

# Pemanfaatan Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebagai Bioetanol Generasi Dua (G2) dengan Variasi Konsentrasi Ragi Melalui Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF)

Dikdik Mulyadi<sup>1\*</sup>, Lela Lailatul Khumaisah<sup>1</sup>, Sugiarti Rahayu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Muhammadiyah Sukabumi  
Jalan R Syamsudin S.H No. 50 Sukabumi 43113, Indonesia

\* Penulis korespondensi; E-mail: [dikdik011@ummi.ac.id](mailto:dikdik011@ummi.ac.id)

---

## ABSTRAK

Saat ini ketergantungan Indonesia terhadap energi fosil dalam memenuhi kebutuhan energi di dalam negeri masih tinggi. Di sisi lain, penggunaan bahan bakar fosil sebagai sumber energi nasional merupakan salah satu faktor penyumbang dalam peningkatan emisi gas rumah kaca yang merusak lingkungan. Beranjak dari hal tersebut, maka perlu adanya alternatif lain seperti penggunaan bioetanol yang lebih ramah lingkungan. Biomassa yang dimanfaatkan sebagai bioetanol dalam penelitian ini ialah kulit manggis karena kandungan lignin, selulosa, serta hemiselulosa berturut-turut sebesar 38.2; 30.7; 29.8% yang dapat dikonversi menjadi bioetanol generasi dua. Penelitian terkait pemanfaatan kulit manggis sebagai bioetanol belum banyak dilakukan, sehingga tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui karakteristik dari bioetanol yang dihasilkan serta konsentrasi ragi yang paling optimum dalam menghasilkan volume bioetanol. Metode penelitian yang digunakan dalam produksi bioetanol adalah sakarifikasi menggunakan enzim selulase campuran *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* perbandingan 1:2 dan fermentasi dengan variasi konsentrasi ragi 2; 4; 6 g/100 mL. Proses karakterisasi menggunakan instrumen GC, AAS, pH meter, serta proses titrasi. Penelitian ini memberikan hasil bahwa variasi ragi 6% merupakan konsentrasi yang paling optimum dalam menghasilkan volume bioetanol sebanyak 160 mL.

**Kata kunci:** Bioetanol, Kulit Manggis, SSF.

## ABSTRACT

Currently, Indonesia's dependence on fossil energy in meeting domestic energy needs is still quite high. On the other hand, the use of fossil fuels as a national energy source is one of the contributing factors in the increase in greenhouse gas emissions which are damaging to the environment. Moving on from this, it is necessary to have other alternatives such as the use of more environmentally friendly bioethanol. Biomass used as bioethanol in this study is mangosteen peel because the contents of lignin, cellulose, and hemicellulose respectively large 38.2; 30.7; 29.8% which could be converted into second generation bioethanol. Research related to the use of mangosteen peel as bioethanol has not been carried out, so the aim of this research is to determine the characteristics of the produced bioethanol, as well as the optimum concentration of yeast in producing bioethanol volume. The research method used in the production of bioethanol is saccharification using cellulase enzymes mixed with *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* with a ratio of 1:2 and simultaneous fermentation with variations in yeast concentration 2; 4; 6g/100 mL. The characterization process used GC instrument for the analysis of ethanol and methanol content, and AAS for the analysis of copper metal.

**Keywords:** Bioethanol, mangosteen rind, SSF.

---

## PENDAHULUAN

Selama ini sistem penyediaan energi nasional berorientasi pada penggunaan energi fosil [1]. Energi fosil pada tahun 2014 menyumbang kontribusi sebanyak 94.3% dari keseluruhan keperluan energi nasional sebesar 1.357 juta SBM (setara barel minyak) [2]. Pembakaran bahan bakar fosil

memberikan kontribusi langsung terhadap peningkatan emisi gas rumah kaca yang merusak lingkungan serta menghasilkan gas karbon dioksida (CO<sub>2</sub>), nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>), sulfur oksida (SO<sub>x</sub>), dan logam berat [3]. Permasalahan ini mengindikasikan bahaya besar bagi kehidupan jika terus-menerus bergantung pada energi fosil. Bentuk upaya untuk meminimalisir masalah tersebut ialah dengan

penggunaan sumber energi alternatif, salah satunya yaitu bioetanol. Bioetanol merupakan cairan biokimia dari hasil fermentasi gula bersumber karbohidrat dengan adanya bantuan mikroorganisme yang dilanjutkan proses distilasi [3]. Sumber bahan baku pembuatan bioetanol dibedakan menjadi tiga generasi. Generasi pertama diperoleh dari tanaman yang mengandung glukosa, generasi kedua tanaman yang mengandung lignoselulosa, dan generasi ketiga menggunakan mikroalga. Perhatian dunia saat ini tertuju pada pengembangan produksi bioetanol generasi dua (G2) tentang penggunaan biomassa lignoselulosa yang tak bersaing dengan bahan pangan serta pakan [1]. Kandungan utama dalam biomassa lignoselulosa ialah selulosa, hemiselulosa, juga lignin [1]. Komponen selulosa dan hemiselulosa dengan rentang jumlah kandungan 23 – 52% dan 12 – 30% memiliki potensi menjadi bioetanol. Produksi bioetanol G2 yang berbahan baku lignoselulosa ini dapat diperoleh dari berbagai limbah, seperti limbah pertanian, perkebunan, kehutanan, industri, serta limbah organik perkotaan [1].

Beberapa contoh biomassa lignoselulosa yang memiliki potensi sebagai bahan baku bioetanol adalah limbah jagung, bagas tebu, tandan kosong, serta kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.). Hasil penelitian terdahulu didapat data bahwa kulit manggis mengandung glukosa, galaktosa, serta manosa sebanyak 10.03, 1.20, dan 1.17% [4]. Adanya kandungan tersebut dapat dikonversi menjadi bioetanol generasi satu (G1) yang berbahan baku glukosa. Selain itu, kulit manggis diketahui memiliki kandungan lignoselulosa di mana komposisinya adalah selulosa 26.22%, hemiselulosa 15.39%, dan lignin 48.52% [5]. Komponen selulosa maupun hemiselulosa bisa dikonversi menjadi etanol yang disebut sebagai bioetanol generasi dua (G2). Hal ini menunjukkan bahwa kulit manggis memiliki potensi yang tinggi untuk diproduksi menjadi bioetanol generasi dua (G2) berbahan baku lignoselulosa.

