

FERMENTASI ETANOL SECARA SINAMBUNG
DARI LIMBAH CAIRAN PULP KAKAO
DENGAN SEL KHAMIR IMOBIL¹⁾

CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION FROM
COCOA PULP LIQUID WASTE USING
IMMOBILIZED YEAST CELLS

Darnoko²⁾

Desrizal dan Liesbetini Hartoto³⁾

ABSTRACT

The cocoa bean pulp juice is a waste of cocoa estate which has not been well utilized so far. Amounted at about 10 % of the bean wet weight, this waste could be used as a substrat for ethanol fermentation since its sugar content is relatively high i.e. 10 - 15 %. The objective of this experiment was to study the continuous production of ethanol from the waste using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Immobilization was carried out using entrapment system in calcium alginate beads. Fermentation was run continuously in a packed bed reactor at various dilution rates and an initial sugar content of 15 %⁻¹. The results showed that a dilution rate of 0.028 hour⁻¹, which was equivalent to a residence time of 36 hours, gave the highest ethanol concentration i.e. 6.9 % (w/v) and a sugar-to-ethanol conversion efficiency of 95 %. This result was higher than that of a batch fermentation.

ABSTRAK

Limbah cairan pulp kakao merupakan limbah yang belum banyak dimanfaatkan. Limbah ini jumlahnya sekitar 10 % dari berat basah biji kakao dan mengandung gula sekitar 10 - 15 % sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol. Penelitian ini bertujuan untuk memanfaatkan limbah cairan pulp kakao menjadi etanol melalui fermentasi sinambung menggunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* imobil.

1) Disampaikan pada Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri, PAU Bioteknologi IPB, Bogor, 10 - 11 Desember 1991.

2) Staf Peneliti Pusat Penelitian Perkebunan Bogor

3) Staf Institut Pertanian Bogor

Imobilisasi dilakukan dengan sistem penjeraban dalam manik-manik kalsium alginat. Fermentasi dilakukan secara sinambung dalam reaktor "packed bed" pada berbagai laju dilusi dengan kadar gula awal substrat 15 %. Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju dilusi 0.028 jam^{-1} yang setara dengan waktu tinggal selama 36 jam menghasilkan produk dengan konsentrasi etanol tertinggi yaitu 6.9 % (b/v) serta efisiensi konversi gula menjadi etanol sebesar 95 %. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil fermentasi secara curah.

PENDAHULUAN

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang sedang banyak dikembangkan di Indonesia saat ini. Luas areal tanaman ini mencapai 182 012 ha pada tahun 1989 dengan produksi biji kakao kering sebesar 53 881 ton (Ditjen Perkebunan, 1989). Produksi ini rendah karena sebagian tanaman kakao masih berupa tanaman yang belum menghasilkan.

Buah kakao yang masak mempunyai cangkang yang tebal dan berisi 30 sampai 40 biji kakao yang dikelilingi oleh pulp (Rohan, 1963). Pulp ini kaya akan gula dan merupakan substrat mikroba dalam proses fermentasi biji. Selama proses fermentasi biji kakao di dalam peti-peti fermentasi, sebagian cairan pulp menetes keluar dari peti fermentasi dan menjadi limbah yang dapat mencemari lingkungan. Jumlah limbah ini sekitar 10 % dari berat basah biji, sehingga mempunyai potensi yang cukup besar untuk dimanfaatkan.

Di Indonesia limbah ini belum banyak dimanfaatkan. Dengan kadar gulanya yang sekitar 10 - 15 % (Lopez et al., 1984), limbah ini dapat digunakan sebagai substrat untuk produksi etanol, asam sitrat, protein sel tunggal atau bahan-bahan lain melalui fermentasi dengan mikroba tertentu. Dalam produksi etanol skala industri, biaya substrat

meliputi 62 % dari total biaya produksi, sehingga pemanfaatan limbah cairan pulp kakao untuk pembuatan etanol diharapkan dapat memberikan keuntungan tambahan bagi perkebunan kakao. Di Ghana pemanfaatan limbah ini menjadi etanol telah dilakukan secara komersial menggunakan teknik fermentasi curah (Adamoko, 1984).

