

PRODUKSI ETANOL DARI TETES TEBU OLEH *Saccharomyces cerevisiae* PEMBENTUK FLOK (NRRL – Y 265)

Ethanol Production from Cane Molasses by Flocculant *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL – Y 265)

Agustin Krisna Wardani, Fenty Nurtyastuti Eka Pertiwi

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65145
Email: wardani8@ub.ac.id

ABSTRAK

Efisiensi produksi bioetanol diperoleh melalui ketepatan pemilihan jenis mikroorganisme, bahan baku, dan kontrol proses fermentasi. Alternatif proses untuk meminimalisasi biaya produksi etanol adalah dengan mengeliminasi tahap pemisahan sentrifugasi sel dari produk karena memerlukan biaya instalasi dan biaya perawatan yang tinggi. Proses sentrifugasi merupakan tahapan penting untuk memisahkan sel mikroba dari medium fermentasi pada produksi bioetanol. Untuk meminimalisir biaya produksi akibat proses tersebut digunakan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dan tetes tebu sebagai sumber gula. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi penambahan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dan konsentrasi sumber gula dalam tetes tebu yang tepat dalam produksi etanol yang maksimum. *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 5%, 10%, dan 15% (v/v) diinokulasikan pada medium tetes tebu hasil *pretreatment* dengan kandungan gula 15%, 20%, dan 25% (b/v) pada pH 5. Fermentasi dilakukan pada suhu 30°C dan agitasi 100 rpm selama 72 jam. Etanol tertinggi didapat pada kondisi konsentrasi inokulum 10% (v/v) dan konsentrasi sumber gula 15% (b/v) yaitu sebesar 8,792% (b/v) dengan *yield* etanol sebesar 65%.

Kata kunci: Etanol, tetes tebu, *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok, fermentasi

ABSTRACT

The potential use of sugar cane molasses by flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production was investigated. In order to minimize the negative effect of calcium on yeast growth, pretreated sugar cane molasses with dilute acid was performed. The influence of process parameters such as sugar concentration and inoculum concentration were evaluated for enhancing bioethanol production. Result showed that maximum ethanol concentration of 8,792% (b/v) was obtained at the best condition of inoculum concentration 10% (v/v) and sugar concentration 15% (b/v). Based on the experimental data, maximum yield of ethanol production of 65% was obtained. This result demonstrated the potential of molasses as promising biomass resources for ethanol production.

Keywords: Ethanol, pretreated cane molasses, *flocculant Saccharomyces cerevisiae*, fermentation

PENDAHULUAN

Jumlah populasi manusia yang semakin meningkat dan semakin berkembangnya industri mengakibatkan semakin tingginya angka ketergantungan terhadap bahan bakar minyak (BBM) sebagai sumber energi utama. Pada tahun 2010 jumlah produksi minyak di Indonesia hanya berkisar 0,98 juta barel per hari (bph), sedangkan jumlah konsumsi minyak lebih besar yaitu 1,27 bph. Selain itu, cadangan minyak bumi di Indonesia juga mengalami penurunan dari tahun

2007 sebesar 8,4 milyar bph menjadi 7,72 milyar bph pada tahun 2010 (Direktorat Jendral Minyak dan Gas, 2011). Hal inilah yang menyebabkan seluruh negara di dunia termasuk Indonesia mengalami krisis energi. Bioetanol merupakan sumber energi alternatif pengganti BBM yang terbuat dari proses fermentasi bahan-bahan alami oleh mikroorganisme (Jeon, 2007). Produksi dan permintaan terhadap bioetanol di dunia mengalami peningkatan setiap tahun. Total permintaan etanol dunia pada tahun 2010 diperkirakan mencapai 3×10^{11} liter (Inoue dkk., 2000).

Efisiensi produksi bioetanol diperoleh melalui ketepatan pemilihan jenis mikroorganisme, bahan baku, dan kontrol proses fermentasi. Tetes merupakan sisa dari proses pengkristalan gula pasir yang masih mengandung gula dan asam-asam organik sehingga merupakan bahan baku yang baik untuk pembuatan etanol. Dibandingkan bahan baku lain, tetes mempunyai keunggulan yaitu selain harganya murah juga mengandung 50% gula sederhana yang dapat difermentasi langsung oleh *yeast* menjadi etanol tanpa *pretreatment* (Murtagh, 1995). *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok merupakan *yeast* yang mampu membentuk flok atau gumpalan sel yang mengendap secara cepat dalam medium pertumbuhannya, yang berperan penting dalam produksi bioetanol karena mempermudah proses purifikasi yaitu meniadakan proses sentrifugasi sehingga dapat menurunkan biaya produksi (Kida dkk., 1991). Saat ini, terdapat tiga teori yang menjelaskan tentang terjadinya flokulasi pada *yeast*, yaitu: teori koloidal, teori jembatan Ca^{2+} dan teori *Lectin-model*. Sementara ini teori *Lectin-model* diakui sebagai teori yang dapat diterima. Berdasarkan teori tersebut, flokulasi terjadi karena interaksi antara dua komponen berbeda dalam permukaan sel yang sama (Domingues dkk., 2000). Hal ini diperkuat oleh Miki dkk. (1982) bahwa flokulasi bisa terjadi karena terjadi interaksi antara permukaan protein dengan polisakarida pada sel yang saling berdekatan. Menurut Smit (1992) flokulasi yang terjadi pada *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok diakibatkan oleh adanya ion Ca^{2+} . Flokulasi tidak terjadi pada saat Ca^{2+} dihilangkan, demikian pula adanya EDTA atau EGTA yang mampu mencegah pembentukan flok. Kondisi optimum untuk proses flokulasi adalah 4.5. Adanya monosakarida juga dapat menghambat flokulasi, khususnya manosa dan metil-pyranosida. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi penambahan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dan konsentrasi sumber gula dalam tetes tebu yang tepat dalam produksi etanol yang tinggi.

