

PRODUKSI BIOETANOL DARI HIDROLISAT PATI SINGKONG RACUN DENGAN FERMENTASI REPEATED-BATCH OLEH *Saccharomyces cerevisiae* TERIMOBILISASI PADA AMPAS SINGKONG

BIOETHANOL PRODUCTION FROM HYDROLYZED CASSAVA STARCH WITH REPEATED-BATCH FERMENTATION BY *Saccharomyces cerevisiae* IMMOBILIZED ON CASSAVA BAGASSE

Liesbetini Haditjaroko^{1)*}, Khaswar Syamsu¹⁾, Anya Meryandini²⁾, Ahmad Jaelani Manurung²⁾

¹⁾Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Kampus IPB Darmaga, PO.Box 122, Bogor 16002, Indonesia
E-mail: liesbetinihartoto@yahoo.com

²⁾Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Bioethanol production by batch fermentation using free cells has low productivity and efficiency. Repeated-batch fermentation by using immobilized cells has been proved to have higher productivity than that of batch fermentation. In this research, *Saccharomyces cerevisiae* was immobilized on cassava bagasse, a by-product of cassava production, which has not been utilized optimally. The objective of the research was to study bioethanol production from cassava starch in six cycles repeated-batch fermentation by *S.cerevisiae* immobilized on cassava bagasse. Research method consisted of starch extraction, starch hydrolysis, cassava bagasse treatment by HCl 3% (v/v), immobilization of *S.cerevisiae* on cassava bagasse, and fermentation by repeated-batch method. The yield of starch obtained was 26.20% (w/w) and conversion efficiency of starch to hydrolyzed starch was 36.89% (w/w). The utilization of cassava bagasse treated by HCl was capable to immobilize 1.76×10^{11} cells/g carrier. The resulting ethanol concentration was 42.72-63.66 g/L, productivity was 1.78-2.66 g/L/h, yield was 0.33-0.47 g/g, sugar conversion was 90.80-95.74%, and efficiency was 65.91-93.13%. This research shows that ethanol production with six cycles repeated-batch fermentation by *S.cerevisiae* immobilized on cassava bagasse has good stability, as well as high productivity, sugar conversion, and efficiency.

Keywords: bioethanol, cassava bagasse, fermentation, repeated-batch, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRAK

Produksi bioetanol secara curah oleh sel mikroba bebas memiliki kelemahan, yaitu produktivitas dan efisiensinya yang rendah. Dalam penelitian ini sel *Saccharomyces cerevisiae* diimobilisasi menggunakan ampas singkong. Bahan ini merupakan hasil samping produksi pati singkong dan belum dimanfaatkan secara optimal. Penelitian ini bertujuan mengkaji proses produksi bioetanol dari pati singkong racun dengan fermentasi secara repeated-batch 6 siklus oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong. Metode penelitian ini terdiri atas ekstraksi pati, pembuatan hidrolisat pati secara enzimatik, perlakuan terhadap ampas singkong oleh HCl 3% (v/v), imobilisasi *S.cerevisiae* pada ampas singkong, serta fermentasi secara repeated-batch. Pada penelitian ini diperoleh rendemen pati sebesar 26,20% (b/b) serta efisiensi konversi pati menjadi hidrolisat pati sebesar 36,89% (b/b). Penggunaan ampas singkong hasil perlakuan oleh HCl telah mampu mengimobilisasi sel sebanyak $1,76 \times 10^{11}$ sel/g carrier. Fermentasi secara repeated-batch oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong dengan kadar total gula awal 140 g/L telah menghasilkan etanol berkadar 42,72-63,66 g/L, produktivitas 1,78-2,66 g/L/jam, yield sebesar 0,33-0,47 g etanol/g gula, persentase konversi gula sebesar 90,80-95,74%, serta efisiensi sebesar 65,91-93,13%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode imobilisasi yang digunakan memiliki kestabilan yang baik, serta didapatkan produktivitas bioetanol, persentase konversi gula dan efisiensi yang tinggi dengan fermentasi secara repeated-batch.

Kata kunci: ampas singkong, bioetanol, fermentasi, repeated-batch, *Saccharomyces cerevisiae*

PENDAHULUAN

Krisis energi saat ini sedang melanda berbagai negara, termasuk Indonesia. Cadangan minyak bumi Indonesia diprediksi akan habis pada tahun 2025 (Prihandana, 2007). Ketersediaan cadangan minyak bumi yang demikian tipis tersebut berbahaya bagi sektor lain. Bahkan, jika tidak dilakukan upaya-upaya solutif, maka diperkirakan net import minyak mentah dan BBM Indonesia akan mencapai 207,2 juta barel pada tahun 2020 (Kemenristek, 2006). Dengan demikian, diperlukan

solusi untuk menangani permasalahan ketersediaan energi tersebut.

