

PROSES PRODUKSI ETANOL OLEH *Saccharomyces Cerivisiae* DENGAN OPERASI KONTINYU PADA KONDISI VAKUM

Wahyudi, Tri Supriyanto, Abdullah, Widayat, Hadiyanto

*Centre of Bioprocess and Renewable Energy (C-BIORE)
Chemical Engineering Department Diponegoro University
Laboratory of Bioprocess, Building A, 3rd floor.
Jln. Prof. Sudharto, Tembalang, Semarang, 50239
Phone/Fax: +62-24-7460058 Mobile: +62-81326477628
Wah_joedy@yahoo.co.id*

Abstrak

Fermentation is one of method for ethanol production. The problem occurring in fermentation process is ethanol inhibition. The influences of ethanol inhibition are membrane stucture destruction of the yeast cell and protein denaturation that makes the microbes growth inhibited and decrease its productivity. To solve the problem, fermentation performed in vacuum condition. In vacuum condition, etanol boiling point will decrease, therefore some ethanol as fermentation product will be vaporized

The aims of this research are to study the effects of pressure to ethanol and yeast cell productivities. The substrate used in this research was molasses with 50-150 gram/L of sugar concentrations. The operation pressure were 0.098 and 0.49 atm. The experiment started with molasses pretreatment, Saccaromyces Cereviseae cultivation and starter production. Fermentation was carried out in 3 L fermentor contains of mixed substrat and starter (10% v/v) using continuous operation with substrate flow rate of 62.5 ml/. The highest productivity of ethanol was 0.767 gram/L/h obtained at substrate concentration 125 gram/L with pressure 0.098 atm. This research shows that the increase of sugar concentration could improve productivity of ethanol and biomass. In vacuum condition, ethanol productivity was more constant and the yeast growth was improved.

Kata kunci: *continuous; ethanol; fermentation; inhibition; productivity; vacuum*

1. Pendahuluan

Jumlah pengguna alat transportasi semakin meningkat dengan meningkatnya jumlah penduduk. Indonesia dengan jumlah penduduk mencapai lebih dari 200 juta jiwa membutuhkan bahan bakar transportasi dalam bentuk premium dan solar dalam jumlah yang besar. Saat ini sumber utama bahan bakar transportasi berasal dari minyak bumi. Data BPS tahun 2005 menunjukkan bahwa produksi premium sekitar 62 juta barrel dan produksi solar sekitar 87 juta barrel. Produk tersebut belum termasuk penggunaan untuk kebutuhan lain, misal minyak pelumas, kerosen, avgas, serta bahan-bahan lain. Hal ini sangat mengkhawatirkan mengingat cadangan minyak bumi yang semakin menipis. Salah satu energi alternatif untuk bahan bakar transportasi adalah bioetanol sebagai pengganti bensin dan biodiesel sebagai pengganti solar.

Etanol merupakan salah satu sumber energi alternatif yang mempunyai beberapa kelebihan, diantaranya sifat etanol yang dapat diperbarui dan ramah lingkungan karena emisi karbondioksida rendah (Jeon, 2007). Etanol dapat digunakan sebagai bahan campuran bensin (gasolin) yang kemudian dinamakan gasohol, dan juga dapat digunakan secara langsung sebagai bahan bakar (McKetta, 1983). Di Indonesia produksi etanol semakin meningkat. Pabrik pembuat etanol pun semakin berkembang. Salah satunya adalah pendirian PT MEDCO ethanol di Lampung yang mempunyai kapasitas produksi 180.000 kiloliter/hari. Indonesia juga tercatat sebagai negara pengekspor etanol. Data BPS tahun 2006 menunjukkan besarnya ekspor etanol sebesar 25.590 ton (Anonim, 2007).

