

**KAJIAN PENGGUNAAN TWEEN80™ PADA PELBAGAI  
KONSENTRASI NIRA NIPAH KENTAL DALAM PROSES  
FERMENTASI BIOETANOL**

**STUDY OF TWEEN80™ APPLICATION ON VERY GRAVITY NIRA SAP  
IN BIOETHANOL FERMENTATION**

**Rezita Azizah (0906121541)**

Fajar Restuhadi and Evy Rossi

[Rezitaazizah@gmail.com](mailto:Rezitaazizah@gmail.com)

**ABSTRACT**

The aimed of the research was to obtain the best combination treatment between early sugar concentration and *Tween80* concentration as surfactant and nutrition for *Saccaromyces cerevisiae* to produce ethanol on very high gravity fermentation from Nypa sap. The exploration research used two factor treatments with two replications. The treatments consist of early sugar concentration N1 (20%), N2 (25%), N3 (30%) and *Tween80* concentration T0 (0%), T1 (0,2%), T2 (0,4%), T3 (0,6%). Observation was conducted every 24 hours i.e sugar concentration, ethanol concentration, amount of cell, and pH. Data obtained were analyzed by descriptive method. The best combination treatment was T1N3 (*Tween80* 0,2% and N 30%) which produced ethanol 16,20%.

*Keywords: Nypa sap, Tween80, Bioethanol, Very High Gravity Fermentation*

---

**PENDAHULUAN**

Bahan bakar dari minyak bumi merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbaharui. Dewasa ini pemakaian bahan bakar sangat tinggi sementara itu persediaan bahan bakar dari minyak bumi sudah semakin menipis. Perlu adanya bahan bakar alternatif sebagai sumber energi untuk mengatasi hal ini. Bioetanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) merupakan senyawa organik yang memiliki peluang besar menjadi pengganti bahan bakar minyak bumi.

Nipah merupakan salah satu tanaman yang berpotensi menghasilkan bioetanol. Mengingat bahwa lokasi hutan nipah sebagai sumber bahan baku yang umumnya merupakan daerah rawa, maka proses pengumpulan nira nipah dari lokasi sentra penadapan ke tempat pengolahan relatif cukup berat. Tidak jarang nira yang terkumpul telah terfermentasi menjadi asam, sehingga menurunkan kualitas nira dan produktivitas jika diolah menjadi bioetanol.

Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas dan mengefisienkan biaya produksi bioetanol adalah dengan memperkenalkan proses fermentasi nira kental (*very high gravity fermentation*). Proses ini melibatkan nira dengan konsentrasi gula 270 gr atau lebih per liter (Bayrock dan Ingledew, 2001; Nuanpeng *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005; Bangrak *et al.*, 2011). Teknik ini memiliki sejumlah keunggulan, seperti meningkatkan konsentrasi etanol yang dihasilkan dan juga meningkatkan laju fermentasi, sehingga dapat mengurangi biaya produksi dan mengurangi resiko kontaminasi oleh bakteri (Chen *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011).

Penambahan nutrisi pada proses fermentasi akan meningkatkan kerja sel selama fermentasi (Tran *et al.*, 2010). Salah satu nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisme adalah asam lemak tak jenuh sebagai penyusun membran sel. *Tween80*<sup>TM</sup> dapat dijadikan sebagai sumber asam lemak tak jenuh yang diperlukan oleh mikroorganisme. *Tween80*<sup>TM</sup> juga berperan sebagai surfaktan untuk menurunkan tegangan permukaan cairan di sekitar sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga media fermentasi yang kental tidak memberikan efek negatif pada sel (Feng *et al.*, 2006).

Efisiensi biaya produksi bioetanol juga dapat dilakukan dengan menerapkan teknik amobilisasi sel. Teknik amobilisasi menyebabkan sel terjebak dalam suatu matriks atau membran. Amobilisasi sel bertujuan untuk membuat sel menjadi tidak bergerak atau berkurang ruang gerakannya sehingga sel menjadi terhambat pertumbuhannya dan substrat yang diberikan hanya digunakan untuk menghasilkan produk. Sel juga dapat digunakan kembali setelah fermentasi selesai dengan cara memisahkan sel dari produk hanya dengan menggunakan kertas saring. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kombinasi perlakuan terbaik antara kadar gula awal dan konsentrasi *Tween80*<sup>TM</sup> sebagai surfaktan dan sumber nutrisi bagi *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Tempat dan Waktu**

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Pengolahan dan Analisis Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Riau. Waktu penelitian berlangsung selama 3 bulan yaitu bulan Oktober hingga Desember 2013.

