

SELEKSI SENYAWA PENGHIDROLISIS UNTUK MENGHASILKAN GULA REDUKSI DARI LIMBAH KULIT ARI KEDELAI SEBAGAI BAHAN FERMENTASI BIOETANOL

Selection of Hydrolysis Compounds to Produce Reduced Sugar From Soybean Husk As Fermentation Materials Bioethanol

Zulkifliani¹, Siska Handayani^{1*}, Adisyahputra¹, Devitra Sakarani¹

Program Studi Biologi FMIPA Universitas Negeri Jakarta (UNJ). Jl. Pemuda No. 10 Rawamangun, Jakarta Timur, Indonesia

*Corresponding Email : siskahdy@hotmail.com

ABSTRACT

This study aims to determine the most effective compound used to hydrolyze soy husk waste to produce reducing sugar as raw material for bioethanol fermentation. The study was conducted at the Laboratory of Bioprocess PPPTMGB "LEMIGAS" in April-September 2015. The method used is experiment using a randomized block design consisting of two factors. The first factor is the type of compounds used in the process of hydrolysis, namely H₂SO₄, HCl, NaOH, and NH₃. The second factor is the concentration of hydrolyze compound 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, and 1% (v/v) and every treatment repeated 4 times. Parameters measured were content of reduced sugar hydrolysis product, and secondary data that content of cellulose and hemicellulose also the density of ethanol. Concentration of reducing sugar from hydrolysis of soybean husk is analyzed by two-way ANOVA test. ANOVA analysis result indicate that the best hydrolysis compounds in hydrolyzing soybean husk is HCl with the optimum concentration is 0,4%. And there are interactions between treatment of compound used to hydrolyze as well as concentration on reducing sugar concentration (mg/mL) as product from soybean husk waste hydrolysis. *Post-hoc* test showed that HCl 0,4% produce the highest concentration of reducing sugar at 31.23 mg/mL.

Keywords: ethanol, reducing sugar, hydrolysis, soybean husk.

PENDAHULUAN

Bioetanol merupakan suatu energi terbarukan yang dibuat dari biomassa (tanaman) melalui proses biologi (enzimatik dan fermentasi). Karbohidrat mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai etanol melalui fermentasi. Untuk mengurangi pemanfaatan bahan pangan sebagai bahan baku energi terbarukan, maka dikembangkan pemanfaatan residu atau limbah agroindustri.

Salah satu limbah/residu agroindustri yang potensial untuk dimanfaatkan yaitu kulit ari kedelai. Kulit ari kedelai banyak dihasilkan dari industri tempe. Sampai saat ini masih limbah tersebut masih dibuang dan hanya sebagian untuk pakan ternak (Wachid, 2011). Salah satu aspek yang unik dari kulit ari kedelai adalah kandungan lignin yang rendah, sehingga memudahkan dalam menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa. Menurut Peruzza

(2010), kandungan selulosa dalam kulit ari kedelai cukup tinggi, yaitu 48,0% dari berat kering. Secara teoretik hidrolisis selulosa dan hemiselulosa dapat menghasilkan glukosa.

Salah satu metode yang paling umum digunakan dalam proses hidrolisis adalah hidrolisis secara kimia dan umumnya menggunakan asam dan basa. Menurut Oktavianus (2013), asam yang umum digunakan antara lain asam sulfat dan asam klorida. Sedangkan basa yang umum digunakan adalah natrium hidroksida dan ammonia (Bjere dan Olesen, 1996). Khusus untuk hidrolisis kulit ari kedele belum pernah dilakukan optimasi penggunaan jenis senyawa penghidrolisis dan optimasi konsentrasinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa yang efektif menghidrolisis kulit ari kedelai dan menentukan konsentrasi optimalnya sebagai bahan baku fermentasi bioetanol.

