

PENGARUH DIAMMONIUM HIDROGEN FOSFAT (NH₄)₂H₂PO₄ PADA EKSPLORASI KHAMIR INDEGENOUS NIRA AREN, KELAPA, NIPAH, DAN SIWALAN TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL

Effects of Diammonium Hydrogen Phosphate (NH₄)₂H₂PO₄ in Exploration Indegenous yeast of Aren, Coconut, Nipah, and Siwalan Nira for Bioetanol Production

Trianik Widyaningrum^{1)*}, Listiatie Budi Utami²

¹⁾Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Ahmad Dahlan

²⁾Program Studi Biologi Universitas Ahmad

DOI: <http://dx.doi.org/10.21111/agrotech.v4i2.1938>

Terima 19 Juli 2017

Revisi 17 Maret 2018

Terbit 12 Desember 2018

Abstrak: Sumber energi utama pada umumnya berasal dari energi fosil yang semakin lama semakin langka ketersediaannya. Berdasarkan fakta tersebut perlu dikembangkan berbagai energi alternatif yang dapat diperbaharui, ramah lingkungan, dan berkelanjutan salah satunya adalah bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan (NH₄)₂H₂PO₄ pada eksplorasi khamir indogenous nira aren, kelapa, nipah, dan siwalan yang potensial untuk produksi etanol. Penelitian ini diawali dengan sampling nira aren dan kelapa serta nira nipah dan nira siwalan. Langkah berikutnya adalah skrining khamir penghasil etanol dengan penambahan (NH₄)₂H₂PO₄ pada Nira meliputi pH, kadar gula reduksi dengan menggunakan metode DNS, waktu fermentasi (0, 2, 4, 6) hari, dan jumlah sel. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kondisi awal nira, yaitu pH nira aren 4,9 kelapa 3,7, nipah 4,3, dan siwalan 4,7, kemudian gula reduksi nira aren 13,41 mg/ml, kelapa 17,09 mg/ml, nipah 33,38 mg/ml, dan siwalan 43,35 mg/ml, kadar etanol nira aren 1,53%, kelapa 4,4 %, nipah 0,3%, dan siwalan 0,23%. Berdasar data tersebut terlihat kadar etanol tertinggi pada nira kelapa, sehingga skrining berikutnya dengan menggunakan nira kelapa dengan penambahan (NH₄)₂H₂PO₄. Berdasar isolasi khamir dari keempat Nira diperoleh 48 isolat s. Berdasar skrining yang dilakukan dengan penambahan (NH₄)₂H₂PO₄

* Korespondensi email: trianik.widyaningrum@pbio.uad.ac.id

Alamat : Universitas Ahmad Dahlan Kampus 4, Jl.Ringroad Selatan, Kragilan, Tamanan, Banguntapan Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, 55191

dan memperhatikan pH nira, waktu fermentasi, gula reduksi, dan jumlah sel diperoleh isolat yang unggul untuk produksi etanol sejumlah 18 isolat dengan waktu fermentasi 4 dan 6 hari.

Kata Kunci : Eksplorasi, Nira, isolat bioetanol.

Abstract: The main source of energy comes from fossil fuels that are becoming increasingly rare. Based on that fact are needed to develop a variety of alternative energy that can be updated, environmental friendly, and sustainable one of them is bioethanol. This study aims to determine the effect of addition $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ on the exploration of indigenous yeast palm, coconut, nipah, and siwalan potential for ethanol production. This research starting with sampling palm juice and coconut as well as palm and siwalan nira. The next step is the screening of ethanol-producing yeast with the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ to Nira including pH, reducing sugar content by DNS method, fermentation duration (0, 2,4,6) days, and cell count. The results showed the initial condition of palm juice, namely pH palm sugar palm 4.9, 3.7, palm 4.3, and siwalan 4.7, then sugar palm sugar reduction 13.41 mg/ml, coconut 17.09 mg/ml, nipah 33.38 mg/ml, and siwalan 43.35 mg/ml, ethanol level of palm sugar palm 1.53%, coconut 4.4%, nipah 0.3%, and siwalan 0.23%. The highest ethanol content in coconut palm, so the next screening using coconut juice with the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$. The isolation of yeasts from the four NIRA were obtained 48 isolates. The screening performed by addition $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ and taking into account the pH of nira, fermentation time, reducing sugar, and cell number were obtained superior isolates for ethanol production of 18 isolates with fermentation on 4 and 6 days.

