

Kajian Perbandingan Proses Fermentasi Etanol Secara Sinambung dalam *Immobilized Cell Fermentor Fixed Bed* Bermedia Penambat Batu Apung dengan *Free Cell Fermentor Recycle* pada Berbagai Konsentrasi Umpan Glukosa

Ronny Kurniawan, Salafudin, Rivansyah Malik, Fazri Aziantoro
Program Studi Teknik Kimia, FTI,
Institut Teknologi Nasional
Jl. PHH. Mustafa No 23 Bandung
E-mail:rk.itenas@gmail.com

Abstract

Fermented ethanol production is one of them influenced by the type of raw material, especially from the sugar content (glucose) contained in the raw material. In the fermentation process glucose will be converted to ethanol, the higher the concentration of glucose the higher the concentration of ethanol produced but it will be limited by the problem of substrate inhibition and inhibition of the product. The general purpose of this study was to determine the best conditions based on variations of glucose concentration (40, 100, 150, 200, and 250) g / L in terms of ethanol concentration, ethanol yield, and the amount of loose cells produced from ethanol fermentation process using column fermentor fix bed continuously with a pumice stone as its retarding medium. While the specific purpose is to compare the process of fermentation of immobilized cell and free cell with recycle in ethanol fermentation process which is done based on ethanol concentration value and ethanol yield percentage. Based on the result of best condition study obtained in immobilized cell condition with a mesh size of 6/8 with 2 days residence time with ethanol concentratin of 20.53% v/v, and ethanol yield value of 37.56% w/w at a glucose feed concentration of 150 g/L. Fermentation of ethanol with immobilized cells fixed bed with pumice stone as a better inhibiting medium than ethanol fermentation with free cell condition with recycle in terms of ethanol concentration and yield% produced for the same glucose feed concentration.

Keyword: fermentation ; Inhibition ; immobillized cell ; pumice

1. Pendahuluan

Kebutuhan etanol di Indonesia akan terus meningkat seiring dengan digunakannya etanol sebagai bahan bakar nabati. Pemerintah Indonesia menargetkan pada tahun 2025 substitusi bahan bakar nabati terhadap bahan bakar minyak mencapai 25% (Instruksi Presiden Nomor 1 Tahun 2006 tentang Pemanfaatan Bahan Bakar Nabati atau Biofuel sebagai Bahan Bakar Alternatif). Berkaitan dengan hal tersebut dibutuhkan upaya peningkatan produksi etanol selain dengan menambah kapasitas produksi dari industri etanol yang sudah ada atau membangun industri etanol yang baru dan tidak kalah pentingnya untuk mengoptimalisasi dari sisi proses dan bahan baku. Produksi etanol melalui fermentasi secara *continue* antara lain dipengaruhi oleh konsentrasi substrat atau kandungan glukosa yang diumpangkan ke fermentor dan jumlah mikroorganisme di dalam fermentor. Besarnya kecilnya konsentrasi substrat (glukosa) yang diumpangkan ke fermentor akan berpengaruh pada inhibisi substrat dan inhibisi produk pada proses fermentasi yang berlangsung sedangkan jumlah mikroorganisme di dalam fermentor akan berpengaruh terhadap besarnya konversi substrat (glukosa) menjadi etanol. Berkaitan dengan hal tersebut perlu dikaji lebih lanjut pengaruh konsentrasi substrat (glukosa) dalam fermentasi *continue* dan jumlah mikroorganisme yang tinggal di dalam fermentor karena di dalam proses fermentasi secara *continue* jumlah mikroorganisme di dalam fermentor sering berkurang karena ikut serta terbawa ke aliran produk (*wash out*). Penurunan produksi etanol pada konsentrasi gula berlebih merupakan efek dari inhibisi subtrat. Konsentrasi subtrat 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, (Nowak, 2000). Inhibitor merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat laju reaksi suatu enzim. Inhibitor bekerja dengan cara berikatan dengan enzim sehingga membuat enzim menjadi rusak atau tidak cocok dengan substratnya. Pengaruh inhibitor pada proses fermentasi substrat adalah ditinjau dari konsentrasi substrat yang mempengaruhi aktivitas enzim. Pada keadaan substrat yang berlebih maka akan terjadi kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat sehingga substrat tidak diubah menjadi produk (Arbianto, 1995).