Pemanfaatan bioetanol merupakan salah satu solusi untuk mengatasi krisis energi di Indonesia. Bahan bakar tersebut merupakan sumber energi alternatif sebagai substitusi bensin. Bioetanol diproduksi dari bahan nabati melalui proses fermentasi. Berkaitan dengan aspek industrialisasi, diperlukan bahan baku bioetanol yang memiliki ketersediaan melimpah, salah satunya singkong. Berdasarkan data dari BPS (2013), diketahui bahwa produksi singkong nasional pada

tahun 2012 mencapai 23.922.075 ton atau meningkat 9,15% dari tahun 2008. Jenis singkong yang sangat potensial sebagai bahan baku bioetanol adalah singkong racun varietas SPP yang memiliki produktivitas 400 kwintal per hektar dengan rendemen pati 30% (Rukmana, 1997).

Penggunaan singkong sebagai bahan baku bioetanol, juga berkaitan dengan ampasnya belum optimal dimanfaatkan. Pada produksi tapioka dari singkong dihasilkan ampas sekitar 11,4% (Tjokroadikoesoemo, 1986). Hal ini berarti ampas singkong yang dihasilkan pada tahun 2012 mencapai sekitar 2.727.116 ton. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk mengoptimalkan penggunaan singkong sebagai bahan baku bioetanol, termasuk pemanfaatan ampasnya.

Salah satu metode yang umum digunakan untuk memproduksi bioetanol adalah fermentasi secara curah. Reddy *et al.* (2006) menyatakan bahwa fermentasi secara curah memiliki produktivitas dan efisiensi yang rendah. Untuk mengatasi hal tersebut, dikembangkan metode fermentasi secara *repeated-batch* untuk memaksimalkan produktivitas dan efisiensinya dengan menggunakan sel mikroba terimobilisasi. Metode ini merupakan pengulangan fermentasi curah yang di akhir setiap siklus dilakukan pengumpulan sel mikroba. Pada metode *repeated-batch*, digunakan teknik imobilisasi sel untuk memudahkan pengumpulan sel mikroba (Kopsahelis *et al.*, 2007).

Pacheco *et al.* (2010) melakukan penelitian perbandingan produktivitas dan efisiensi antara metode curah oleh sel bebas dan metode *repeated-batch* oleh sel *S.cerevisiae* terimobilisasi. Hasil penelitian tersebut memperlihatkan produktivitas dari metode fermentasi *repeated-batch* sebesar 6,15 g/L/jam, lebih tinggi dari metode curah (4,29 g/L/jam). Efisiensi metode *repeated-batch* (95,98%) pun lebih tinggi dari metode curah (88,95%). Teknik imobilisasi dalam penelitian tersebut adalah adsorpsi menggunakan ampas jambu mete sebagai *carrier*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji proses produksi bioetanol dari hidrolisat pati singkong racun dengan menggunakan fermentasi secara *repeated-batch* oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Peralatan

Bahan utama dalam penelitian ini adalah singkong varietas SPP yang diperoleh dari perkebunan daerah Cibinong, Bogor, Jawa Barat. Mikroorganisme yang digunakan untuk menghasilkan bioetanol ialah *Saccharomyces cerevisiae* dari Laboratorium Kimia Pangan, Departemen Teknologi Pangan, FATETA-IPB. *Carrier* untuk imobilisasi *S.cerevisiae* adalah ampas singkong. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu α -amilase dan amiloglukosidase

produksi NOVO Industry Denmark, CaCO_3 , NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), glukosa, *yeast extract*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , HCl, serta NaCl.

Peralatan yang digunakan yaitu labu erlenmeyer 500 mL, *rotary shaking incubator*, *waterbatch shaker*, sentrifus, penyaring vakum, oven, neraca analitik, otoklaf, pH-meter, mikropipet, spektrofotometer, *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan HPLC merk Waters 2695.

Metode

Ekstraksi Pati Singkong

Sebelum pati diekstrak, terlebih dahulu dilakukan analisis proksimat terhadap umbi singkong. Analisis tersebut meliputi kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein, kadar serat kasar, dan kadar karbohidrat *by difference*. Setelah dilakukan analisis proksimat terhadap umbi singkong, selanjutnya pati pada bahan tersebut diekstrak. Ekstraksi pati diawali dengan pembersihan dan pamarutan umbi singkong disertai dengan penambahan air sebanyak 1:3 (b:v). Singkong hasil pamarutan diperah, sehingga diperoleh suspensi pati. Penambahan air dan pemerahan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Suspensi hasil pemerahan didekantasi selama 14 jam. Pati terdekantasi dipisahkan dari cairan dan bersama ampas dikeringkan pada suhu 50°C selama 8-12 jam. Pati yang telah kering digiling dan disaring dengan ayakan berukuran 150 mesh, sedangkan ampas kering disimpan untuk digunakan sebagai *carrier* pada imobilisasi *S.cerevisiae*.

Hidrolisis Pati (Modifikasi Atifah, 2006)

Suspensi pati 30% (b/v air) digelatinisasi pada suhu 70-80°C. Pati tergelatinisasi dilikuiifikasi selama 180 menit oleh α -amilase 1,75 U/g pati disertai pengadukan secara konstan (suhu 85-95°C). Hasil likuifikasi disakarifikasi selama 48 jam oleh amiloglukosidase 0,3 U/g pati disertai pengadukan berkecepatan 150 rpm (suhu 60°C). Hasil sakarifikasi dipanaskan pada suhu 105°C selama 5 menit dan disaring vakum. Hidrolisat hasil penyaringan dianalisa kadar total gulanya (metode Fenol- Asam sulfat).