METODE PENELITIAN

Bahan

Saccharomyces cerevisiae (NRRL -Y265) pembentuk flok yang diperoleh dari *Northen Regional Research Laboratory*, USA. Tetes tebu dari PG Gempol Kerep, PT Serbaguna Harapan, Mojokerto, Jawa timur. Glukosa (Merck), *yeast extract* (Pronadisa), pepton (Pronadisa), NaOH p.a (Merck), EDTA (Merck), HCl 37% p.a (Merck), DNS (Sigma-aldrich), gliserol 87% (Merck), asam sitrat (Merck), Na-sitrat (Merck), Na-K Tartarat (Merck), HNO_3 65% p.a (Merck), dan H_2SO_4 95-97% p.a (Merck).

Alat

Shaker waterbath (Model Memmert WNB 14), autoklaf (Model HL-36 AE, Hirayama Jepang), inkubator (Binder BD 53 Germany), mikroskop (Olympus CH 20), vorteks (Turbo Mixer model LW Scientific), hot plate stirrer (Model IKA RH Basic 2), plate stirrer (Model IKA Big squid star), pH meter (HANNA), *laminar air flow* (Magnehelic), timbangan analitik (Mettler Toledo AL 204), mikropipet 1000 μl dan 40-200 μl (Finnpipett, Labssystem), sentrifuse dingin (Hettich Zentrifugen Jerman), sentrifuse 8 x 5L (WINA Instruments type 5020A), *refrigerator* (Sharp), *atomic absorption spectrophotometer* (AA-6300 SHIMADZU), kompor listrik (Maspion), tanur pengabuan (Furnacethermolyne).

Pengamatan *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok Menggunakan Mikroskop Cahaya

Untuk mengetahui bentuk sel *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok, maka dilakukan pembuatan preparat basah *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok (Cappuccino dan Sherman, 2005). Pembuatan preparat basah dilakukan dengan cara mengambil 1 ose inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dari media agar miring PGYA kemudian diletakkan dalam gelas preparat yang telah ditambahkan 1 tetes aquades. Setelah itu gelas preparat ditutup dengan kaca penutup dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan 1000 kali.

Pola Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok

Metode sebagaimana telah dilakukan oleh Cappuccino dan Sherman (2005). Untuk mengetahui pola pertumbuhan *S. cerevisiae* pembentuk flok, 4% (v/v) kultur ditumbuhkan pada medium sintetik PGYB (glukosa 20 g/L, yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/L), kemudian diamati *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 660 nm setiap 4 jam selama 24 jam. Nilai OD menyatakan dengan jumlah sel yg tumbuh dalam medium PGYB.

Pembuatan Stok Kultur dan Peremajaan Kultur

Pembuatan stok kultur dan peremajaan mengacu pada Bandaru dkk.(2005). Pembuatan stok kultur dilakukan dengan menumbuhkan 1 ose kultur *flocculant S. cerevisiae* yang telah diremajakan (umur 24 jam) pada media agar miring (PGYA) dengan komposisi glukosa 20 g/L, yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/L dan agar 15 g/L. Stok kultur agar miring ditumbuhkan pada inkubator suhu 30 °C selama 24 jam, kemudian disimpan dalam lemari es suhu 4°C dan diremajakan setiap 2 minggu sekali. Pembuatan stok kultur

dalam gliserol dilakukan dengan memasukkan kultur yang berumur 24 jam dari media PGYB dimasukkan pada *microtube* dan ditambahkan dengan gliserol 60% dengan perbandingan 1:1. Kemudian disimpan dalam *freezer* dengan metode *deep freezing*. Peremajaan kultur dilakukan dengan menumbuhkan 1 ose kultur *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok pada media sintetik cair (PGYB) pH 5 dengan komposisi pepton 20 g/L, glukosa 20 g/L, yeast extract 10 g/L. Sel ditumbuhkan dalam inkubator suhu 30 °C selama 24 jam.

Pembuatan Kultur Starter Flocculant *Saccharomyces cerevisiae*

Kultur starter *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dibuat dengan menumbuhkan 4% (v/v) kultur yang telah diremajakan selama 24 jam pada medium sintetik PGYA dalam erlenmeyer 250 ml dan diinkubasi di dalam inkubator selama 15 jam pada suhu 30 °C (Speers dkk., 2006).