METODE PENELITIAN

PREPARASI BIOMASSA

Kulit ari kedelai diperoleh dari salah satu pabrik tempe skala rumahan yang berada di daerah Srengseng, Jakarta Barat. Kulit ari kedelai dijemur hingga kering kemudian digiling dan diayak untuk ukuran 2 mm, dalam jumlah 2 kg dan disimpan dalam wadah tertutup.

ANALISA SELULOSA DAN HEMISELULOSA

Analisis selulosa dan hemiselulosa dilakukan berdasarkan metode Chesson (Datta, 1981). Sebanyak 1 gr sampel kering (a) ditambahkan 150 ml akuades, direfluks pada suhu 100°C dengan *waterbath* selama 1 jam. Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas (300 ml). Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai konstan kemudian ditimbang (b). Residu ditambahkan 150 ml H₂SO₄ 1 N kemudian direfluks dengan *waterbath* selama 1 jam pada suhu 100°C. Hasilnya disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (300 ml) lalu dikeringkan (c). Residu kering ditambahkan 10 ml H₂SO₄ 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam. Ditambahkan 150 ml H₂SO₄ 1 N dan direfluks pada *waterbath* selama 1 jam pada pendingin balik. Residu disaring dan dicuci dengan akuades sampai netral (400 ml) kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105±3°C selama 24 jam dan hasilnya ditimbang (d). Perhitungan kadar selulosa dan kadar hemiselulosa dihitung menggunakan rumus dibawah ini. Analisis selulosa dan hemiselulosa dilakukan sebelum proses hidrolisis dan sesudah proses hidrolisis.

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

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

Keterangan: a = berat kering sampel awal, b = berat kering sampel awal setelah direfluks pada suhu 100°C, berat kering sampel hasil dari b yang direfluks dengan 150 ml H₂SO₄ 1 N, dan C = berat kering sampel hasil dari c yang ditambahkan 10 ml H₂SO₄ 72%

HIDROLISIS

Beberapa botol schoot diisi dengan kulit ari kedelai dan ditambahkan senyawa penghidrolisis (H₂SO₄, HCl, NaOH dan NH₃) sehingga mencapai konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% dan 1% (v/v). Bahan yang telah dicampurkan kemudian di *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan proses penyaringan untuk memisahkan antara residu dan filtrat biomassa. Optimasi yang memberikan hasil gula reduksi terbanyak selanjutnya digunakan untuk menghasilkan gula reduksi sebagai bahan baku fermentasi etanol.

Uji Gula Reduksi Dengan Metode Dinitrosalicylic Acid Reagent (DNS)

Sebanyak 3 mL larutan dipipet ke dalam kuvet. Lalu 3 mL *DNS reagent* ditambahkan dan dipanaskan dalam *waterbath* selama 5 menit. Ketika isi tabung reaksi masih hangat, ditambahkan 1 mL 40% *Rochelle salt solution*. Didinginkan hingga mencapai suhu ruangan dan dibaca intensitas warna merah tua pada panjang gelombang 575 nm. Untuk kurva standar glukosa digunakan teknik Miller (1959).

*Isolasi Khamir Komersial (*S. cerevisiae*) dari Fermipan*

Khamir komersial (*S. cerevisiae*) dengan pengenceran 10^{-8} dibiakkan pada medium PDA dengan cara memipet 0,1 mL larutan, kemudian disebar pada permukaan medium secara merata dengan triglaski, medium didiamkan selama 48 jam sampai koloninya tumbuh.

*Peremajaan Khamir Komersial (*S. cerevisiae*)*

Sebanyak satu ose kultur khamir diambil secara aseptis untuk digoreskan pada media PDA miring. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Media agar yang berisi khamir komersial (*S. cerevisiae*) disimpan dalam suhu sekitar 5°C untuk dijadikan stok kultur.

*Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir Komersial (*S. cerevisiae*)*

Khamir komersial (*S. cerevisiae*) dari media padat diinokulasi dalam 100 mL media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan kecepatan 100 rpm. Pembuatan kurva tumbuh dilakukan dengan metode TPC (*Total Plate Count*) setiap 2 jam. Penanaman biakan dilakukan secara duplo. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Laju pertumbuhan dihitung dengan menggunakan rumus (Fardiaz, 1992):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{T_t - T_0}$$

dimana N_t adalah jumlah sel pada waktu t , N_0 adalah jumlah sel awal, T_t adalah waktu t dan T_0 adalah waktu awal. Umur inokulum terbaik ditunjukkan oleh waktu dengan laju pertumbuhan mikroba yang tertinggi.

Fermentasi dan penentuan berat jenis etanol

Proses fermentasi dilakukan dengan mencampurkan 100 mL hidrolisat kulit ari kedelai (konsentrasi gula reduksi tertinggi) dengan 10% inokulum khamir komersial (*S. cerevisiae*), kemudian didiamkan selama 4 hari pada suhu 37°C dan pH awal 4,5. Berat jenis etanol hasil fermentasi hidrolisat kulit ari kedelai dianalisis menggunakan piknometer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

KANDUNGAN SELULOSA DAN HEMISELULOSA SEBELUM DAN SESUDAH HIDROLISIS

Sebelum hidrolisis, dilakukan analisis kandungan selulosa dan hemiselulosa pada kulit ari kedelai yang dilakukan di Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta. Hasil analisis menunjukkan bahwa kulit ari kedelai sebelum hidrolisis memiliki kandungan 54% selulosa dan 20,96% hemiselulosa (Tabel 1). Hasil ini tidak jauh berbeda seperti pernyataan Peruzza (2010), yang menyatakan bahwa pada kulit ari kedelai terdiri dari 48% selulosa dan 17% hemiselulosa.

ANALISIS GULA REDUKSI

Hasil analisis anava menunjukkan bahwa terdapat interaksi perlakuan senyawa penghidrolisis serta

konsentrasinya terhadap konsentrasi gula reduksi (mg/ml) yang dihasilkan dari hidrolisis kulit ari kedelai. Uji *post-hoc* menunjukkan bahwa larutan HCl 0,4% mampu menghidrolisis gula reduksi secara efektif dibandingkan dengan jenis dan konsentrasi senyawa. Hasil tertinggi yang diperoleh adalah sebesar 31,23 mg/mL.

Dari hasil percobaan diketahui bahwa kenaikan jumlah gula reduksi tertinggi secara umum terjadi pada semua jenis senyawa penghidrolisis pada konsentrasi 0,4% (Tabel 2). Penambahan konsentrasi senyawa penghidrolisis tampaknya akan menyebabkan gugus radikal bebas yang dibentuk akan lebih banyak. Hal tersebut menyebabkan semakin rendahnya proporsi air sebagai penyedia kebutuhan OH⁻ (dari ionisasi H₂O) sebagai pengikat radikal bebas. Akibatnya glukosa yang dihasilkan semakin sedikit (Lavarack *et al.*, 2002).

Tabel 1. Kandungan Selulosa dan Hemiselulosa Sebelum dan Sesudah Hidrolisis dengan HCl 0,4%

No.	Analisis	Ulangan	Kulit Ari Kedelai	
			Sebelum Hidrolisis (%)	Sesudah Hidrolisis (%)
1	Selulosa	1	53,14	65,69
		2	54,86	64,06
		Rerata	54	64,88
2	Hemiselulosa	1	21,38	9,46
		2	20,53	9,64
		Rerata	20,96	9,55

Selain itu, menurut Tewari (1986), peningkatan konsentrasi senyawa penghidrolisis yang digunakan akan menurunkan glukosa yang dihasilkan karena glukosa yang terbentuk akan terdegradasi lebih lanjut menjadi senyawa-senyawa furfural, seperti hidroksimetil furfural.