Penyiapan Carrier dan Imobilisasi *S.cerevisiae* (Modifikasi Pacheco *et al.*, 2010)

Penyiapan *carrier* diawali dengan perendaman ampas singkong dalam HCl 3% (v/v) selama 180 menit (suhu 60-70°C). Jumlah ampas singkong yang direndam adalah 30% (b/v larutan HCl 3%). Ampas hasil perendaman dicuci dengan air dan dikeringkan pada suhu 50°C selama 8-12 jam. Ampas yang telah kering digerus hingga berukuran 0,5-2,0 mm dan disimpan untuk digunakan sebagai *carrier* imobilisasi *S.cerevisiae*.

Imobilisasi *S.cerevisiae* diawali dengan penyiapan kultur. Sebanyak 2-3 jarum Ose isolat *S.cerevisiae* disegarkan pada media agar miring (NA) dan diinkubasi selama 48 jam (suhu 30°C). Isolat hasil penyegaran sebanyak 2-3 jarum Ose selanjutnya diinokulasikan pada 10 mL media cair NB steril serta diinkubasi dalam inkubator goyang selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm (suhu ruang).

Ampas singkong sebanyak 6% (b/v media fermentasi) disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dan dimasukkan ke dalam media cair steril (m mengandung 30 g/L glukosa, 5 g/L yeast extract, 10 g/L (NH₄)₂SO₄, 4,5 g/L KH₂PO₄, 1 g/L MgSO₄•7H₂O, dan 0,65 g/L ZnSO₄) serta ditambah 10 mL inokulum hasil propagasi. Semua bahan tersebut dikultivasi selama 24 jam (suhu ruang) dalam inkubator goyang berkecepatan 150 rpm. Hasil kultivasi didekantasi untuk memisahkan cairan kultivasi dan sel imobil. *S.cerevisiae* terimobilisasi tetap dibiarkan dalam labu erlenmeyer dan dicuci dengan air suling steril.

Jumlah total sel *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong dikuantifikasi dengan menggunakan Hemasitometer. Ampas singkong yang mengandung sel terimobilisasi sebanyak 1 gram dimasukkan ke 50 mL larutan NaCl 0,85% dan dikocok pada shaker berkecepatan 150 rpm selama 24 jam. Suspensi hasil pengocokan tersebut ditempatkan pada Hemasitometer dan jumlah sel dihitung dengan bantuan mikroskop optik. Pengamatan hasil imobilisasi sel dilakukan dengan menggunakan teknik *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

Fermentasi Repeated-Batch (Modifikasi Kopsahelis et al., 2007)

Sebanyak 100 mL media steril (m mengandung 140 g/L total gula, 2,5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,65 g/L MgSO₄•7H₂O, dan 0,65 g/L ZnSO₄; pH 5,5) dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 500 mL yang di dalamnya telah terdapat *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong. Fermentasi dilakukan dengan *repeated-batch* 6 siklus dalam *rotary shaking incubator* pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam untuk setiap siklus.

Hasil fermentasi didekantasi untuk memisahkan cairan fermentasi dengan sel yang terimobilisasi pada ampas singkong. Cairan fermentasi diambil untuk dianalisis kadar total gula sisa dan kadar etanolnya, sedangkan sel terimobilisasi pada ampas singkong tetap dibiarkan di dalam labu erlenmeyer. Fermentasi siklus kedua hingga siklus keenam dimulai dengan memasukkan media baru yang memiliki komposisi sama sebagaimana siklus pertama ke dalam labu erlenmeyer berisi sel terimobilisasi. Selain itu, kondisi dan lama fermentasi siklus kedua sampai

siklus keenam ini sama dengan fermentasi siklus pertama.

Analisis Parameter Fermentasi (Pacheco et al., 2010)

Pada setiap akhir siklus, cairan fermentasi diambil dan dianalisis kadar gula dan kadar etanolnya, kemudian ditentukan produktivitas dan *yield* etanol, persentase konversi gula, serta efisiensi produksi etanolnya. Kadar etanol dianalisa dengan *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menggunakan sistem Water HPLC (Waters, Milford, MA, USA) dengan detektor *refractive index* Waters 2695, kolom Aminex® HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm (fase gerak H₂SO₄ 0,008 N), laju alir 1 mL per menit dan suhu 35°C. Sampel diidentifikasi berdasarkan perbandingan antara *retention time* dengan kadar etanol standar.