Walaupun cukup sederhana, fermentasi etanol secara curah mempunyai beberapa kelemahan diantaranya ialah tidak efisien, karena prosedur untuk memulai dan mengakhiri proses fermentasi memerlukan waktu dan tenaga yang besar, produktivitasnya rendah, terutama karena konsentrasi mikroba dalam fermentor rendah, adanya variasi antara satu proses dengan proses lainnya, diperlukan tahap pemisahan antara produk dan mikroba serta biaya investasinya cukup besar (Cheryan, 1986). Fermentasi sinambung dengan sel imobil merupakan salah satu cara untuk mengatasi kelemahan-kelemahan tersebut.

Sel imobil ialah sel yang terperangkap atau terikat secara kimia maupun fisika dalam suatu matriks polimer yang inert tetapi masih mempunyai aktivitas biokatalis. Dengan imobilisasi ini sel dapat digunakan berulang kali sehingga produktivitasnya lebih tinggi daripada sel bebas. Di samping itu proses fermentasi dapat dilakukan secara sinambung dengan produk yang lebih konsisten, kecepatan reaksi yang lebih tinggi serta kontrol proses yang lebih mudah.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari proses pembuatan etanol secara sinambung dari limbah cairan pulp kakao dengan menggunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* imobil.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Buah kakao segar diperoleh dari Perkebunan Rajamandala PT Perkebunan XII, Bandung.

Pengumpulan cairan pulp kakao

Biji kakao segar dimasukkan ke dalam kotak kayu dengan ukuran panjang 20 cm, lebar 20 cm dan tinggi 90 cm. Cairan yang menetes dari bawah kotak dikumpulkan dan digunakan sebagai substrat dalam penelitian ini. Tinggi kotak ini dibuat sama dengan tinggi peti fermentasi yang biasa digunakan di perkebunan sehingga jumlah cairan yang menetes diharapkan juga sama.

Fermentasi curah

Fermentasi curah (batch) dilakukan dalam reaktor gelas berkapasitas 2 liter dengan volume kerja satu liter. Pengadukan dilakukan secara terus menerus dengan pengaduk magnetik. Kondisi anaerob dijaga dengan menempatkan tabung leher angsa yang berisi larutan asam pada tutup reaktor. Pengambilan sampel dilakukan dengan pompa peristaltik. Sebagai inokulum digunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* R60 yang diperoleh dari Laboratorium Teknologi Fermentasi ITB, Bandung. Susunan medium (g/l) yang digunakan untuk propagasi mikroba adalah sebagai berikut (Mehaia dan Cheryan, 1984) :

Ekstrak khamir	8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.6
KH_2PO_4	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.023
CaCl_2	0.28
Asam sitrat	4.7
Natrium sitrat	1.25

Imobilisasi sel

Proses imobilisasi sel dilakukan menggunakan natrium alginat 2 % (Hartoto dan Sastramihardja, 1987; Kierstan dan Buke, 1977). Larutan natrium alginat yang telah disterilisasi, dicampur dengan biakan sel *Saccharomyces cerevisiae* dengan perbandingan 3 : 1. Campuran tersebut selanjutnya dialirkan dengan pompa peristaltik ke dalam erlenmeyer berisi larutan kalsium klorida 0.2 M sambil diaduk dengan pengaduk magnetik (Gambar 1). Pada ujung selang terdapat jarum dengan diameter kecil sehingga gel yang terbentuk berukuran sekitar 2 mm. Gel yang dihasilkan kemudian dibiarkan dalam larutan kalsium klorida selama dua jam dan selanjutnya larutan kalsium klorida diganti dengan medium.

Fermentasi sinambung

Fermentasi sinambung dilakukan pada suhu ruang menggunakan reaktor "packed bed" terbuat dari gelas dengan diameter 4 cm, tinggi 40 cm dan volume kerja 560 ml. Reaktor diisi dengan gel sebanyak 260 ml sehingga volume rongga reaktor (void volume) yaitu volume yang dapat diisi oleh substrat adalah 300 ml. Substrat berupa cairan pulp kakao yang telah disterilisasi dialirkan dari bagian bawah reaktor dengan pompa peristaltik dengan laju dilusi sebesar 0.028, 0.042, 0.84 dan 0.167 jam⁻¹ atau setara dengan waktu tinggal selama 36, 24, 12 dan 6 jam. Produk ditampung dan secara periodik diambil sampel untuk analisis gula pereduksi dan etanol. Pada sampel ditambahkan sodium azida 33 mM sebanyak 0.1 ml tiap ml contoh untuk inaktivasi mikroba.