Immobilized cell adalah teknik penambatan sel di dalam suatu media penambat. *Immobilized cell* mikroba memiliki keuntungan teknis dan ekonomis tertentu dibandingkan sistem *free cell*. *Immobilized cell* untuk fermentasi telah dikembangkan untuk menghilangkan hambatan yang disebabkan oleh konsentrasi tinggi dari substrat dan produk, juga untuk meningkatkan produktivitas dan hasil produksi etanol. (Talebnia et al, 2006). *Immobilized cell* memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan *free cell*. Dengan menambatkan sel, desain proses menjadi lebih mudah dan sederhana karena sel dilekatkan pada partikel atau permukaan yang lebih besar sehingga mudah dipisahkan dari aliran. Cara penambatan tersebut memastikan proses fermentasi pada fermentor *kontinyu* tanpa adanya sel yang terbuang. Penambatan sel juga dapat meningkatkan kondisi kondusif diferensiasi sel dan komunikasi antar sel.

Tujuan dari penelitian ini adalah Menentukan kondisi terbaik berdasarkan variasi konsentrasi glukosa ditinjau dari konsentrasi etanol, perolehan etanol, dan jumlah sel yang lepas yang dihasilkan dari proses fermentasi etanol menggunakan fermentor kolom *fix bed* secara *kontinyu* dengan batu apung sebagai media penambatnya serta membandingkannya dengan hasil fermentasi *free cell* dengan *recycle*.

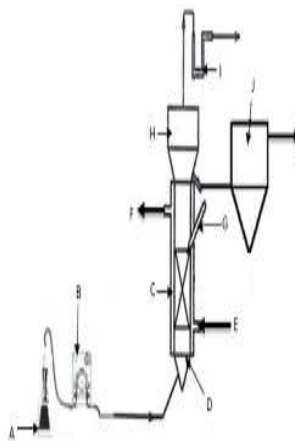
2. Metodologi

Pendekatan Penelitian

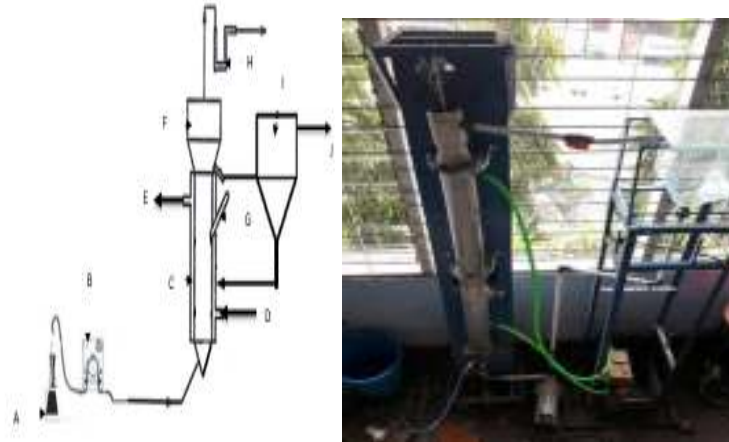
Proses pembuatan etanol dilakukan dengan fermentasi secara *continue* dalam fermentor kolom *fixed bed*, menggunakan mikroorganisme dari jenis ragi yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, dan media penambat yang digunakan dalam kondisi *immobilized cell* adalah batu apung dengan metode adsorpsi. Parameter pada penelitian ini adalah ukuran batu apaung mesh 6/8, waktu fermentasi 2 hari, temperatur fermentasi 30°C, dan pH 4,5 sedangkan variabel penelitian adalah konsentrasi glukosa 40 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, dan 250 g/L serta Kondisi sel yaitu *free cell* yang di *recycle* dan *immobilized cell*.