Dari data diketahui ternyata hidrolisis menggunakan asam memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan basa. Hal tersebut mungkin karena ikatan glikosidik lebih mudah dihidrolisis oleh asam tetapi tidak oleh basa. Proses hidrolisis menggunakan basa disertai pemanasan memungkinkan terjadinya saponifikasi pada ikatan ester dari residu lignin yang ada, serta membuat struktur hemiselulosa menjadi lebih terbuka. Proses ini memungkinkan hemiselulosa ikut terhidrolisis, karena strukturnya yang amorf dan tidak teratur (Kartika *et al.*, 1992). Menurut Balat *et al.* (2008), pada proses hidrolisis dengan asam, gugus H⁺ dari asam dapat memecah ikatan glikosidik pada selulosa maupun hemiselulosa, sehingga akan terbentuk monomer-monomer gula sederhana. Monomer gula yang dihasilkan masih mengandung gugus radikal bebas. Gugus radikal bebas kemudian akan berikatan dengan gugus OH⁻ dari air dan bereaksi pada suhu 120-160⁰C menghasilkan gula reduksi (Lavarack *et al.*, 2002).

Tabel 2. Rerata Konsentrasi Gula Reduksi (Rerata ± SE) dari Hidrolisat Kulit Ari Kedelai (mg/mL)

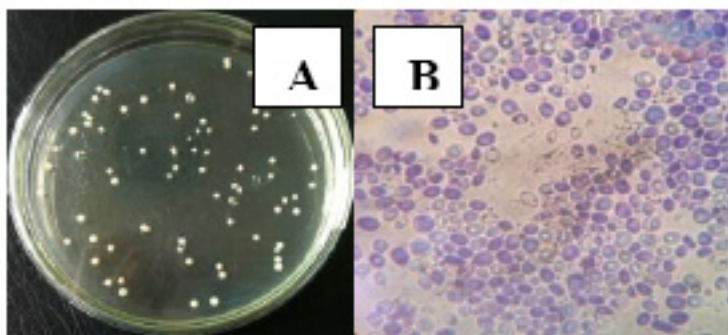
No.	Analisis	Ulangan	Kulit Ari Kedelai	
			Sebelum Hidrolisis (%)	Sesudah Hidrolisis (%)
1	Selulosa	1	53,14	65,69
		2	54,86	64,06
		Rerata	54	64,88
2	Hemiselulosa	1	21,38	9,46
		2	20,53	9,64
		Rerata	20,96	9,55

Adanya perbedaan konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan H_2SO_4 dengan HCl (Tabel 2) diperkirakan karena HCl memiliki tetapan ionisasi asam (K_a) yang lebih tinggi. H_2SO_4 memiliki nilai K_a sebesar $1,0 \times 10^3$, sedangkan HCl yaitu $1,3 \times 10^6$ (ncsu.edu, 2015).

Hasil pengukuran setelah proses hidrolisis dengan asam (HCl 0,4%) memperlihatkan adanya penurunan jumlah hemiselulosa sebesar 54,44% dan meningkatkan jumlah selulosa sebesar 20,15%. Hal ini kemungkinan dikarenakan asam yang digunakan pada hidrolisis akan memutus ikatan komponen lignoselulosa. Pemutusan ikatan glikosidik pada hemiselulosa ditandai dengan penurunan kandungan hemiselulosa pada campuran hidrolisat. Penurunan ini disebabkan ikatan glikosidik pada hemiselulosa diputus oleh katalis asam menghasilkan monomer gula penyusunnya seperti xilosa, arabinosa dan glukosa. Molekul hemiselulosa lebih mudah untuk dihidrolisis dibanding selulosa karena strukturnya yang bercabang sehingga umumnya hemiselulosa tidak berbentuk Kristal (Balat *et al.*, 2008). Berbeda dengan hemiselulosa, ternyata kandungan selulosa meningkat menjadi sebesar 64,88%. Kenaikan kandungan selulosa karena selulosa yang awalnya masih berikatan dengan lignin menjadi terlepas setelah hidrolisis. Proses hidrolisis pada suhu tinggi dapat membantu melepaskan lignin dari selulosa dan hemiselulosa serta memecah lignin menjadi partikel yang lebih kecil (Tahezadeh dan Karimi, 2007). Xu (2009) melakukan penelitian tentang hidrolisis dari *corn stover*. Hidrolisis dilakukan dengan asam formiat (CH_2O_2) pada konsentrasi 4% juga meningkatkan kandungan selulosa dalam hidrolisat, seperti dalam penelitian ini. Selulosa meningkat dari 54% menjadi 64,88% setelah proses hidrolisis. Sedangkan kandungan hemiselulosa menurun dari 20,96% menjadi 9,55%. Besarnya penurunan kandungan hemiselulosa secara tajam ini yang diperkirakan menjadi faktor utama yang mendorong pembentukan gula reduksi dalam penelitian ini, sehingga diperoleh gula reduksi sebanyak 31,25 %.