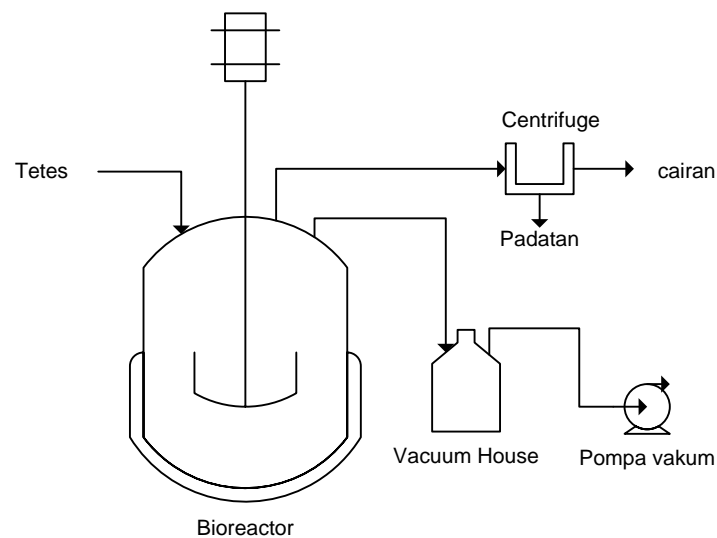
Salah satu metode pembuatan etanol yang paling terkenal adalah fermentasi. Bahan baku untuk proses fermentasi berupa bahan mentah seperti mono/disakarida (gula tebu, tetes tebu), bahan berpati (padi, jagung, umbi, dll), dan bahan selulosa (kayu, limbah pertanian). Ragi yang dapat digunakan dalam proses fermentasi etanol adalah *Saccharomyces cerivisiae*, *Saccharomyces uvarum* (tadinya *Saccharomyces carlsbergensis*), *Candida utilis*, *Saccharomyces anamensis*, *Schizosaccharomyces pombe*. Proses fermentasi dapat dijalankan secara batch maupun kontinyu. Fermentasi secara batch membutuhkan waktu sekitar 50 jam, pH awal 4,5 dan suhu 20-30 °C untuk menghasilkan yield etanol 90% dari nilai gula teoritis. Hasil akhir etanol sekitar 10-16% v/v (Bailey, 1986).

Secara teoritik tiap molekul glukosa akan menghasilkan 2 mol etanol dan 2 mol karbondioksida, dan melepaskan energi. Nutrien diperlukan dalam pertumbuhan ragi. Nutrien yang ditambahkan adalah karbon, nitrogen, fosfor, belerang, dan hidrogen, sedangkan nutrien dalam jumlah kecil yaitu kalium, magnesium, kalsium, mineral, dan senyawa-senyawa organik seperti vitamin, asam nukleat, dan asam amino. Temperatur operasi yang digunakan tergantung pada jenis ragi, umumnya adalah 30-40 °C.

2. Bahan dan Metode Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tetes tebu, strain *Saccharomyces cerevisiae*, minyak goreng, kalium fosfat, amonium fosfat, aquadest dan reagen-reagen untuk analisa gula antara lain DNS, kalium hidroksida, asam klorida, dan indikator PP. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah grade analisis (PA). Strain *saccharomyces cerevisiae* diperoleh dari Laboratorium Biologi jurusan Biologi Universitas Diponegoro. Tetes tebu yang digunakan terlebih dahulu dianalisis dan dilakukan perlakuan fosfat. Lima liter tetes ditambah 300 ml asam fosfat 27%. Campuran diaduk dan dipanaskan sampai suhu 70 °C selama 30 menit. pH diatur pada kisaran 6-7 dengan larutan NaOH 10%. Selanjutnya endapan dipisahkan dengan sedimentasi (Triantari, 2005).

Pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi gula total dan tekanan vakum. Konsentrasi gula yang digunakan adalah 50;75;100;125;150 gram/L, sedangkan variasi tekanannya adalah 0,098 dan 0,49 atm. Respon yang diamati adalah konsentrasi gula total, etanol, dan biomassa. Analisa gula total dilakukan dengan metode DNS, analisa konsentrasi biomassa dilakukan dengan metode spektrofotometri, dan analisa konsentrasi etanol dilakukan dengan metode kromatografi gas yang dilakukan di Laboratorium Kimia Analisa Politeknik Negeri Malang (Polinema). Alat-alat percobaan terangkai seperti gambar 1.



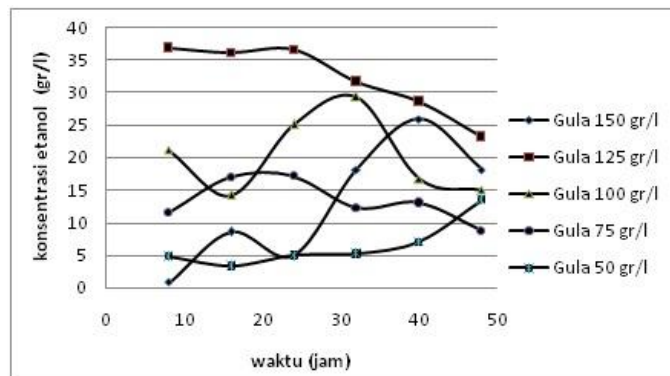
Gambar 1. Rangkaian Alat Percobaan

Kultur disiapkan dengan cara menimbang 5 gram agar potato dextrose dicampur dengan 20 ml aquadest murni, kemudian dipanaskan sampai mendidih. Larutan tersebut didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring. Jamur dipindahkan ke atas kultur agar potato dextrose dan dibiarkan selama 5 hari supaya jamur dapat berkembang biak. Satu tabung agar miring yang terisolasi ragi dengan umur 5 hari diambil kemudian dipindahkan dengan air steril ke dalam tetes steril sebanyak 300 ml di dalam erlenmeyer dan diinkubasikan selama 2 hari. Bioreaktor diisi dengan tetes steril sampai volume 3 liter. Proses fermentasi dilakukan dengan cara kontinyu. Tetes steril dialirkan ke dalam bioreaktor dengan laju alir 1,39 ml/menit. Laju alir dijaga pada nilai yang ditentukan agar volum reaktor konstan. Produk keluaran reaktor dipisahkan dengan sentrifuge hingga terpisah antara padatan dan cairannya. Produk cair dianalisa konsentrasi etanol dan gulanya sedangkan padatan dianalisa konsentrasi biomasannya.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Pengaruh Konsentrasi Gula Terhadap Perolehan Etanol

Pada percobaan ini, konsentrasi substrat yang dipilih adalah 50, 75, 100, 125, dan 150 gram/l dengan tekanan 0,098 atm. Secara umum, hubungan antara waktu dan konsentrasi gula terhadap konsentrasi etanol dapat ditunjukkan pada Gambar 1.



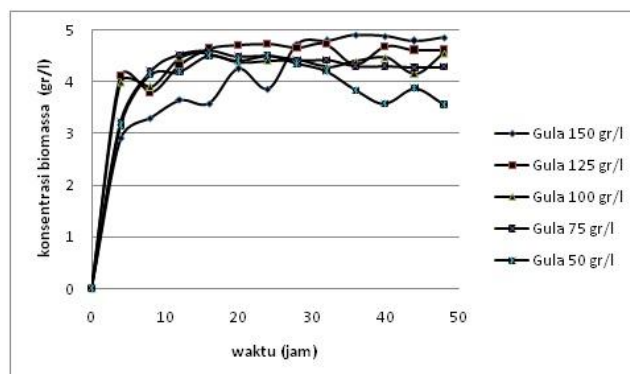
Gambar 2. Grafik Hubungan Antara Waktu Terhadap Konsentrasi Etanol

