

FERMENTASI NIRA NIPAH MENJADI BIOETANOL MENGGUNAKAN TEKNIK IMMOBILISASI SEL *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ella Awaltanova, Syaiful Bahri, Chairul

Laboratorium Teknologi Bioproses
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Bina Widya Km 12,5 Simpang Baru, Panam, Pekanbaru 28293
Email : ellaawal22@yahoo.com

ABSTRACT

The high dependence of fuel resource such as oil, coal, and gas will influence depletion of fossil resources (oil, natural gas, and coal). Therefore, it is important to study conversion of biomass to bioethanol as renewable energy to overcome dependence on fossil fuels. Production of bioethanol using free cell in fermentation and it several disadvantages in separation of yeast cells and biethanol concentration. This research was conducted the fermentation of nypa sap with immobilization cell, using tween 80 and ergosterol as suplement to obtain high concentration of bioethanol as well as avoid osmosis in cells . This work is aimed to study of bioethanol production from nypa sap using immobilized cells, to determine effect of cell immobilization weight and fermentation time to bioethanol, and to obtain maximum conditions on the process. Fermentation was conducted in 2L fermentor having variations of fermentation time such as 24, 36, 48, 60, 72, 84, and 96 hours respectively and cell immobilization weight e.g. 5 %w/v, 10 %w/v, 15 %w/v, and 20 %w/v respectively, and also addition of tween 80 of 0,2% v/v and ergosterol of 0,5 g/l. The concentration of bioethanol was increased with increases of immobilized cells. Maximum conditions of bioethanol production from nypa sap using immobilized cells are shown having cell immobilization weight of 20% w/v and fermentation hours 96th about 17,574 % v/v equal with 138,708 mg/ml.

Keywords : bioethanol, ergosterol, immobilized cells, nypa, sacharomyces cereviceae, tween 80

I. PENDAHULUAN

Tingginya ketergantungan terhadap bahan bakar fosil seperti minyak bumi (sekitar 47%), batubara (sekitar 27%) dan gas (sekitar 20%) mengakibatkan pengurusan terhadap sumber daya fosil (minyak bumi, gas alam, dan batu bara) (Poernomo, 2014). Minyak bumi dan gas bumi merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbaharui dan suatu saat akan habis apabila dilakukan eksploitasi secara terus menerus. Energi terbarukan yang dijadikan solusi untuk permasalahan tersebut juga masih belum optimal pengembangannya. Oleh karena itu, perlu dilakukan dorongan terhadap teknologi energi terbarukan seperti konversi bioetanol dari biomassa.

Penggunaan nira nipah sebagai bahan baku pembuatan bioetanol lebih prospektif dan potensial. Nira nipah memiliki komposisi kimia sebesar 19,5 wt% berupa sukrosa, glukosa, dan fruktosa (Tamunaidu et al, 2012). Menurut Tamunaidu *et al* (2011) nira nipah berpotensi untuk menghasilkan 15.600 liter etanol per hektar, atau 2 kali lipat hasil yang diperoleh dari tebu, dan 6 kali lipat hasil dari jagung.

Selama ini bioetanol diproduksi dengan proses fermentasi yang menggunakan sel bebas. Metode tersebut dilakukan dengan mencampurkan sel ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan substrat gula dalam gelas erlemeyer yang dihomogenisasi dalam shaker pada kondisi

tertentu. Cara tersebut mempunyai kelemahan karena pemisahan produk lebih sulit dan sel ragi yang bercampur dengan produk sulit dipisahkan (Sebayang, 2006). Untuk mengatasinya maka dilakukan teknik immobilisasi sel untuk memproduksi bioetanol dengan menggunakan bahan baku nira nipah.

Teknik immobilisasi sel menyebabkan sel terjatoh dalam suatu matriks atau membran. Immobilisasi sel bertujuan untuk membuat sel menjadi tidak bergerak atau berkurang ruang geraknya sehingga sel menjadi terhambat pertumbuhannya dan substrat yang diberikan hanya digunakan untuk menghasilkan produk. Sel juga dapat digunakan kembali setelah fermentasi selesai dengan cara memisahkan sel dari produk yang hanya menggunakan kertas saring (Azizah, 2014).