Persiapan Tetes Tebu

Tetes tebu diencerkan dengan penambahan aquades yang bertujuan untuk menurunkan kandungan gula dalam tetes menjadi 15%, 20%, dan 25% (b/v). Proses *pretreatment* dilakukan dengan penambahan asam sulfat 75% (v/v) yang bertujuan untuk mengendapkan dan pengikatan logam serta *trace element* hingga pH dibuat mencapai titik isoelektrik yaitu sekitar 2,8-3,2 kemudian dipanaskan pada suhu 90°C selama 5 menit. Tetes tebu diendapkan 24 jam pada suhu ruang untuk memaksimalkan endapan yang terbentuk. Setelah itu tetes tebu disaring menggunakan kain saring untuk memisahkan cairan dengan endapannya. Proses sentrifugasi dilakukan pada 1200 rpm selama 30 menit untuk memisahkan endapan yang masih terlarut di dalam cairan tetes tebu. pH tetes diatur pada pH 5 dengan menggunakan NaOH 50% bertujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok. Kemudian dilakukan pemanasan pada suhu ±90°C selama 5 menit. Tetes tebu sebelum dan sesudah *pretreatment* dilakukan analisis kadar abu dan kadar kalsium untuk mengontrol kandungan logam dan zat pengotor.

Fermentasi Etanol dari Tetes Tebu

Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum dan konsentrasi sumber gula terhadap produksi etanol dari tetes tebu, inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok masing-masing sebanyak 5%, 10%, dan 15% (v/v) diinokulasikan pada medium tetes tebu yang telah mengalami *pretreatment* tanpa suplementasi dengan konsentrasi sumber gula 15%, 20%, dan 25% (b/v) sesuai dengan rancangan

percobaan. Fermentasi dilakukan pada suhu 30°C, 100 rpm selama 72 jam, kemudian juga dilakukan analisis *optical density* (OD) sel, pH, gula reduksi setiap 24 jam, dan analisis kadar etanol pada jam ke-72.

Metode Analisis

Pengujian bahan baku tetes meliputi analisis total gula metode DNS (Ceirwyn, 1995), total abu (Sudarmadji, 1997), kadar kalsium menggunakan AAS. Pengujian produk hasil fermentasi tetes tebu meliputi analisis pH menggunakan pH meter, total gula menggunakan metode DNS (Ceirwyn, 1995), konsentrasi sel dengan spektrofotometer dan kadar etanol menggunakan gas kromatografi.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

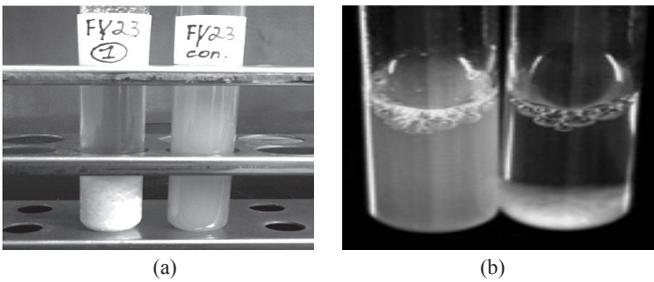
Penelitian ini dirancang menggunakan dua faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi inokulum (I) *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok yang terdiri atas tiga level yaitu 5%, 10%, dan 15 % (v/v). Faktor kedua adalah konsentrasi sumber gula (S) yang merupakan kandungan gula dalam tetes tebu terdiri terdiri level yaitu 15%, 20%, dan 25% (b/v), sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan. Data dianalisis dimana penentuan perlakuan terbaik didasarkan pada produksi etanol tertinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

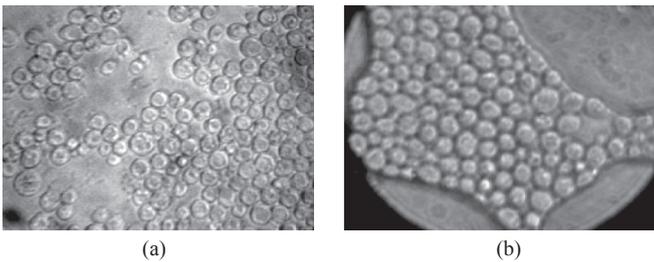
Karakteristik *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok

Berdasarkan penelitian ini, *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok NRRL – Y265 yang ditumbuhkan pada media sintetik PGYB kemudian divorteks untuk mencampur sel dalam medium, sel terbukti tetap membentuk flok (gumpalan sel) yang melayang dalam medium dan dapat mengendap di dasar medium dalam waktu tujuh menit. Menurut Kida dkk. (1991) flokulasi *yeast* didefinisikan sebagai agregasi *yeast* sel secara aseksual, *reversible*, dan tergantung pada kalsium yang membentuk flok dimana terdiri dari sejumlah besar sel yang dengan cepat dapat mengendap pada medium pertumbuhan cair. Umumnya industri etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* bukan pembentuk flok yang membutuhkan biaya pemurnian dengan sentrifugasi atau filtrasi yang mahal untuk memisahkan sel. Gambar *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dalam media dapat dilihat pada Gambar 1.

Penampakan sel *flocculant Saccharomyces cerevisiae* NRRL – Y265 melalui penagamatan di bawah mikroskop cahaya dapat dilihat pada Gambar 2.

