

BIOETANOL DARI LIMBAH KEJU (WHEY) MENGGUNAKAN *KLUYVEROMYCES MARXIANUS*

BIOETHANOL FROM CHEESE WASTE (WHEY) USING KLUYVEROMYCES MARXIANUS

Alif Nur Laili Rachmah^{1*}, Ratri Sekaringgalih², Binti Ruliana³, Ansori Ansori⁴

^{1,2,4}Program Studi Teknik Kimia, Institut Teknologi dan Bisnis Muhammadiyah Banyuwangi, Indonesia

³Program Studi Teknik Mesin, Fakultas Teknik, Universitas Mercu Buana Jakarta, Indonesia

*Email: alifnurlailirachmah@itbmb.ac.id

Diterima: 24 September 2023. Disetujui: 24 Nopember 2023. Dipublikasikan: 18 Desember 2023

Abstrak: Alternatif pengganti kelangkaan minyak bumi menjadi banyak perhatian para peneliti. Pengembangan bioetanol merupakan salah satu energi terbarukan yang harus didukung dengan adanya penelitian dari berbagai sumber-sumber bahan baku sehingga dapat di konversi menjadi bioetanol. Karena bahan baku bioetanol umumnya menggunakan biomassa yang mengandung gula dan bahan baku pati, jika biomassa yang di gunakan seperti tebu dan singkong maka ketersediaan pangan juga akan terancam. Oleh karena itu Salah satu bahan baku alternatif yang dapat digunakan adalah limbah industri keju (whey). Whey adalah produk sampingan dari industri keju, yang memiliki kandungan laktosa 4-5%. Tujuan dari penelitian ini adalah mengoptimasi proses fermentasi whey untuk pembuatan bioetanol menggunakan *Kluyveromyces Marxianus* dengan variasi waktu dan volume starter. Pembuatan bioetanol dengan bahan baku laktosa dalam whey menggunakan bakteri *Kluyveromyces Marxianus* menggunakan variabel berubah yaitu waktu fermentasi dan volume starter. Untuk variabel waktu fermentasi yaitu 24, 48, 60, 72 dan 84 jam dan untuk variabel volume starter yaitu 20%, 22% dan 24% v/v. Kadar etanol tertinggi pembuatan bioetanol menggunakan *Kluyveromyces Marxianus* yaitu pada variabel volume starter 24% dan waktu 84 jam diperoleh kadar bioetanol 0,32% dengan pH 3,5.

Kata Kunci : Bioetanol, *Kluyveromyces Marxianus*, Limbah Keju, Fermentasi

Abstract: Alternatives to petroleum scarcity are of much concern to researchers. The development of bioethanol is one of the renewable energies that must be supported by research from various sources of raw materials so that it can be converted into bioethanol. Generally, the raw material of bioethanol used contains sugar and starch. if biomass usessugar cane and cassava then the availability of food will also be threatened. Therefore, one of the alternative raw materials that can be used is industrial waste cheese (whey). Whey is the side of the product cheese industry, which contains 4-5%. The study aims to optimize whey fermentation to the production of bioethanol using *Kluyveromycesmarxianus* with the variation of time and starter volume. Bioethanol production with raw material lactose which is contained in whey used *KluyveromycesMarxianus* with variabel changed time fermentation and starter volume. For time fermentation variables are 24, 48, 60, 72 dan 84 hours, and for volume starter variabel are 20%, 22%, dan 24% v/v. The highest content of bioethanol production used *KluyveromycesMarxianus* on variable starter volume 24% at time 84 hours was obtained 0,32% bioethanol content with pH 3,5.

