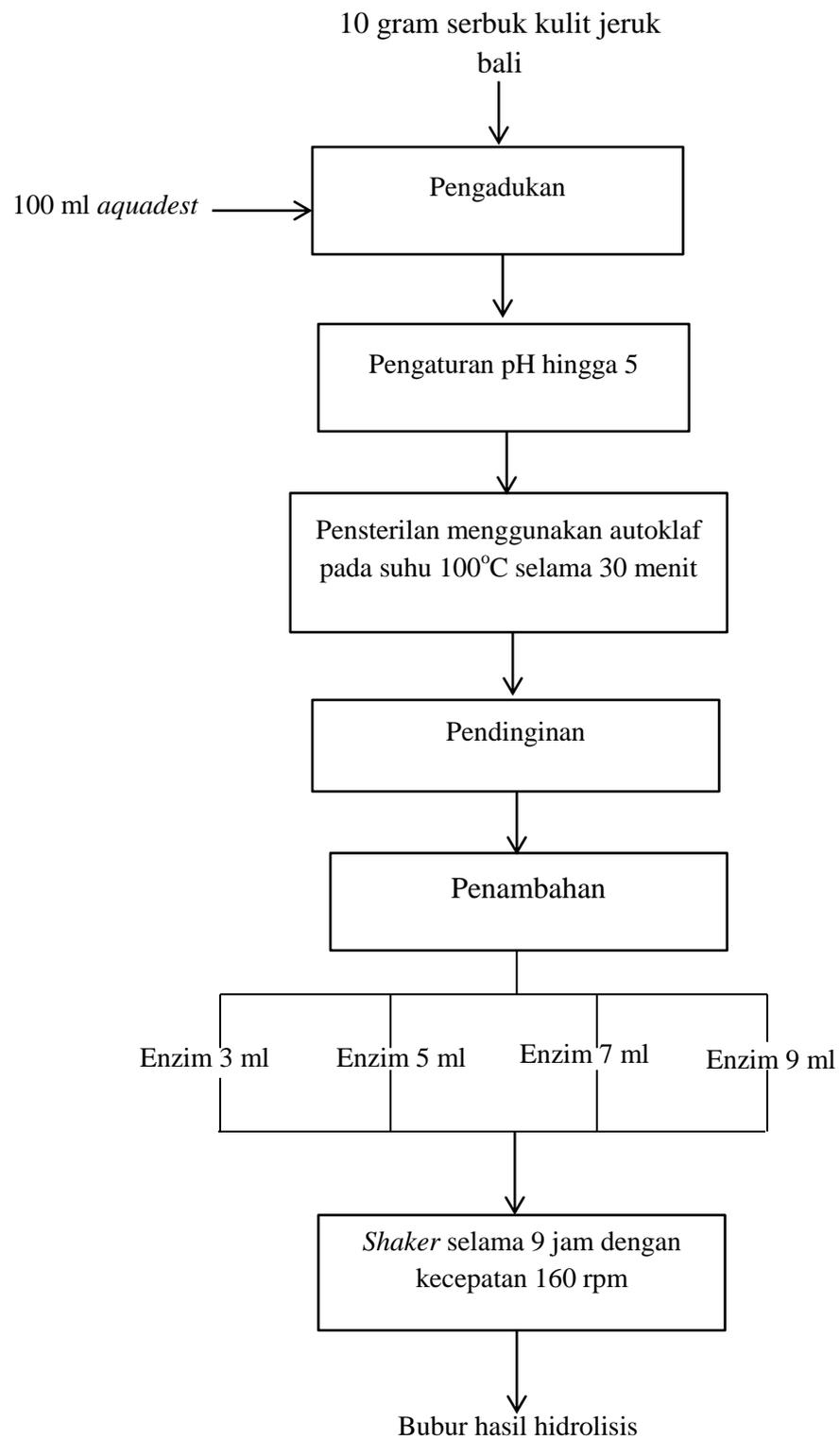


- **Memproduksi enzim**



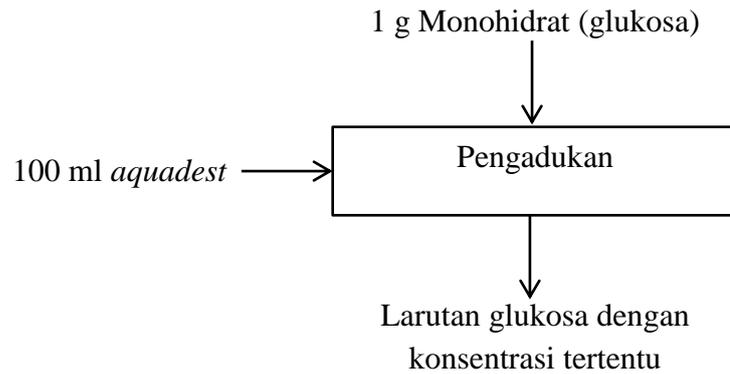
- **Pengambilan enzim**



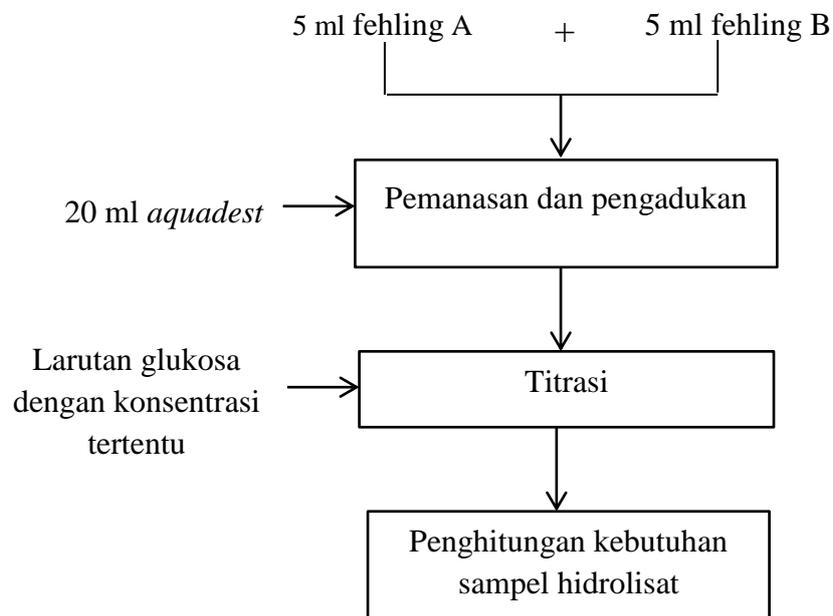
**Lampiran 4. Skema Kerja Hidrolisis Selulosa Secara Enzimatik**