Produktivitas fermentasi (Qp) dihitung sebagai perbandingan antara kadar etanol (Pf; g/L) dengan lama fermentasi (t; jam). Rumus perhitungan produktivitas fermentasi adalah sebagai berikut:

$$Q_p = \frac{P_f}{t} \dots \dots \dots (1)$$

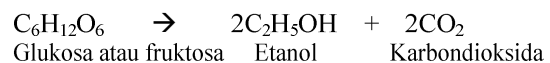
Yield etanol (Yp/s) dihitung sebagai rasio antara kadar etanol (Pf; g/L) terhadap selisih kadar total gula awal (So; g/L) dan kadar total gula akhir (Sf; g/L). Rumus perhitungan *yield* etanol adalah sebagai berikut:

$$\frac{Y_p}{s} = \frac{P_f}{S_o - S_f} \dots \dots \dots (2)$$

Persentase konversi gula (%) dihitung sebagai rasio selisih kadar total gula awal (So; g/L) dan kadar total gula akhir (Sf) terhadap kadar total gula awal (So; g/L). Rumus perhitungan persentase konversi gula adalah sebagai berikut:

$$\text{Persentase Konversi Gula} = \frac{S_o - S_f}{S_o} \times 100\% \dots (3)$$

Efisiensi konversi substrat terhadap etanol (η; %) dihitung sebagai rasio *yield* etanol (Yp/s; g etanol/g substrat) terhadap *yield* teoritik dari Yp/s (Yth; 0,51 g etanol/g substrat). *Yield* teoritik mengasumsikan hanya gula pereduksi yang dikonversi menjadi etanol berdasarkan persamaan reaksi berikut:



Rumus perhitungan efisiensi adalah sebagai berikut:

$$\eta = \frac{Y_{p/s}}{Y_{th}} \times 100\% \dots \dots \dots (4)$$

Analisa Statistik

Analisa statistik dengan uji T ($\alpha=0,05$) menggunakan Program SPSS 16.0 dilakukan untuk mengevaluasi signifikansi perbedaan antar-siklus fermentasi secara *repeated-batch* pada parameter yang dianalisis. Hal ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kestabilan proses pada siklus pertama hingga siklus terakhir.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Pati dan Pembuatan Hidrolisat Pati

Dengan menggunakan 12,42 kg singkong, diperoleh daging umbi sebanyak 8,88 kg (71,49%) dan kulit sebanyak 3,54 kg (28,51%). Faktor yang mempengaruhi nilai persentase tersebut diantaranya adalah karakter alami singkong varietas SPP (kulit umbi menempel kuat pada daging umbi), jarak pemotongan antara umbi singkong dengan pangkal akar serta usia panen.

Daging umbi sebelum digunakan sebagai bahan baku, terlebih dahulu dianalisis proksimat yang meliputi kadar air, kadar abu, kadar lemak, kadar protein, kadar serat kasar, dan kadar karbohidrat. Hasil analisis proksimat daging umbi singkong disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil analisa proksimat daging umbi singkong

Parameter	Jumlah (% b/b)
Kadar Air	64,45
Kadar Abu	0,55
Kadar Lemak	0,23
Kadar Protein	0,74
Kadar Serat Kasar	0,73
Kadar Karbohidrat ^{*)}	33,30

Ket: ^{*)} Dihitung berdasarkan *by difference*

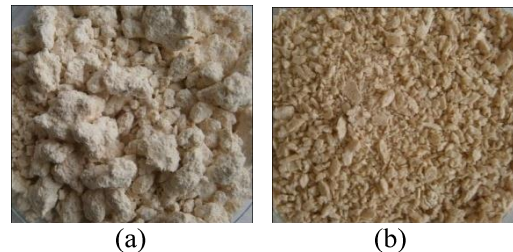
Dari ekstraksi pati singkong, diperoleh rendemen pati sebesar 26,20% dengan jumlah pengulangan pemerahan sebanyak 3 kali, sedangkan ampas singkong yang dihasilkan sebanyak 10,77%. Ampas singkong yang komponen utamanya merupakan serat kasar ini, selanjutnya digunakan sebagai *carrier* untuk imobilisasi *S.cerevisiae*. Pati yang diperoleh kemudian dihidrolisis secara enzimatis melalui dua tahap utama, yaitu likuifikasi (oleh enzim α -amilase) dan sakarifikasi (oleh enzim amiloglukosidase). Efisiensi konversi pati menjadi hidrolisat yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah 36,89% dan kadar total gula sebesar 165,75 g/L dengan lama sakarifikasi 48 jam. Nilai efisiensi tersebut menunjukkan dihasilkan total gula sebanyak 36,89 g untuk setiap 100 g pati yang dihidrolisis. Hidrolisat pati selanjutnya digunakan sebagai bahan utama dalam produksi bioetanol dengan fermentasi secara *repeated-batch*.

Penyiapan *Carrier* dan Imobilisasi *S.cerevisiae*

Carrier yang digunakan untuk mengimobilisasi *S.cerevisiae* adalah ampas singkong

hasil perlakuan HCl 3%. Perlakuan tersebut bertujuan untuk menghidrolisis pati pada ampas singkong. Keberadaan pati pada ampas singkong akan menghalangi imobilisasi sel ke dalam pori-pori ampas singkong.

Ampas singkong sebelum dan sesudah perlakuan HCl 3% diperlihatkan pada Gambar 1. Karakter fisik ampas singkong sebelum diberi perlakuan HCl 3% ialah berwarna putih, berbentuk tidak beraturan, serta berwujud bongkahan padat yang rapuh (*fragile*). Ampas singkong setelah diberi perlakuan HCl 3% mengalami perubahan karakter fisik menjadi berwarna putih-kecoklatan, berbentuk pipih dengan ketebalan sekitar 0,5-2 mm, serta berwujud padatan yang kokoh (*solid*).