Keywords: Exploration, nira, isolates bioethanol

1. Pendahuluan

Bahan bakar fosil, terutama minyak bumi, batu bara, dan gas alam, merupakan sumber energi utama bagi sebagian besar industri dan masih merupakan bahan baku yang paling penting untuk menghasilkan energi di dunia. Saat ini, nilai pasar energi dunia sekitar 1,5 triliun dolar didominasi oleh bahan bakar fosil (Goldemberg, 2006). Namun, sumber-sumber ini tidak lagi dianggap berkelanjutan, dan ketersediaannya jauh lebih sedikit.

Shafiee dan Topal (2009) meramalkan bahwa minyak, batubara, dan gas hanya akan tersisa secara berurutan sekitar 35, 107, dan 37 tahun. Selain itu bahan bakar tersebut menimbulkan dampak lingkungan seperti pemanasan global akibat emisi gas rumah kaca (Naik dkk., 2010). Oleh karena itu, diperlukan sumber energi terbarukan, berkelanjutan, dan ramah lingkungan antara lain bioetanol.

Penelitian produksi bioetanol melalui fermentasi telah banyak dipublikasi di luar negeri dengan menggunakan berbagai strain mikroorganisme, seperti bakteri, khamir, dan jamur dengan sumber karbon yang berbeda (Dien dkk., 2003; Desai dkk., 2004; Demain dkk., 2005; Chinn dkk., 2006; Stephanopoulos 2007; Riyanti dan Rogers, 2009). Bioetanol umumnya diproduksi dengan bantuan mikroorganisme jenis khamir dengan sumber karbon gula sederhana dari tetes tebu (molase), jagung atau tebu (Riyanti, 2011).

Penelitian tentang produksi etanol dengan berbagai macam bahan baku (molase, nira kelapa, nira nipah, mikro dan makroalgae, *Sargassum*) sudah dilakukan (Sebayang, 2006; Wardani dan Pertiwi, 2013; Wijaya dan Arthawan, 2012); Chairul dan Yenti, 2013; Hadi dkk., 2013). Selain tetes tebu (molase), bahan baku lain yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber etanol adalah Nira. Nira merupakan cairan manis mengandung gula pada konsentrasi 7,5 sampai 20,0 % yang terdapat di dalam bunga

tanaman aren, kelapa, dan lontar yang pucuknya belum membuka dan diperoleh dengan cara penyadapan (Dyanti, 2002). Nira aren mengandung air 87,66 %, gula 12,04 %, protein 0,36 %, serta lemak dan abu masing-masing 0,36 % dan 0,21 % (Hasbullah, 2001).

Berdasarkan penelitian-penelitian yang sudah dilakukan berkaitan dengan nira, molase, dan algae sebagai bahan pembuatan etanol dengan memanfaatkan *Saccharomyces cerevisiae*. Tujuan dari penelitian ini adalah mengeksplorasi khamir indogenous dari nira aren, kelapa, nipah, dan siwalan dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ yang potensial dalam memproduksi bioetanol.

2. Bahan dan Metode

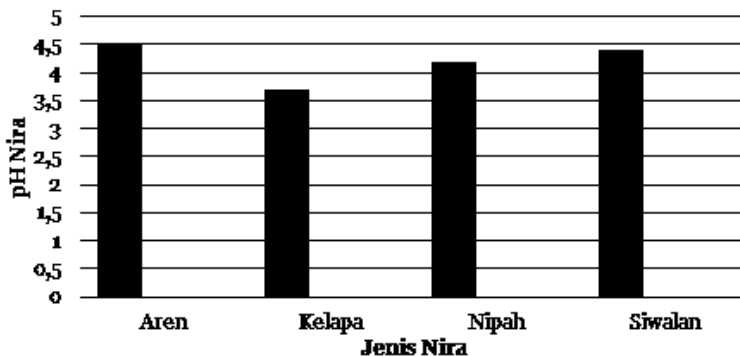
Penelitian ini diawali dengan sampling nira aren dan kelapa yang diperoleh dari Desa Pagerharjo Samigaluh Kabupaten Kulon Progo yang dilakukan pada 20 Desember 2016 serta nira nipah dari Desa Ujung Manik Kecamatan Kawungan Cilacap yang dilakukan pada 25 Desember 2016, dan nira siwalan yang diperoleh dari Desa Landoh, Rembang yang dilakukan pada 27 Desember 2017. Selanjutnya dilakukan isolasi khamir dari keempat sumber nira tersebut berdasarkan Heard dan Armada, (1986) dalam Blanco dkk., (2012). Langkah berikutnya adalah skrining khamir penghasil etanol dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ pada Nira meliputi pH, kadar gula reduksi dengan menggunakan metode