Peralatan Penelitian

Peralatan utama yang digunakan di dalam penelitian ini adalah sebagai berikut



(a)



(b)

Keterangan Gambar:

- A. Tangki Umpan
- B. Pompa *Peristaltic*
- C. Jaket pemanas
- D. *Screen support*
- E. Inlet air pemanas
- F. Outlet air pemanas
- G. Termometer
- H. Kolom Fermentor
- I. Leher Angsa
- J. Tangki Produk
- K. *Outlet Produk*

Gambar 1. Skema dan Foto Alat (a) Fermentor Kolom *Fixed Bed Immobilized Cell* (b) Bioreaktor *Free Cell Recycle*

Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap :

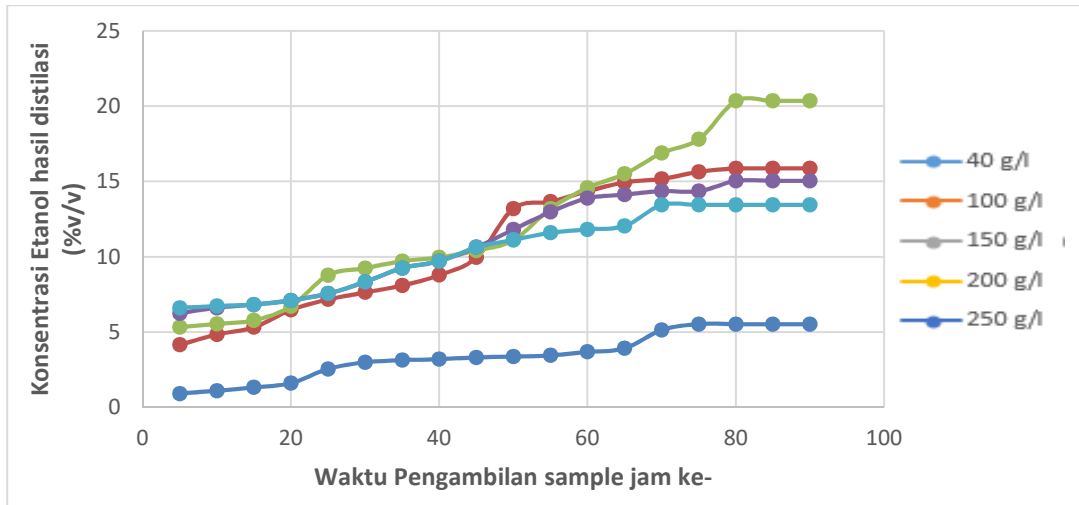
1. Tahap pendahuluan yang terdiri dari tahap pertumbuhan ragi dan tahap penambatan sel
2. Tahap pembentukan produk etanol pada fermentor kolom *fixed bed immobilized cell* dan *free cell recycle*, dan
3. Tahap pemurnian etanol melalui proses distilasi.

Analisis

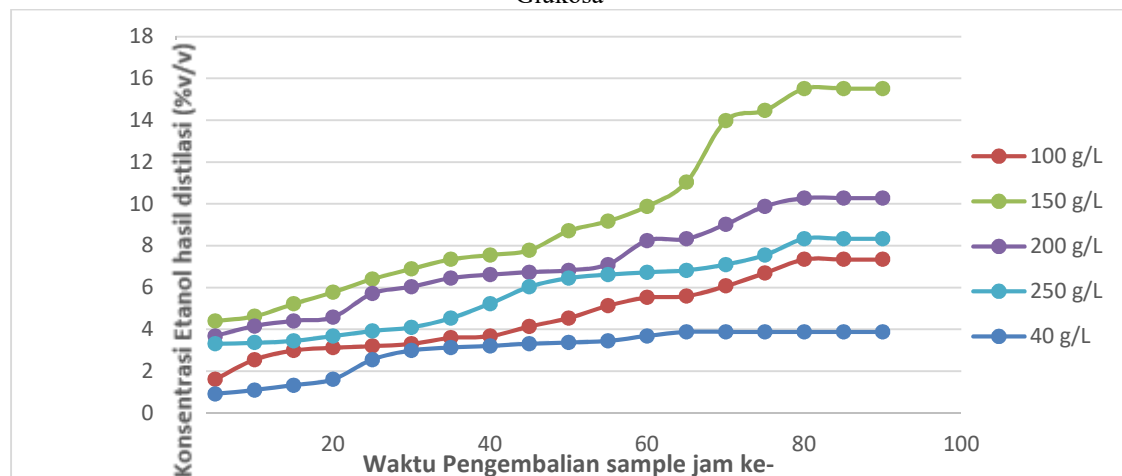
Analisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah analisis konsentrasi etanol dengan metode refraktometri, analisis konsentrasi glukosa dengan metode *Somogyi-Nelson*, dan analisis jumlah sel dengan metode *Counting Chamber*.

3. Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Waktu Pengambilan Sample terhadap Konsentrasi Etanol pada Kondisi *Immobilized Cell* dengan variasi Konsentrasi Umpan Glukosa



Gambar 2. Pengaruh Waktu Pengambilan Sampel terhadap Konsentrasi Etanol Hasil Distilasi untuk Kondisi *Immobilized Cell* dengan Waktu Fermentasi 2 hari pada Berbagai Konsentrasi Umpan Glukosa



Gambar 3. Pengaruh Waktu Pengambilan Sampel terhadap Konsentrasi Etanol Hasil Distilasi untuk Kondisi *Free Cell* dengan *Recycle* dengan Waktu Fermentasi 2 hari pada Berbagai Konsentrasi Umpan Glukosa

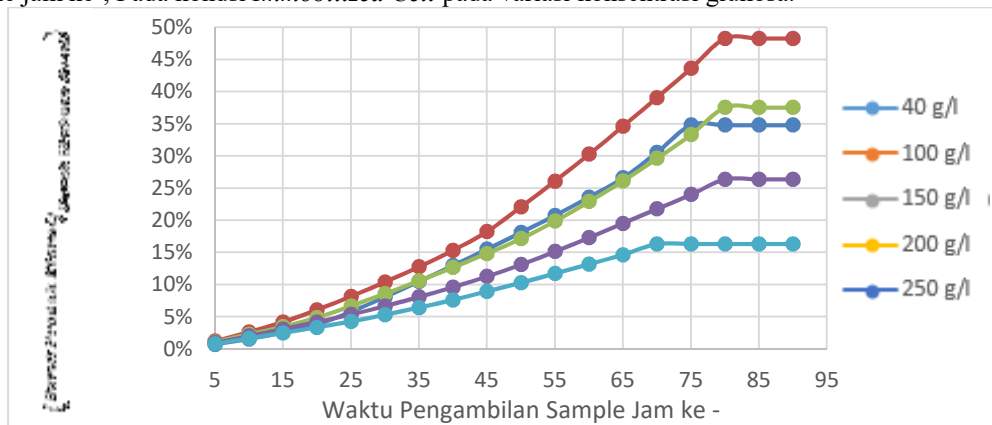
Untuk waktu tinggal yang sama proses fermentasi dengan kondisi *immobilized cell* menghasilkan konsentrasi etanol yang lebih tinggi untuk kondisi 150 g/L sebesar 20,35 % v/v dibandingkan dengan kondisi *free cell* dengan *recycle* sebesar 15,51 % v/v. Hal ini dimungkinkan jumlah *cell* dalam fermentor pada kondisi *immobilized* selama fermentasi lebih banyak karena *cell* tidak banyak yang ikut terbuang ke aliran produk meskipun jumlah sel ragi pada saat fermentasi awal yang tinggal dalam kolom fermentor untuk kondisi *immobilized cell* sebanyak $2,78 \times 10^9$ sedangkan untuk kondisi *free cell* dengan *recycle* jumlah mikroianya sebanyak $2,81 \times 10^9$. Gambar 2 dan 3 menunjukkan adanya pengaruh konsentrasi etanol pada kondisi *Immobilized Cell* dan *free cell* dengan *recycle* untuk waktu tinggal yang sama. Menunjukkan bahwa pengambilan sample yang semakin lama akan menghasilkan konsentrasi etanol yang semakin tinggi sampai mencapai kondisi *steady state* yaitu kondisi di mana jumlah sel di dalam fermentor sudah tidak berubah maka konsentrasi etanol yang dihasilkan akan tetap tidak berubah. Hal tersebut akan berlaku untuk konsentrasi umpan glukosa 40 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L dan 250 g/L. Semakin lama waktu pengambilan sample semakin banyak glukosa yang terkonversi menjadi etanol sampai dengan keadaan *steady state*.