Produk hasil fermentasi yang tinggi sangat diharapkan pada sebuah proses produksi. Hal ini memberikan keuntungan yang besar dari segi ekonomis, namun hal tersebut juga memberikan dampak negatif pada *Saccharomyces cerevisiae*. Kadar etanol yang tinggi akan menyebabkan dinding sel yang terdiri dari senyawa organik larut, akibatnya dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* akan lisis sehingga menyebabkan mati. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengatasi kendala tersebut, salah satunya dengan penambahan tween 80 dan ergosterol. Tween 80 dapat dijadikan sebagai sumber asam lemak tak jenuh yang diperlukan oleh mikroorganisme. Tween 80 juga berperan sebagai surfaktan untuk menurunkan tegangan permukaan cairan di sekitar sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga media fermentasi yang kental tidak memberikan efek negatif pada sel (Feng et al, 2006). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan proses fermentasi nira nipah dengan teknik immobilisasi sel yang menggunakan tween 80 dan ergosterol sebagai suplemen, sehingga diperoleh etanol dari nira nipah yang lebih tinggi.

II. METODE PENELITIAN

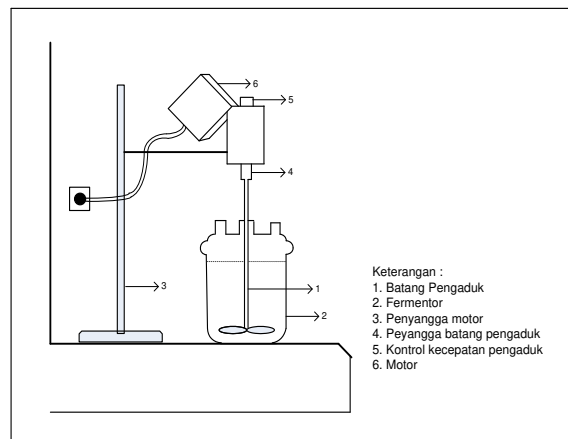
2.1 Bahan dan Alat

2.1.1 Bahan

Bahan baku pada penelitian ini adalah nira nipah yang didapat dari Kabupaten Rokan Hilir Provinsi Riau. Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan merupakan produk dari Saf-Instant. Bahan kimia yang digunakan antara lain reagen Nelson-Samogyi, CaCl_2 , Urea, NPK, KH_2PO_4 , NaOH, H_2SO_4 , NaCl, dan aquadest

2.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu rangkaian alat fermentasi seperti ditampilkan pada Gambar 2.1 (fermentor 2 liter, pengaduk, motor pengaduk), autoclave, inkubator, mikroskop, erlenmeyer, gelas piala, labu ukur, gelas ukur, timbangan digital, pipet, dan tabung reaksi serta alat analisa (spektrofotometer UV-VIS dan *Gas Chromatography*).



Gambar 2.1 Rangkaian Alat Fermentasi

2.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari beberapa tahap sebagai berikut.

1. Persiapan Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira nipah. Nira nipah hasil penyadapan dilakukan pemanasan untuk mencegah nira nipah supaya tidak menjadi asam dan juga untuk menguapkan sebagian air yang masih banyak terkandung dalam nira nipah.

2. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar glukosa digunakan dalam penentuan konsentrasi glukosa dari substrat dengan metode Nelson–Somogyi (Sudarmadji, 1997). Kurva ini menyatakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa. Dengan kurva ini larutan yang mengandung gula (gula pereduksi) dapat diketahui konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak.

3. Sterilisasi Peralatan

Semua peralatan yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan cara mencuci peralatan dengan detergen sampai bersih, kemudian dilakukan pengeringan di dalam oven pengering. Setelah dikeringkan peralatan yang terbuat dari kaca disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15psi. Tabung reaksi terlebih dahulu ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil, gelas ukur, pipet tetes kaca, spatula, erlemeyer dan peralatan kaca dibungkus menggunakan koran dan plastik. Peralatan yang terbuat dari plastik disterilkan dengan cara menyemprotnya dengan alkohol 98%.