Pengaruh Diammonium Hidrogen Fosfat $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ pada Eksplorasi Khamir Indegenous Nira Aren, Kelapa, Nipah, dan Siwalan Terhadap Produksi Bioetanol

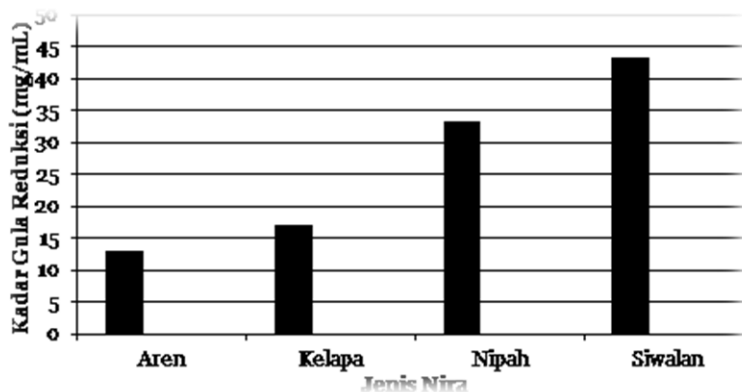
DNS, waktu fermentasi (0, 2,4,6) hari, dan jumlah sel spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Rancangan percobaan menggunakan Rancangan acak kelompok. Data dianalisis dengan Anava dan DMRT.

3. Hasil dan Pembahasan

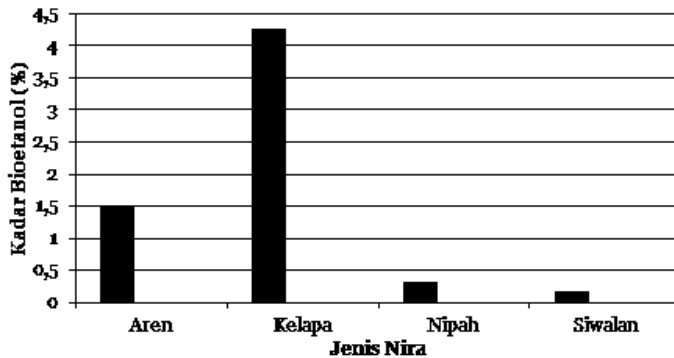
Berdasar sampling nira aren, kelapa, nipah, dan siwalan dihasilkan kondisi awal Nira tersebut seperti pada Gambar 1,2, dan 3 berikut



Gambar 1. Derajat Keasaman Nira



Gambar 2. Kadar gula reduksi nira



Gambar 3. Kadar Bioetanol nira

Berdasar hasil pengujian awal nira terlihat kadar bioetanol tertinggi pada nira kelapa, kemudian langkah selanjutnya dilakukan skrining untuk mendapatkan isolat yang produktif dalam produksi bioetanol dengan menggunakan nira kelapa dan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ dengan tujuan untuk menambah kandungan N sebagai sumber hara bagi pertumbuhan khamir. Berdasar skrining tersebut diperoleh data seperti pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Hubungan jenis isolat dan waktu fermentasi terhadap rata-rata kadar gula reduksi, pH kadar bioetanol, dan jumlah sel.