Keywords : Bioethanol, *KluyveromycesMarxianus*, Whey Cheese, Fermentation

PENDAHULUAN

Cadangan Minyak bumi semakin lama semakin menipis. Untuk menjaga keamanannya, pengembangan energi baru dan terbarukan perlu dilakukan, karena populasi dan pertumbuhan ekonomi terus meningkat. Baru-baru ini, etanol merupakan salah satu komoditas utama yang dikembangkan dan digunakan sebagai bahan bakar cair (*gasoline partial substitution*), dan proses pembuatan etanol dari berbagai bahan baku banyak dipelajari. Produksi etanol dalam pengembangan generasi pertama energi terbarukan umumnya menggunakan biomassa yang mengandung gula dan bahan baku pati sebagai bahan baku. Namun terjadi kekhawatiran mengenai hal ini karena jika Biomassa seperti tebu dan singkong yang digunakan dalam produksi bioethanol, masih dikategorikan sebagai makanan pokok, maka ketersediaan pangan juga akan terancam[1]. Sehingga untuk produksi

bioetanol di butuhkan alternatif bahan baku. pengembangan energi baru generasi kedua menekankan pada biomassa dari limbah. bahan seperti limbah pertanian, atau dari limbah industri keju. Salah satu contoh dari limbah industri yang bisa dimanfaatkan untuk pembuatan bioetanol adalah limbah industri keju yakni whey. Selain itu whey keju mengandung tinggi karbohidrat organik dan asam organik lainnya, yang membuatnya menjadi substrat yang layak untuk produksi biohidrogen [2].

Industri whey saat ini menghadapi tantangan baru dan peluang. Contohnya adalah perluasan produk susu industri, di mana produksi whey adalah bagiannya. Contoh lain termasuk produksi whey asam [3]. Indonesia memiliki banyak industri keju skala besar maupun skala kecil, yakni tersebar di daerah DKI Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Jawa Timur. Bahan baku susu segar di peroleh dari peternak lokal 500 liter dengan rata-rata produksi

industri keju di Indonesia sebesar 50 kg per hari[4]. Salah satu industri rumahan keju di Jawa Timur adalah Narendara Food Company yang memproduksi keju mozzarella. Dalam setiap harinya, rata-rata Narendara Food Company memproduksi keju dari susu cair setiap batch memerlukan 480 liter susu untuk dapat menjadi keju. Dalam satu batch tersebut didapatkan curd atau keju 80 liter, sedangkan whey yang diperoleh 400 liter.

Berdasarkan Penelitian yang telah dilakukan Whey adalah limbah industri yang mengandung polusi tingkat tinggi, Untuk membuat 1 kg keju dihasilkan limbah whey sebanyak 9 kg yang dibuang ke lingkungan. Whey mengandung bahan organik besar dengan nilai BOD dan COD masing-masing 50 dan 80 g / L [5]. Di sisi lain, whey juga mengandung laktosa (disakarida) sekitar 4,5 - 5%; laktosa adalah sumber karbon yang bisa dijadikan bahan baku untuk beberapa produk. Proses fermentasi dengan menggunakan ragi dapat mengkonversi laktosa menjadi etanol, terutama jenis *Kluyveromyces Marxianus*[6]. Adanya laktosa dalam whey sebagai satu-satunya karbohidrat dapat membatasi pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Spesies *Kluyveromyces Marxianus* dapat secara optimal memecah laktosa menggunakan enzim laktase. Selain laktosa, whey juga mengandung vitamin dan mineral yang dapat meningkatkan aktivitas fisiologis sel. Whey protein berhasil digunakan dalam produksi sosis, karena tidak hanya menggantikan lemak, tetapi juga mempertahankan kelembaban [7]. Ini berarti bahwa hasil produk akhir dapat ditingkatkan tanpa mengurangi kandungan protein hewani yang berharga atau menggunakan Aditif. Selain itu, produk akhir memiliki lebih baik sifat fungsional dan teknologi, serta peningkatan karakteristik rasa [8].

Saat ini whey dimanfaatkan sebagai pakan ternak, produk makanan dan minuman beralkohol. Pemanfaatan whey sebagai bahan baku proses pembuatan etanol belum bisa diimplementasikan karena perkembangan teknologinya masih terbatas. Maka berdasarkan hal tersebut, penelitian tentang pemanfaatan whey sebagai bahan baku bioetanol sangat penting dan dibutuhkan.