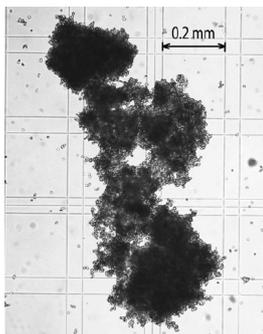


Gambar 1. Gambar *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dalam medium sintetik (a) Hasil pengamatan dan (b) Literatur (Bauer dkk., 2010)



Gambar 2. Gambar *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok NRRL – Y265 melalui mikroskop cahaya (a) Perbesaran 400x dan (b) Perbesaran 1000x

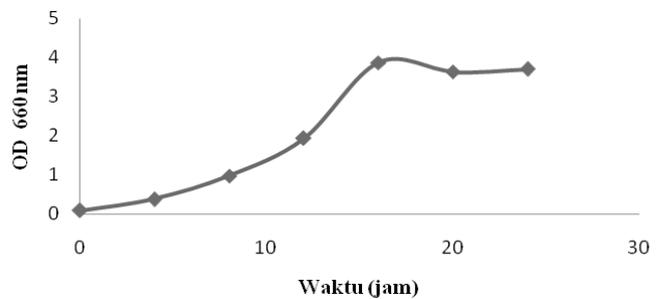
Berdasarkan Gambar 2, sel *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok NRRL – Y265 membentuk kumpulan sel (flok) yang berdekatan antara satu dengan sel yang lain. Hal ini dikarenakan adanya flokulin yang melekat pada dinding sel glikoprotein akan berikatan dengan α -manan karbohidrat dari sel yang lain (Teinissen dan Steensma, 1995). Miki dkk.(1982) menambahkan adanya ion Ca^{2+} yang berperan sebagai kofaktor dalam mengaktifkan permukaan protein sehingga meningkatkan kemampuan lektin untuk berikatan dengan α -manan karbohidrat. Oleh karena itu, penampakan *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok bila dilihat melalui mikroskop magnetik dalam bentuk tiga dimensi adalah seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengamatan *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok menggunakan mikroskop magnetik dengan perbesaran 50x (Purwadi, 2006)

Pola Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok

Pengamatan terhadap pola pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok bertujuan untuk mengetahui terjadinya fase awal stasioner dimana jumlah sel paling maksimum. Pada fase ini, *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok digunakan sebagai kultur starter dalam fermentasi bioetanol karena dapat mempersingkat fase adaptasi mikroba pada medium fermentasi tetes tebu sehingga dapat mempercepat terjadinya proses fermentasi etanol. Pola pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Pola pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok (NRRL – Y 265)

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok mengalami fase lag pada jam ke-0 sampai jam ke-4, kemudian mengalami fase log pada jam ke-4 sampai jam ke-16 dimana sel tumbuh sangat cepat dan jumlah sel bertambah mengikuti kurva logaritmik. Pada jam ke-16 hingga ke-24, *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok mengalami fase stasioner dimana jumlah sel relatif tetap karena terbatasnya jumlah substrat sehingga sel hidup sama dengan sel yang mati. Menurut Khongsey dkk. (2010) konsentrasi awal sel tertinggi adalah pada saat awal fase stasioner. Oleh karena itu, pada penelitian ini kultur starter yang digunakan untuk fermentasi etanol dari tetes tebu adalah *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok yang berumur 15 jam yaitu berdasarkan hasil kurva pertumbuhan dimana konsentrasi sel dianggap paling maksimal serta fase adaptasi sel terhadap medium fermentasi selanjutnya dapat dipercepat sehingga proses fermentasi berjalan lebih cepat. Fase kematian *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok tidak teramati pada kurva karena pengukuran sel menggunakan OD dimana sel yang terbaca merupakan total sel yang hidup dan mati.

Analisis Bahan Baku Tetes Tebu

Parameter penting tetes tebu pembuatan bioetanol adalah kandungan gula dan total abu. Kandungan gula

dalam tetes berperan sebagai substrat yang digunakan oleh *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok untuk dikonversi menjadi etanol. Tetes tebu mempunyai kandungan logam dan kandungan zat pengotor lainnya akibat dari proses pembuatan gula pasir. Kadar logam yang tinggi dapat menyebabkan kerak pada alat serta dapat menghambat fermentasi. Oleh karena itu, kadar abu dan kalsium yang merupakan indikator kandungan logam dan zat pengotor perlu diketahui dan diminimalisir jumlahnya dalam tetes tebu yang akan digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol. Berikut ini adalah tabel hasil analisis total gula reduksi, kadar abu, dan kadar kalsium tetes tebu yang diambil dari PG. Gempol Krep, PT. Serbaguna Harapan, Mojokerto, Jawa Timur.

Tabel 1. Kandungan bahan baku tetes tebu

Parameter	Hasil (%)	
	Analisis	Literatur
Total gula	50-60*	50,23
Kadar abu	7-15**	11,005
Kadar kalsium Tetes tebu	7-15**	12,28
Tetes encer tanpa <i>pretreatment</i>	7-15**	11,67
Tetes encer <i>pretreatment</i>	0,5***	9,38