Analisis

Kadar air, abu dan total nitrogen dilakukan menurut metode standard (AOAC, 1984). Gula pereduksi ditentukan

dengan metode DNS (Miller, 1959). Biomasa sel diukur dengan metode spektrofotometer (Chay et al., 1984). Etanol ditetapkan dengan gas khromatograf menggunakan kolom Carbowax 20 M.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis komposisi cairan pulp kakao dari perkebunan Rajamandala PT Perkebunan XII Bandung, disajikan pada Tabel 1. Dari tabel tersebut terlihat bahwa kandungan total gula cairan pulp kakao cukup tinggi, yaitu sekitar 15 persen sehingga cukup potensial dijadikan sebagai bahan baku untuk pembuatan etanol. Disamping gula, cairan pulp kakao juga mengandung total nitrogen 0.63 persen yang juga sangat diperlukan dalam proses fermentasi etanol.

Menurut Higinis et al. (1984) konsentrasi gula yang baik untuk fermentasi etanol adalah 16 sampai 25 persen, yang akan menghasilkan etanol sebesar 6 sampai 12 persen (b/v). Pada konsentrasi gula substrat sekitar 16 persen dapat membantu mempercepat pertumbuhan khamir pada awal fermentasi. Apabila konsentrasi etanol yang dihasilkan lebih besar dari 12 persen, etanol dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan mikroorganisme.

Tabel 1. Komposisi kimia cairan pulp kakao dari Perkebunan Rajamandala PT Perkebunan XII.

Komponen	Konsentrasi (% , basis basah)
Air	79.61
Gula pereduksi	15.50
Nitrogen	0.63
Abu	0.50
Bahan-bahan lain	4.26

Pada penelitian ini, konsentrasi gula cairan pulp kakao diatur sekitar 15 persen karena merupakan konsentrasi terendah yang diperoleh.

Selain unsur pokok tersebut, mikroorganisme juga memerlukan mineral dalam jumlah yang relatif sangat kecil (Fiechter, 1982). Dari hasil analisis diperoleh bahwa kadar abu (bahan anorganik) dalam cairan pulp kakao relatif cukup untuk memenuhi kebutuhan mineral mikroorganisme selama berlangsungnya proses fermentasi.

Fermentasi Curah

Fermentasi curah dilakukan untuk mengetahui waktu fermentasi optimum yang selanjutnya digunakan sebagai dasar dalam penentuan kisaran laju dilusi (*dilution rate*) yang akan digunakan pada fermentasi sinambung. Gambar 3 menunjukkan kinetika fermentasi curah cairan pulp kakao menjadi etanol selama 40 jam. Dari gambar tersebut terlihat bahwa laju produksi etanol sejalan dengan laju pembentukan biomasa sel. Hal ini menunjukkan bahwa fermentasi etanol tergolong pada jenis fermentasi tipe I (Aiba et al., 1973). Pada jam ke 30 mulai terlihat terjadinya keseimbangan antara konsumsi gula dan pembentukan produk. Apabila dilihat dari konsentrasi etanol dan efisiensi konversi gula menjadi etanol dapat ditetapkan bahwa waktu fermentasi optimum adalah 36 jam. Tabel 2 menunjukkan beberapa parameter kinetik yang diperoleh dari fermentasi curah dengan waktu fermentasi 36 jam.

Fermentasi sinambung

Pada penelitian ini imobilisasi dilakukan dengan kalsium alginat. Menurut Nagashima et al., (1984) kalsium alginat mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan polimer lain seperti resin epoksi, nilon, poliester gel poliakrilamida, polisterena, gel pektin, atau karaginan.

Tabel 2. Parameter kinetik fermentasi curah cairan pulp kakao menjadi etanol dengan *S. cerevisiae*.

Waktu fermentasi	36	jam
Konsentrasi gula awal	150	g/L
Konsentrasi biomasa awal	2.4	g/L
Konsentrasi gula akhir	9	g/L
Persen penggunaan gula		%
Konsentrasi etanol	65.6	g/L
Konsentrasi biomasa akhir	9.8	g/L
Y p/s	0.47	
Efisiensi konversi gula	92	%
Produktivitas	1.81	g EtOH/L.jam

Keunggulan tersebut terutama karena tingginya aktivitas sel imobil, mudah diperoleh dalam jumlah besar, biaya imobilisasi relatif rendah, mudah di "scale up" serta mempunyai kekuatan mekanis yang tinggi walaupun dioperasikan dalam waktu yang lama. Dengan pertimbangan tersebut proses fermentasi etanol dengan menggunakan sel imobil diperkirakan dapat dikembangkan di Indonesia.