Penelitian tentang pembuatan etanol dari limbah keju menggunakan *kluyveromyces marxianus* dan *Saccaromyces Cerevisae* dengan melalui perbandingan treatment dan non treatment awal pada whey, diperoleh perbedaan hasil etanol pada non-treatment ialah 3,4 – 18,5 g/l sedangkan etanol pada treatment 24,11 – 57,66 g/l. pH maximum 5,5 dan waktu optimum 48 jam dengan penambahan 0,3 % yeast ekstrak dari jumlah whey di peroleh hasil etanol dengan *saccharomyces* sebesar 65,36 g/l dan etanol menggunakan *Kluyveromyces Marxianus* sebesar 69,85 g/l[9].

Penelitian yang sama, yaitu pembuatan bioetanol dari limbah keju menggunakan yeast *kluyveromyces marxianus*, dari hasil penelitian tersebut diketahui pada 10 jam pertama laktose

mengalami penurunan tetapi tidak signifikan, pada proses tersebut *kluyveromyces marxianus* bekerja memecah laktosa menjadi glukosa, setelah 10 jam pertama laktosa mengalami penurunan secara drastis, sedangkan etanol yang terbentuk semakin meningkat, hal ini disebabkan terjadinya proses konversi glukosa menjadi etanol, sedangkan pada waktu ke 60 jam dan seterusnya COD, laktosa, dan etanol semuanya dalam kondisi stabil. Penelitian tersebut diperoleh hasil etanol 10 g/l ; biomass 8 g/l ; dan laktosa 5 g/l dengan waktu optimum selama 24 jam, suhu fermentasi sebesar 34 °C dengan pH 4,5. Berdasarkan analisis statistik, mengikuti kondisi optimal untuk hidrolisis protein whey keju cottage: suhu 46,4°C; durasi 180 menit; dan jumlah enzim 9,5% dari kandungan protein. Kondisi ini memberikan kapasitas antioksidan 7,5 TE mmol/L dengan 17,96% tingkat hidrolisis, membuka prospek baru untuk Mengolah whey keju cottage asam dan menggunakan whey protein sebagai komponen fungsional potensial dengan peningkatan antioksidan[10]. Pembuatan bioetanol dari limbah keju yang mengandung laktosa sebesar 5,91%, difermentasi dengan menggunakan *Kluyveromyces Marxianus* dengan variabel waktu fermentasi (12, 24, 36, 48, 60) jam dan starter (8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%) dari volume whey. Dari hasil penelitian tersebut diperoleh kadar etanol tertinggi sebesar 0,24142% pada waktu 60 jam dengan penambahan starter sebanyak 18% dari volume whey.

Berdasarkan penelitian terdahulu, maka diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui penambahan jumlah starter dan waktu fermentasi yang tepat untuk menghasilkan bioetanol dari limbah keju (whey) yang mengandung laktosa.

METODE PENELITIAN

1. Preparasi limbah keju (whey).

Limbah keju suhu 90°C selama 15 menit untuk deprotenisasi, memisahkan sisa curd pada limbah keju, cairannya dengan suhu 100°C selama 15 menit untuk pasteurisasi, analisa laktosa pada whey menggunakan metode *Luff Schrooll*.