No	Nama Isolat	Waktu Fermentasi (hari)	Kadar gula (mg/mL)	Ph	Kadar Etanol (%)	Jumlah Sel
1	N3D	0	64,36	4,84	1,18	2559,98
		2	45,02	4,72	2,44	3108,03
		4	44,81	4,38	10,44	4613,19
		6	44,39	4,41	11,97	4926,93
2	N3E	0	57,36	4,78	1,4	23821,40
		2	57,74	4,38	6,5	29837,13
		4	55,78	4,33	10,44	36196,04
		6	41,81	4,34	12	37447,63
3	N1A	0	63,81	4,65	1,1	37565,52
		2	59,32	4,38	7	54587,72
		4	59,33	4,33	10,08	60610,96
		6	55,78	4,37	11,52	66470,52
4	N3B	0	62,47	4,64	1,2	8318,27
		2	53,94	4,25	2,4	10448,91
		4	45,94	4,31	4,72	11663,71
		6	46,60	4,27	12,16	11720,65
5	A3B	0	62,30	4,76	1,12	30158,42
		2	57,82	4,31	6,4	37602,56
		4	45,89	4,39	10,8	45069,26
		6	43,23	4,37	11,78	45069,26
6	A11E	0	62,08	4,74	1,12	3603,69
		2	56,49	4,42	7	4148,90
		4	50,69	4,33	10,08	4620,97
		6	44,60	4,34	11,78	5150,67
7	A3A	0	62,08	4,54	1,12	3050,55
		2	62,07	4,16	8,12	3975,01
		4	53,98	4,27	10,62	4350,46
		6	51,98	4,26	10,62	4401,82
8	A22A	0	55,24	4,56	1,22	2635,83
		2	51,27	4,39	6	3194,76
		4	47,15	4,2	9,88	3774,54
		6	49,11	4,29	12	4030,32
9	A11B	0	53,52	4,76	1,12	15530,49
		2	52,40	4,44	6,9	26589,43
		4	43,35	4,39	10,08	38540,22
		6	58,03	4,39	10,97	41215,77
10	K3D	0	62,30	4,39	2,75	102334,74
		2	61,87	4,11	7,08	149841,54
		4	45,56	4,21	8,12	167339,88
		6	43,77	4,2	10,98	177791,38
11	K21A	0	52,57	4,7	1,12	18222,71
		2	51,90	4,35	7,08	22553,42
		4	43,31	4,54	10	28491,86
		6	39,85	4,36	12,9	28593,25
12	K1C1	0	62,13	4,77	1,12	34767,74
		2	56,82	4,6	4,8	38904,91
		4	49,86	4,34	10,29	52526,61
		6	49,19	4,45	11,34	55425,44
13	K2C	0	62,14	4,74	1,18	6535,91
		2	56,15	4,42	2,32	8088,77
		4	47,06	4,42	12,07	9946,01
		6	47,40	4,49	13,02	10018,23
14	K1A	0	54,58	4,8	1,24	4470,41
		2	49,77	4,56	4,96	5571,38
		4	43,93	4,43	11,8	7833,72
		6	35,59	4,49	12,81	8800,42
15	S3D	0	53,85	4,78	1,2	253737,50
		2	50,40	4,54	6,96	290217,52
		4	43,18	4,46	10,62	359014,09
		6	44,56	4,46	10,62	378047,15
16	S1A	0	55,35	4,83	1,16	7668,37
		2	49,86	4,59	2,85	8382,48
		4	46,31	4,39	11,8	10278,58
		6	43,85	4,46	13	10545,34
17	S2D	0	61,22	4,48	1,12	7183,46
		2	56,57	4,24	2,36	9563,84
		4	48,27	4,29	8,4	10214,24
		6	48,65	4,34	9,27	11090,29
18	S1C	0	52,63	4,79	1,2	37759,40
		2	47,69	4,7	2,24	44607,51
		4	43,52	4,45	10,26	59345,84
		6	44,60	4,45	10,98	62695,46

Keterangan: A: isolat dari nira Aren, K: isolat dari nira kelapa, N: isolat dari nira Nipah, S: isolat dari nira siwalan, 1, 2 A, B, C, D: kode isolat.

Setelah dilakukan uji statistik menunjukkan bahwa berdasar perlakuan lama fermentasi yang menghasilkan kadar bioetanol tertinggi adalah waktu fermentasi 6 hari, sedangkan berdasar kadar bioetanol hasil fermentasi pada hari ke 6 menunjukkan ke 18 isolat menghasilkan kadar bioetanol berkisar 9,27 - 13,02 %, dan berdasarkan uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara jenis isolat terhadap kadar bioetanol, meskipun berdasarkan pengukuran kadar bioetanol menunjukkan isolat K2C menghasilkan kadar bioetanol tertinggi yaitu 13,02 (isolat dari nira kelapa).

Berdasar Tabel 2 terlihat pada hari ke 6 kadar bioetanol didapatkan semakin meningkat. Hal tersebut disebabkan karena pada hari ke 6 merupakan fase eksponensial yaitu mikrobial akan tumbuh dengan laju pertumbuhan yang sangat tinggi sehingga peningkatan jumlah sel terjadi secara eksponensial atau logaritmik (Yuwono, 2005). Berdasarkan Tabel 2 tersebut terlihat bahwa kadar bioetanol tertinggi terdapat pada Isolat K2C yaitu sebesar 13,02 %, fase ini masih pada fase eksponensial dikarenakan kadar bioetanol masih mengalami kenaikan, hal ini sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh Desrosier (2008) bahwa untuk menghasilkan kadar bioetanol yang optimal melalui fermentasi, waktu yang dibutuhkan adalah 3-6 hari.