4. Pembuatan Sel Immobilisasi (Calinescu, 2012)

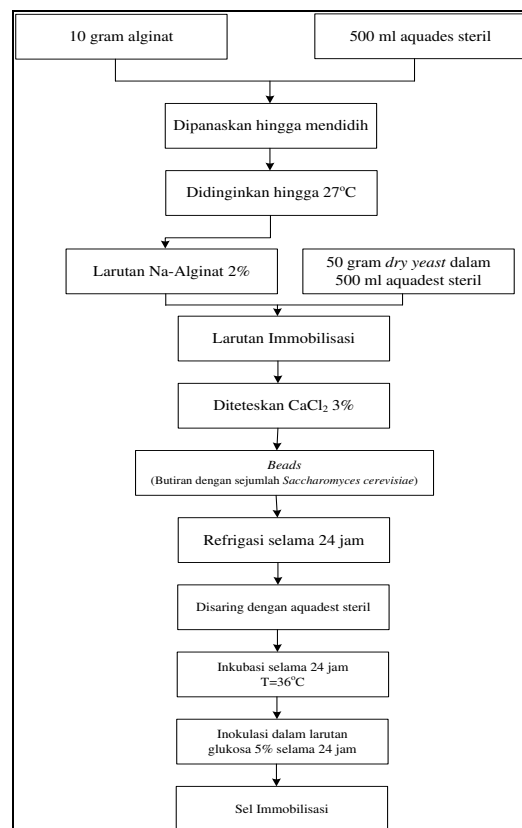
Sel yang digunakan dalam immobilisasi adalah sel *Saccharomyces cerevisiae*, sedangkan bahan pengimmobilisasi digunakan larutan Na-Alginat 2%. Larutan alginat 2% dibuat dengan cara melarutkan 10 gram alginat dalam 500 ml aquades. Larutan di aduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga mendidih dan larut. Sementara itu, larutan CaCl₂ 3% disiapkan dengan melarutkan 30 gram CaCl₂ dalam 1000 ml aquades. Larutan alginat dan CaCl₂ di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan kemudian didinginkan.

Dry yeast (saf instant) sebanyak 50 gram dilarutkan dalam 500 ml aquades yang telah disterilkan. Larutan *yeast* diaduk selama 15 menit pada suhu 35°C dengan

sangat lambat. Larutan *yeast* dibiarkan mengendap selama 40 menit, setelah itu diaduk selama 5 menit.

Larutan alginat dicampurkan kedalam larutan *yeast* dan diaduk hingga homogen. Campuran ini diteteskan kedalam larutan CaCl₂ 3% melalui injektor hingga terbentuk *beads*. *Beads* didinginkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, *beads* dicuci dengan aquades yang telah steril. Sementara itu, larutan nutrisi disiapkan dengan cara melarutkan 10 gram glukosa, 3 gram KH₂PO₄, dan 4,5 gram Na₂PO₄ dalam 1 liter aquades. Larutan nutrisi di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin, sebanyak 1 gram *dry yeast* (saf instant) ditambahkan kedalam larutan nutrisi. Larutan nutrisi diteteskan kedalam *beads* yang telah dicuci dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36°C.

Larutan glukosa 5% disiapkan. Setelah 24 jam, *beads* ditiriskan dari larutan nutrisi dan dimasukkan dalam larutan glukosa 5%. *Beads* di simpan dalam lemari es hingga dilakukan fermentasi.