2. Pembuatan starter

Whey yang telah di preparasi ke dalam erlenmeyer sebanyak 200 ml ditambah 0,3 % yeast ekstrak dari volume whey, 0,6 gram KH_2PO_4 , 0,6 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ serta biakan *kluyveromyces marxianus* sebanyak 10 ose, starter di homogenkan pada suhu 30°C selama 2 x 24 jam di dalam *water batch shaker*

3. Proses Fermentasi

Whey sebanyak 200 ml yang sudah di tambahkan starter dan 0,3 % yeast ekstrak dari volume whey, 0,6 gram KH_2PO_4 , 0,6 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pengadukan selama 15 menit dengan suhu 35°C, serta di inkubator oven sesuai dengan waktu variabel yang di tentukan dengan suhu 35°C. Kadar Etanol di analisa menggunakan Gas *Chromatography (GC)*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Analisa awal pada Limbah Keju

Tahap pertama dalam pelaksanaan penelitian ini adalah menganalisa kandungan laktosa, protein, lemak, abu dan pH dari limbah keju (whey) yang berpotensi untuk dijadikan etanol. Berikut adalah hasil analisa terhadap limbah keju (whey) :

Tabel 1. Hasil Analisa Whey Asam

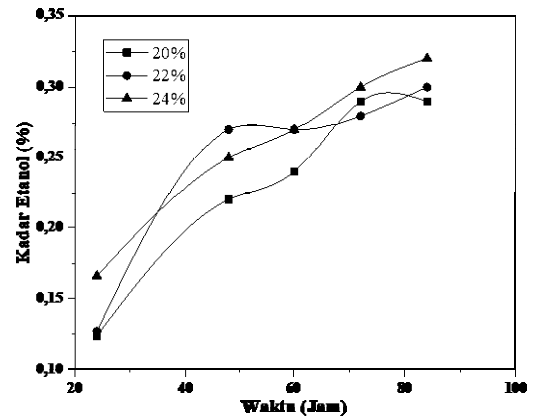
Jenis Analisa	Hasil Analisa
Laktosa (%)	4,9
Protein (%)	0,31
Lemak (%)	<0,01
Abu (%)	0,79
PH awal	5,5

Limbah Keju mengandung laktosa sebesar 4,9%, protein 0,31%, lemak <0,01, abu 0,79% dan pH awal sebesar 5,5. Kandungan laktosa dalam whey sebesar 4-5%. Pada whey asam yang di gunakan pada penelitian ini ialah kadar 4,9%, sehingga limbah keju (whey) berpotensi untuk dijadikan etanol[11].

2. Pengaruh waktu fermentasi dan volume starter terhadap kadar etanol

Proses fermentasi bertujuan untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol dengan bantuan mikroba yaitu *Kluyveromyces Marxianus*. *Kluyveromyces Marxianus* menghasilkan enzim beta-galaktosidase yang juga berfungsi memecah laktosa menjadi glukosa dan galaktosa. Proses fermentasi menggunakan variasi starter 20% v/v, 22% v/v, 24%v/v, dan waktu fermentasi selama 24, 48, 60 72, dan 84 jam[12].

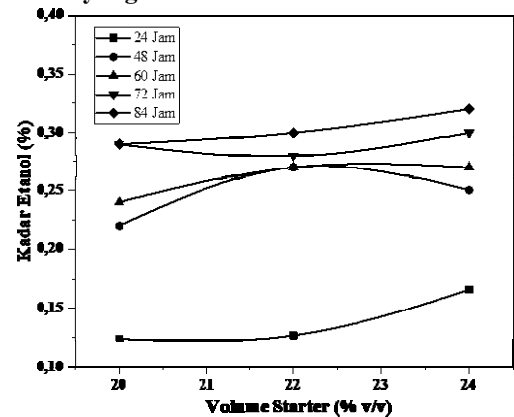
Semakin lama waktu yang di gunakan maka kadar etanol yang di dihasilkan semakin meningkat. Pada proses fermentasi, lama fermentasi akan mempengaruhi mikroba[13].Kadar etanol tertinggi pada waktu ke 84 jam dengan kadar sebesar 0,32%. Hal ini berarti pertumbuhan yeast *kluyveromyces Marxinus* pada waktu tersebut berada pada fase eksponensial yaitu fase perkembangan yang meningkat, selain itu belum terjadi penurunan pada variabel waktu yang telah digunakan, berarti dapat di simpulkan bahwa yeast *Kluyveromyces Marxianus* masih dapat bekerja hingga waktu yang lebih lama dan belum mengalami fase kematian.