Inhibitor substrat merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat laju reaksi suatu enzim. Inhibitor bekerja dengan cara berikatan dengan enzim sehingga membuat enzim menjadi rusak atau tidak cocok dengan substratnya. Inhibitor pada produk adalah zat yang menghambat atau menurunkan laju reaksi

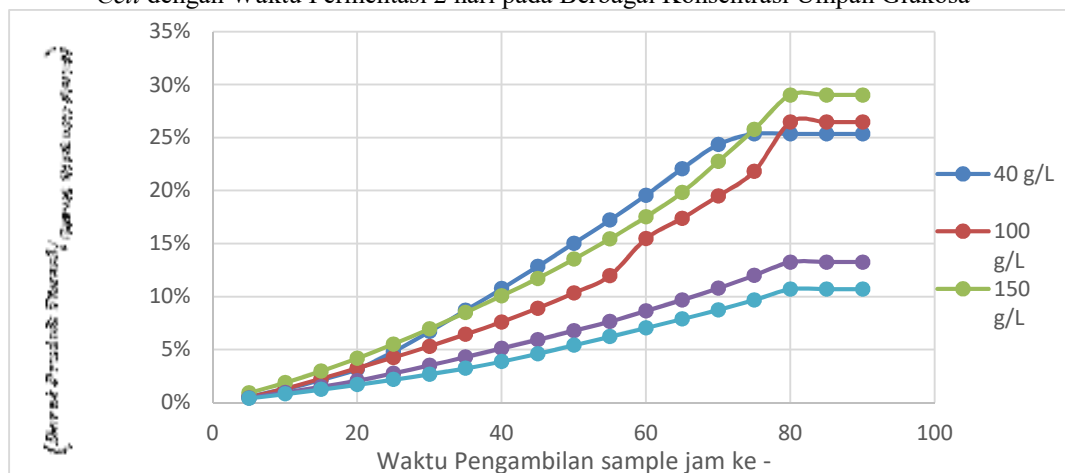
kimia. Sifat inhibitor berlawanan dengan katalis, yang mempercepat laju reaksi. Pada proses fermentasi selalu terjadi penurunan kadar gula akibat terurainya glukosa menjadi etanol, pada konsentrasi gula tinggi. Pengaruh konsentrasi glukosa pada konsentrasi etanol hasil distilat yang dihasilkan yaitu semakin tinggi konsentrasi glukosa maka konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin tinggi yaitu pada variasi konsentrasi glukosa (40, 100, dan 150) g/L. Hal ini karena pada konsentrasi umpan glukosa yang lebih tinggi, tersedia lebih banyak substrat yang dapat dikonversi menjadi etanol sehingga produk yang dihasilkan juga lebih tinggi. Pada konsentrasi glukosa (200 dan 250) g/L mengalami penurunan konsentrasi etanol hasil distilat karena substrat menjadi inhibitor (Goksungur dan Zorlu, 2001) serta terjadinya osmosis yang tinggi (Baros, 1990) sehingga membran plasma sel keluar mengakibatkan sel berkurang. Konsentrasi etanol maksimal terjadi pada variasi konsentrasi 150 g/l karena pada variasi konsentrasi 200 g/L dan 250 g/L mengalami penurunan. Kondisi *immobilized cell* maupun *free cell* dengan *recycle* pada variasi konsentrasi 40 g/L, 100 g/L, 150 g/L konsentrasi etanol mengalami kenaikan, namun pada variasi konsentrasi 200 g/L, 250 g/L mengalami penurunan. Yang membedakan konsentrasi etanol antara *immobilized cell* dan *free cell* dengan *recycle* yaitu nilai konsentrasi etanol *immobilized cell* lebih tinggi dari pada kondisi *free cell* dengan *recycle*.