Fermentasi sinambung dilakukan selama empat kali waktu tinggal (24 jam sampai dengan 144 jam, tergantung pada laju dilusinya) sedangkan pengambilan contoh dilakukan pada waktu tinggal kedua.

Gambar 4 menunjukkan konsentrasi etanol dalam produk dari keempat laju dilusi yang dicoba. Pada gambar tersebut dan gambar-gambar berikutnya, waktu tinggal dinyatakan dalam penggantian volume, artinya satu penggantian volume sama dengan satu waktu tinggal. Dari gambar tersebut tampak bahwa laju dilusi terendah, yaitu 0.028/jam atau sama dengan waktu tinggal selama 36 jam, menghasilkan etanol

dengan konsentrasi tertinggi. Selama tiga kali waktu tinggal, konsentrasi etanol dalam produk relatif stabil yang menunjukkan bahwa aktivitas mikroba dalam manik-manik tetap tinggi dan stabil. Kenaikan laju dilusi menyebabkan penurunan konsentrasi etanol (Gambar 6). Hal ini kemungkinan karena semakin singkatnya waktu tinggal dalam reaktor sehingga belum semua substrat terbentuk menjadi etanol seperti ditunjukkan oleh Gambar 5 dan 6. Kedua gambar tersebut memperlihatkan bahwa semakin tinggi laju diusi, semakin banyak gula yang tersisa dalam produk. Untuk laju dilusi terendah masih terdapat gula sisa sekitar 7 gram/L. Pada kondisi tersebut diperkirakan terjadi kesetimbangan, sehingga tidak ada lagi gula yang dikonversi menjadi etanol. Hal ini terlihat pada data fermentasi curah (Gambar 3) yang menunjukkan bahwa setelah waktu fermentasi 36 jam, tidak terdapat lagi kenaikan kadar etanol.

Dalam fermentasi etanol secara sinambung menggunakan sel imobil penggunaan laju dilusi yang tinggi dapat dilakukan apabila konsentrasi biomasa sel dalam manik-manik kalsium alginat cukup tinggi. Pada penelitian ini konsentrasi sel dalam gel relatif rendah yaitu 9.7 gram/L. Nagashima (1982) melaporkan bahwa konsentrasi sel dalam gel dapat ditingkatkan sampai dengan 250 g/L. Dalam keadaan demikian laju dilusi yang tinggi dapat diterapkan sehingga produktivitas reaktor dapat ditingkatkan pula.

Gambar 7 menunjukkan tingkat konversi gula pereduksi yang dikonsumsi menjadi etanol yang dihitung dalam persen. Secara teoritis tingkat konversi gula menjadi etanol mencapai 100 % apabila dari satu gram gula yang dikonsumsi oleh mikroba, diperoleh etanol sebanyak 0.51 gram. Dari Gambar 7 terlihat bahwa untuk laju dilusi 0.028 efisiensi konversi gula menjadi etanol rata-rata mencapai 95 %. Tingkat konversi ini lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi curah yang sebesar 92 %. Gula pereduksi yang

tidak terkonversi menjadi etanol digunakan oleh mikroba untuk pemeliharaan sel. Pada kondisi anaerob, laju sintesa sel baru sangat rendah.

Dari data-data diatas dapat ditetapkan bahwa laju dilusi optimum untuk fermentasi etanol menggunakan sel imobil pada kondisi percobaan adalah 0,028 /jam. Pada kondisi ini produktivitas reaktor yang dihitung sebagai gram produk pervolume kerja reaktor persatuan waktu adalah 1.92 g etanol/L.jam. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan produktivitas reaktor curah. Produktivitas ini masih dapat ditingkatkan dengan meningkatkan jumlah biomasa dalam gel alginat yang dapat dicapai dengan memberikan aerasi yang cukup pada awal fermentasi.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa limbah cairan pulp kakao dapat dimanfaatkan menjadi etanol melalui fermentasi baik secara curah maupun sinambung. Fermentasi curah menghasilkan etanol dengan konsentrasi 65.6 g/l dan produktivitas sebesar 1,81 g/l/jam. Fermentasi sinambung menggunakan sel imobil dalam reaktor packed bed menghasilkan etanol dengan konsentrasi lebih tinggi yaitu 69.70 g/l serta produktivitas yang juga lebih tinggi yaitu sebesar 1.92 g/l/jam pada laju dilusi optimum yaitu 0.028/jam