**Lampiran 5. Skema Kerja Analisis Kadar Gula dalam Hidrolisat**

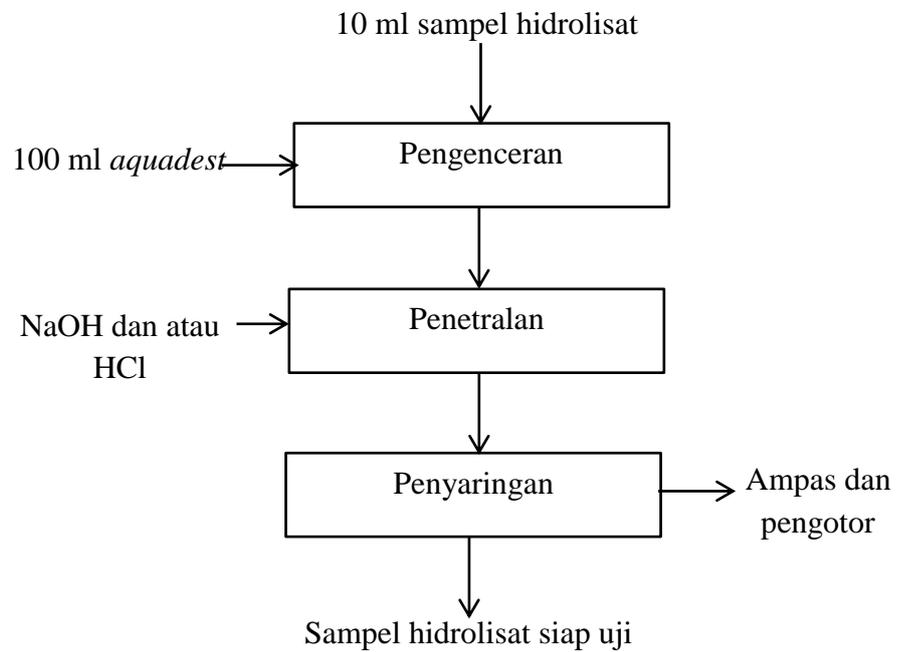
- **Standarisasi larutan fehling**



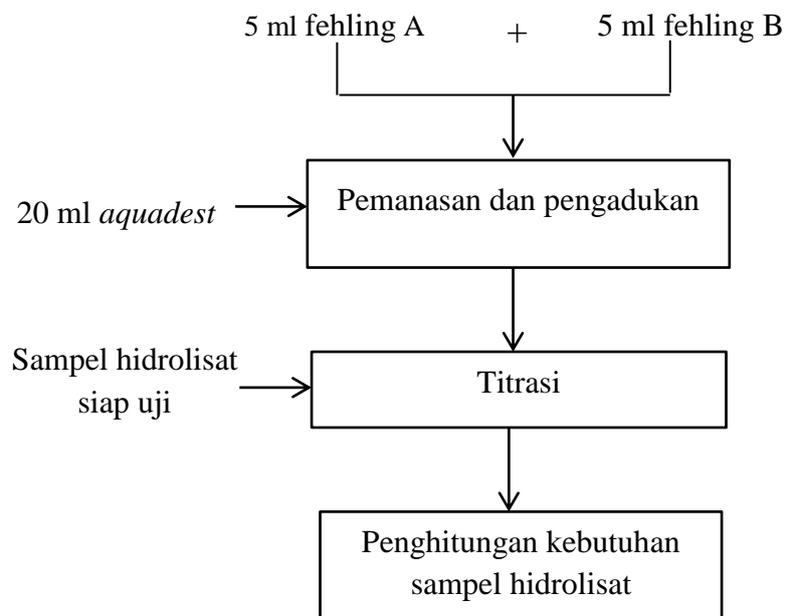
- **Titration fehling**

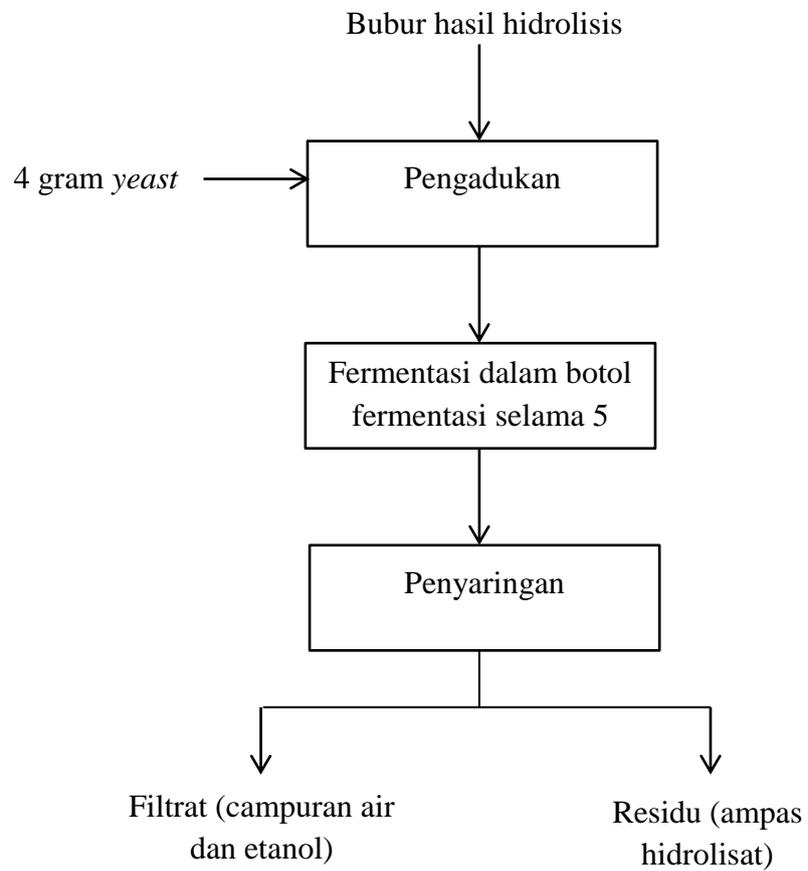


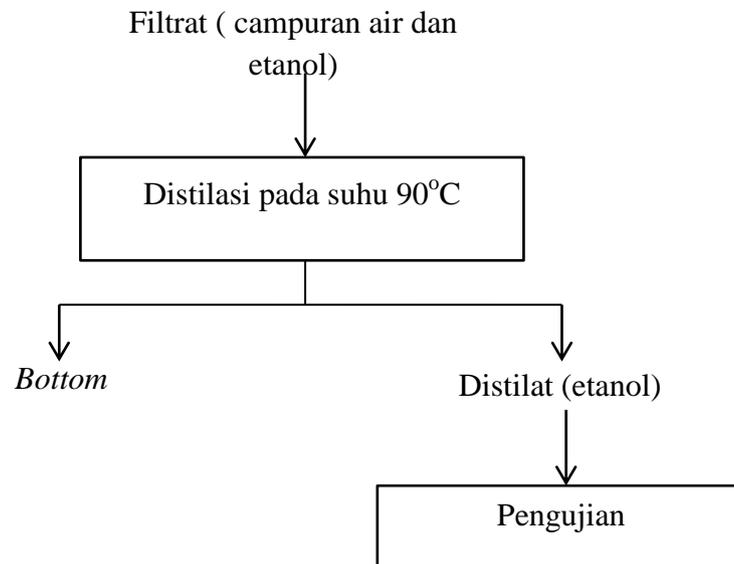
- **Persiapan sampel hidrolisat**



- **Titration fehling**

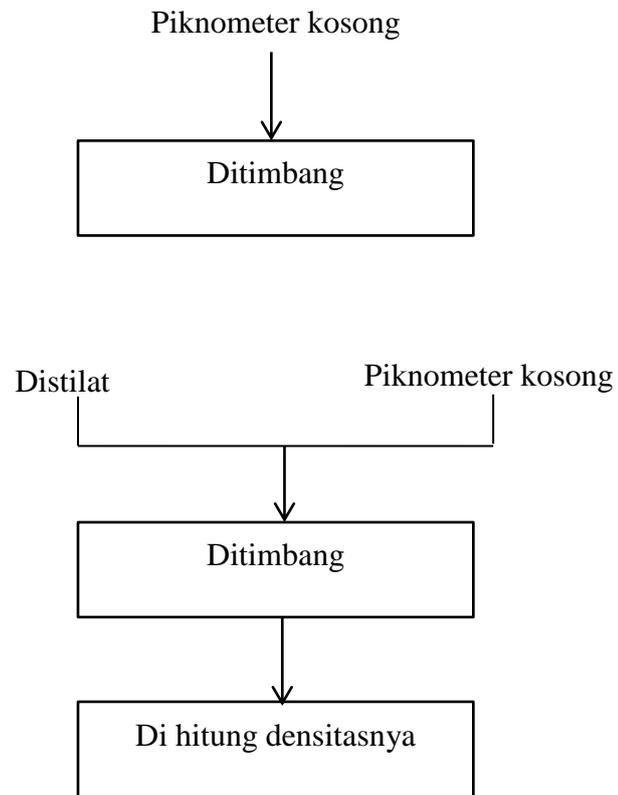


**Lampiran 6. Skema Kerja Fermentasi**

**Lampiran 7. Skema Kerja Distilasi**

**Lampiran 8. Skema Kerja Uji Distilat yang Dihasilkan**

- Uji densitas distilat