### **Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira nipah, khamir *Saccharomyces cerevisiae* R-58 yang diperoleh dari laboratorium Bioproses Institut Teknologi Bandung, akuades, *Tween80*<sup>TM</sup>, Na-alginat, media *Nutrient Broth* (NB), *Plate Count Agar* (PCA), kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) 3%, asam klorida (HCl) 37%, dan garam fisiologis. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis adalah glukosa anhidrat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Kalium-natrium-tartrat,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96%,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , amonium molibdat, dan  $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas yaitu gelas ukur, corong, pipet ukur, labu ukur, tabung reaksi, kuvet, cawan petri, pipet tetes, *hockey stick* dan erlenmeyer. Peralatan analisis yaitu pH meter, sensor etanol, dan UV-mini Spektrofotometri. Alat-alat lainnya seperti timbangan analitik, sentrifuse, *water bath shaker*, spatula, *autoclave*, mikro pipet, tip, *automatic mixer*, jarum ose, kapas penutup, aluminium foil, *hot plate*, *magnetic stirrer*, pompa suntikan, kertas saring Whatman no 42, inkubator, oven pengering, *laminar flow cabinet*, saringan *stainless*, lampu spritus, lemari es (*refrigerator*), kamera, peralatan tulis, dan alat lainnya.

### **Metode Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode percobaan (*Experimental Method*) dengan menggunakan dua perlakuan. Perlakuan pertama

adalah konsentrasi *Tween80*<sup>TM</sup> yang terdiri dari 4 taraf (0; 0,2; 0,4; 0,6)% dan perlakuan kedua adalah konsentrasi gula awal nira nipah yang terdiri dari 3 taraf (20, 25, 30)%. Masing-masing kombinasi perlakuan (Tabel 1) akan diulang dua kali sehingga diperoleh 24 unit percobaan. Parameter yang diamati meliputi kadar etanol, kadar gula, jumlah sel dan perubahan pH di akhir fermentasi. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan akan dianalisis secara deskriptif dengan menggunakan tabulasi dan grafik.

Tabel 1 . Rancangan kombinasi perlakuan

| Konsentrasi<br><i>Tween80</i> <sup>TM</sup> | Konsentrasi Glukosa Nira Nipah |      |      |
|---|--------------------------------|------|------|
|   | N1                             | N2   | N3   |
| T1  | T1N1                           | T1N2 | T1N3 |
| T2  | T2N1                           | T2N2 | T2N3 |
| T3  | T3N1                           | T3N2 | T3N3 |
| T4  | T4N1                           | T4N2 | T4N3 |