Grafik 1. pengaruh waktu fermentasi terhadap kadar etanol

Pada penelitian dari dari grafik 1 tersebut pada waktu fermentasi 24 jam di peroleh kadar etanol terendah yaitu 0,1393% dengan penambahan startersebanyak 20% v/v.

3. Pengaruh volume starter terhadap kadar etanol yang di dihasilkan



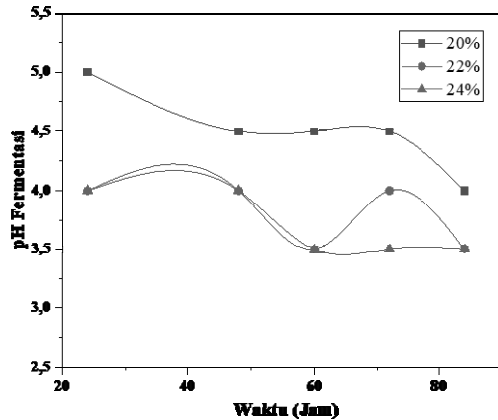
Grafik 2. pengaruh volume starter terhadap kadar etanol

Semakin banyak volume starter yang di tambahkan maka kadar etanol semakin meningkat hal ini di karenakan semakin banyak jumlah starter yang di tambahkan maka semakin banyak jumlah yeast yang akan memecah laktosa menjadi glukosa dan memfermentasi glukosa tersebut menjadi etanol. faktor fermentasi dipengaruhi oleh jumlah mikroba, lama fermentasi, pH (keasaman), suhu, oksigen, dan substrat. Tetapi pada grafik diatas, penambahan volume stater ebanyak 24% v/v waktu 48 jam terjadi sedikit penurunan kadar dari 0,27% menjadi 0,25% , hal ini dapat di sebabkan karena beberapa faktor salah satunya ialah jarak waktu fermentasi dan pengujian kadar etanol yang terlalu lama[9].

4. Pengaruh waktu fermentasi dan volume starter terhadap pH akhir

Semakin lama waktu fermentasi yang di gunakan maka semakin turun nilai pH hal tersebut merupakan pengaruh waktu fermentasi terhadap pH etanol yang di dihasilkan. Pada saat proses fermentasi terdapat proses biosintesis

piruvat yang menghasilkan produk asamsehingga membuat pH semakin rendah atau asam [14].Asam piruvat tersebut terkonversi menjadi asam asetat, etanol dan CO₂ yang terjadi pada proses fermentasi anaerob [15].

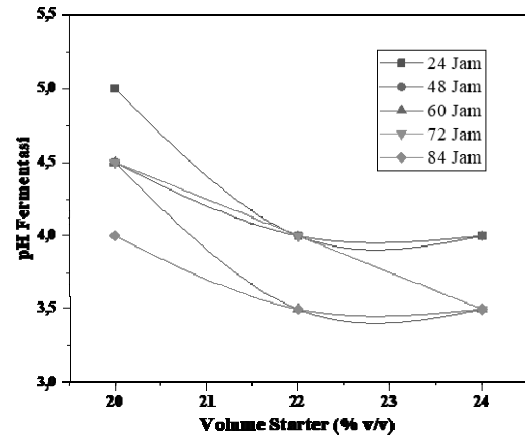


Gambar 3. Pengaruh waktu fermentasi terhadap pH fermentasi

Pada akhir fermentasi jam ke-84 di peroleh nilai pH nya paling rendah. Gas CO₂ berkontribusi terhadap penurunan pH, karena gas CO₂ merupakan gas yang bersifat asam. Selain itu, selama penyimpanan atau pada saat pembuatannya, kontaminasi bakteri asam asetat dan penguraian (oksidasi) bioetanol juga dapat menyebabkan terkonversinya bioetanol menjadi asam asetat, sehingga hal tersebut juga menjadi faktor terjadinya penurunan pH[16].