Penelitian terkait pemanfaatan limbah kulit manggis sebagai bioetanol G1 telah dilakukan terdahulu melalui metode hidrolisis dan fermentasi terpisah (SHF). Penggunaan metode tersebut menghasilkan bioetanol sebesar 63.2 g/kg limbah kulit manggis dengan hasil konversi etanol 75% [6]. Namun, penelitian produksi bioetanol G1 yang telah dilakukan masih terdapat kekurangan, yaitu limbah kulit manggis yang sulit dihidrolisis karena tingginya proporsi lignin di dinding sel. Oleh karena itu, pada penelitian selanjutnya akan dilakukan produksi bioetanol G2 dari kulit manggis. Proses produksi bioetanol G2 akan melalui tahapan delignifikasi secara kimia untuk mengurangi kadar lignin sehingga lebih mudah dihidrolisis. Metode yang digunakan untuk produksinya yaitu *Simultaneous Saccharification Fermentation* (SSF). Prinsip kerja metode ini menggabungkan tahap hidrolisis dan fermentasi. Alasan pemilihan metode SSF karena

biaya modal lebih rendah, serta pada prosesnya gula yang dilepaskan akan langsung dikonsumsi oleh sel-sel yang memfermentasi, sehingga secara tidak langsung dapat mencegah penghambatan selulase dengan risiko kontaminasi yang rendah. Beberapa penelitian terkait produksi bioetanol melalui proses SSF menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dibanding metode lainnya [7 – 10]. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui konsentrasi ragi optimum serta karakteristik dari bioetanol yang dihasilkan.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini di antaranya gelas kimia, erlenmeyer, seperangkat alat distilasi, gelas ukur, penangas air, pengaduk, neraca analitik, kertas saring, grinder, oven, pH meter, cawan petri, ayakan mesh 80, *autoclave*, *water bath*, sentrifugasi, kertas lakmus, kertas saring, corong gelas, seperangkat alat titrasi, instrumen *Gas Chromatography* (GC), dan *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS). Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 72%,  $H_2SO_4$  1 N dan 4 N, natrium hidroksida (NaOH) 10%, NaOH 0.01 N, ragi instan, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, magnesium sulfat heptahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), amonium sulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ ), asam klorida (HCl) pekat 37%, asam nitrat ( $HNO_3$ ) 68%, kalium dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4$ ), urea, kalsium klorida monohidrat ( $CaCl_2 \cdot H_2O$ ), indikator fenolftalein, Tween 80, kalium ferrosianida ( $K_4Fe(CN)_6$ ), kalium iodida (KI), natrium tiosulfat ( $Na_2S_2O_3$ ) 0.1 N, larutan perak nitrat ( $AgNO_3$ ) 0.1 N, larutan amilum ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> 1%, larutan iodin 0.025 N, larutan luff schrool, Zn asetat ( $Zn(CH_3CO_2)_2$ ), serta akuades

### Prosedur Penelitian

#### Preparasi Sampel

Kulit manggis dibersihkan dari kotoran, lalu dicacah hingga berukuran kecil. Selanjutnya kulit manggis tersebut dikeringkan dan dilakukan penggilingan menggunakan grinder agar memperkecil kembali ukuran sampel, lalu diayak dengan ayakan ukuran 80 mesh. Analisis kadar glukosa, selulosa, hemiselulosa, dan lignin [11].

#### Delignifikasi

Serbuk kulit manggis yang telah diperoleh ditimbang sebanyak 100 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 mL. Berikutnya ditambahkan NaOH 10% hingga tanda batas, lalu diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 85°C selama satu jam. Selanjutnya sampel disaring dan dicuci hingga pH

netral. Setelah itu dikeringkan dalam oven menggunakan suhu 105°C selama 6 jam. Analisis kadar glukosa, selulosa, hemiselulosa, dan lignin [11].

### Analisis Kadar Selulosa dan Hemiselulosa

Satu gram sampel kering (a) ditambahkan 150 mL akuades, lalu direfluks pada suhu 100°C dalam *water bath* selama satu jam. Hasil refluks disaring dan dicuci dengan air panas lalu residu ditimbang (b). Setelah ditimbang, residu ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks dengan *water bath* selama satu jam pada suhu 100°C. Hasil refluks disaring, dicuci dengan akuades sampai netral, dan dikeringkan lalu ditimbang (c). Residu kering ditambahkan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Setelah itu ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks dalam *water bath* selama satu jam. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral, lalu dipanaskan dengan oven pada suhu 105°C dan hasilnya ditimbang (d). Residu selanjutnya ditambahkan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Setelah itu ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks dalam *water bath* selama satu jam. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral, lalu dipanaskan dengan oven pada suhu 105°C dan hasilnya ditimbang (e). Kadar lignin, selulosa, dan hemiselulosa dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$a. \text{ Kadar hemiselulosa} = \frac{b-c}{a} \times 100$$

$$b. \text{ Kadar selulosa} = \frac{c-d}{a} \times 100$$

$$c. \text{ Kadar lignin} = \frac{d-e}{a} \times 100$$

### Analisis Kadar Lignin Metode Klason [12]

Satu gram sampel kering (a) ditambahkan 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Setelah itu ditambahkan 150 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N dan direfluks dalam *water bath* selama satu jam. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral, lalu dipanaskan dengan oven pada suhu 105°C dan hasilnya ditimbang (b). Selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (c).

$$\text{Kadar lignin (\%)} = \frac{b-c}{a} \times 100$$

### Peremajaan Kultur Stok *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*

Media PDA disiapkan pada cawan petri. Strain induk *T. reesei* dan *A. niger* diambil menggunakan kawat ose steril. Strain induk yang menempel pada kawat ose digesekkan pada media PDA, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Kultur dalam cawan petri ini berperan sebagai sel stok dan disimpan pada alat pendingin dengan suhu 4°C agar dapat digunakan pada penelitian selanjutnya.