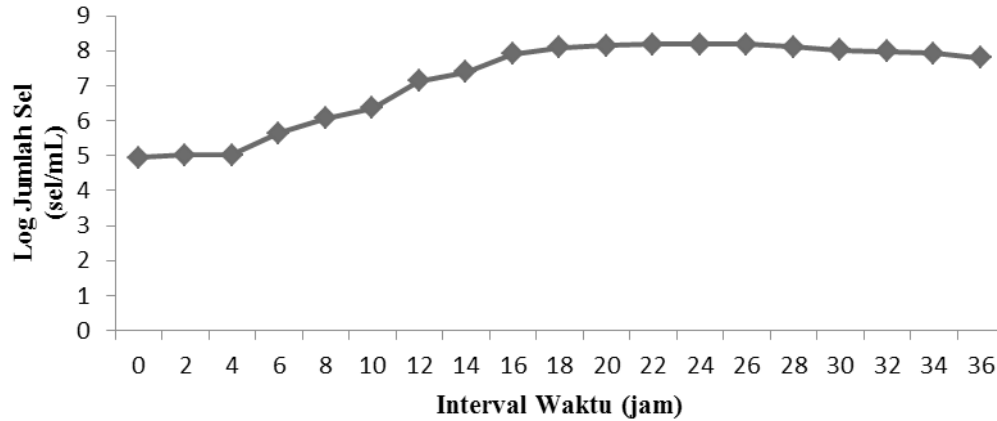
ISOLASI KHAMIR KOMERSIAL (*S. cerevisiae*)

Khamir yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari fermipan. Dalam penelitian ini tidak dilakukan uji biokimia dan DNA terhadap *S. Cerevisiae* yang digunakan. Oleh karena itu, disebutkan sebagai khamir komersial saja. Khamir komersial memiliki bentuk koloni yang hampir sama dengan koloni *S. cerevisiae* ATCC 19433 dalam penelitian Idral (2012).



Gambar 1. Khamir Komersial (*S. cerevisiae*) Secara Makroskopik (A) dan Mikroskopik (B) pada Media PDA, Umur 24 Jam dan Suhu Inkubasi $37^{\circ}C$.