5. Pengaruh waktu fermentasi dan volume starter terhadap pH

Pengaruh volume starter terhadap pH etanol yang di hasilkan ialah semakin lama volume starter yang di tambahkan pada fermentasi maka semakin turun nilai pH. Kadar etanol yang terkandung di dalam substrat setelah difermentai secara tidak langsung akan mempengaruhi pH substrat. Hal ini disebabkan karena semakin banyak volume Starter yang di tambahkan maka produksi etanol semakin meningkat, dan semakin tinggi kadar etanol maka pH substrat akan semakin asam dan semakin rendah kadar etanol maka pH substrat makin mendekati pH asli substrat. oleh karena itu semakin banyak volume starter yang di tambahkan maka nilai pH semakin menurun. Semakin tinggi produksi etanol yang di hasilkan, maka pH nya semkain menurun[17].



Gambar 4. Pengaruh volume starter terhadap pH fermentasi

6. Analisa Statistika menggunakan metode Full Factorial.

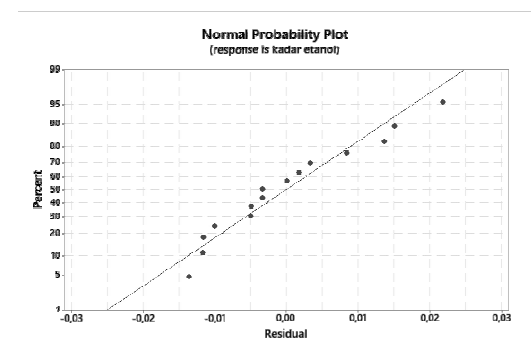
Analisa Statistika ANOVA menggunakan minitab 16 metode full factorial menunjukan bahwa variabel waktu fermentasi dan volume starter sangat berpengaruh signifikan pada kadar etanol yang di hasilkan ($P\text{-Value} < 0,05$)[13].

Tabel 2. Tabel Anova pengaruh waktu fermentasi dan volume starter

Source	DF	Adj SS	F-Value	P-Value
Model	6	0,052593	43,94	0,000
Linear	6	0,052593	43,94	0,000
time	4	0,050557	63,37	0,000
starter	2	0,002036	5,10	0,037
Error	8	0,001596		
Total	14	0,054188		

S : 0,0141233; R-sq : 97,06%;

R-sq(adj): 94,85%; R-sq(pred) :89,65%



Gambar 5. Grafik Normal Probability

Pada gambar 5 sumbu tidak menyebar pada garis diagonal sehingga dapat di simpulkan bahwa *probaility plottidak* terdistribusi secara normal. Dibuktikan dengan adanya distribusi normal membentuk satu garis lurus diagonal. Uji normal probaility ini bertujuan untuk mengetahui variabel penelitian sesuai dengan model regresi yang di gunakan sudah baik atau sebaliknya [18].