### Pembuatan Larutan Nutrisi

Dilarutkan urea sebanyak 3 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.5 g/L dalam 1 liter akuades. Setelah itu diukur pH awal dan diatur hingga pH 5 untuk *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*.

### Produksi Enzim [13]

Larutan nutrisi sebanyak 200 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 20 g limbah padat kulit manggis yang sudah didelignifikasi lalu ditutup. Campuran tersebut kemudian disterilisasikan pada suhu 121°C selama 15 menit di dalam autoclave dan didinginkan. Setelah itu diinokulasikan satu blok agar *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* ke dalam media tersebut secara terpisah diinkubasi selama 6 dan 8 hari pada suhu ruang.

### Ekstraksi Enzim

Ekstraksi hasil produksi enzim menggunakan larutan tween 80 dengan konsentrasi 0.1% sebanyak 100 mL. Selanjutnya campuran tersebut diaduk dengan kecepatan 100 rpm selama 120 menit pada suhu ruang. Setelah itu dilakukan proses sentrifugasi menggunakan kecepatan 6000 rpm dengan lama waktu 10 menit. Supernatan yang dihasilkan tersebut lalu dipisahkan sebagai ekstrak enzim kasar.

### Produksi Bioetanol [13]

Sebanyak 15 gram limbah kulit manggis padat yang telah terdelignifikasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL, ditambahkan larutan nutrisi steril sebanyak 300 mL. Selanjutnya dilakukan proses sakarifikasi dan fermentasi secara serempak (SSF) menggunakan enzim dan ragi roti secara bersamaan. Enzim yang digunakan sebanyak 45 mL dengan perbandingan enzim dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* yaitu 1:2. Ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* ditambahkan dengan variasi konsentrasi 2; 4; dan 6 g/100 mL. Proses produksi bioetanol secara SSF dilakukan selama 96 jam. Setelah proses SSF selesai, larutan kemudian disaring dan filtrat yang dihasilkan lalu dilakukan proses distilasi.

### Distilasi [14]

Setelah proses fermentasi selesai, dirangkai alat untuk distilasi. Berikutnya dimasukkan cairan hasil fermentasi ke dalam labu distilasi dan dialirkan air sebagai pendingin melalui kondensor. Suhu yang digunakan pada *thermocontrol* adalah 78°C sesuai dengan titik didih etanol. Setelah didapatkan hasil

distilasi pertama, diukur volumenya. Konsentrasi ragi yang memberikan hasil volume etanol tertinggi selanjutnya dilakukan proses karakterisasi.

### Karakterisasi Produk Bioetanol

Pengujian kadar etanol, metanol, serta air dilakukan menggunakan instrumen GC, kandungan asam asetat dengan titrasi asam basa, kandungan tembaga menggunakan instrumen AAS, kandungan ion klorida melalui titrasi argentometri, sulfur melalui titrasi iodometri, pH menggunakan pH meter, dan tampilan dilakukan secara visual.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

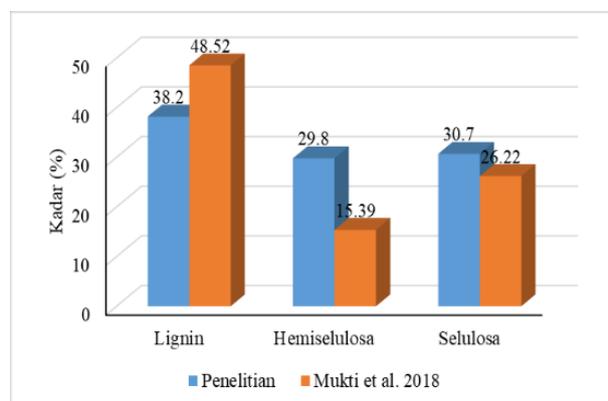
### Kadar Lignoselulosa sebelum Delignifikasi

Kulit manggis yang telah melalui proses preparasi, selanjutnya dilakukan analisis kadar lignoselulosa serta glukosa dan didapat data bahwa kandungan lignoselulosa dari kulit manggis sebelum delignifikasi tersaji pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kandungan lignoselulosa dan glukosa kulit manggis sebelum delignifikasi

Komponen	Kadar (%)
Lignin	38.2
Hemiselulosa	29.8
Selulosa	30.7
Glukosa	7.05

Berdasarkan data tersebut, terdapat perbedaan kandungan lignoselulosa pada penelitian ini dan terdahulu yang tersaji dalam Gambar 1. Faktor yang mempengaruhi proporsi tersebut dapat disebabkan karena jenis dan kondisi tanah, budidaya tanaman, serta daerah tanam yang berbeda, sehingga menghasilkan proporsi yang berbeda pula.



**Gambar 1.** Perbedaan kandungan lignoselulosa.

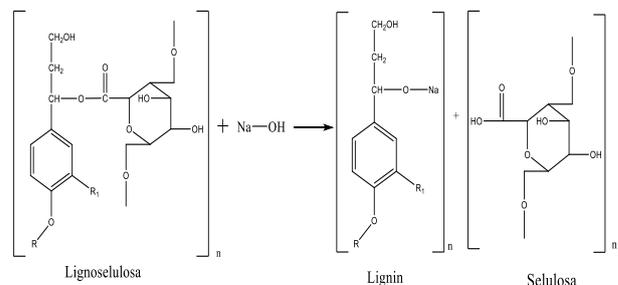
Pada data tersebut dapat diketahui bahwa proporsi lignin dalam sampel masih tinggi. Tingginya kadar lignin dalam sampel dapat menghambat hidrolisis selulosa serta hemiselulosa. Ketahanan terhadap hidrolisis ini disebabkan adanya eter [1].

Eter (R-O-R) adalah senyawa organik di mana atom oksigen terikat dengan dua gugus alkil. Panjangnya ikatan gugus alkil menentukan kelarutan eter dalam air. Semakin panjang gugus alkil, maka semakin rendah kelarutan dalam air. Hal ini karena gugus alkil dalam bentuk hidrokarbon bersifat hidrofobik yakni menolak molekul air. Oleh karena itu, kulit manggis yang telah melalui tahap preparasi dilanjutkan dengan proses delignifikasi.