Gambar 2.3 Pembuatan Sel Immobilisasi

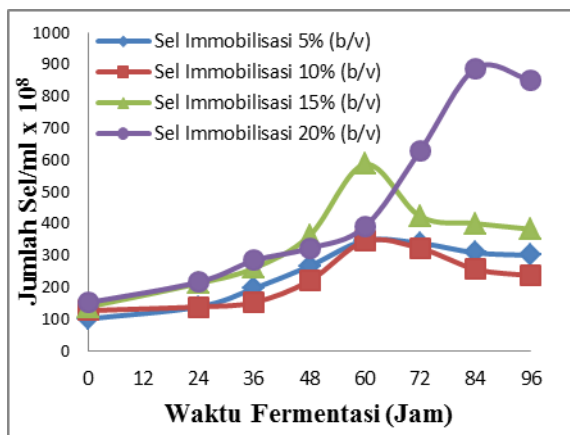
5. Fermentasi

Proses fermentasi dimulai dengan sterilisasi medium fermentasi yang terdiri dari nira nipah sebagai substrat yang ditambahkan tween 80 sebanyak 0,2 (v/v), ergosterol sebanyak 0,5 gr/l, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (Urea) 0,4 gr/l, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (NPK) 0,5 gr/l, dan *yeast extract* 1gr/l. Medium fermentasi tersebut dimasukkan ke dalam labu fermentor 2000 ml lalu di cek pH dan ditutup dengan kapas dan kain kasa kemudian dilapisi dengan aluminium foil. Kemudian dibungkus menggunakan plastik dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Medium fermentasi yang telah dingin ditambahkan *beads* (sel immobilisasi) dengan variasi 5% (b/v), 10% (b/v), 15% (b/v), dan 20% (b/v). Fermentasi dilakukan pada suhu kamar ($25\text{-}30^\circ\text{C}$). Waktu fermentasi divariasikan pada 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, 72 jam, 84 jam, 96 jam untuk mengamati pengaruh waktu fermentasi terhadap bioetanol yang dihasilkan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Berat Sel Immobilisasi Terhadap Jumlah Sel

Berat sel immobilisasi berpengaruh terhadap jumlah sel mikroba yang terdapat dalam medium fermentasi. Semakin tinggi berat sel immobilisasi maka jumlah sel yang terdapat dalam medium fermentasi semakin banyak.

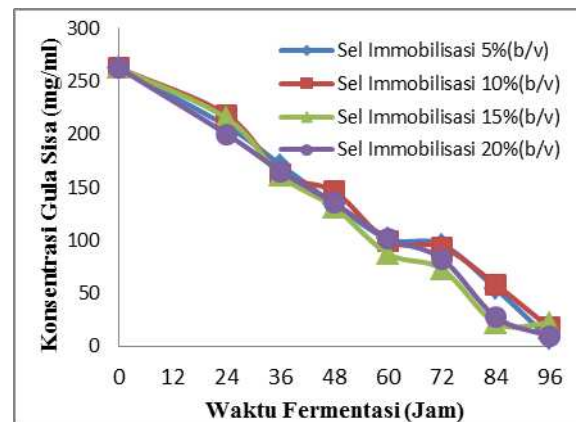


Gambar 3.1. Hubungan Jumlah Sel Mikroba Terhadap Waktu Fermentasi

Penambahan tween 80 dan ergosterol dapat meningkatkan pertumbuhan sel mikroba *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat dilihat pada Gambar 3.1. Selain itu juga disebabkan oleh peran immobilisasi sel dalam melawan tekanan osmotik dan stress sel terhadap etanol dalam medium fermentasi (Tang et al, 2013).

3.2 Pengaruh Berat Sel Immobilisasi dan Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Gula Sisa

Analisa gula sisa bertujuan untuk melihat efektivitas sel immobilisasi dalam mengkonversi gula menjadi bioetanol. Berikut ini adalah grafik hubungan konsentrasi gula sisa terhadap waktu fermentasi.



Gambar 3.2. Grafik Pengaruh Berat Sel Immobilisasi dan Waktu Fermentasi Terhadap Gula Sisa Fermentasi

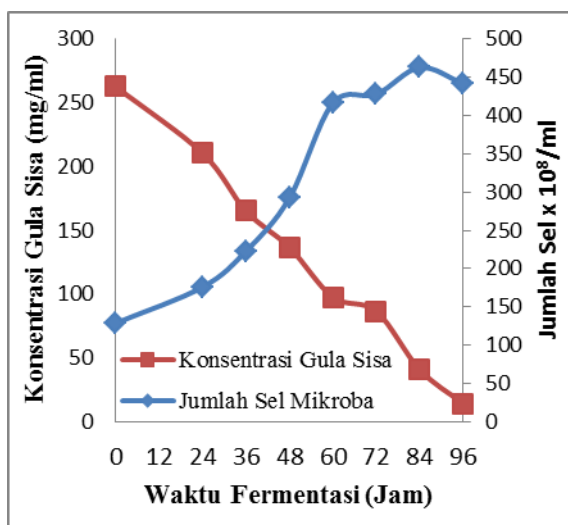
Gula yang dihasilkan menurun seiring dengan lamanya waktu fermentasi dan semakin tinggi konsentrasi berat sel immobilisasi maka jumlah gula yang dikonsumsi semakin banyak. Gula yang terdapat didalam medium fermentasi akan terkonversi menjadi bioetanol dan juga sebagai sumber karbon (C) oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk pertumbuhan sel. Adanya variasi konsentrasi gula sisa pada akhir fermentasi disebabkan oleh adanya variasi berat sel immobilisasi. Semakin tinggi berat sel immobilisasi maka gula reduksi yang

dihasilkan pada akhir fermentasi semakin sedikit yaitu terlihat pada berat sel immobilisasi 20% (b/v), dengan gula reduksi yang tersisa sebesar 10,057 mg/ml.