Pengaruh Waktu Pengambilan Sampel terhadap % yield (Berat Etanol dibandingkan terhadap Berat Glukosa Awal) pada Kondisi *Immobilized Cell* dan *Free Cell* dengan *Recycle* Pada variasi Konsentrasi Umpan Glukosa Awal

Yield merupakan perbandingan banyaknya produk etanol yang dihasilkan terhadap glukosa awal selama reaksi fermentasi. Gambar 4 menunjukkan hubungan yield etanol (%) terhadap pengambilan Sample jam ke-, Pada kondisi *Immobilized Cell* pada variasi konsentrasi glukosa.



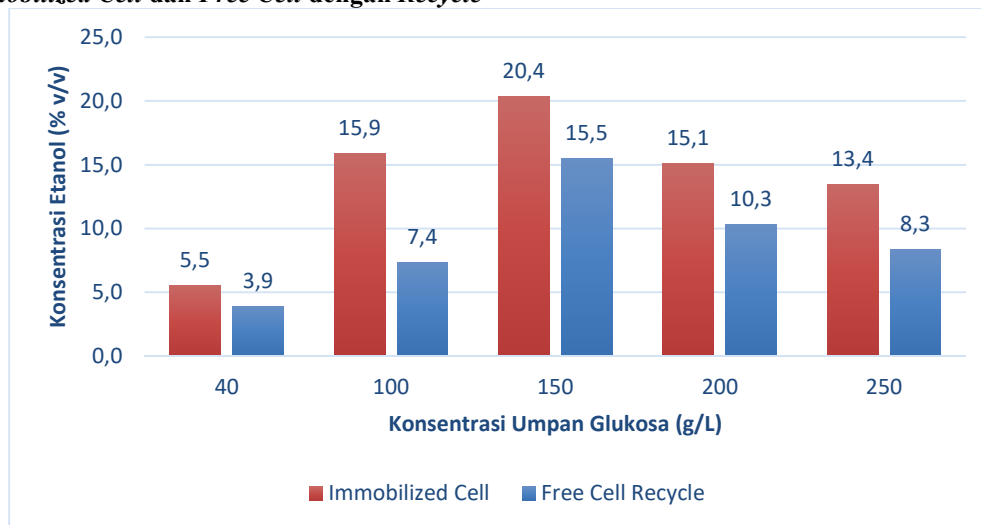
Gambar 4 Pengaruh % Yield terhadap Waktu Pengambilan Sampel untuk Kondisi *Immobilized Cell* dengan Waktu Fermentasi 2 hari pada Berbagai Konsentrasi Umpan Glukosa



Gambar 5. Pengaruh % Yield terhadap Waktu Pengambilan Sampel untuk Kondisi *Free Cell* dengan *Recycle* waktu Fermentasi 2 hari pada Berbagai Konsentrasi Umpan Glukosa

Dari gambar 4 dan 5 menunjukkan bahwa kurva di atas menghasilkan % yield yang semakin naik dari waktu ke waktu, hal ini disebabkan adanya aktivitas ragi untuk menghasilkan etanol sehingga konsumsi glukosa oleh ragi semakin meningkat, namun pada waktu etanol yang di hasilkan jumlah tidak lagi berubah atau mengalami kondisi konstan. Hal ini di sebabkan enzim yang di hasilkan untuk merombak glukosa menjadi etanol oleh ragi sudah seimbang artinya ragi yang mati akibat persaingan maupun ragi yang berkembang hidup jumlahnya sama hal ini dapat di lihat pula analisis *counting chamber* dimana sel ragi yang lepas jumlahnya tidak lagi banyak berubah. Pada kondisi tertentu % yield yang dihasilkan juga mengalami penurunan, hal ini di sebabkan pada waktu tertentu sel ragi mengkonsumsi glukosa untuk bertahan hidup tanpa ada aktivitas menghasilkan enzim untuk menghasilkan etanol hal inilah yang menjadi salah satu pengaruh dimana pada waktu tertentu kadar etanol menurun. Dari kurva di atas dapat dilihat pula dari berbagai kondisi pada fermentasi etanol dihasilkan persen yield yang paling tinggi yaitu dihasilkan pada konsentrasi umpan glukosa 150 g/L dengan kondisi *immobilized cell* dengan media penambat batu apung mesh 6/8. Hal ini membuktikan penjeratan sel mikroorganisme dalam aktivitas fermentasi cukup efektif dalam menghasilkan produk etanol dengan kadar yang cukup baik akibat mikroorganisme yang digunakan relatif cukup banyak selang waktu tertentu mikroorganismenya jumlah *wash out* nya relatif sedikit. Bila di dibandingkan kondisi *free cell* maka etanol yang dihasilkan tidak lebih baik dari kondisi *immobilized cell* hal ini disebabkan *wash out* mikroorganisme meskipun dengan ada *recycle* kembali ke dalam fermentor akan tetapi masalah *wash out* sel ke aliran produk relatif banyak yang terbawa aliran produk.