### Delignifikasi

Penggunaan NaOH sebagai katalis dalam tahapan delignifikasi dikarenakan NaOH merupakan basa kuat untuk proses delignifikasi yang berdampak pada meningkatnya hasil hidrolisis enzim dibanding *pre-treatment* menggunakan alkali lainnya [19]. Larutan NaOH dalam *pre-treatment* berfungsi menyerang dan merusak struktur lignin. Selain itu, NaOH mampu menghilangkan lignin secara selektif, menurunkan derajat polimerisasi, menurunkan kristalinitas selulosa, memisahkan ikatan struktural antara lignin dan karbohidrat, serta mampu meningkatkan porositas dan luas permukaan serbuk kulit manggis sehingga dapat meningkatkan performa hidrolisis enzimatik.

NaOH merupakan basa yang bersifat nukleofil akan menyerang atom C pada karbonil dari lignoselulosa karena bersifat elektrofil. Penyerangan nukleofilik ini akan mengakibatkan putusannya ikatan rangkap pada karbonil (C=O). Kemudian, serangan nukleofilik ini akan diikuti eliminasi gugus -OR atau dengan kata lain, gugus -OR menjadi gugus pergi. Ketika gugus -OR pergi, maka akan terbentuk kembali ikatan rangkap dan menghasilkan gugus karbonil. Reaksi eliminasi ini menyebabkan putusannya struktur dasar lignin dan selulosa. Pada struktur lignin, ion O<sup>-</sup> yang kaya akan elektron menyebabkan ion Na<sup>+</sup> dari natrium hidroksida mendekat dan membentuk natrium fenolat (Gambar 2). Garam fenolat ini bersifat mudah larut dan akan larut saat proses pencucian. Reaksi yang terjadi dari proses delignifikasi menggunakan NaOH tersaji pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Reaksi delignifikasi dengan NaOH.

Penggunaan suhu 85°C dalam proses *pre-treatment* dikarenakan suhu tersebut adalah suhu moderat di mana apabila terlalu rendah, maka lignin

belum terurai. Namun, jika suhu terlalu tinggi, maka selulosa ikut terdegradasi dan terlarut [1,14]. Selain itu, penggunaan suhu 105°C setelah proses pencucian bertujuan untuk menghilangkan kandungan air. Hasil dari proses ini terdapat perubahan warna sampel di mana warna awal sampel adalah *orange*, lalu berubah menjadi lebih kecokelatan. Perubahan ini disebabkan karena lignin adalah polimer acak dan kompleks yang mengandung struktur kromoforik dalam hal ini senyawa aromatik dalam hal ini senyawa aromatik yang bertanggung jawab atas warna kayu pada tumbuhan [20]. Warna tersebut dihasilkan dari absorpsi cahaya oleh gugus kromofor [21]. Kromofor merupakan gugus tak jenuh yang bertanggung jawab terhadap terjadinya absorpsi elektronik, misalnya C=C dan C=O, NO<sub>2</sub> [22]. Setelah proses delignifikasi, terjadi degradasi struktur kromoforik yang mengakibatkan penurunan kecerahan warna akibat dari rusaknya struktur lignin merupakan gugus tak jenuh yang bertanggung jawab terhadap terjadinya absorpsi elektronik, misalnya C=C dan C=O, NO<sub>2</sub> [18]. Setelah proses delignifikasi, terjadi degradasi struktur kromoforik yang mengakibatkan penurunan kecerahan secara umum. Sampel yang telah terdelignifikasi selanjutnya dilakukan analisis kadar lignin, selulosa, hemiselulosa, dan glukosa (Tabel 2).

**Tabel 2.** Kandungan lignoselulosa dan glukosa kulit manggis setelah delignifikasi

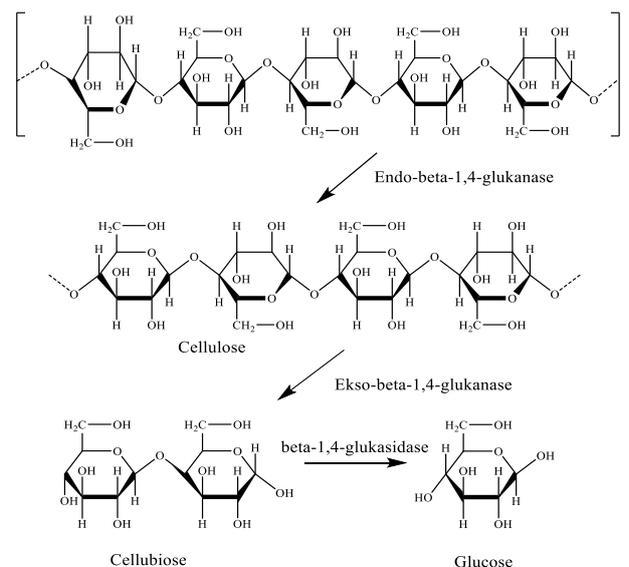
Komponen	Kadar (%)
Lignin	18.1
Hemiselulosa	47.6
Selulosa	60.6
Glukosa	0

Hasil analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa telah terjadi penurunan kadar lignin dan terdapat peningkatan kadar selulosa serta hemiselulosa. Peningkatan kadar hemiselulosa juga selulosa disebabkan oleh ikatan lignin yang terputus dari biomassa akibat degradasi pada alfa dan beta lignin. Larutan NaOH bertujuan untuk merusak struktur lignin dalam biomassa dan dapat mengekstraksi selulosa serta hemiselulosa dengan memecah struktur lignoselulosa [10]. Pecahnya ikatan lignoselulosa mengakibatkan kandungan selulosa dan hemiselulosa meningkat [19 – 20]. Sementara itu, terdapat penurunan kadar glukosa dari sampel kulit manggis setelah delignifikasi. Hal ini disebabkan karena penggunaan suhu yang cukup tinggi pada saat proses delignifikasi. Menurut hasil kajian literatur, diketahui bahwa monosakarida akan mudah terdegradasi pada suhu yang tinggi [21].