* Yumaihana dan Aini, 2008

** Chen dkk., 1993

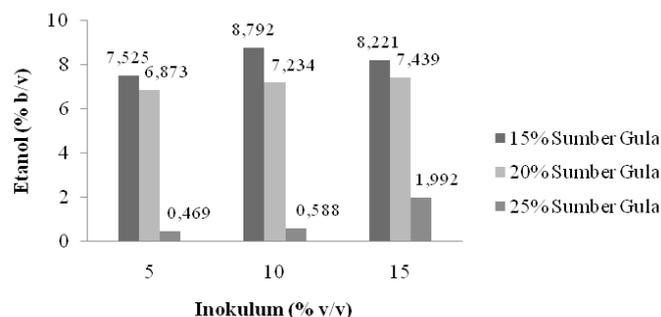
*** Yadaf, dkk., 1997

Berdasarkan Tabel 1, tetes tebu yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol pada penelitian ini mengandung gula sebesar 50,23 %. Hal ini sesuai dengan Yumaihana dan Aini (2008) yang menyebutkan bahwa tetes tebu mengandung gula dengan kadar tinggi yaitu 50-60%, asam amino dan mineral sehingga tetes sangat potensial dimanfaatkan sebagai bahan baku bioetanol. Karena kadar gula tetes tebu yang sangat tinggi, tetes tebu diencerkan terlebih dahulu hingga kadar gulanya berkisar 12-17% sebelum digunakan sebagai bahan baku bioetanol.

Dari Tabel 1, tetes yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kadar abu sebesar 11,001% (b/v). Berdasarkan Chen dkk. (1993), kadar abu tetes berkisar 7-15%. Sedangkan spesifikasi utama tetes tebu sebagai bahan baku alkohol (termasuk etanol) adalah tidak mengandung abu lebih dari 10% (Murtagh, 1995). Karena kadar abu tetes tebu dalam penelitian ini lebih dari 10%, maka dilakukan *pretreatment* untuk mengendapkan logam dan komponen pengotor dalam tetes tebu sehingga dapat dijadikan sebagai bahan baku produksi etanol. Pada penelitian ini dilakukan *pretreatment* tetes menggunakan H₂SO₄ pekat dimana ion SO₄²⁻ akan mengikat logam-logam yang terkandung dalam tetes yang pada akhirnya mengendap dan dapat dipisahkan dalam medium. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang

menunjukkan bahwa kadar kalsium dalam tetes setelah dilakukan *pretreatment* turun dari 11,67 % menjadi 9,38 %. Yadav dkk. (1997) telah meneliti efek *pretreatment* tetes menggunakan H₂SO₄ dan K₄Fe(CN)₆ dalam produksi etanol oleh berbagai jenis strain *yeast* telah diteliti dengan tujuan untuk menemukan metode yang efektif untuk mengurangi berbagai komponen penghambat.

Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* terhadap Produksi Etanol dari Tetes Tebu



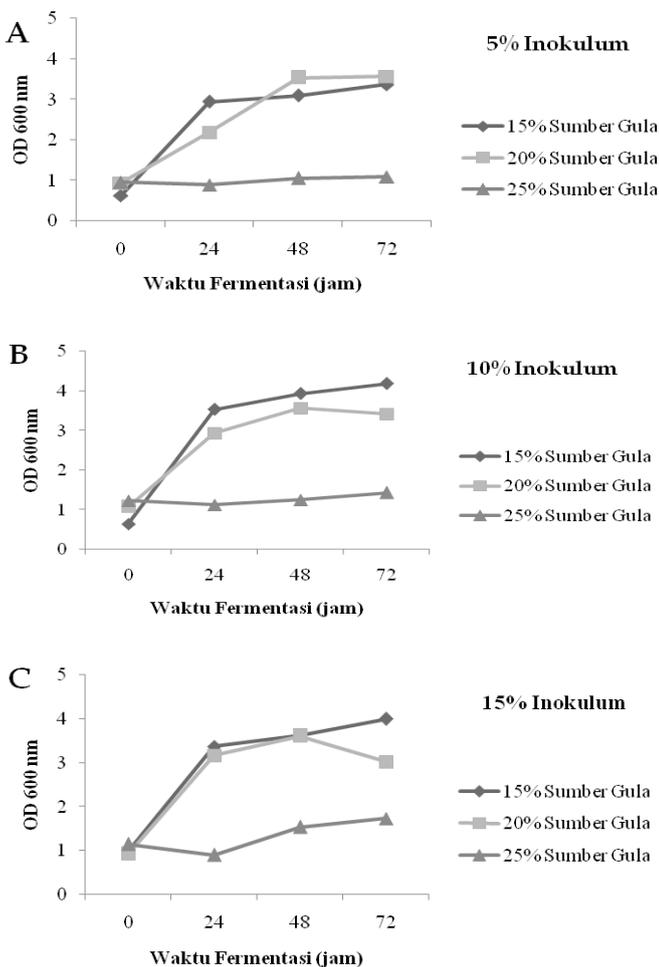
Gambar 5. Pengaruh konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok terhadap produksi etanol dari tetes tebu