UCAPAN TERIMA KASIH

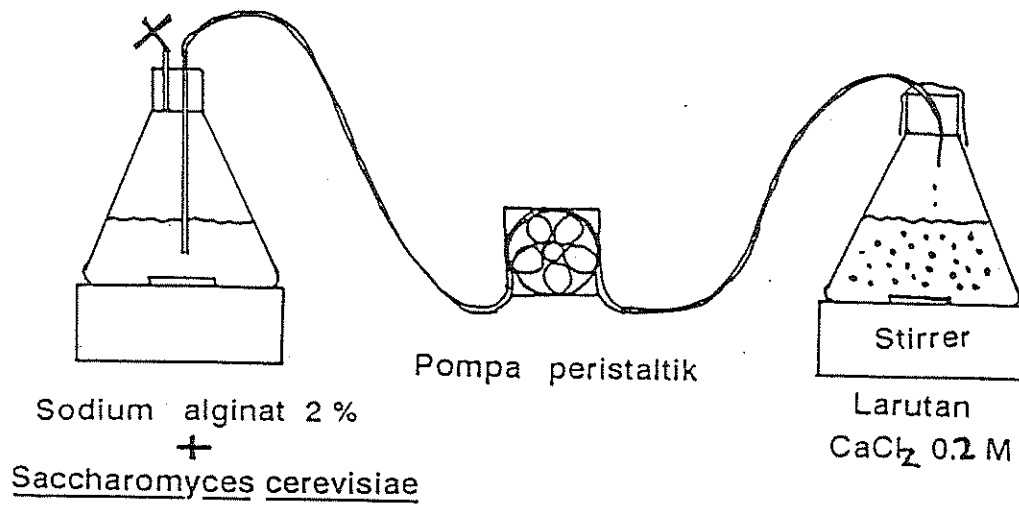
Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direksi PT Perkebunan XII dan Administratur Perkebunan Rajamandala atas bantuan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