### Produksi Enzim Selulase

Pada tahap produksi enzim selulase, jamur yang digunakan sebagai penghasil enzim tersebut

ialah campuran dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*. Penggunaan kedua jamur tersebut dikarenakan berdasarkan hasil kajian literatur, diketahui bahwa *Trichoderma reesei* menghasilkan endo-β-1,4-glukanase 20 – 36%, ekso-β-1,4-glukanase 60 – 80%, dan β-1,4-glukosidase 1%, sehingga molekul yang dihasilkannya bukan glukosa, melainkan selubiosa. Sementara itu, *Aspergillus niger* menghasilkan β-1,4-glukosidase yang tinggi sedangkan endo-β-1,4-glukanase, ekso-β-1,4-glukanase rendah [22]. Tahapan tersebut tersaji pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Mekanisme hidrolisis dengan enzim selulase.

Pada proses produksi enzim selulase diperlukan adanya penambahan larutan nutrisi. Hal ini karena pertumbuhan jamur pada media fermentasi dipengaruhi oleh nutrisi yang ada dalam substrat [23]. Nutrisi yang diperlukan oleh jamur terdiri atas unsur karbon (C), nitrogen (N), hidrogen (H), mineral seperti fosfor (P), sulfur (S), kalsium (Ca), kalium (K), dan magnesium (Mg). Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel kulit manggis terdelignifikasi. Keberadaan karbon berfungsi sebagai unsur utama pembentukan sel. Kemudian, urea (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) dan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> digunakan sebagai sumber nitrogen yang berfungsi untuk pertumbuhan serta sekresi enzim. Sementara itu, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O merupakan sumber magnesium, kalsium, kalium yang diperlukan sebagai pengendapan senyawa-senyawa kimia yang dapat mengganggu pertumbuhan jamur *A. niger* dan *T. reesei* [23].

Proses pembuatan larutan nutrisi perlu adanya kontrol derajat keasaman di mana pH yang diperlukan adalah pH 5. Menurut hasil kajian literatur, pH 5 merupakan pH optimum untuk pertumbuhan *A. niger* dan *T. reesei*. Penelitian terdahulu terkait hidrolisis enzimatis selulosa dari ampas tebu dengan adanya variasi pH 4, 5, dan 6 dalam proses hidrolisis, memberikan hasil pH 5 menghasilkan

kadar glukosa paling tinggi, lalu terjadi penurunan pada pH 6. Hal ini karena enzim selulase yang bekerja pada pH selain pH optimum akan mengalami perubahan struktur atau muatan asam amino yang merupakan sisi aktif untuk pengikatan substrat. Hal ini mengakibatkan terganggunya interaksi antara sisi aktif enzim selulase dengan substrat selulosa [13].

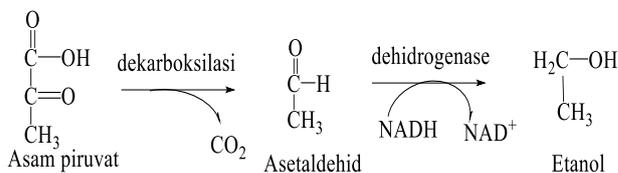
### Produksi Bioetanol

Proses penambahan enzim selulase campuran *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* perbandingan 1:2 dalam produksi bioetanol didasari karena *Trichoderma reesei* menghasilkan lebih banyak endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4-glukanase, sehingga molekul yang dihasilkannya bukan glukosa, melainkan selubiosa. Sementara itu, *Aspergillus niger* menghasilkan  $\beta$ -1,4-glukosidase yang tinggi sedangkan endo- $\beta$ -1,4-glukanase, ekso- $\beta$ -1,4-glukanase rendah [26]. Hal tersebut didukung pula dengan hasil penelitian terkait pengaruh perbandingan campuran *A. niger* dan *T. reesei* terhadap efektivitas proses hidrolisis, diperoleh data bahwa perbandingan 1:2 merupakan kondisi yang paling optimum. Hal ini dimungkinkan karena jumlah endo dan ekso glukonase lebih banyak, sehingga menghasilkan selubiosa yang banyak pula dan dengan penambahan *A. niger* sebagai penghasil  $\beta$ -1,4-glukosidase akan memotong rantai selubiosa menjadi glukosa [27, 29].

Penambahan campuran enzim selulase ini dilakukan secara bersamaan dengan ragi. Konsentrasi ragi *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2; 4; 6 g/100 mL. Pemilihan *Saccharomyces cerevisiae* sebagai mikroba dikarenakan dapat tumbuh dalam kondisi anaerob maupun aerob, menghasilkan enzim zimase untuk mengubah glukosa menjadi etanol, pertumbuhan sederhana, media murah, fermentasi murni dengan ketahanan terhadap inhibitor, serta menghambat kontaminan dari kondisi pertumbuhan [1]. Sebagai komponen utama dalam fermentasi, *S. cerevisiae* memengaruhi jumlah rendemen etanol [30]. Pemilihan fermentasi selama 96 jam dikarenakan waktu tersebut merupakan kondisi optimal untuk menghasilkan kadar bioetanol yang tinggi. Sementara itu, apabila waktu kurang dari 96 jam belum mencapai titik optimal karena *S. cerevisiae* masih berada pada fase lag/adaptasi. Apabila lebih dari 96 jam, mikroba mengalami kematian yang ditandai dengan menurunnya kadar etanol. Fase kematian dapat terjadi karena *S. cerevisiae* kekurangan nutrisi, kadar glukosa semakin berkurang, dan terjadi pembentukan produk lanjutan dari proses SSF berupa asam cuka, atau keracunan etanol [14, 15, 31 – 32]. Mekanisme fermentasi tersaji pada Gambar 4.