## Lampiran 9. Analisis Data

- Analisis data perhitungan konsentrasi gula

- ✓ Konsentrasi gula standart

$$\begin{aligned}
 M_{\text{gula}} &= \frac{m_{\text{gula}}}{mr} \times \frac{1000}{v} \\
 &= \frac{1,0034}{198,17} \times \frac{1000}{100} \\
 &= \frac{1,0034}{108,17} \times 10 \\
 &= 0,050 \text{ M}
 \end{aligned}$$

- ✓ M fehling

$$\begin{aligned}
 M_{\text{gula}} \times V_{\text{gula}} &= M_{\text{fehling}} \times V_{\text{fehling}} \\
 0,050 \times 6,5 &= M_2 \times 30 \\
 M_2 &= 0,010833 \text{ M}
 \end{aligned}$$

- ✓ Konsentrasi gula untuk variabel enzim

- Variabel 3 ml

Kebutuhan rata-rata sampel yang digunakan adalah 16,0 ml dalm 10 ml

$$\begin{aligned}
 M_{\text{gula}} \times V_{\text{gula}} &= M_{\text{fehling}} \times V_{\text{fehling}} \\
 M_1 \times 16 &= 0,010833 \times 10 \\
 M_1 &= 6,770625 \times 10^{-3} \text{ M}
 \end{aligned}$$

- Variabel 5 ml

Kebutuhan rata-rata sampel yang digunakan 24,53 ml dalam 30 ml

$$\begin{aligned}
 M_{\text{gula}} \times V_{\text{gula}} &= M_{\text{fehling}} \times V_{\text{fehling}} \\
 M_1 \times 24,53 &= 0,010833 \times 30 \\
 M_1 &= 0,013248675 \text{ M}
 \end{aligned}$$