## Pelaksanaan Penelitian

### Amobilisasi Sel

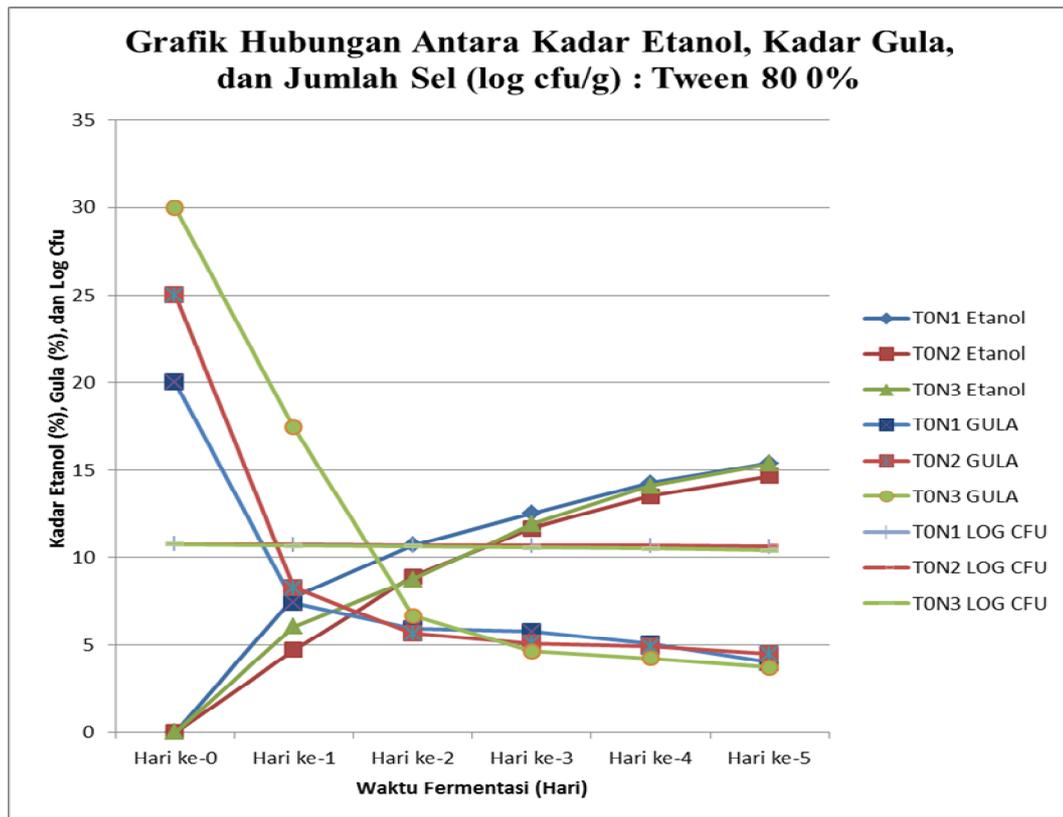
Sebanyak 10 gram Na-Alginat dicampurkan dengan 250 ml aquadest. Campuran ini dipanaskan sambil diaduk hingga mendidih. Setelah mendidih campuran didinginkan hingga suhu 27°C atau pada suhu kamar sehingga starter yang akan dicampur tidak akan rusak. Sejumlah 250 ml starter *S. cerevisiae* dicampurkan dengan 250 ml Na-Alginat 4% kemudian diteteskan dengan jarum suntik ke dalam larutan dingin 1000 ml CaCl<sub>2</sub> 3%. Tetesan Na-Alginat yang sudah mengandung sel akan memadat selama kontak dengan larutan CaCl<sub>2</sub> membentuk butiran-butiran kecil (*beads*) dengan sejumlah sel *S. cerevisiae* yang terperangkap di dalam butiran-butiran Na-Alginat tersebut. *Beads* dibiarkan mengeras selama 30 menit, lalu disaring dan dicuci dengan 0,85% NaCl. Butiran-butiran sel teramobilisasi di dalam Na-Alginat tersebut disimpan dalam wadah. Selanjutnya *beads* diletakkan dalam refrigerator pada suhu 4°C sampai siap untuk digunakan.

### Fermentasi

Media nira nipah masing-masing dengan konsentrasi sesuai perlakuan dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 200 ml. *Tween80*<sup>TM</sup> ditambahkan sesuai perlakuan pada masing-masing konsentrasi nira. Kemudian media tersebut diatur pHnya menjadi 5, karena pH optimum di awal fermentasi bioetanol adalah 5. Substrat disterilisasi di dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu kamar. Kemudian ke dalam substrat atau media dimasukkan sel amobil *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 10 gram. Setelah itu substrat difermentasi pada suhu 27°C dalam *water bath shaker* pada kecepatan 100 rpm. Kemudian larutan dianalisis kadar etanol, kadar CO<sub>2</sub>, perubahan pH, dan kadar gula secara berkala setiap 24 jam. Setelah fermentasi selesai, dilakukan pemisahan sel dengan produk.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