Dari Gambar 1 terlihat bahwa produktivitas tertinggi tercapai pada konsentrasi gula 125 gram/l dan terjadi pada waktu 8 jam. Kecenderungan yang terjadi yaitu semakin naiknya konsentrasi gula akan menghasilkan produktivitas etanol yang makin tinggi. Hal ini disebabkan semakin banyaknya substrat yang tersedia untuk digunakan dalam metabolisme *yeast* sehingga akan menghasilkan metabolit yaitu etanol yang semakin banyak pula. Pada penelitian terdahulu, dengan proses *batch* dan konsentrasi gula 1,6-5 gram/l serta kondisi operasi yang hampir sama, didapatkan konsentrasi etanol sebesar 5-18,4 gram/l setelah diinkubasikan selama 24 jam (Ergun dan Mutlu, 2000). Jika dibandingkan nilai produktivitasnya maka akan jelas sekali bahwa dengan peningkatan konsentrasi substrat akan menaikkan perolehan etanol. Pada penelitian ini dengan *dilution rate* sebesar 0,02/jam, didapatkan nilai produktivitas 0,77 gram/l/jam. Sedangkan untuk penelitian terdahulu oleh Ergun dan Mutlu, didapatkan nilai produktivitas sebesar 0,48 gram/l/jam dengan proses *batch*. Proses kontinyu menghasilkan produktivitas yang lebih tinggi karena dengan proses kontinyu substrat ditambahkan secara terus menerus kedalam sistem fermentasi sehingga kebutuhan sumber karbon serta nutrisi-nutrisi lain yang diperlukan oleh *yeast* selalu tersedia.

Telah dijelaskan bahwa dengan kenaikan konsentrasi substrat akan menaikkan perolehan etanol, namun tetap saja ada batas maksimal konsentrasi substrat untuk proses fermentasi etanol. Menurut Roukas (1996), penurunan produksi etanol pada konsentrasi gula berlebih merupakan efek dari inhibisi substrat. Konsentrasi substrat yang tinggi akan mengurangi jumlah oksigen terlarut. Dalam proses fermentasi ini, oksigen tetap dibutuhkan walaupun dalam jumlah yang sedikit. *Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan oksigen untuk mempertahankan kehidupan dan menjaga konsentrasi sel tetap tinggi, (Hepworth 2005; Nowak 2000; Tao dkk, 2005). Fungsi oksigen disini adalah untuk memproduksi ATP dalam glikolisis dan dalam fosforilasi oksidatif. Proses fosforilasi oksidatif merupakan proses yang paling menonjol dalam produksi ATP. Bila tidak ada oksigen (anaerob), NADH dalam mitokondria tidak dapat dioksidasi kembali maka daur asam sitrat, pembentukan ATP serta pemecahan nutrisi akan terhenti. Hal inilah yang mengakibatkan pada konsentrasi gula tertinggi, yaitu 150 gram/l didapatkan nilai produktivitas yang lebih rendah daripada konsentrasi gula 125 gram/l.

3.2 Pengaruh Konsentrasi Gula Terhadap Perolehan Sel

Pada percobaan ini, konsentrasi substrat yang dipilih adalah 50, 75, 100, 125, dan 150 gram/l dengan tekanan 0,098 atm. Secara umum, hubungan antara waktu dan konsentrasi gula terhadap konsentrasi biomassa dapat ditunjukkan pada Gambar 2.



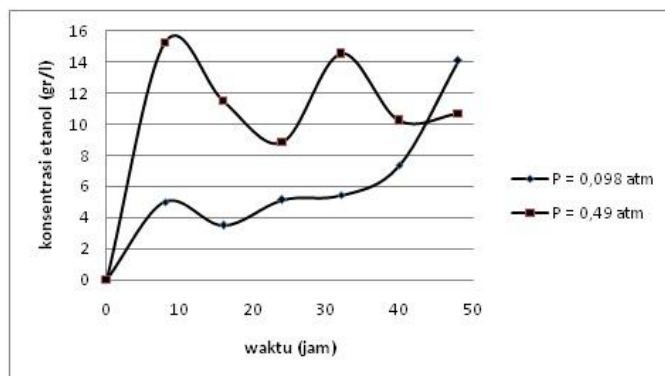
Gambar 3. Grafik Hubungan Antara Waktu Terhadap Konsentrasi Biomassa