Selama proses fermentasi berlangsung, terbentuk gelembung yang banyak pada hari pertama, lalu mengalami penurunan jumlah gelembung

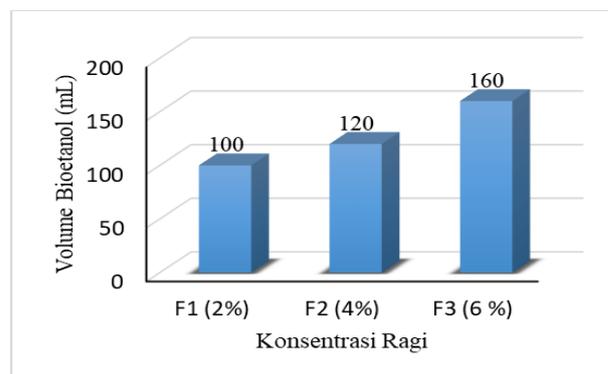
hingga hari ketiga. Pembentukan gelembung ini dikarenakan saat proses konversi glukosa menjadi etanol akan menghasilkan gas berupa karbon dioksida.



Gambar 4. Mekanisme fermentasi alkohol.

### Distilasi

Dasar pemisahan dari distilasi sederhana ialah perbedaan titik didih yang jauh atau dengan salah satu komponen bersifat volatil. Jika campuran dipanaskan, maka komponen yang titik didihnya lebih rendah akan menguap terlebih dahulu [32]. Tahapan ini memberikan hasil bahwa volume bioetanol paling banyak diperoleh dari sampel dengan perlakuan variasi konsentrasi ragi 6% sebanyak 160 mL, sedangkan volume terendah dihasilkan dari konsentrasi ragi 2% sebanyak 100 mL. Pengaruh konsentrasi ragi terhadap volume bioetanol yang dihasilkan tersaji pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh variasi konsentrasi ragi

Berdasarkan data tersebut, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ragi, maka semakin banyak pula volume bioetanol yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu terkait pengaruh variasi konsentrasi ragi dalam produksi bioetanol dan memberikan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi, kadar bioetanol akan semakin banyak, lalu akan turun setelah melewati titik optimumnya [13, 29, 33, 34]. Menurut hasil kajian literatur, hal tersebut dikarenakan semakin tinggi kadar *S. cerevisiae* yang diberikan, maka akan mempengaruhi interaksi *S. cerevisiae* dalam menggunakan sumber nutrisi, dan semakin lama berinteraksi maka mortalitas dari sel ragi akan semakin menurun yang berdampak pada optimalisasi proses fermentasi [33]. Sampel yang memberikan volume bioetanol paling tinggi selanjutnya dilakukan distilasi kedua dengan perolehan bioetanol 70 mL, lalu dilanjutkan dengan proses karakterisasi produk bioetanol.

### Karakterisasi Bioetanol

Berdasarkan hasil karakterisasi bioetanol dari kulit manggis, diperoleh data yang tersaji pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil karakterisasi bioetanol

Parameter	Hasil	Standar*	Metode
Etanol	2%	94 – 99,5%	GC
Metanol	38%	0,5%	GC
Tampakan	Jernih	Jernih	Visual
pH	8.61	6,5 – 9,0	pH meter
Cl	4.96 mg/L	40 mg/L (maks)	Argentometri
Cu	0.0065 mg/L	0.1 mg/L (maks)	AAS
Sulfur	11.6 mg/L	50 mg/L (maks)	Titration
Asam asetat	13.5 mg/L	30 mg/L (maks)	Titration alkalimetri
Air	59%	0,7%	GC

\*Standar mutu bahan bakar jenis bioetanol menurut Keputusan Direktur Jenderal Minyak dan Gas Bumi nomor 23204 tahun 2008.

Berdasarkan data yang telah diperoleh dari Tabel 3, diketahui hasil pengujian menggunakan instrumen GC menunjukkan bahwa kandungan etanol dalam sampel bioetanol masih sangat rendah. Sementara itu, kandungan air dan metanol melebihi standar mutu bahan bakar jenis bioetanol. Rendahnya kandungan etanol dan tingginya kandungan air disebabkan karena proses distilasi yang belum optimal, sehingga perlu dilakukan distilasi berulang untuk mencapai konsentrasi etanol yang sesuai. Keberadaan air dalam konsentrasi yang cukup tinggi dapat menyebabkan bahan bakar sulit terbakar [36, 37]. Selain itu, adanya kandungan metanol diketahui sebagai produk samping dari hasil fermentasi.

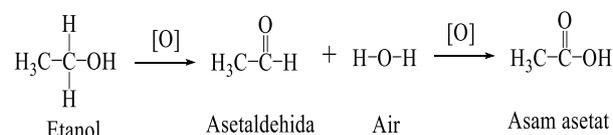
Kemudian, proses karakterisasi bioetanol terkait tampakan diketahui bahwa sampel bioetanol kulit manggis telah sesuai dengan standar yaitu jernih dan tidak terdapat endapan. Faktor yang memengaruhi sampel bioetanol menjadi jernih ialah proses distilasi di mana proses ini merupakan cara yang efektif untuk menjernihkan cairan dari kontaminan-kontaminan yang tidak diinginkan.

Selanjutnya, kandungan ion klorida dalam sampel bioetanol telah memenuhi standar mutu bahan bakar jenis bioetanol. Apabila melebihi ketentuan, maka akan menyebabkan korosif pada mesin. Hal ini dikarenakan ion klorida bersifat sangat korosif dan dapat menurunkan performa mesin [38]. Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian terdahulu berbahan baku limbah pabrik brem di mana kandungan ion klorida 5.93 mg/L [39]. Adanya kandungan ion klorida sampel bioetanol kulit manggis disebabkan penambahan larutan nutrisi yang mengandung kalsium klorida di mana senyawa tersebut merupakan larutan garam yang dapat terionisasi menjadi  $Ca^{2+}$  dan  $2Cl^-$ .

Berikutnya, kandungan tembaga dan sulfur dalam bioetanol kulit manggis telah memenuhi standar mutu bahan bakar. Berdasarkan data pada Tabel 4, diketahui bahwa kandungan sulfur bioetanol kulit manggis lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian terdahulu berbahan baku limbah pabrik brem. Hal ini disebabkan karena adanya penambahan bahan kimia berupa magnesium sulfat dan amonium sulfat dalam larutan nutrisi yang digunakan. Kandungan senyawa tersebut dapat berkontribusi meningkatkan kandungan sulfur. Kandungan sulfur dalam bahan bakar yang melebihi ketentuan dapat menyebabkan kerusakan pada mesin dikarenakan terbentuknya lapisan kerak pada ruang bakar, tangki bahan bakar, dan pipa pembuangan [38].