Pengaruh Inhibitor Subtrat terhadap Konsentrasi Etanol yang Dihasilkan pada Kondisi *Immobilized Cell* dan *Free Cell* dengan *Recycle*



Gambar 6. Kurva Pengaruh Konsentrasi Umpan Glukosa terhadap Nilai Konsentrasi Etanol Pada Waktu Fermentasi 2 hari Untuk Kondisi *Immobilized Cells* dan *Free Cell* dengan *Recycle*

Berdasarkan hasil percobaan dihasilkan bahwa Konsentrasi etanol tertinggi dicapai pada konsentrasi gula total 150 g/L dengan *Saccharomyces cerevisiae* yaitu sebesar 20,4% v/v, semakin tinggi konsentrasi umpan glukosa maka semakin tinggi konsentrasi etanol yang dihasilkan. Fermentasi dengan *immobilized* kemungkinan sel ragi yang terbuang ke aliran produk semakin kecil sehingga jumlah sel ragi di dalam kolom fermentor tidak banyak berkurang. Bila dibandingkan dengan kondisi *free cell* yang di *recycle* maka etanol yang dihasilkan tetap lebih rendah dari kondisi *immobilized cell* hal ini disebabkan *wash out* mikroorganisme meskipun dengan ada *recycle* kembali ke dalam fermentor akan tetapi masalah *wash out* mikroorganisme tetap terjadi dan lebih banyak dibandingkan dengan kondisi *immobilized*. Hal lain yang mempengaruhi juga yaitu masalah konsentrasi umpan glukosa tinggi yang menyebabkan terjadinya plasmolisis, terlepasnya membran plasma dari dinding sel ke lingkungannya, serta sifat substrat yang *inhibitor* terhadap sel yang menyebabkan laju fermentasi turun.

Pengaruh Kondisi Fermentasi dan Waktu Tinggal terhadap Sel yang Lepas
Tabel 1. Perbandingan Sel yang Lepas dengan kondisi *Immobilized Cell*

Kondisi	40 g/L		100 g/L		150 g/L		200 g/L		250 g/L	
	Sel yang lepas (%)	Jumlah sel yang lepas	Sel yang lepas (%)	Jumlah sel yang lepas	Sel yang lepas (%)	Jumlah sel yang lepas	Sel yang lepas (%)	Jumlah sel yang lepas	Sel yang lepas (%)	Jumlah sel yang lepas
Jumlah sel										
Sampel jam ke-1 sel yang lepas	6,89	$2,37 \times 10^8$	6,21	$2,27 \times 10^8$	5,55	$2,27 \times 10^8$	5	$2,07 \times 10^8$	4,17	$2,27 \times 10^8$
Sampel jam ke-40 sel yang lepas	6,82	$2,55 \times 10^8$	5,86	$2,51 \times 10^8$	5,17	$2,51 \times 10^8$	4,65	$2,51 \times 10^8$	3,96	$2,51 \times 10^8$
Sampel jam ke-70 sel yang lepas	6,55	$2,24 \times 10^8$	5,68	$2,24 \times 10^8$	5,10	$2,24 \times 10^8$	4,48	$2,24 \times 10^8$	3,65	$2,24 \times 10^8$