Gambar 5 menunjukkan bahwa konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh terhadap produksi etanol dari tetes tebu. Produksi etanol semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi inokulum yang ditambahkan pada medium tetes yang mengandung sumber gula sebesar 20% dan 25%. Mukhtar dkk. (2010) menyatakan bahwa konsentrasi etanol meningkat dengan semakin banyaknya konsentrasi inokulum yang ditambahkan. Wahyudi (1997) menyatakan bahwa pada konsentrasi sumber gula yang lebih tinggi dibutuhkan inokulum yang lebih banyak untuk mengkonversi gula menjadi etanol. Pada media tetes dengan kandungan gula 15% (b/v), tetes tebu yang diinokulasikan 10% (v/v) *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok menghasilkan etanol yaitu 8,792% b/v yang lebih tinggi daripada penambahan konsentrasi inokulum 15% yang menghasilkan etanol sebesar (8,221% b/v). Agbogbo dkk. (2007) menyatakan bahwa penambahan inokulum dengan konsentrasi yang rendah mengakibatkan laju fermentasi menjadi lambat, tetapi dapat menghasilkan etanol yang lebih tinggi karena setelah sel memperbanyak diri, sel akan mengkonversi gula menjadi etanol secara perlahan. Maka selama fermentasi tidak akan terjadi akumulasi etanol yang bisa menjadi racun bagi sel tersebut dan sel masih tetap bisa menghasilkan etanol hingga akhir fermentasi. Mukhtar dkk. (2010) menyatakan bahwa dalam pembuatan etanol, inokulasi *yeast* yang terlalu tinggi menyebabkan proses melemah lebih cepat dan menurunkan viabilitas sel setelah

fase pertumbuhan. Kondisi pertumbuhan dan metabolisme pada populasi sel yang tinggi tidak diharapkan karena mengganggu akses nutrisi, keterbatasan ruang, dan interaksi antar sel.

Produksi etanol tertinggi sebesar 8,792 % (b/v) diperoleh dari fermentasi dari tetes tebu yang mengandung sumber gula 15% dengan penambahan inokulum sebanyak 10% (v/v). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Neelakandan dan Usharani (2009).

Pengaruh Konsentrasi Sumber Gula terhadap Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*



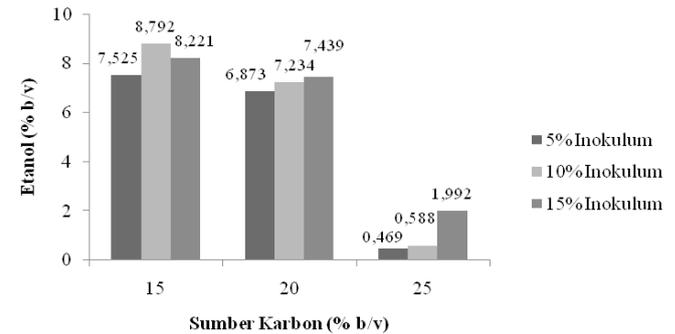
Gambar 6. Pengaruh konsentrasi sumber gula terhadap pertumbuhan *Sacharomyces cerevisiae* pembentuk flok selama fermentasi etanol pada penambahan inokulum 5% (A), inokulum 10% (B), inokulum 15% (C)

Berdasarkan Gambar 6, jumlah sel paling maksimal diperoleh setelah fermentasi selama 48 jam pada medium tetes tebu yang mengandung sumber gula 15% (b/v) dan penambahan inokulum sebesar 10% (v/v). Jumlah sel yang lebih rendah dihasilkan pada medium tetes yang mengandung

sumber gula lebih tinggi dari 15% yaitu 20% dan 25%. Jumlah sel paling minimum dihasilkan pada medium tetes dengan kandungan sumber gula 25%. Hal ini sesuai dengan Thomas dkk.(1996) yang menyebutkan bahwa fermentasi pada medium yang mengandung gula sebesar 25% tergolong fermentasi pada kondisi tekanan osmotik tinggi dimana sel mengalami stres sehingga metabolisme sel terganggu.

Berdasarkan Gambar 6, konsentrasi sumber gula dalam tetes tebu berpengaruh terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi sumber gula 15% dan 20%, sel mengalami pertumbuhan secara signifikan. Namun, pada konsentrasi sumber gula 25% tingkat pertumbuhan sel sangat rendah karena tingginya kandungan sumber gula mengakibatkan viskositas dan tekanan osmotik dalam medium meningkat sehingga sel mengalami stres dan metabolisme sel menurun. Gaur (2006) menyatakan bahwa pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi gula hingga 20% dalam medium, tetapi meningkatnya konsentrasi gula lebih dari 20% mengakibatkan pertumbuhan sel terhambat.

Pengaruh Konsentrasi Sumber Gula terhadap Produksi Etanol dari Tetes Tebu



Gambar 7. Pengaruh konsentrasi sumber gula terhadap produksi etanol dari tetes tebu

Berdasarkan Gambar 7, produksi etanol semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi sumber gula dalam tetes tebu yaitu pada konsentrasi 15%, 20%, dan 25% (b/v). Menurut Asli (2009) konsentrasi gula awal mempengaruhi konsentrasi etanol dan konversi gula dalam proses fermentasi. Pada konsentrasi terendah sumber gula 15% menunjukkan produksi etanol paling maksimal dimana mikroba akan tumbuh dan mengkonversi substrat menjadi etanol tanpa adanya inhibisi substrat yang menyebabkan sel mengalami stres dan metabolisme sel menurun. Konsentrasi sumber gula yang tepat untuk menghasilkan etanol paling tinggi berdasarkan penelitian ini adalah 15% (b/v) yang sesuai

dengan hasil penelitian Mariam dkk. (2009). Semakin tinggi konsentrasi substrat, akan meningkatkan tekanan osmotik yang dapat mengganggu metabolisme sel dan efisiensi proses fermentasi (Gaur, 2006).