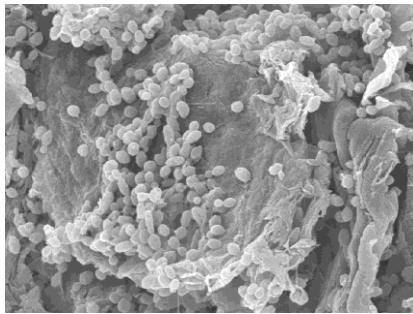
Gambar 1. *Carrier* ampas singkong sebelum (a) dan sesudah (b) perlakuan oleh HCl 3%

Jumlah sel *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong mencapai $1,76 \times 10^{11}$ sel/g *carrier*. Jumlah ini tergolong cukup tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian lain, seperti $1,13 \times 10^8$ sel/g *carrier* (Pacheco *et al.*, 2010) dan 10^9 sel/g *carrier* (Kopsahelis *et al.*, 2007). Jumlah sel terimobilisasi yang lebih banyak diharapkan mampu memproduksi bioetanol dalam jumlah lebih banyak pula.

Faktor yang mempengaruhi perbedaan jumlah sel terimobilisasi hasil penelitian ini dengan penelitian Pacheco *et al.* (2010) dan Kopsahelis *et al.* (2007) adalah perbedaan kondisi proses imobilisasi, jenis *carrier*, serta jenis isolat *S.cerevisiae* yang digunakan. Pacheco *et al.* (2010) melakukan imobilisasi sel dengan menggunakan *carrier* dari jenis ampas lain, yaitu ampas jambu mete. Selain itu, penelitian tersebut juga menggunakan isolat *S.cerevisiae* dari ragi roti. Kopsahelis *et al.* (2007) melakukan imobilisasi *S.cerevisiae* dengan menggunakan *carrier* berupa ampas gandum serta volume kerja 1 L.

Imobilisasi *S.cerevisiae* pada ampas singkong disebabkan oleh dua faktor, yaitu gaya elektrostatis antara selulosa ampas singkong dan gugus amina pada membran sel, sehingga keduanya saling membentuk ikatan dan keberadaan media kultivasi dalam pori-pori ampas singkong. Media kultivasi akan mengarahkan *S.cerevisiae* memasuki pori-pori ampas untuk mengonsumsi media. Media inilah yang berperan penting sebagai pengikat antara *carrier* dan *S.cerevisiae*. Pada Gambar 2 diperlihatkan sel *S.cerevisiae* terimobilisasi pada

ampas singkong hasil pengamatan dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM).



Gambar 2. Hasil pengamatan *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong dengan menggunakan SEM (perbesaran 1000x)

Imobilisasi sel secara adsorpsi pada serat selulosa, memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan teknik imobilisasi lain. Kelebihannya antara lain adalah pertumbuhan sel lebih cepat yang ditandai dengan *doubling time* lebih singkat, akses lebih mudah terhadap substrat, sehingga memperluas peran sisi aktif sel, serta ketersediaan *carrier* melimpah dengan harga yang murah (de Vasconcelos *et al.*, 2004). Meskipun demikian, imobilisasi secara adsorpsi memiliki beberapa kelemahan, yaitu rentan terhadap perubahan pH, gaya ionik yang dipengaruhi senyawa garam, serta perubahan komposisi media fermentasi (Kilonzo dan Bergougnou, 2012). Kelemahan ini dapat diantisipasi dengan menjaga kondisi proses dan pengaturan komposisi media fermentasi.

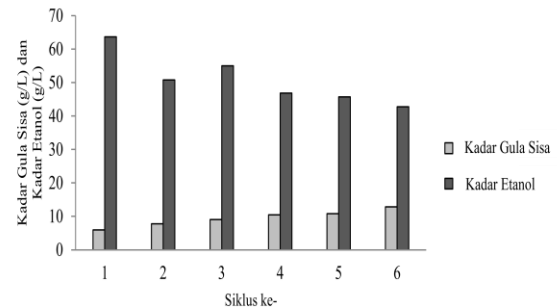
Imobilisasi *S.cerevisiae* dilakukan bersamaan dengan kultivasi dalam kondisi aerobik. Kondisi tersebut bertujuan agar substrat digunakan oleh *S.cerevisiae* untuk pertumbuhan sel. Jika proses imobilisasi dilangsungkan dalam kondisi anaerobik, maka *S.cerevisiae* akan menggunakan media untuk memproduksi etanol (Shuler dan Kargi, 2002). Hal ini disebabkan *S.cerevisiae* merupakan jenis mikroorganisme yang bersifat fakultatif anaerobik (Rosenfeld dan Beauvoit, 2003).

Fermentasi secara *Repeated-Batch*

Produksi bioetanol pada penelitian ini dilakukan dengan fermentasi secara *repeated-batch*. Jumlah siklus dalam penelitian ini didasarkan pada penelitian Kopsahelis *et al.* (2007) yang melakukan produksi bioetanol secara *repeated-batch* oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas gandum. Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa jumlah siklus terbaik bagi fermentasi secara *repeated-batch* adalah 6 siklus.