Beranjak pada hasil karakterisasi lainnya, bioetanol kulit manggis diketahui memiliki pH 8.63. Sementara itu, hasil pH bioetanol penelitian terdahulu ialah 7.15 [39]. Nilai tersebut lebih rendah dibandingkan sampel bioetanol kulit manggis. Faktor yang menyebabkan pH sampel bioetanol kulit manggis cukup tinggi adalah pada saat proses pencucian kulit manggis pasca delignifikasi sulit netral. Hal ini mengakibatkan pH kulit manggis lebih basa dan berdampak pada hasil karakterisasi yang hampir melebihi standar mutu bahan bakar bioetanol. Apabila pH produk bioetanol terlalu asam atau basa dapat menyebabkan korosif pada alat pembakaran.

Parameter terakhir yang diuji ialah kandungan asam asetat. Dari data Tabel 3 diketahui bahwa kandungan asam asetat bioetanol kulit manggis tidak melebihi standar mutu bahan bakar. Asam asetat tersebut dapat berasal dari kontaminasi atau penguraian/oksidasi etanol selama penyimpanan, distribusi, dan/atau pembuatan etanol [14] (Gambar 6). Larutan encer asam organik dengan berat molekul rendah, seperti asam asetat, sangat korosif terhadap sebagian besar logam, sehingga konsentrasinya ditekankan serendah mungkin [39].



**Gambar 6.** Reaksi oksidasi etanol.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi ragi paling optimum dalam menghasilkan volume bioetanol tertinggi adalah konsentrasi 6%.
2. Beberapa karakteristik bioetanol kulit manggis telah sesuai dengan ketentuan umum standar mutu bioetanol untuk campuran BBM meliputi, nilai pH, kadar keasamaan sebagai asam asetat, kadar ion klorida, tembaga, belerang, dan

tampakan. Namun, parameter kadar etanol, mentanol, dan air dalam sampel belum memenuhi standar mutu bahan bakar.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya sampaikan kepada pembimbing, serta instansi yang telah membantu serta menunjang pelaksanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sudyani Y, Syahrul Aiman, Dieni Mansur. 2019. *Perkembangan Bioetanol G2; Teknologi Perspektif*. Jakarta: LIPI Press.
- [2] Purnomo Hadi. 2014. *Laporan Dewan Energi Nasional*. Jakarta: Dewan Energi Nasional Republik Indonesia.
- [3] Hermawati Wati, Haznan Abimanyu, Nanang Roffandi Ahmad, Dwi Susilaningih, Ishelina Rosaira, Prakoso Bhairawa Putera. 2014. *Konversi Biomassa untuk Energi Alternatif di Indonesia: Tinjauan Sumber Daya, Teknologi, Manajemen, dan Kebijakan*. Jakarta: LIPI Press.
- [4] Senu Zamila Mohd, Maryam Husin, Abd Rashid Li, Rusnah Samsuddin, Mohd Radzi Ahmad, Nik Roslan Nik Abd Rashid, Nur Zalikha Mohd Taza. 2015. Production of Glucose, Galactose, and Mannose from the Skins of Durian and Mangosteen. *Springer Science-Business Media Singapore*.
- [5] Mukti Nur Indah Fajar, Imam Prasetyo, Aswati Mindaryani, dan Shofwatunnaida S. 2018. Preparation of Porous Carbon as Ethylene Adsorbent by Pyrolysis of Extraction Waste Mangosteen Rinds. *EDP Science*.
- [6] Cho Eun Jin, Chan Song Park, Gahui Gwak, Hyeun-Jong Bae. 2018. Production of Bioethanol and Biomaterials from Mangosteen Peel Waste by Popping Pretreatment. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*. 6.
- [7] Tropea Alessia, David Wilson, Loredana G, Rosario B, Peter Saugman, Peter Trory Davies, Giacomo Dugo, Keith W Waldron. 2014. Bioethanol Production from Pineapple Wastes. *Journal of Food Research*. 3 (4).
- [8] Tan Inn Shi, Keat Teong Lee. 2014. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Seaweed Solid Wastes for Bioethanol Production: An Optimization Study. *Energy Xxx*. 1 – 10.
- [9] Dahnum Deliana, Sri Octavia Tasum, Eka Triwahyuni, Muhammad Nurdin, Haznan Abimanyu. 2015. Comparison of SSF and SHF Process Using Enzyme and Dry Yeast for Optimization of Bioethanol Production from Empty Fruit Bunch. *Energy Procedia*. 107 – 116.
- [10] Febriasari Arifina, Ahmad Mujimi, Nawawi Irawan, Roni Candra, Nina Arlofa. 2021. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap Kadar Etanol dari Kulit Nanas Madu dengan Metode SHF dan SSF. *Jurnal Chemtech*.
- [11] Novia, Destarani Wijaya, Putri Yanti. 2017. Pengaruh Waktu Delignifikasi terhadap Lignin dan Waktu SSF terhadap Etanol Pembuatan Bioetanol dari Sekam Padi. *Jurnal Teknik Kimia*. 23 (1).
- [12] Standar Nasional Indonesia. 2008. Pulp dan Kayu Cara Uji Kadar Lignin Metode Klason SNI 0492:2008. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- [13] Gayatri Nurul Putri dan Dewi Astuti Herawati. 2021. Pengaruh Variasi Massa *Saccharomyces cerevisiae* dan Waktu Fermentasi pada Pembuatan Bioetanol dari Limbah Padat Pati Aren Metode *Simultaneous of Saccharification and Fermentation*. *Jurnal Kimia dan Rekayasa*. 1 (2).
- [14] Wandono E Hugeng, Endang Kusdiyantini, Hadiyanto. 2020. Efektivitas Limbah Kulit Kering Nanas Madu (*Ananas comosus* L. Merr) untuk Pembuatan Bioetanol dengan Proses Fermentasi dan Distilasi. *Jurnal Energi Baru & Terbarukan*. 1 (2).
- [15] Kim Jun Seok, YY Lee, Tae Hyun Kim. 2015. A Review on Alkaline Pretreatment Technology for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*.
- [16] Cogulet Antoine, Pierre Blanchet, Veronic Landy. 2016. Wood Degradation Under UV irradiation A lignin Characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology*.
- [17] Zaidar Sapta Ahmad, Sri Hidayati, Rafma Ariana. 2014. Kajian Delignifikasi Pulp Formacell dari Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Hidrogen Peroksida ( $H_2O_2$ ) dalam Media Asam Asetat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*.
- [18] Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: LPTIK Universitas Andalas.
- [19] Kurniaty Ika, Ummul Habibah H, Devi Yustiana, Isnaini Fajriah M. 2017. Proses Delignifikasi Menggunakan NaOH dan Amonia Pada Tempurung Kelapa. *Jurnal Integrasi Proses*.
- [20] Dewi Ika Atsari, Azimmatul Ihwah, Hendrix Yulis, Alfi Ayuning, dan Afifah Ulfah. 2017. Optimasi Proses Delignifikasi Pelepah Pisang Untuk Bahan Baku Pembuatan Kertas Seni. *Jurnal Sebatik*.
- [21] Obed, Andi Hairil Alimuddin, Harlia. 2015. Optimasi Katalis Asam Sulfat dan Asam Maleat Pada Produksi Gula Pereduksi dari Hidrolisis Kulit Buah Durian. *JKK* 4 (1).
- [22] Ahamed Aftab, Patrick Vermette. 2008. Culture Based Strategies to Enhance Cellulase Enzyme Production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions. *Journal Biochemical Engineering*.