Berat sel immobilisasi berpengaruh terhadap gula yang dikonsumsi. Semakin tinggi konsentrasi berat sel immobilisasi maka semakin banyak sel dan semakin banyak enzim yang dihasilkan sehingga semakin banyak gula yang terkonversi menjadi bioetanol. Konsentrasi gula yang semakin menurun seiring berjalannya waktu fermentasi disebabkan karena gula yang tersedia setiap waktunya terkonversi menjadi bioetanol akibat dari aktivitas sel ragi dan juga digunakan untuk makanan sel ragi dalam mempertahankan hidupnya dan bereproduksi (Kurniawan et al, 2012).

3.3 Hubungan Sel Mikroba Dengan Konsentrasi Gula Sisa Fermentasi

Jumlah sel mikroba rata-rata untuk semua variasi berat sel immobilisasi memiliki hubungan yang tidak sebanding dengan konsentrasi gula sisa rata-rata setiap waktu fermentasi. Semakin lama waktu fermentasi maka konsentrasi gula sisa semakin menurun sedangkan jumlah sel mikroba semakin naik. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 3.3.

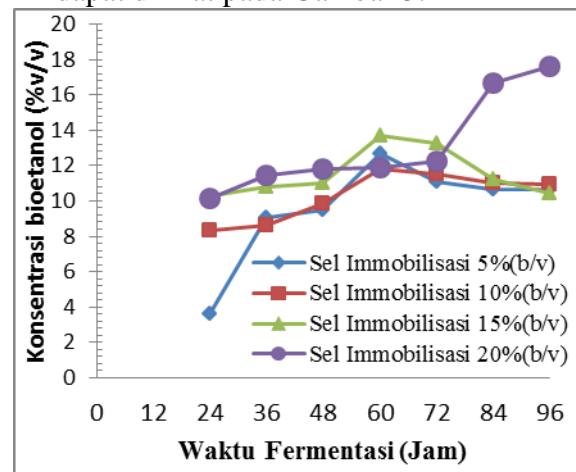


Gambar 3.3. Hubungan Jumlah Sel Mikroba dengan Konsentrasi Gula Sisa

Penurunan konsentrasi gula sisa terjadi karena adanya konsumsi gula oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol dan melakukan metabolisme. Glukosa yang dikonsumsi oleh *Saccharomyces cerevisiae* akan menyebabkan tingginya jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* yang terdapat dalam medium fermentasi.

3.4 Pengaruh Berat Sel Immobilisasi Terhadap Kadar Bioetanol

Berat sel immobilisasi berpengaruh terhadap konsentrasi bioetanol yang dihasilkan. Semakin banyak konsentrasi berat sel immobilisasi maka semakin tinggi konsentrasi bioetanol yang dihasilkan. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 3.4



Gambar 4.4. Hubungan Berat Sel Immobilisasi dan Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Bioetanol

Pada Gambar 3.4 dapat dilihat bahwa konsentrasi bioetanol yang dihasilkan semakin meningkat hingga mencapai kondisi tertinggi dan akan terjadi penurunan di akhir fermentasi pada variasi sel immobilisasi 5%(b/v), 10%(b/v), dan 15%(b/v). Hal ini diduga terjadinya degradasi bioetanol menjadi asam asetat sehingga bioetanol yang dihasilkan menurun di akhir fermentasi. Terbentuknya asam asetat ditandai oleh menurunnya pH di akhir fermentasi.