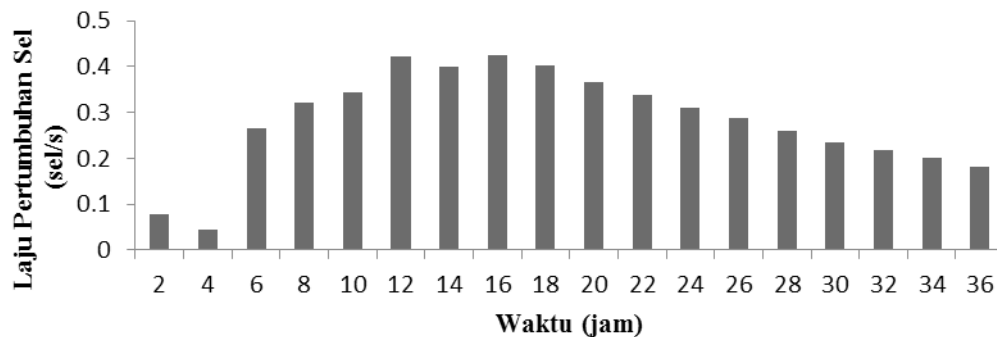
Secara makroskopik, koloni khamir komersial berbentuk bulat, berwarna putih kekuningan, permukaan berkilau, licin dan tekstur lunak (Gambar 1). Pengamatan sel khamir secara mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan sederhana menggunakan *methylen blue*. Secara mikroskopik, terlihat bahwa sel khamir ini terdiri dari sel anak, *budding* dan sel induk. Hal ini disebabkan karena khamir komersial bereproduksi dengan cara bertunas.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan Khamir Komersial (*S. cerevisiae*) dari Fermipan pada Media PDB, Suhu 37°C dan Kecepatan 100 rpm

KURVA PERTUMBUHAN DAN LAJU PERTUMBUHAN KHAMIR KOMERSIAL (*S. CEREVISIAE*)

Kurva pertumbuhan khamir komersial (*S. cerevisiae*) dapat dilihat pada Gambar 2. Kurva pertumbuhan khamir komersial pada Gambar 2 menunjukkan adanya fase adaptasi pada 0-4 jam pertama. Fase logaritmik khamir komersial ditandai dengan pertumbuhan yang cepat dan konstan. Fase logaritmik ditunjukkan dari jam ke-6 sampai jam ke-20. Selama fase logaritmik, mikroba tumbuh dengan laju pertumbuhan maksimum (μ m). Kemudian dilanjutkan dengan fase stasioner dari jam ke-22 sampai jam ke-26. Khamir komersial memasuki fase kematian setelah jam ke-28. Sedangkan laju pertumbuhan khamir komersial dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan kurva laju pertumbuhan, umur inokulum khamir komersial yang paling baik digunakan sesuai percobaan yaitu 16 jam sebesar 0,425 sel/s.



Gambar 3. Laju Pertumbuhan Khamir Komersial (*S. cerevisiae*) dari Fermipan pada Media PDB, Suhu 37°C dan Kecepatan 100 rpm

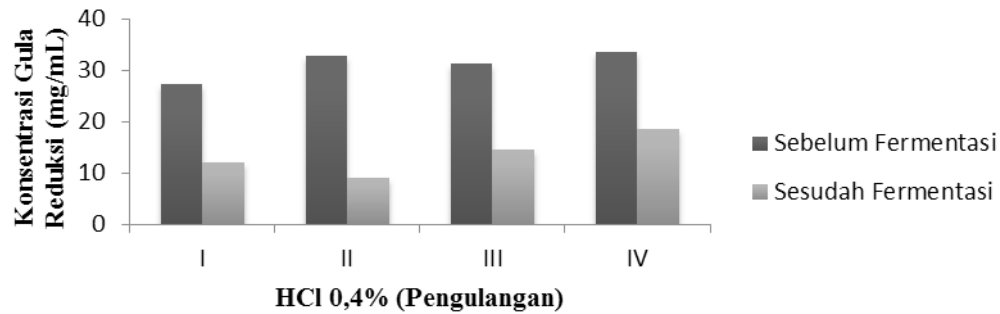
Produksi Etanol

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diketahui bahwa rerata volume destilat yang dihasilkan dari proses fermentasi hidrolisat kulit ari kedelai dengan HCl 0,4% sebesar 11 mL. Laurentina (2009) menyatakan bahwa alkohol yang diperoleh dari proses fermentasi biasanya hanya 8 – 12% volume.

Berat jenis sampel destilat diperoleh rerata 0,90 g/mL. Hasil ini berbeda dengan berat jenis etanol absolut yaitu 0,79 g/mL. Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel destilat masih bercampur dengan air.