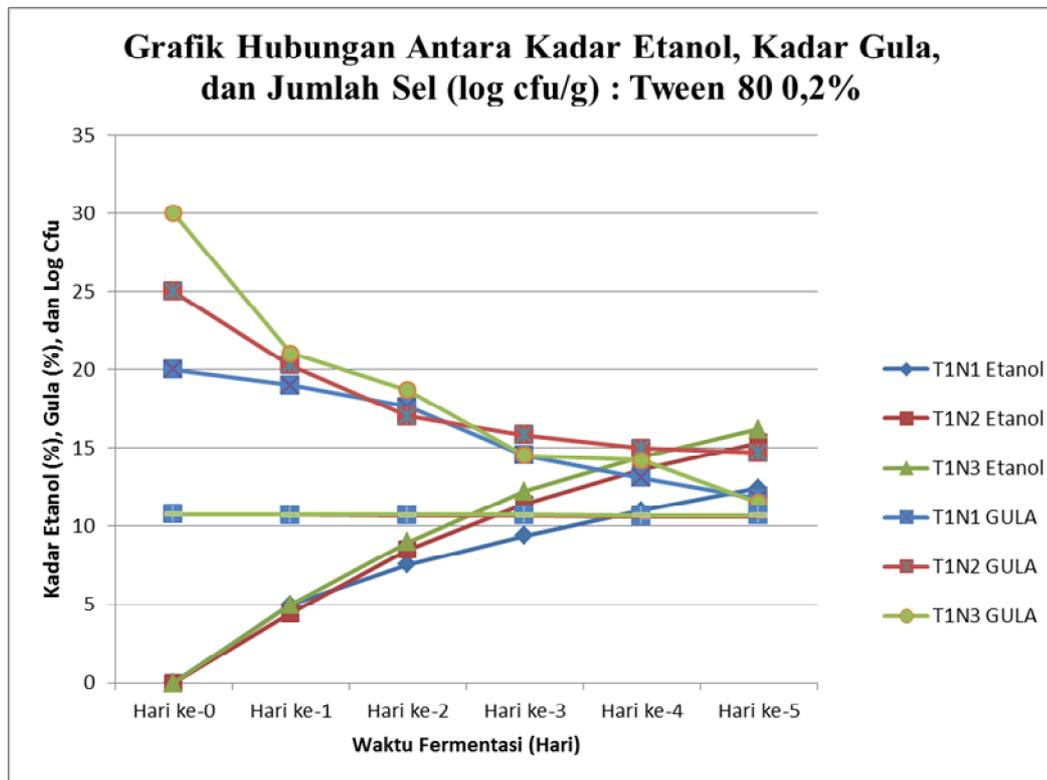
Pembuatan bioetanol pada penelitian ini menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Proses fermentasi bioetanol melibatkan reaksi oksidasi gula sederhana dalam kondisi anaerob dan dibagi menjadi dua fase yaitu proses oksidasi glukosa dan proses metabolisme piruvat (Drapcho *et al.*, 2008).



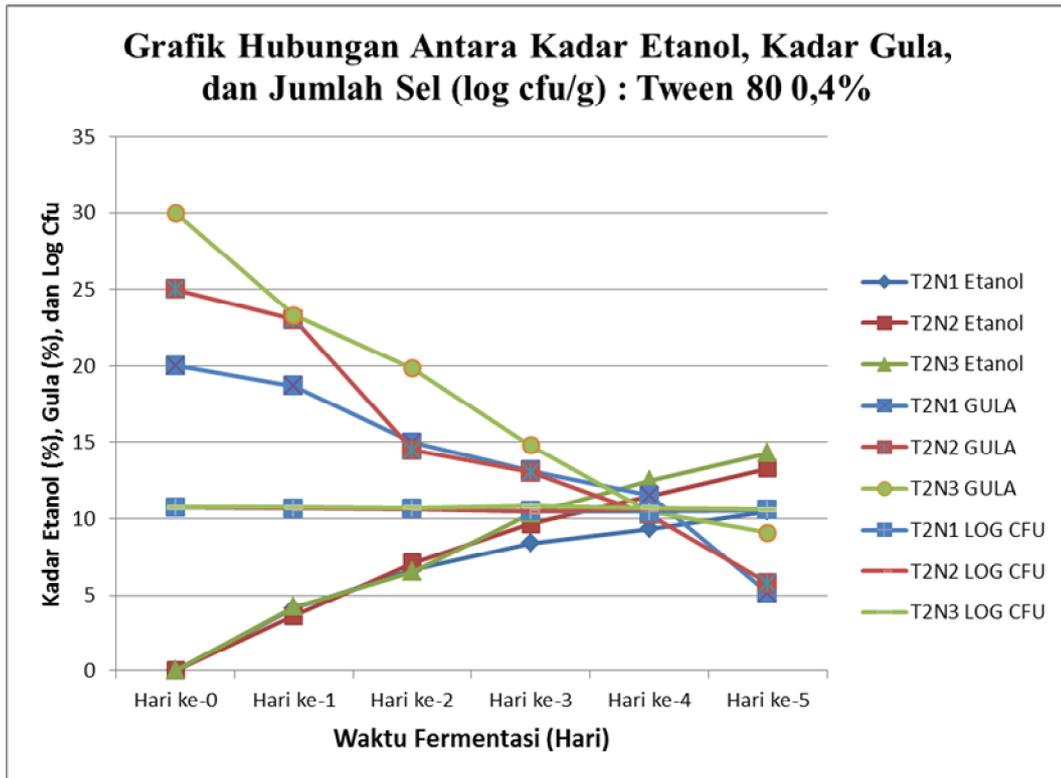
Gambar 1. Grafik hubungan kadar etanol, kadar gula dan jumlah sel pada perlakuan (T0) konsentrasi *Tween 80* 0%