Fermentasi secara *repeated-batch* oleh *S.cerevisiae* pada penelitian ini menghasilkan etanol dengan kadar 42,72-63,66 g/L. Hasil ini tergolong

tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian lain, seperti 19,82-37,83 g/L (Pacheco *et al.*, 2010), 40,92-51,67 g/L (Kopsahelis *et al.*, 2007), dan 51,30 g/L (Plessas *et al.*, 2007). Faktor yang menyebabkan hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian lain di antaranya ialah perbedaan jenis *carrier* yang digunakan, kadar total gula awal, kondisi pH, serta jumlah total sel awal. Kadar etanol dan kadar gula sisa hasil penelitian ini disajikan pada Gambar 3.



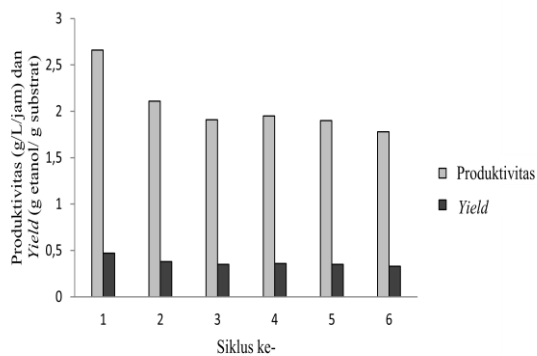
Gambar 3. Kadar etanol dan kadar gula sisa setiap siklus

Hasil penelitian memperlihatkan terjadi penurunan kadar etanol dan peningkatan kadar gula sisa seiring dengan peningkatan jumlah siklus. Hasil analisa menggunakan uji T ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar etanol dan kadar gula sisa secara signifikan antara siklus pertama dengan siklus kedua, sedangkan antara siklus kedua dengan siklus-siklus selanjutnya tidak terdapat perbedaan secara signifikan. Faktor utama yang menyebabkan penurunan kadar etanol dan peningkatan kadar gula sisa dari siklus pertama ke siklus kedua adalah terjadi adaptasi *S.cerevisiae* terhadap lingkungan baru. Hal ini merupakan konsekuensi dari media fermentasi yang berbeda dengan media imobilisasi serta kondisi fermentasi (anaerobik) yang berbeda dengan kondisi imobilisasi sel (aerobik).

Hasil uji T ($\alpha=0,05$) juga memperlihatkan tidak terdapat perbedaan kadar etanol dan kadar gula sisa secara signifikan pada siklus kedua hingga siklus terakhir. Hal ini berarti bahwa fermentasi secara *repeated-batch* oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi berlangsung stabil. Kondisi tersebut sesuai dengan target fermentasi secara *repeated-batch*, yaitu proses pada setiap siklus diharapkan dapat berlangsung secara stabil. Oleh karena itu, hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa ampas singkong cocok dan baik untuk digunakan sebagai *carrier* pada imobilisasi *S.cerevisiae*.

Parameter lain berupa produktivitas dan *yield* hasil penelitian ini disajikan pada Gambar 4. Produktivitas merupakan nisbah antara kadar etanol yang dihasilkan suatu siklus dengan lama fermentasi, sedangkan *yield* merupakan nisbah

jumlah etanol yang dihasilkan terhadap jumlah substrat yang digunakan (Pacheco *et al.*, 2010).



Gambar 4. Produktivitas dan *yield* etanol pada setiap siklus

Produktivitas hasil penelitian ini mencapai 1,78-2,66 g/L/jam. Hasil ini tergolong cukup tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian lain, yaitu penelitian Kopsahelis *et al.* (2007) yang hanya mencapai 1,52-2,00 g/L/jam.

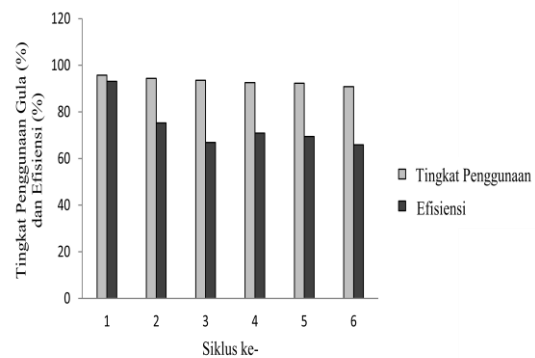
Produktivitas fermentasi untuk menghasilkan etanol dipengaruhi oleh kondisi pH, kadar total gula awal serta total sel terimobilisasi. Nilai pH pada penelitian ini ialah 5,5. Nilai tersebut berada dalam selang pH optimum bagi kinerja sel *S.cerevisiae*, yaitu 3-6 (Supatmawati, 2010). Hal ini pula yang menyebabkan produktivitas hasil penelitian Kopsahelis *et al.* (2007) lebih rendah, yaitu dikarenakan kondisi pH proses fermentasi tersebut adalah 7,0-7,5.