- Variabel 7 ml

Kebutuhan rata-rata sampel yang digunakan 20,9 ml dalam 30 ml

$$M_{gula} \times V_{gula} = M_{fehling} \times V_{fehling}$$

$$M_1 \times 20,9 = 0,010833 \times 30$$

$$M_1 = 0,01554976 \text{ M}$$

- Variabel 9 ml

Kebutuhan rata-rata sampel yang digunakan 19,96 ml dalam 30 ml

$$M_{gula} \times V_{gula} = M_{fehling} \times V_{fehling}$$

$$M_1 \times 19,96 = 0,010833 \times 30$$

$$M_1 = 0,0162820 \text{ M}$$

- Analisis data perhitungan densitas etanol

$$\rho = \frac{m_{pikno\ isi} - m_{pikno\ kosong}}{v_{pikno}}$$

- ✓ Variabel 3 ml

$$\rho = \frac{10,07 - 7,77}{2,388263391} = 0,963042857 \text{ gr/ml}$$

- ✓ Variabel 5 ml

$$\rho = \frac{10,05 - 7,77}{2,388263391} = 0,954668571 \text{ gr/ml}$$

- ✓ Variabel 7 ml

$$\rho = \frac{10,06 - 7,79}{2,388263391} = 0,950481428 \text{ gr/ml}$$

- ✓ Variabel 9 ml

$$\rho = \frac{10,04 - 7,77}{2,388263391} = 0,950481428 \text{ gr/ml}$$

- Analisis data perhitungan kadar etanol

- ✓ Variabel 3 ml

Diketahui:

$$x_0 = 30\% \quad y = 0,963042857 \text{ g/ml} \quad y_1 = 0,95821 \text{ gr/ml}$$

$$x_1 = 35\% \quad y_0 = 0,96452 \text{ gr/ml}$$

$$\frac{x - x_0}{x_1 - x_0} = \frac{y - y_0}{y_1 - y_0}$$

$$\frac{x - 30}{35 - 30} = \frac{0,963042857 - 0,96452}{0,95821 - 0,96452}$$

$$\frac{x - 30}{5} = \frac{-0,00148}{-0,00631}$$

$$\frac{x - 30}{5} = 0,23454834$$

$$x - 30 = 1,1727417$$

$$x = 31,173\%$$

- ✓ Variabel 5 ml

$$x_0 = 35\% \quad y = 0,954668571 \text{ g/ml} \quad y_1 = 0,95097 \text{ gr/ml}$$

$$x_1 = 40\% \quad y_0 = 0,95821 \text{ gr/ml}$$

$$\frac{x - x_0}{x_1 - x_0} = \frac{y - y_0}{y_1 - y_0}$$

$$\frac{x - 35}{40 - 35} = \frac{0,954668571 - 0,95821}{0,95097 - 0,95821}$$

$$\frac{x - 35}{5} = \frac{-0,003541429}{-0,00724}$$

$$\frac{x - 35}{5} = 0,4891475$$

$$x - 35 = 2,44573825$$

$$x = 37,446 \%$$

✓ Variabel 7 ml

$$x_0 = 40\% \quad y = 0,950481428 \text{ g/ml} \quad y_1 = 0,94277 \text{ gr/ml}$$

$$x_1 = 45\% \quad y_0 = 0,95097 \text{ gr/ml}$$

$$\frac{x-x_0}{x_1-x_0} = \frac{y-y_0}{y_1-y_0}$$

$$\frac{x-40}{45-40} = \frac{0,950481428-0,95097}{0,94277-0,95097}$$

$$\frac{x-40}{5} = \frac{-0,000488572}{-0,0082}$$

$$\frac{x-40}{5} = 0,059581951$$

$$x-40 = 0,297909756$$

$$x = 40,298 \%$$

✓ Variabel 9 ml

$$x_0 = 40\% \quad y = 0,950481428 \text{ g/ml} \quad y_1 = 0,94277 \text{ gr/ml}$$

$$x_1 = 45\% \quad y_0 = 0,95097 \text{ gr/ml}$$

$$\frac{x-x_0}{x_1-x_0} = \frac{y-y_0}{y_1-y_0}$$

$$\frac{x-40}{45-40} = \frac{0,950481428-0,95097}{0,94277-0,95097}$$

$$\frac{x-40}{5} = \frac{-0,000488572}{-0,0082}$$

$$\frac{x-40}{5} = 0,059581951$$

$$x-40 = 0,297909756$$

$$x = 40,298 \%$$