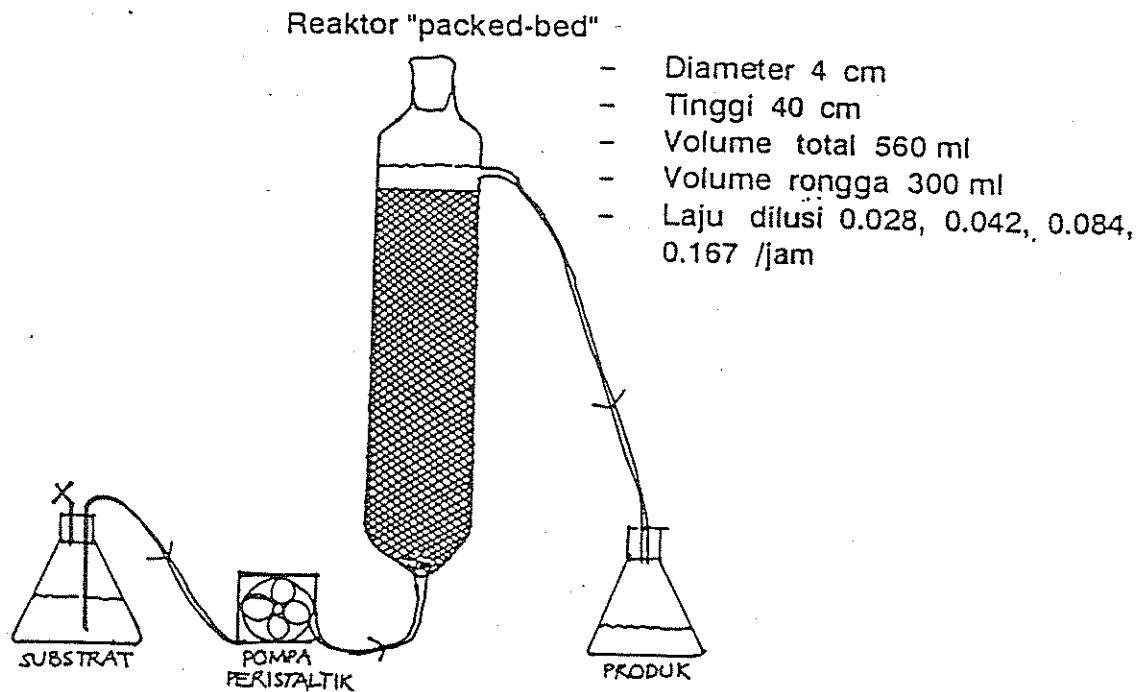
- Adamoko, D. 1984. Some conversion technologies for the utilization of cocoa wastes. Proc. 9th International Cocoa Res. Conf. Cocoa Producer Alliance.
- Aiba, S., Humphrey, A.E., dan Millis, N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2nd Ed. Academic Press, New York, 432 p.
- A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 13rd Ed. Arlington, Virginia, A.O.A.C., 1141 p.
- Chay, P.P, Chouvel, H., Cheffel, J.C., Ghommidh, C dan Navarro, J.M. 1984. Extrusion hydrolyzed starch and flours as fermentation substrate for ethanol production. Leb.Wiss. Technol. (17) : 257 - 267.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 1989. Statistik Perkebunan Indonesia Tahun 1984 - 1989. Departemen Pertanian RI, Jakarta.
- Fiechter, A. (ed). 1982. Advances in Biochemical Engineering. Springer - Verlag, Berlin.
- Higgins, I.C., Best, D.J., dan Jones, J. 1984. Biotechnology Principle and Application. Balckwell Scientific Publ., London.
- Hartoto, L., dan Sastramihardja, I. 1987. Pembuatan Etanol dengan "Immobilized Cell" *S. cerevisiae* dan Bahan Baku Molase di dalam Reaktor Unggun Terfluidakan. Makalah pada Seminar Nasional Teknologi Fermentasi. PAU Bioteknologi ITB, Bandung, Oktober 1987.
- Kierstan, M dan Bucke, C. 1977. Immobilization of microbial, subcelluler organelles, and enzymes in calcium alginate gels. Biotechnol. and Bioeng, 25 : 387 - 397.
- Lopez, A., Ferreira, H.I.S., Llamoses, A dan Romev. A.P. 1984. Present status of cocoa by-product utilization in Brazil. Proc. International Res. Conf. Cocoa Producer Alliance, p. 425 - 432.
- Mehaia, M. A., dan Cheryan, M. (1984). Ethanol production in hollow fiber bioreactor. Appl. Microb. Biotechnol. (20) : 100 104.

Nagashima, M., Azuma, M., Noguchi, S., Inuzuka, K. 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cell. Biotechnol. and Bioeng. (26) : 992 - 997.

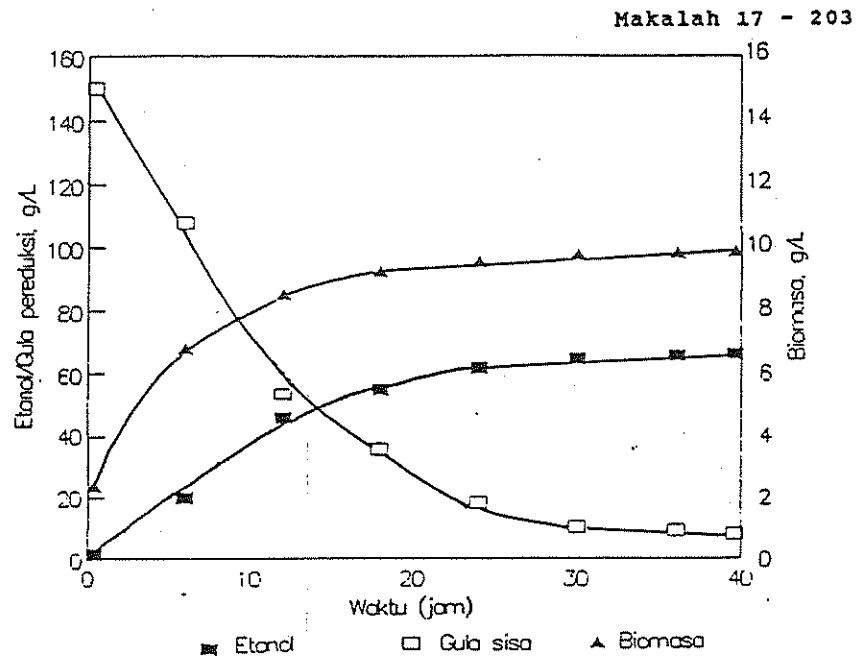
Rohan, T.A. 1963. Processing of Raw Cocoa for The Market. Food and Agricultural Organization of The United Nation, Rome.