- [23] Safaria Selvisa, Nora Idiawati, Titin Anita Zaharah. 2013. Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *Jurnal JKK*.
- [24] Jayus Jaya, Sony Suwosno, Ike Wijayanti. 2017. Produksi Bioetanol Secara SHF dan SSF menggunakan *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, dan *New Aule Instant Dry Yeast* pada Media Kulit Ubi Kayu. *Jurnal Agroteknologi*. 11 (1).
- [25] Haryani Kristinah, Hargono, Noer Abyor Handayani, Hendra Harles, Sheila Amanda Putri. 2021. Pengaruh Konsentrasi Pati dan Yeast Pada Pembuatan Etanol dari Pati Sorgum Melalui Proses *Simultaneous Saccharification Fermentation* (SSF) dan *Separated Hydrolysis Fermentation* (SHF). *Jurnal Rekayasa Mesin*. 16 (2).
- [26] Karisma. 2015. Pembuatan Bioetanol dari Jerami Padi (*Oryza sativa* L.) melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). [Skripsi]. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin.
- [27] Kodri, Bambang Dwi Argo, Rini Yulianingsih. 2013. Pemanfaatan Enzim dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan *Pretreatment* Microwave. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. 1 (1)
- [28] Azhar Siti Hajar Mohd, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol, Kenneth. 2017. Yeast in Sustainable Bioethanol Production: A Review. *Journal Biochemistry and Biophysics Reports*.
- [29] Rasjava Achmad Ramadhanna'il. 2020. Pengaruh Konsentrasi Ragi dan Waktu Fermentasi Pada Pembuatan Bioetanol Sekam Padi (*Oryza sativa*) melalui Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation*. [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- [30] Amtiran Feriyanti Bati, Imanuel Gauru, Fani K Y Serangmo. 2019. Pembuatan Bioetanol Skala Laboratorium sebagai Bahan Bakar Alternatif untuk Pengembangan Energi Terbarukan dari Bahan Baku Serbuk Buah Bidara. *Jurnal Teknik Mesin*. 2 (1).
- [31] Rasjava Achmad Ramadhanna'il. 2020. Pengaruh Konsentrasi Ragi dan Waktu Fermentasi Pada Pembuatan Bioetanol Sekam Padi (*Oryza sativa*) melalui Metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation*. [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- [32] Amtiran Feriyanti Bati, Imanuel Gauru, Fani K Y Serangmo. 2019. Pembuatan Bioetanol Skala Laboratorium sebagai Bahan Bakar Alternatif untuk Pengembangan Energi Terbarukan dari Bahan Baku Serbuk Buah Bidara. *Jurnal Teknik Mesin*. 2 (1).
- [33] Mustadi Lalu, Siswi Astuti, Aladin Eko Purkuncoro. 2020. *Buku Ajar Distilasi Uap dan Bahan Bakar Pelet Arang Sampah Organik*. Malang: CV IRDH.
- [34] Sulaiman Dady, St Syahdan, Siti Maria Ulva. 2021. Analisis Uji Karakteristik Bioetanol dari Pisang Hutan Terhadap Variasi Massa Ragi. *Jurnal Kumparan Fisika*. 4 (3).
- [35] Rijal Muhammad, Adila Rumberu, Abajaidun Mahulauw. 2019. Pengaruh Konsentrasi *Saccharomyces cereviceae* Terhadap Produksi Bioetanol Berbahan Dasar Batang Jagung. *Jurnal Biology Science & Education*. 8 (1)
- [36] Roni Kiagus A, Dorie Kartika, Hasyirullah Apriyadi, dan Netty Herawati. 2019. The Effect of Type and Concentration Yeast with Fermentation Time and Liquefaction Variations on the Bioethanol Concentration Resulted by Sorgum Seeds with Hydrolysis and Fermentation Processes. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*. 16.
- [37] Sanches C, Sergio S, Raquel S, Charles, Liene-mann, and Jose. 2020. Profiling of Organic Compound in Bioethanol Samples of Different Nature and the Related Fractions. *ACS OMEGA*.
- [38] Anisa Sintia Putri, Muhaji. 2021. Produksi Bioetanol dari Limbah Brem sebagai Bahan Bakar Alternatif dengan Adsorben Batuan Zeolit. *JPTM*. 10 (2).
- [39] Purwasih Ratih, Dwi Heru Sutjahjo. 2017. Pemanfaatan Limbah Pabrik Brem sebagai Bahan Baku Bioetanol untuk Bahan Bakar Alternatif. *JPTM*. 2 (6).