Faktor total gula awal dan total sel terimobilisasi berpengaruh terhadap kecepatan proses. Hal tersebut secara langsung akan mempengaruhi produktivitas fermentasi, sebagaimana produktivitas hasil penelitian Plessas *et al.* (2007), yaitu 5,13 g/L/jam. Produktivitas yang lebih tinggi dari hasil penelitian ini merupakan implikasi dari kadar total gula awal yang tergolong rendah (125 g/L) dan total sel yang tergolong relatif tinggi (10^{13} sel/g *carrier*).

Yield etanol hasil penelitian ini ialah 0,33-0,47 g etanol/g substrat. Nilai ini mengindikasikan bahwa dalam setiap penggunaan 1 gram hidrolisat pati oleh *S.cerevisiae* akan dihasilkan etanol sekitar 0,33-0,47 g. Hasil uji T ($\alpha=0,05$) memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan antara *yield* etanol pada siklus pertama dan siklus kedua, sedangkan pada siklus-siklus berikutnya tidak terdapat perbedaan secara signifikan. Hasil ini berarti bahwa *yield* etanol pada siklus pertama hingga siklus kedua diproduksi dalam kondisi tidak stabil karena terjadinya adaptasi *S.cerevisiae* terhadap lingkungan baru. *Yield* etanol dihasilkan dalam kondisi stabil pada siklus kedua hingga siklus terakhir (keenam).

Yield etanol hasil penelitian ini tergolong tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian lain, seperti 0,27-0,33 g etanol/g substrat (Kopsahelis *et*

al., 2007) dan 0,34 g etanol/g substrat (Plessas *et al.*, 2007). Tingginya *yield* etanol hasil penelitian ini dipengaruhi oleh dua faktor utama, yaitu jumlah total sel awal serta lama fermentasi. Semakin banyak jumlah total sel awal dan semakin lama fermentasi, maka *yield* etanol yang dihasilkan pun semakin tinggi. Dalam hal ini, Kopsahelis *et al.* (2007) menggunakan total sel awal sebanyak 10^9 sel/g *carrier* dengan lama fermentasi sekitar 24 jam dan kadar total gula awal 156 g/L, sedangkan Plessas *et al.* (2007) menggunakan total sel awal sebanyak 10^{13} sel/g *carrier* dengan kadar total gula awal 125 g/L dan lama fermentasi sekitar 10 jam. Parameter lain berupa persentase konversi gula dan efisiensi disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Persentase konversi gula dan efisiensi pada setiap siklus

Persentase konversi gula merupakan perbandingan jumlah gula yang terkonversi terhadap jumlah total gula awal. Parameter ini tidak hanya mencakup pemanfaatan gula untuk memproduksi etanol, melainkan juga untuk pemenuhan kebutuhan energi serta pertumbuhan sel (Pacheco *et al.*, 2010). Persentase konversi gula yang dihasilkan pada penelitian ini sebesar 90,80-95,74%. Dengan demikian, *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong telah mampu memanfaatkan 127,12-134,04 g/L dari total gula awal yang tersedia sebesar 140 g/L.

Persentase konversi gula hasil penelitian ini tergolong cukup tinggi serta tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian lain, seperti 95,30% (Kopsahelis *et al.*, 2007) dan 96,80% (Plessas *et al.*, 2007). Dengan demikian, hasil ini mengindikasikan bahwa *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong memiliki kemampuan yang baik dalam memanfaatkan hidrolisat pati singkong racun baik untuk pertumbuhan maupun untuk pembentukan etanol. *S.cerevisiae* merupakan khamir yang mempunyai kemampuan menggunakan beragam gula yang terdapat pada hidrolisat pati singkong, terutama glukosa dan sukrosa (Shah *et al.*, 2006). Kinetika pertumbuhan dan konsumsi gula oleh khamir secara kualitatif dan kuantitatif tergantung dari spesies khamir, sifat alami dan konsentrasi gula,

keberadaan oksigen serta parameter lingkungan lain seperti adanya asam lemah (Dijken *et al.*, 1993)

Efisiensi yang dihasilkan pada penelitian ini ialah sebesar 65,91-93,13%. Nilai efisiensi ini menunjukkan kemampuan *S.cerevisiae* dalam mengkonversi hidrolisat pati singkong racun menjadi etanol dibandingkan dengan produksi etanol teoritis. Nilai efisiensi hasil penelitian ini tergolong tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian lain, seperti 52,29-65,15% (Kopsahelis *et al.*, 2007) dan 66,18% (Plessas *et al.*, 2007).