KESIMPULAN

Volume *starter* berpengaruh terhadap hasil fermentasi yaitu semakin banyak volume *starter* yang di tambahkan, maka kadar etanol semakin meningkat, dan kadar etanol terbaik sebesar 0,32% pada penambahan starter 24% v/v. Waktu Fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol yang di dihasilkan, yaitu semakin lama waktu fermentasi maka kadar etanol yang dihasilkan semakin meningkat, dan kadar etanol terbaik yaitu 0,32% pada waktu 84 jam. Variabel volume starter dan waktu fermentasi berpengaruh signifikan pada proses pembentukan etanol, hal tersebut di buktikan pada uji ANOVA bahwa $P\text{ value} < 0,05$.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570–1580.
- [2] Rao, R., & Basak, N. (2021). Fermentative molecular biohydrogen production from cheesewhey: present prospects and future strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(7), 2297–2330.
- [3] Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constantino, C. A., Castañeda-Ovando, A., & Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 1010–1027.
- [4] Siti, D. P., Puspita, A. A., & Ariyanti, D. (2013). Pembuatan Bioetanol Dari Limbah Keju (Whey) Melalui Proses Fermentasi Fed-Batch Dengan *Kluyveromyces Marxianus*. In *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri* (Vol. 2, Issue 3). [Http://EjournalS1.Undip.Ac.Id/Index.Php/Jtki](http://EjournalS1.Undip.Ac.Id/Index.Php/Jtki)
- [5] Zafar, S., & Owais, M. (2006). Ethanol Production from Crude Whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 295–298
- [6] Domingues, L., Guimarães, P. M. R., & Oliveira, C. (2010). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioengineered Bugs*, 1(3), 164–171.
- [7] Zou, J., & Chang, X (2022). Past, Present, and Future Perspectives on Whey as a Promising Feedstock for Bioethanol Production by Yeast. *Journal Of Fungi*, 8(4).
- [8] Mansor, E., S., Ali, E. A., & Shaban, A. M. (2021). Tight ultrafiltration polyethersulfone membrane for cheesewhey wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 407, 127175.
- [9] Mohamed, H., Abdel, N. A. Z., & Maysa, M. A. A. (2013). Optimization of the fermentation conditions for ethanol production by new thermotolerant yeast strains of *Kluyveromyces* sp. *African Journal of Microbiology Research*, 7(37), 4550–4561.
- [10] Agarkova, E. Y., Kruchinin, A. G., Zolotaryov, N. A., Pryanichnikova, N. S., Belyakova, Z. Y., & Fedorova, T. V. (2020). Processing cottage cheese whey components for functional food production. *Foods and Raw Materials*, 8(1).
- [11] Siti, D. P., Puspita, A. A., & Ariyanti, D. (2013). Pembuatan Bioetanol Dari Limbah Keju (Whey) Melalui Proses Fermentasi Fed-Batch Dengan *Kluyveromyces Marxianus*. In *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri* (Vol. 2, Issue 3). [Http://EjournalS1.Undip.Ac.Id/Index.Php/Jtki](http://EjournalS1.Undip.Ac.Id/Index.Php/Jtki).
- [12] Tesfaw, A., Oner, E. T., & Assefa, F. (2021). Evaluating Crude Whey For Bioethanol Production Using Non-*Saccharomyces* Yeast, *Kluyveromyces Marxianus*. *SN Applied Sciences*, 3(1), 1–8.
- [13] Rachmah, A. N. L., Fatmawati, A., & Widjaja, A. (2022). Impact of surfactant-aided subcritical water pretreatment process condition on the reducing sugar production from oil palm empty fruit bunch. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 963(1).
- [14] Rachmah, A. N. L., Susanti, Y., A'yun, A. Q., Ansori, A., & Sekaranggalih, R. (2023). Pemanfaatan Biji Lamtoro untuk Pembuatan Kecap dan Pemberdayaan Kelompok PKK di Desa Kaliploso Cluring, Banyuwangi. *Warta LPM*, 26(2), 157–165.
- [15] Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522–550.
- [16] Syauqiah, I. (2015). Pengaruh Waktu Fermentasi Dan Persentase Starter Pada Nira Aren (*Arenga Pinnata*) Terhadap Bioetanol Yang Dihasilkan. *Info Teknik*, 16(2), 217–226.
- [17] Yeast, T., Dahiya, M., & Vij, S. (2012). Comparative Analysis Of Bioethanol Production From Whey By Different Strains Of Immobilized. 2(3), 2–6.
- [18] Budiantono, S., Retnaningsih, S., & Aksioma, D. (2016). Measurement System Analysis Repeatability and Reproducibility (Gauge R&R) pada Alat Vickers Hardness Tester Di PT Jaykay Files Indonesia. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 5(2), 468–473.