Gambar 2 menunjukkan hubungan antara waktu dengan pertumbuhan sel. Dari grafik terlihat bahwa perolehan sel tertinggi adalah 4,9 gram/l yang terjadi pada konsentrasi gula 150 gram/l dan terendah adalah 3,8 gram/l yang terjadi pada konsentrasi gula 50 gram/l. Tren grafik yang lain pun menunjukkan bahwa semakin tinggi

konsentrasi gula akan didapatkan sel yang semakin banyak. Pada akhir periode analisa didapatkan konsentrasi biomassa tertinggi pada konsentrasi gula 150 gram/l. Dengan adanya substrat yang lebih banyak maka pertumbuhan mikroba akan lebih baik karena kebutuhan nutrisinya yang semakin terpenuhi. Konsentrasi gula maksimal yang digunakan sebagai variabel disini adalah 150 gram/l. Konsentrasi tersebut masih sesuai untuk kondisi tumbuh *yeast*, karena konsentrasi gula optimal untuk fermentasi adalah antara 50-250 gram/l, artinya konsentrasi gula yang digunakan dalam percobaan ini masih sesuai dengan kondisi tumbuh mikroba (Pramanik, 1999). *Yeast* yang digunakan langsung diadaptasikan dengan substrat (molasses) ketika pembuatan starter, sehingga fase adaptasi sel terjadi saat *yeast* dikembangkan dalam starter. Oleh karena itu dalam grafik terlihat bahwa antara selang waktu 0 jam sampai 20 jam langsung terjadi fase eksponensial.

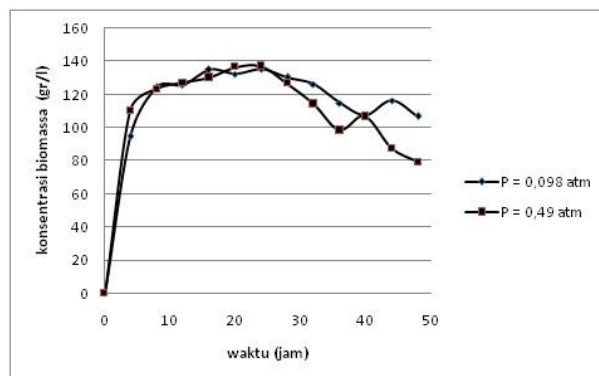
3.3 Pengaruh Tekanan Terhadap Perolehan Etanol

Pada percobaan ini, konsentrasi substrat yang dipilih adalah 50, 75, 100, 125, dan 150 gram/l dengan tekanan 0,098 dan 0,49 atm. Secara umum, hubungan antara waktu dan tekanan operasi terhadap konsentrasi etanol dapat ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 4. Grafik Hubungan Antara Waktu dan Tekanan Operasi Terhadap Konsentrasi Etanol