Pada variasi sel immobilisasi 20%(b/v) konsentrasi bioetanol cenderung meningkat hingga akhir fermentasi. Jumlah

sel yang tersedia pada sel immobilisasi 20%(b/v) di akhir fermentasi masih banyak sehingga mampu menghasilkan konsentrasi bioetanol yang tinggi di akhir fermentasi. Tingginya konsentrasi bioetanol di akhir fermentasi pada sel immobilisasi 20%(b/v) disebabkan akumulasi bioetanol yang dihasilkan pada waktu sebelumnya dan tidak terjadinya reaksi lanjut bioetanol menjadi asam asetat.

Hal ini disebabkan peran sel immobilisasi dalam fermentasi yang dapat meningkatkan yield produk fermentasi dan meningkatkan ketahanan sel mikroba dari pengaruh kondisi lingkungan seperti pH, suhu, pelarut organik, dan zat beracun, sehingga menyebabkan kadar bioetanol yang dihasilkan tinggi (Talebrina *et al*, 2006).

Tween 80 dan ergosterol juga berperan dalam meningkatkan ketahanan sel mikroba dalam medium fermentasi untuk menghasilkan bioetanol dengan kadar yang lebih tinggi. Penambahan tween 80 pada medium fermentasi dapat meningkatkan kemampuan membran sel untuk bertahan dari peristiwa osmosis (Tran *et al* 2010). Ergosterol dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme, kegiatan fermentasi, dan etanol yang dihasilkan dari hasil fermentasi (Chen *et al*, 1990).

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa kondisi maksimum dari fermentasi nira nipah dengan teknik immobilisasi sel *Saccharomyces cerevisiae* diperoleh pada konsentrasi berat sel immobilisasi 20% (b/v) pada waktu fermentasi 96 jam dengan konsentrasi bioetanol sebesar 17,574% (v/v) atau 138,708 mg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

Azizah, Rezita. 2014. *Kajian Penggunaan Tween 80TM Dan Sel Amobil Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari*

Nira Nipah Kental. Skripsi. Universitas Riau

Calinescu, I., Petre Chipurici, Adrian Trifan, Corina Badoi. 2012. *Immobilisation Of Saccharomyces Cerevisiae For The Production Of Bioethanol*. U.P.B.Sci.Bull Journal. ISSN 1454-2331. Vol 74 Hal:33-40

Chen, C., Dale, M. C. and Okos, M. R. 1990. *Minimal nutritional requirements for immobilized yeast*. Biotechnology and Bioengineering 36: 993-1001.

Feng, J., Y. Zeng, C. Ma, X. Cai, Q. Zhang, M. Tong, B. Yu, and P. Xu. 2006. *The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization*. Applied and Environmental Microbiology 72 (11) : 7390-7393.

Kurniawan, R., S. Juhanda., Melati Septiyanti., Yufithia Resgiaty. 2012. *Produksi Etanol Secara Continue dengan Sel Tertambat Menggunakan Bioreactor Tower Fluidized Bed*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan 2012. ISSN: 1693-4393.

Poernomo, A. 2014. *Prospek Panas Bumi Untuk Mendukung Ketahanan Energi*. Dewan Energi Nasional. Pekanbaru.

Sebayang, Firman. 2006. *Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Saccharomyces cerevisiae yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat*. Hal 75-80. ISSN 1412-7814.

Sudarmadji, S., Bambang Haryono., Suhardi., 1997. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta.

Talebrina, F., Taherzadeh, Mohammad J. 2006. *In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology. 377-384

- Tamunaidu, Pramila, Takahito Kakihira, Hitoshi Miyasaka, and Shiro Saka. 2011. *Prospect of Nipa Sap for Bioethanol Production*. In ed. Takeshi Yao. Springer Japan, p. 159–164. http://dx.doi.org/10.1007/978-4-431-53910-0_21.
- Tamunaidu, P and Shiro Saka. 2012. *Potential of Bioethanol from Sugars in Nipa Sap*. 9th Biomsass-Asia Workshop. Japan.
- Tang, P.D.P. and Le, V.V.M. 2013. *Fermentation Performance of Free and Immobilized Yeast On Crock (Sonneratia caseolaris) root-Application Of Immobilized Yeast To Repeated Batch Ethanol Fermentation*. International Food Research Journal. 1813-1817
- Tran, Q. H., Nguyen, T. T., Le V. V. M. and Hoang, K. A. 2010. *Effect of Tween80TM and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing*. International Food Research Journal 17: 309-318.