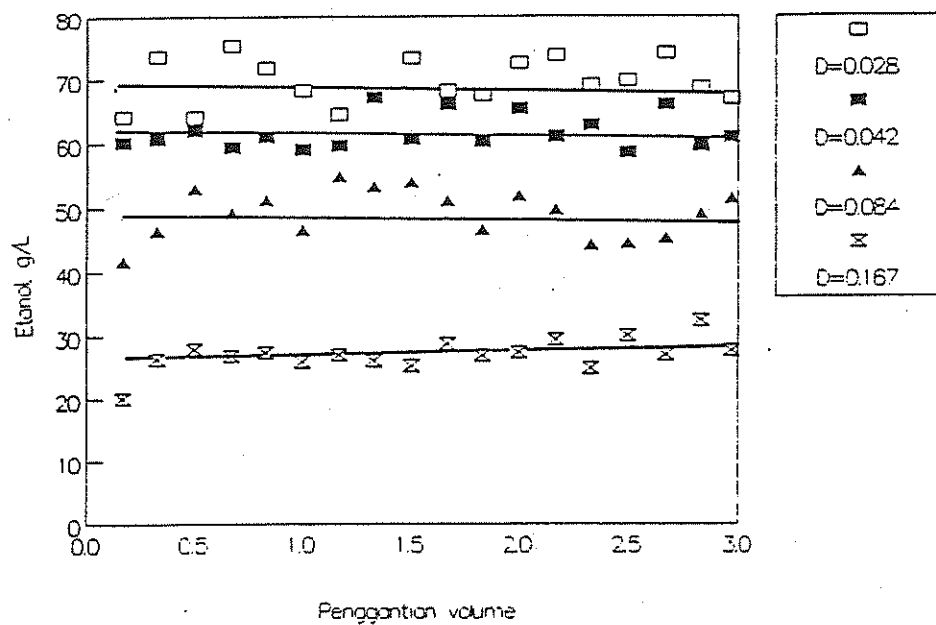
Gambar 1. Proses imobilisasi sel.



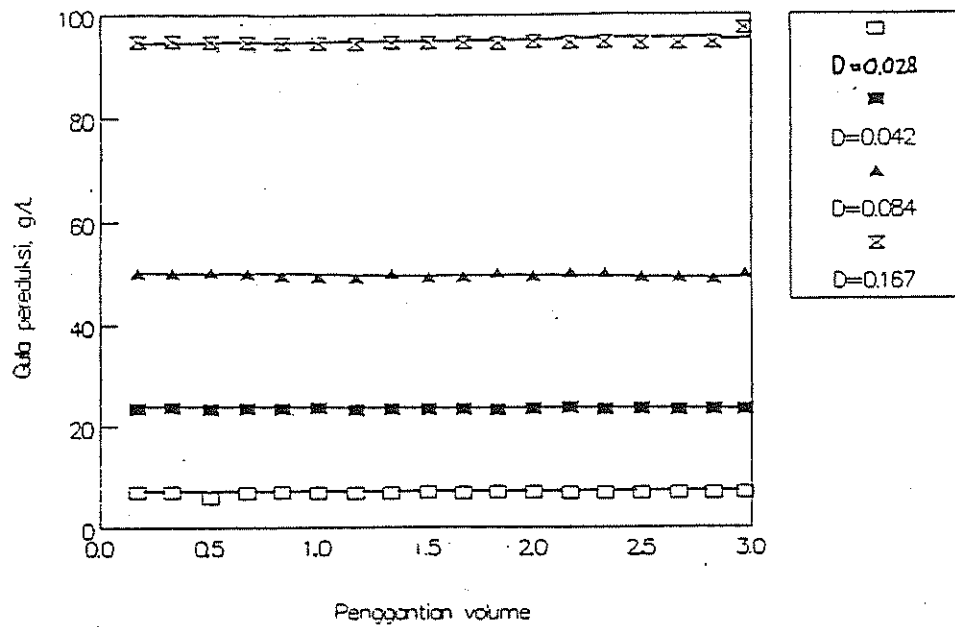
Gambar 2. Fermentasi sinambung.