Perubahan Gula Reduksi Sebelum dan Sesudah Fermentasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi gula reduksi setelah fermentasi sebesar 56,56% (Gambar 4).



Gambar 4. Perubahan Konsentrasi Gula Reduksi Sebelum dan Sesudah Fermentasi

Gula reduksi sebelum dan sesudah fermentasi mengalami penurunan sebesar 17,67 mg. Penurunan tersebut berasal dari adanya perubahan konsentrasi gula reduksi dari 31,24 mg/mL menjadi 13,57 mg/mL (Gambar 4). Berdasarkan analisis uji-t, didapatkan hasil yang signifikan terhadap konsentrasi gula reduksi sebelum dan sesudah fermentasi. Penurunan konsentrasi gula reduksi karena gula pada media fermentasi karena digunakan sebagai sumber karbon bagi khamir untuk mensintesis etanol dalam rangka penyerapan energi. Tidak samanya jumlah etanol yang dihasilkan dengan jumlah gula terpakai (11 ml etanol dibanding 17,67 mg gula reduksi), diperkirakan adanya pemakaian gula untuk tumbuh kembang khamir selama proses fermentasi serta kebutuhan energi untuk berbagai aktivitas dan metabolisme khamir.

KESIMPULAN

Dari hasil analisis dan diskusi telah diketahui bahwa larutan HCl 0,4 % merupakan larutan yang paling efektif untuk menghidrolisis limbah kulit ari kedelai. Jika sebelum hidrolisis pada hidrolisat ditemukan 54% selulosa dan 20,96% hemiselulosa, setelah hidrolisis jumlah selulosa meningkat menjadi 64,88%, sebaliknya terjadi penurunan hemiselulosa dari 20,96 menjadi 9,55% setelah hidrolisis dan kondisi ini mampu menghasilkan gula sebanyak 31,27 mg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Balat, M., H. Balat and C. Oz. 2008. Progress in Bioethanol Processing. *Elsevier:SciDir*. 34: 551-573.
- Bjerre, AB dan AB Olesen. 1996. Pretreatment of Wheat Straw Using Combined Wet Oxidation and Alkaline Hydrolysis Resulting in Convertible Cellulose and Hemicellulose. *J. Biotechnol. Bioeng*. 49.
- Idral, Daniel De, M. Salim, dan E. Mardiah. 2012. Pembuatan Bioetanol Dari Ampas Sagu Dengan Proses Hidrolisis Asam Dan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Kim. Unand*. 1 (1).
- Kartika, B., A. D. Guritno, D. Purwadi, dan D. Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Lavarack, B.P., G. J. Griffin, and D. Rodman. 2002. Measured kinetics of acid-catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to produce xylose. *J. Catalysis*. 63: 257-265.

- Oktavianus, F., R. M. Sigirow dan M. D. Bustan. 2013. Pembuatan Bioetanol Dari Bahan Jarak Menggunakan Metode Hidrolisa Dengan Katalis Asam Sulfat. *J. Tek. Kim.* 19.
- Peruzza, A. L. 2010. Exploring Pretreatment Methods and Enzymatic Hydrolysis of Oat Hulls. *Thesis*. Canada: University of Toronto.
- Taherzadeh, M. and K. Karimi. 2007. Acid-based Hydrolysis Processes For Ethanol From Lignocellulosic Materials. *J. Bioresources. Rev.* 2(3):472-499.
- Tewari, H. K., S. S. Marwaha & K. Rupal. 1986. Ethanol from Banana Peels. *J. Agric. Wastes.* 16: 135-146.
- Wachid, M. 2011. Potensi Bioethanol Dari Limbah Kulit Ari Kedelai Limbah Produksi Tempe. *Ejournal UMM.* 6: 113 – 122.
- Xu, Jian, M. H. Thomsen dan A. B. Thomsen. 2009. Pretreatment on Corn Stover with Low Concentration of Formic Acid. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (8): 845-850.