Dapat dilihat bahwa pada Gambar 1, perlakuan tanpa penambahan *Tween 80*<sup>TM</sup> terjadi perubahan drastis jumlah gula pada hari pertama, namun tidak diikuti dengan peningkatan kadar etanol secara drastis. Hal ini disebabkan karena sel tidak langsung memanfaatkan substrat untuk diubah menjadi etanol, melainkan terlebih dulu diserap untuk menyeimbangkan konsentrasi di dalam dan di luar sel. Selanjutnya gula dimanfaatkan sebagai nutrisi untuk diubah menjadi energi selama keadaan masih aerob. Gula menjadi sumber nutrisi utama pada proses fermentasi ini, karena nutrisi tidak didapatkan dari sumber lain. Kadar gula yang tinggi di awal fermentasi menyebabkan sel mengalami *osmotic shock* akibat proses osmosis. Peristiwa tersebut menyebabkan rusaknya sebagian organel sel, oleh karena itu sel memanfaatkan gula sebagai nutrisi untuk memperbaiki dan memelihara organel sel tersebut (Draphco *et al.*, 2008).

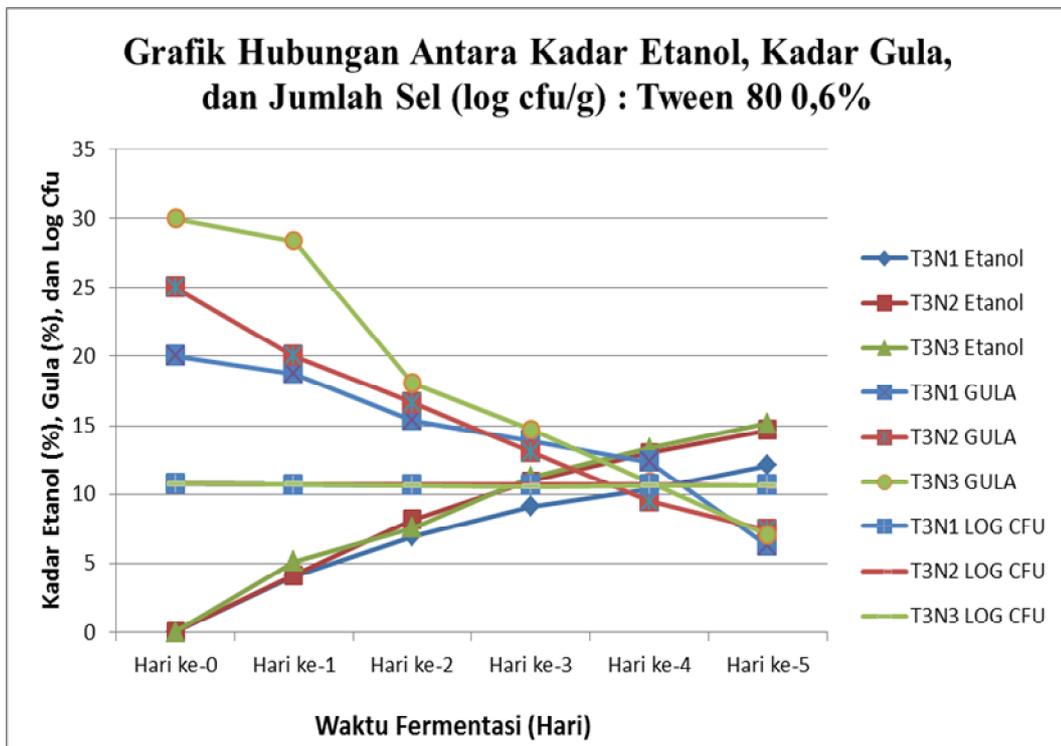
Gambar 2, 3, dan 4 menunjukkan penurunan gula yang tidak terlalu drastis, hal ini sejalan dengan kenaikan etanol yang juga tidak terlalu drastis. Peristiwa tersebut terjadi karena pengaruh adanya *Tween 80*<sup>TM</sup> yang ditambahkan pada media. *Tween 80*<sup>TM</sup> diduga dapat mencegah lisisnya sel akibat pengaruh kadar gula yang tinggi. Kadar gula yang tinggi menyebabkan tekanan osmosis yang sehingga dinding sel pecah. Dinding sel dapat diperbaiki oleh membran sel dengan tambahan nutrisi yang diperlukan (Waites *et al.*, 2001). Penambahan *Tween 80*<sup>TM</sup> pada medium fermentasi diharapkan dapat meningkatkan kemampuan membran sel untuk melakukan biosintesis dinding sel yang rusak akibat osmosis (Tran *et al.*, 2010). Penambahan *Tween 80*<sup>TM</sup> menyebabkan sel tidak memanfaatkan gula pada media sebagai sumber nutrisinya lagi, melainkan sebagai substrat yang akan diubah menjadi etanol. Hal ini dapat dilihat dari grafik 2, 3, 4 bahwa di akhir hari ke-5 masih banyak gula yang belum termanfaatkan. Kemungkinan jika dilanjutkan maka fermentasi akan terus terjadi.