Perlakuan Terbaik Produk Etanol

Produksi etanol tertinggi sebesar 8,792% (b/v) diperoleh pada fermentasi tetes tebu dengan konsentrasi gula 15% (b/v) dan penambahan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok sebesar 10% (v/v). Tabel 2 merupakan data lengkap hasil produksi etanol yang dipengaruhi oleh variasi konsentrasi inokulum dan sumber gula.

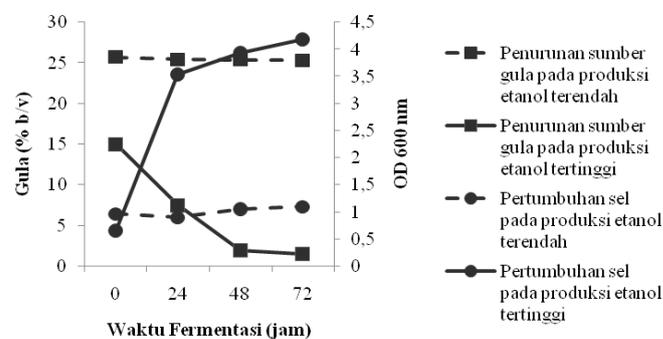
Tabel 2. Pengaruh konsentrasi inokulum dan konsentrasi sumber gula terhadap produksi etanol dari tetes tebu oleh *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok

Konsentrasi inokulum (% v/v)	Konsentrasi sumber gula (% b/v)		
	15	20	25
5	7,525	6,873	0,469
10	8,792	7,234	0,588
15	8,221	7,439	1,992

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Neelakandan dan Usharani (2009) yaitu produksi etanol maksimum sebesar 8,0% diperoleh pada penambahan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* sebesar 10%. Pengaruh perbedaan konsentrasi gula awal pada produksi etanol dari tetes tebu telah diteliti oleh Mariam dkk. (2009) dimana gula maksimal produksi etanol diperoleh pada konsentrasi gula 15%.

Produksi etanol dipengaruhi oleh konsumsi gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dan pertumbuhan inokulum selama fermentasi. Tinggi atau rendahnya produksi etanol dapat dilihat berdasarkan besarnya konsumsi gula dan pertumbuhan *yeast* selama fermentasi. Semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi gula dalam tetes tebu akan semakin berkurang dan konsentrasi sel akan semakin bertambah. Grafik hubungan antara pertumbuhan sel dan konsentrasi sumber gula selama fermentasi etanol dapat dilihat pada Gambar 8.

Berdasarkan Gambar 8, semakin besar konsumsi gula yang ditandai dengan penurunan konsentrasi gula yang signifikan, maka pertumbuhan sel juga semakin tinggi sehingga pada penelitian ini dihasilkan etanol paling tinggi sebesar 8,792% (b/v). Sedangkan semakin sedikit konsumsi gula oleh *yeast*, pertumbuhan sel juga semakin rendah sehingga pada kondisi ini dihasilkan etanol paling rendah yaitu sebesar 0,469% (b/v).



Gambar 8. Hubungan pertumbuhan sel *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dan penurunan konsentrasi sumber gula selama fermentasi etanol

Efisiensi penggunaan substrat untuk menghasilkan etanol dinyatakan dalam *yield* etanol. Semakin tinggi nilai *yield*, maka semakin efisien proses fermentasi tersebut. Perhitungan *yield* pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

$$yield = - \frac{\Delta \text{produk}}{\Delta \text{substrat}} \times 100\%$$

$$yield \text{ etanol teori} = - \frac{\text{mol etanol}}{\text{mol glukosa}} \times 100\% = \frac{96}{192} \times 100 = 51,1\%$$

$$yield \text{ etanol hasil penelitian} = - \frac{8,792}{1,494 - 15,02} \times 100\% = 65 \%$$

Yield etanol perlakuan terbaik pada penelitian ini adalah 65%. Tingginya *yield* yang diperoleh menyatakan bahwa proses fermentasi pada penelitian ini telah efisien. Najafpour dan Lim (2002) menyatakan *yield* maximum etanol oleh *yeast* sebesar 0,51 g etanol/g glukosa atau 51% yang dihitung melalui reaksi stoikiometri. Menurut Maiorella (1985), pada kondisi anaerobik, *yeast* melakukan metabolisme dengan merombak glukosa menjadi etanol melalui jalur Embden-Meyerhof (EMP). Reaksi fermentasi keseluruhan melibatkan produksi masing-masing 2 mol etanol, tetapi hasil dicapai dalam fermentasi praktis biasanya tidak melebihi 90 - 95% dari *yield* teori. Namun, Demain dkk. (2005) menyatakan bahwa *yield* etanol dapat melebihi dari 92-95% dari *yield* teori. Alasan *yield* etanol yang sangat tinggi tidak hanya karena penggunaan ATP untuk pertumbuhan sel. Beberapa energi digunakan untuk fungsi sel yang lain, salah satunya untuk mempertahankan sel akibat kondisi ekstrim seperti inhibisi etanol dan kekurangan nutrisi. Untuk menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang tinggi dalam kondisi tersebut, sel akan meningkatkan penggunaan ATP untuk reproduksi sel

dan pemecahan sumber gula sehingga sumber gula dalam medium fermentasi turun dari 10% menjadi 5% yang diikuti dengan peningkatan *yield* etanol.