Tabel 2. Perbandingan Sel yang Lepas dengan kondisi *Free Cell* dengan *Recycle*

Kondisi	40 g/L	Sel yang lepas (%)	100 g/L	Sel yang lepas (%)	150 g/L	Sel yang lepas (%)	200 g/L	Sel yang lepas (%)	250 g/L	Sel yang lepas (%)
Jumlah sel										
Jumlah sel yang digunakan	$2,9 \times 10^8$	-	$2,9 \times 10^8$	-	$2,9 \times 10^8$	-	$2,9 \times 10^8$	-	$2,9 \times 10^8$	-
Sampel jam ke-1 sel yang lepas	2×10^8	6,89	$1,8 \times 10^8$	6,21	$1,61 \times 10^8$	5,55	$1,45 \times 10^8$	5	$1,21 \times 10^8$	4,17
Sampel jam ke-40 sel yang lepas	$1,98 \times 10^8$	6,82	$1,7 \times 10^8$	5,86	$1,5 \times 10^8$	5,17	$1,35 \times 10^8$	4,65	$1,15 \times 10^8$	3,96
Sampel jam ke-70 sel yang lepas	$1,9 \times 10^8$	6,55	$1,65 \times 10^8$	5,68	$1,48 \times 10^8$	5,10	$1,3 \times 10^8$	4,48	$1,06 \times 10^8$	3,65

Berdasarkan tabel 1 dan tabel 2 menunjukkan bahwa sel yang lepas pada variasi kondisi *immobilized cell* dan *free cell* dengan *recycle* mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya variasi konsentrasi umpan glukosa. Semakin tinggi konsentrasi umpan glukosa, sel yang lepas akan semakin berkurang karena glukosa dikonsumsi secara optimal yang digunakan sebagai bahan makanan oleh sel ragi sehingga mengurangi kekurangan nutrisi yang menyebabkan sel lepas.

Pada tabel 2 kondisi *free cell* dengan *recycle* memiliki jumlah sel yang lepas lebih banyak dibandingkan dengan kondisi *immobilized cell* dimana pada kondisi ini tidak terdapat medium penambat untuk membatasi gerak dari sel ragi akibatnya banyak sel ragi yang terbawa bersama aliran produk jumlahnya cukup banyak bila dibandingkan dengan kondisi *immobilized cell*.

4. Kesimpulan

1. Kondisi terbaik dari fermentasi etanol dengan batu apung sebagai media penambat dengan konsentrasi umpan sebesar (40, 100, 150, 200, dan 250) g/L yaitu konsentrasi glukosa sebesar 150 g/l dengan nilai konsentrasi etanol sebesar 20,53% v/v dan persen yield sebesar 37,56% b/b.
2. Persentase rata-rata jumlah sel yang lepas yaitu pada fermentasi etanol dengan *immobilized cell* kurang dari 1 % sedangkan dengan kondisi *free cell* dengan *recycle* sebesar 3,93% s.d 6,75%.
3. Ditinjau berdasarkan nilai konsentrasi dan % yield fermentasi etanol dengan *immobilized cells fixed bed* dengan penambat batu apung lebih baik dibandingkan fermentasi etanol dengan kondisi *free cell* dengan *recycle*

Daftar Pustaka

- [1] Arbianto P, 1995, Pengembangan Industri Fermentasi Tradisional Umumnya Tempe Khususnya, Prosiding Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern, hal 182 – 188, Penerbit yayasan tempe Indonesia, Jakarta
- [2] Baros et al, 1990, *Kinetic of Partly Diffusian Controller Reaction 22 Diffusion Effect on the Kinetics Excimer Formation*, Journal Psys Chem, 94 (7)
- [3] Goksungur, Zorlu, 2001, *Production of Ethanol from Beet Mollases by Alginate Immobilized Cell in a Packed – Bed – Bioreactor*, Turkish Journal of Biology, Turkey
- [4] Nowak et al, 2000, *The Doa 4 Deubiguti Nating Enzyme is Functionally Linked to the Vacolar Protein-Sorting and Endocytic Pathways*, Journal Molecular Biology of the Cell, Vol 11 No 10
- [5] Talebnia et al, 2006, *In Situ Detoxification and Cultivation of Dilute Acid Hydrolyzate to Ethanol by Encapsulated S.cerevisiae*, Journal of Biotechnology, Volume 125, Issue 3, page 377-384