Gambar 2. Grafik hubungan kadar etanol, kadar gula dan jumlah sel pada perlakuan (T1) konsentrasi *Tween 80* 0,2%



Gambar 3. Grafik hubungan kadar etanol, kadar gula dan jumlah sel pada perlakuan (T2) konsentrasi Tween 80 0,4%



Gambar 4. Grafik hubungan kadar etanol, kadar gula dan jumlah sel pada perlakuan (T2) konsentrasi Tween 80 0,6%

Pernyataan di atas juga menjelaskan tidak adanya perubahan yang signifikan pada jumlah sel. Grafik 1, 2, 3, 4 menunjukkan lereng grafik jumlah sel dari ke empat grafik tersebut yang konstan. Sel yang rusak akan segera diperbaiki oleh membran sel itu sendiri, tentunya dengan bantuan nutrisi. Proses amobilisasi sel juga mempengaruhi kestabilan jumlah sel selama fermentasi. Sel yang terperangkap akan terlindung dari efek negatif peristiwa osmosis akibat kadar gula yang tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bangrak *et al.*, (2011); Sebayang (2008); Elevri *et al.*, (2006) yang menyatakan bahwa proses amobilisasi sel dapat melindungi sel dari senyawa penghambat dari proses fermentasi.

Gambar 1, 2, 3, dan 4 menunjukkan kadar etanol yang dihasilkan berbanding lurus dengan perlakuan kadar gula di awal fermentasi. Semakin tinggi kadar gula maka etanol yang dihasilkan akan semakin tinggi pula. Namun perlakuan penambahan *Tween 80<sup>TM</sup>* tidak memberikan pengaruh nyata terhadap etanol yang dihasilkan. Penggunaan *Tween 80<sup>TM</sup>* tidak cukup efektif untuk membantu proses metabolisme nira kental dalam proses fermentasi curah tunggal (*single batch*) yang berlangsung selama lima hari. Peranan *Tween 80<sup>TM</sup>* sebagai turunan asam lemak belum terlihat dalam penelitian ini karena waktu fermentasi yang relatif singkat.