KESIMPULAN

Produksi etanol tertinggi sebesar 8,792% (b/v) diperoleh pada penambahan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok sebesar 10% (v/v) dalam tetes tebu yang mengandung sumber gula sebesar 15% (b/v). *Yield* etanol yang dihasilkan adalah 65% lebih dari *yield* etanol secara teori yaitu sebesar 51%. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi proses fermentasi pada penelitian ini sudah efisien.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dikti) yang telah memberikan bantuan dana untuk melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbogbo, F.K., Kelly, G.C., Smith, M.T., Wenger, K. dan Jeffries, T.W. (2007). The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology* **41**: 2331-2336.
- Asli, M.S. (2009). A study on some efficient parameters in batch fermentation of ethanol using *Saccharomyces cerevisiae* SC1 extracted from fermented siahe sardasht pomace. *African Journal of Biotechnology* **9**: 2906-2912.
- Cappuccino, J.G. dan Sherman, N. (2005). *Microbiology: a Laboratory Manual*, Seventh Edition. Pearson Education, Inc., San Fransisco.
- Chen, J.C.P. dan Chou, C.C. (1993). *Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and Their Chemists*, 12th edition. John Wiley and Sons Ltd., New York.
- Ceirwyn, S.J. (1995). *Analytical Chemistry of Foods*. Blackie Acad and Professional, London.
- Demain, A.L., Newcomb, M. dan Wu, J.H.D. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**: 124-154.
- Direktorat Jendral Minyak dan Gas. (2011). Data Statistik Minyak Bumi. http://www.esdm.go.id/publikasi/statistik/cat_view/58-publikasi/240-statistik/341-statistik-minyak-bumi.html. [18 Desember 2012].
- Domingues, A.A. Vicente, N.L. dan Jose, A.T. (2000). Applications of yeast flocculation in biotechnological proceses. *Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering* **5**: 288-305.
- Gaur, K. (2006). *Process Optimization for The Production of Ethanol via Fermentation*. Dissertation (Master of Science). Department of Biotechnology and Env. Science. Thapar Institute of Engg and Technology. Patiala
- Inoue, T., Lefuji, H., Fujii, T., Soga, H. dan Satoh, K. (2000). Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64**: 229-236.
- Jeon, B.Y. (2007). Development of a serial bioreactor system for direct ethanol production from starch using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **12**: 566-573.
- Khongsay, N., Lakkana, L. dan Pattana, L. (2010). Growth and batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity condition. *Journal of Biotechnology* **9**: 9-16.
- Kida, K., Morimura, S., Kume, K., Suruga, K. dan Sonoda, Y. (1991). Repeated batch ethanol fermentation by a flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* IR-2. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **71**: 340-344.
- Mariam, Irfana, Kanwal, M., Sikander, A. dan Ikram, U.H. (2009). Enhanced production of ethanol from free and immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* under stationary culture. *Pakistan Journal of Botany* **41**: 821-833.
- Miki, B.L.A., Poon, N.H., James, A.P. dan Seligy, V.L. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene flo 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **150**: 878-899.
- Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K. dan Zia-ul-Hussnain, S. (2010). Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**: 1-5.

- Murtagh, J.E. (1995). Molasses as a feedstock for Alcohol Production. http://crybaby1td.com/oodu/Classes/009_Ethnogens/009_Distilling_n_Brew/The%20Alcohol%20Text%20Book/chapt06.pdf. [11 November 2010].
- Neelakandan, T. dan Usharani, G. (2009). Optimization and production of bioethanol from cashew apple juice using immobilized yeast cells by *Saccharomyces cerevisiae*. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* **4**: 85-88.
- Purwadi, R. (2006). *Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzate: Detoxification and Fermentation Strategy*. Thesis. Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology. Sweden.
- Smit, G., Marika, H.S., Ben, J.J.L. dan Jan, W.K. (1992). Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Journal of Applied Environment and Microbiology* **58**(11): 3709-3714.
- Speers, R.A., Yong-Quan W., Yu-Lai J. dan Robert, J.S. Effects of fermentation parameters and cell wall properties on yeast flocculation. *Journal of Instrumental Brewing* **112**: 246–254.
- Sudarmadji, S., Haryadi, B. dan Suhardi. (1997). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty, Yogyakarta
- Thomas, K.C., Hynes, S.H. dan Ingledew, W.M. (1996). Practical and theoretical consideration in the production of high concentration of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry* **31**: 321-33.
- Wahyudi. (1997). Produksi Alkohol oleh *Saccharomyces ellipsoideus* dengan Tetes Tebu (Molase) sebagai Bahan Baku Utama. http://iirc.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/23151/8/image0001_Fateta-S1.pdf. [3 November 2010].
- Yadav, B.S., Anita, S., Usha, R. dan Dalel S. (1997). High ethanol productivity in an immobilized cell reactor. *Indian Journal of Microbiology* **37**: 65-67.
- Yumaihana dan Aini, Q. (2008). Pembinaan Petani Tebu melalui Teknologi Pembuatan Bioetanol dari Molases dan Tebu. <http://repository.unand.ac.id/3416/1/YUMA-IHANA.pdf>. [3 November 2010].