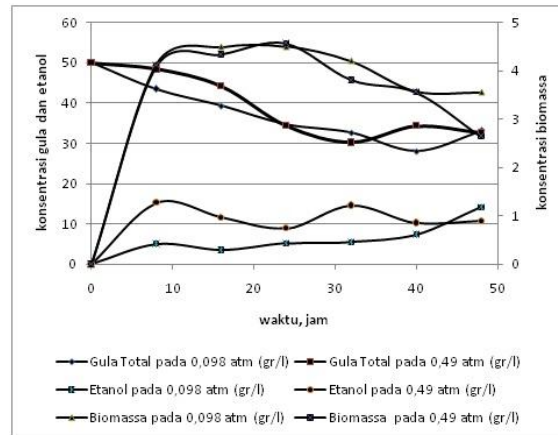
Gambar 3 menunjukkan hubungan antara waktu dengan konsentrasi etanol yang dihasilkan selama proses fermentasi pada tekanan yang berbeda. Dari grafik dapat dilihat adanya perbedaan konsentrasi etanol yang cukup signifikan dimana pada tekanan 0,098 atm, etanol yang terdeteksi pada sampel lebih kecil daripada tekanan 0,49 atm. Pada tekanan 0,098 atm, kondisi didalam fermentor lebih vakum sehingga jumlah etanol yang teruapkan selama proses fermentasi lebih banyak. Hal tersebut menyebabkan konsentrasi etanol yang terdeteksi pada sampel lebih sedikit. Hal ini berakibat pada pertumbuhan sel selama fermentasi seperti ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 5. Grafik Hubungan Antara Waktu dan Tekanan Operasi Terhadap Konsentrasi Biomassa

Gambar 4 menunjukkan perbedaan profil pertumbuhan sel pada variasi tekanan 0,098 atm dan 0,49 atm. Pada tekanan 0,098 atm, konsentrasi etanol dalam sistem fermentasi lebih sedikit sehingga kemungkinan terjadinya inhibisi lebih kecil. Hal ini berakibat pada pertumbuhan sel yang lebih baik karena gangguan akibat inhibisi produk etanol selama proses pertumbuhan lebih sedikit. Pada masa awal pertumbuhan tidak terdapat perbedaan profil pertumbuhan yang berarti. Namun mulai jam ke 28, terdapat perbedaan profil pertumbuhan dimana untuk tekanan 0,098 atm lebih baik daripada 0,49 atm. Hal ini sesuai dengan profil etanol, dimana mulai jam ke 28 konsentrasinya naik sama-sama naik namun konsentrasi untuk 0,49 atm jauh lebih besar sehingga menghasilkan profil pertumbuhan yang sedikit berbeda. Konsentrasi etanol yang besar menyebabkan pertumbuhan sel terhambat atau bahkan dapat

menyebabkan kematian sel. Oleh karena itu untuk tekanan 0,49 atm dimana konsentrasi etanolnya lebih besar fase kematian untuk selnya terjadi lebih ekstrim yang ditunjukkan dengan penurunan konsentrasi sel yang lebih banyak daripada pada tekanan 0,098 atm. Secara garis besar profil perubahan konsentrasi gula, etanol, dan biomassa dengan variasi tekanan dapat ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 6. Grafik Hubungan Antara Waktu dan Tekanan Operasi Terhadap Konsentrasi Gula, Konsentrasi Etanol, dan Konsentrasi Etanol

Dari Gambar 5 dapat dilihat bahwa profil produksi etanol, penurunan konsentrasi gula, serta pertumbuhan sel untuk dua variasi tekanan secara umum hampir sama. Pada grafik terlihat bahwa penggunaan gula pada tekanan 0,098 atm lebih banyak dibandingkan dengan tekanan 0,49 atm, hal ini menunjukkan adanya produktivitas yang lebih tinggi, namun yang terdeteksi oleh analisa dengan GC lebih kecil akibat sebagian besar etanol telah teruapkan. Hal ini disebabkan pengaruh tekanan operasi. Pada tekanan 0,098 atm titik didih etanol murni adalah sekitar 30 °C, sedangkan pada tekanan 0,49 atm, titik didih etanol sekitar 62 °C. Terdapat perbedaan titik didih yang sangat besar sehingga etanol pada tekanan 0,098 atm yang teranalisa oleh GC lebih kecil jika dibandingkan pada tekanan 0,49 atm. Penelitian terdahulu oleh Ghasem dkk, pada kondisi atmosferik didapatkan produktivitas etanol yang lebih tinggi yaitu sebesar 1,77 gram/l/jam. Substrat yang digunakan pada penelitian tersebut adalah glukosa murni dengan konsentrasi 150 gram/l. Pada konsentrasi gula yang sama, untuk penelitian dengan tekanan 0,098 atm ini menghasilkan produktivitas sebesar 0,539 gram/l/jam. Hal ini disebabkan karena sebagian besar etanol yang telah diproduksi teruapkan akibat kondisi sistem dalam keadaan vakum. Dengan demikian, etanol yang terkandung dalam sampel menjadi lebih sedikit. Selain itu dengan substrat yang berbeda maka akan dihasilkan perbedaan hasil karena dengan glukosa dengan molasses mempunyai karakteristik yang sangat berbeda. Molasses masih mengandung sejumlah pengotor sehingga akan mempengaruhi pertumbuhan sel, hal ini akan berakibat langsung terhadap produktivitas etanol.