Analisis parameter efisiensi pada setiap siklus memperlihatkan telah terjadi penurunan efisiensi secara drastis dari siklus pertama ke siklus kedua (selisih 16,76%). Penurunan tersebut disebabkan perlunya adaptasi sel terhadap kondisi anaerobik dan media fermentasi berupa hidrolisat pati. Sel telah mampu beradaptasi terlihat pada siklus kedua hingga siklus keenam yang menghasilkan efisiensi secara stabil.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemanfaatan pati singkong racun varietas SPP memiliki potensi yang baik untuk digunakan sebagai bahan baku bioetanol berdasarkan kadar karbohidratnya yang mencapai 33,30% (b/b). Rendemen pati yang dihasilkan pada penelitian ini adalah 26,20% (b/b) dan efisiensi konversi pati menjadi hidrolisat sebesar 36,89% (b/b). Ampas singkong hasil perlakuan oleh HCl 3% (v/v) mampu mengimobilisasi *S.cerevisiae* sebanyak $1,76 \times 10^{11}$ sel/g *carrier*. Imobilisasi tersebut dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu gaya adsorpsi dari pori-pori ampas singkong dan media yang terdapat dalam pori-pori tersebut.

Fermentasi secara *repeated-batch* oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong dengan pengulangan 6 siklus serta kadar total gula awal sebesar 140 g/L telah menghasilkan etanol berkadar 42,72-63,66 g/L, produktivitas 1,78-2,64 g/L/jam, *yield* 0,33-0,47 g etanol/g substrat, persentase konversi gula sebesar 90,80-95,74%, serta efisiensi sebesar 65,91-93,13%. Hasil ini mengindikasikan bahwa fermentasi secara *repeated-batch* oleh *S.cerevisiae* terimobilisasi pada ampas singkong memiliki kestabilan proses yang baik, serta produktivitas, persentase konversi gula dan efisiensi proses yang tinggi.

Saran

Diperlukan optimasi nisbah jumlah *carrier* dan kadar total gula awal terbaik berdasarkan jumlah sel terimobilisasi, kadar etanol, produktivitas serta efisiensi. Selain itu, perlu dikaji lebih lanjut fermentasi secara *repeated-batch* lebih dari 6 kali siklus untuk mengetahui tingkat kestabilan maksimum ampas singkong sebagai *carrier* pada imobilisasi secara adsorpsi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ditjen DIKTI - Kemendiknas melalui IPB yang telah memberikan bantuan pendanaan BOPTN Tahun 2013 bagi keberlangsungan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Atifah N. 2006. Pemanfaatan Hidrolisat Pati Sagu sebagai Sumber Karbon pada Produksi Bioplastik Polihidroksialkanoat secara *Fed-Batch* oleh *Ralstonia eutropha*. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2013. Produksi Singkong Nasional 2008-2012. Jakarta: Badan Pusat Statistik RI.
- de Vasconcelos JN, Lopes CE, de Franca FP. 2004. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Braz J Chem Eng.* 21 (03): 357-365.
- Dijken JR, Weusthuis RA, dan Pronk JT. 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 63: 343-352. *Kluwer Academic Publishers The Netherland*.
- [Kemenristek] Kementerian Riset dan Teknologi RI. 2006. Penelitian, Pengembangan dan Penerapan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bidang Sumber Energi Baru dan Terbarukan untuk Mendukung Keamanan Ketersediaan Energi Tahun 2025. Jakarta: Kemenristek RI.
- Kilonzo P dan Bergougnou M. 2012. Surface modification for controlled and optimized cell immobilization by adsorption: application in fibrous bed bioreactors containing recombinant cells. *J Microb Biochem Technol.* S8:001.
- Kopsahelis N, Nikolas A, Bekatorou A, Kanellaki M. 2007. Comparative study of spent grains and delignified spent grains as yeast support for alcoholic production from molasses. *Biores Technol.* 98: 1440-1447.
- Pacheco AM, Gondim DR, dan Goncalves LRB. 2010. Ethanol production by fermentation using immobilized cells of *saccharomyces cerevisiae* in cashew apple bagasse. *Appl Biochem and Biotechnol.* 161: 209-217.
- Plessas S, Bekatorou A, Koutinas AA, Soupioni M, Banat IM, Marchant. 2007. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Biores Technol.* 98: 860-865.
- Prihandana R. 2007. *Bioetanol Ubi kayu Bahan Bakar Masa Depan*. Jakarta: Agromedia.
- Reddy LVA, Reddy YHK, dan Reddy OVS. 2006. Wine production by guava pieces

- immobilized yeast from Indian cultivar grapes and its volatile composition. *Biotechnol.* 5 (4): 449-454.
- Rosenfeld E dan Beauvoit B. 2003. Role of the non-respiratory pathway in the utilization of molecular oxygen by *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20: 1115-1144.
- Rukmana R. 1997. *Ubi Kayu, Budidaya dan Pascapanen*. Yogyakarta: Kanisius.
- Shah FA, Aziz S, Memon HR, Rajoka MI. 2006. Ethanol production kinetics by a thermo-tolerant mutant of *saccharomyces cerevisiae* from starch industry waste (Hydrol). *Pak J Anal Environ Chem.* 11 (1): 16-21.
- Shuler ML dan Kargi F. 2002. *Bioprocess Engineering-Basic Concept*. New Jersey: Practice-Hall Inc.
- Supatmawati. 2010. Rekayasa bioproses produksi bioetanol dari hidrolisat pati sagu (*Metroxylon* sp) menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoides* pada kultivasi nir-sinambung dan semi sinambung. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Tjokroadikoesoemo PS. 1986. *HFS dan Industri Kayu Lainnya*. Jakarta: Gramedia.