Sebagai perbandingan penelitian Pham *et al.* (2010) *Tween 80<sup>TM</sup>* efektif digunakan bersama ergosterol sebagai sumber asam lemak dalam fermentasi, namun menggunakan sistem *fed batch fermentation* selama 7-12 hari dimana dilakukan penambahan substrat segar secara berkala. Pada penelitian tersebut substrat segar yang ditambahkan secara berkala menyebabkan sel terus bekerja dalam kurun waktu yang lama sehingga sel mengalami kelelahan dan juga rusak akibat etanol yang dihasilkannya sendiri. *Tween 80<sup>TM</sup>* dan ergosterol inilah yang berperan sebagai sumber nutrisi untuk memperbaiki sel-sel yang rusak.

## KESIMPULAN DAN SARAN

*Tween80<sup>TM</sup>* berperan sebagai penurun tegangan permukaan, tanpa *Tween80<sup>TM</sup>* sel akan mengalami *osmotik shock* sehingga gula tidak semuanya dikonversi menjadi etanol. Gula akan dimanfaatkan oleh sel untuk membentuk energi guna membentuk kondisi isotonik agar sel tidak rusak. Penggunaan *Tween80<sup>TM</sup>* sebesar 0,2% dengan konsentrasi gula media fermentasi sebesar 30% menghasilkan kadar etanol tertinggi pada akhir fermentasi hari ke-5 yaitu sebesar 16,20%.

Penambahan *Tween80<sup>TM</sup>* yang diharapkan berfungsi sebagai tambahan nutrisi bagi sel tidak terlalu terlihat peranannya. Pada penelitian ini *Tween80<sup>TM</sup>* lebih berperan sebagai penurun tegangan permukaan. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menambahkan nutrisi seperti Ergosterol sebagai sumber asam lemak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bai, F.W., W.A. Anderson, and M. Moo-Young. 2008. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. *Biotechnology Advances* 26(1): 89–105.
- Bangrak, P., S. Limtong, and M. Phisalaphong. 2011. **Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-**

- reinforced alginate carriers.** Brazilian Journal of Microbiology 42: 676–684.
- Bayrock, D.P. and M.W. Ingledew. 2001. **Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology.** Journal of industrial microbiology biotechnology 27(2): 87–93.
- Chen, L.-J., Y.-L. Xu, F.-W. Bai, W.A. Anderson, and M. Moo-Young. 2005. **Observed quasi-steady kinetics of yeast cell growth and ethanol formation under very high gravity fermentation condition.** Biotechnology and Bioprocess Engineering 10(2): 115–121.
- Draphco, C.M., N.P. Nhuan., and T.H. Walker. 2008. **Biofuels Engineering Process Technology.** The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Elevri, P.A. dan S.R. Putra. 2006. **Produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang diamobilisasi dengan agar batang.** Akta Kimindo 1 (2): 105-114.
- Feng, J., Y. Zeng, C. Ma, X. Cai, Q. Zhang, M. Tong, B. Yu, and P. Xu. 2006. **The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization.** Applied and Environmental Microbiology 72 (11) : 7390-7393.
- Liu, C.-G., Y.-H. Lin, and F.-W. Bai. 2011. **Aging vessel configuration for continuous redox potential controlled very high gravity fermentation.** Journal of Bioscience and Bioengineering 111(1): 61–66.
- Nuanpeng, S., L. Laopaiboon, P. Srinophakun, P. Klanrit, P. Jaisil, and P. Laopaiboon. 2001. **Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation.** Electronic Journal of Biotechnology 14(1): 1–12.
- Pham T.N.L., N.H.D. Doan and V.V.M. Le. 2010. **Using fed-batch fermentation in very high gravity brewing: Effects of Tween80™ and ergosterol supplementation on fermentation performance of immobilized yeast in calcium alginate gel.** International Food Research Journal 17: 995-1002.
- Sebayang, F. 2008. **Pembuatan etanol dari molase secara fermentasi menggunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* yang teramobilisasi pada kalsium alginat.** Jurnal Teknologi Proses 5(2): 75-80.
- Tran, Q. H., T.T. Nguyen, V.V. M., and K. A. Hoang. 2010. **Effect of Tween80™ and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing.** International Food Research Journal 17: 309-318.
- Waites, M.J., N.L. Morgan, J.S. Rockey, and G. Highton. 2001. **Industrial Microbiology : An Introduction.** London: Blackwell Science Ltd.