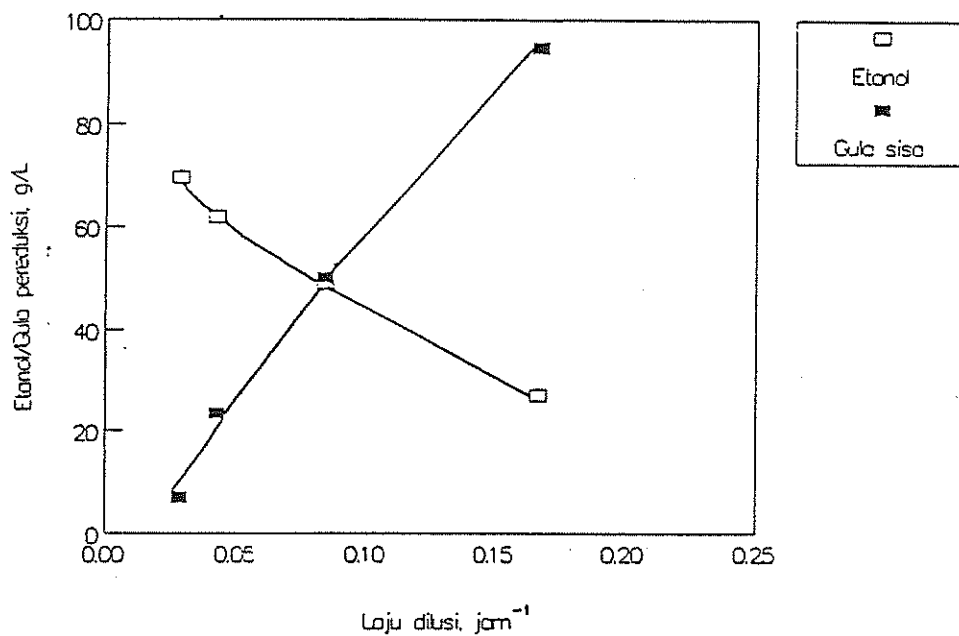
Gambar 3. Kinetika fermentasi curah.



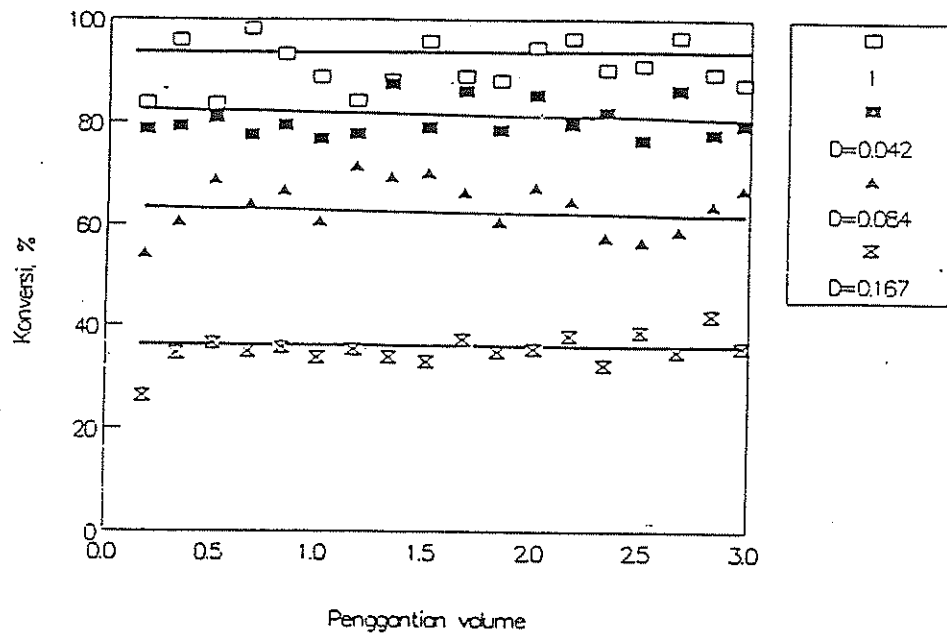
Gambar 4. Konsentrasi etanol produk pada berbagai laju dilusi.



Gambar 5. Gula pereduksi sisa pada berbagai laju dilusi.



Gambar 6. Pengaruh laju dilusi pada konsentrasi etanol dan gula pereduksi.



Gambar 7. Tingkat konversi gula menjadi etanol pada berbagai laju dilusi.