Kesimpulan

Secara umum, semakin tinggi konsentrasi gula maka akan didapatkan produk etanol yang semakin banyak. Semakin tinggi konsentrasi gula akan didapatkan konsentrasi sel yang semakin banyak. Penggunaan kondisi vakum tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap produksi etanol.

Ucapan terima kasih

Terima kasih disampaikan kepada fakultas Teknik Universitas Diponegoro Semarang yang telah membiayai penelitian ini sesuai dengan surat perjanjian Nomor: 2368/H7.3.3/PG/2010 tanggal 15 maret 2010

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada bapak kalyawan dari laboratorium kimia analisa jurusan teknik kimia Politeknik Negeri Malang (Polinema) yang telah membantu proses analisis kromatografi gas.

Daftar Pustaka

- Bailey, James E. and David F. Ollis, 1986, "Biochemical Engineering Fundamentals", edisi 2, McGraw-Hill Book Co., Singapore.
- Ergun, M dan SF, Mutlu, 2000, "Application of a Statistical Technique to Production of Ethanol From Sugar Beet Molasses by *Saccharomyces cerevisiae*", *Bioresour Technol*, 73, hal. 251-255.
- Ghasem N, Habibollah Y., Ku S, Ku I., 2004, "Ethanol Fermentation In An Immobilized Cell Reactor Using *Saccharomyces cerevisiae*", *Bioresour Technol*, 92, hal. 251-260.
- Hepworth, M., 2005, "Technical, Environmental and Economic Aspects of Unit Operation for The production of Bioethanol From Sugar Beet in the United Kingdom", CET IIA Exercise 5, Corpus Christi College.



- Jeon, Bo Young et al, 2007, "Development of a Serial Bioreactor System for Direct Ethanol Production from Starch Using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, Vol. 12, pp. 566-573.
- Lin, Yan and Tanaka, Shuzo, 2006, "Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects", *Applied Microbiology Biotechnology*, Springer-Verlag, 69: 627-642.
- McKetta, John J. and Cunningham, William Aaron, 1983, "*Encyclopedia of Chemical Processing and Design*", Marcel Dekker, Inc., New York and Bessel.
- Nowak, J., 2000, "Ethanol Yield and Productivity of *Zymomonas mobilis* in Various Fermentation Methods", *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, Vol. 3, No. 2 seri Food Science and Technology.
- Pramanik, K., 1999, "Parametrics Studies on Batch Alcohol Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Extracted From Toddy", Department of Chemical Engineering, Regional Engineering College, Andra Pradesh.
- Roukas, T., 1996, "Continuous Ethanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissiris Using A Two-reactor System", *Journal Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 59, No. 3.
- Tao, F., Miao, J. Y., Shi, G. Y., dan Zhang, K. C., 2003, "Ethanol Fermentation by an Acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under Non-sterilized Condition", *Process Biochemistry*, Elsevier, 40, hal. 183-187.
- Triantarti, 2005, "Karakteristik Resin Untuk Proses Ion Exclusion Chromatography Dan Aplikasinya Pada Pengambilan Gula Dari Tetes Tebu", *Jurnal ILMU DASAR*, Vol. 6 No. 1, pp. 48-57.