Berdasar Tabel 2 setelah dilakukan proses fermentasi kondisi pH mulai menurun. Pada fermentasi hari ke 6 menunjukkan pH mengalami penurunan, meskipun tidak signifikan hal ini sesuai dengan pendapat Azizah (2012), bahwa pertumbuhan mikroba optimal pada kondisi pH kisaran antara 3,5-6,5 sedangkan pada kondisi basa tidak akan tumbuh. Lingkungan yang terlalu asam atau basa membuat mikroorganisme sulit untuk beradaptasi. Selama fermentasi perubahan pH dapat disebabkan oleh hasil fermentasi yang merupakan asam atau basa yang dihasilkan selama pertumbuhan mikroorganisme dan komponen organik dalam medium (Keenan dkk, (1990) dalam (Rahmawati, 2010)). Kecenderungan media fermentasi semakin asam disebabkan amonia yang digunakan sel khamir sebagai sumber nitrogen diubah menjadi NH_4^+ . Molekul NH_4^+ akan menggabungkan diri ke dalam sel sebagai R-NH_3 . Dalam proses ini H^+ ditinggalkan dalam media, sehingga semakin lama waktu fermentasi semakin rendah pH media (Judoamidjojo dkk, (1989) dalam (Rahmawati, 2010)).

Waktu fermentasi yang semakin lama menunjukkan kadar gula reduksi yang menurun tetapi kadar bioetanolnya semakin meningkat (Tabel 2), hal tersebut disebabkan karena gula tersebut diubah menjadi bioetanol oleh khamir. Berdasar jumlah sel terlihat semakin lama waktu fermentasi jumlah sel semakin meningkat, hal tersebut menunjukkan bahwa sel khamir dapat tumbuh dengan

baik pada kondisi pH berkisar 4 (asam) dan dengan penambahan $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ terlihat khamir dapat mengalami pertumbuhan dengan baik akibat tersedianya unsur N dalam media nira kelapa

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan terlihat bahwa nira aren, kelapa, nipah dan siwalan terdapat khamir indegenous yang dapat memproduksi bioetanol. Isolat yang unggul untuk produksi etanol sejumlah 10 isolat, yaitu A11E, A3A (dari Aren), K1C1, K2C, K1A (dari Kelapa), N3D, N3E, N1A (dari Nipah), dan S1A, S2D (dari Siwalan). dengan waktu fermentasi 4 dan 6 hari.

Saran yang dapat disampaikan berdasar hasil penelitian yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis khamir indegenous dari nira aren, kelapa, nipah, dan siwalan yang selanjutnya dapat diketahui hubungan kekerabatan dari isolat-isolat tersebut untuk selanjutnya digunakan dalam produksi bioetanol.

5. Referensi

Azizah.N, Dkk. 2012. "Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, Ph, Dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substansi Kulit Nanas". Semarang: UNDIP. *Jurnal Penelitian Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol. 1, No. 2, 2012: 72-73

- Blanco, J.M. M. Avalos and I. Orriols. 2012. Effect of must characteristics on the diversity of *Saccharomyces* strains and their prevalence in spontaneous Fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 112 (1): 936–944
- Chairul dan S.R. Yenti.2013. Pembuatan Bioetanol dari Nira Nipah Menggunakan *Sacharomyces cereviceae*.*Jurnal Teknobiologi*, IV(2): 105 – 108.
- Chinn, M.S., E.E. Nokes, and H.J. Strobel. 2006. Screening of thermophilic anaerobic bacteria for solid substrate cultivation on lignocellulosic substrates. *Biotechnol.Prog.* 22 (1): 53–59.
- Dien, B.S., M.A. Cotta, and T.W. Jeffries. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* 63 (1): 258–266.
- Demain, A.L., M. Newcomb, and J.H.D. Wu. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69(1): 124–154.
- Desai, S.G., M.L. Guerinot, and L.R. Lynd. 2004. Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Desrosier, Norman W, 2008. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Jakarta: Universitas

Indonesia Press.

- Dyanti, 2002. Studi Komparatif Gula Merah Kelapa dan Gula Merah Aren. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, *Institut Pertanian Bogor, Bogor*. 2 (1): 26-40
- Goldemberg, J. 2006. The promise of clean energy. *Energy Policy*. 34 (1): 2185–2190.
- Hadi, Thamrin., Moersidik, S.S., Bahry, S. 2013. Karakteristik dan Potensi Bioetanol dari Nira Nipah (*Nypa fruticans*) untuk Penerapan Skala Teknologi Tepat Guna. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 2 (1): 291-293.
- Hasbullah. 2001. *Teknologi Tepat Guna Agroindustri Kecil Sumatera Barat*. Padang. Dewan Ilmu Pengetahuan, Teknologi dan Industri Sumatera Barat.
- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K. & Dalai, A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14 (1): 578–597.
- Rahmawati, A. 2010. “Pemanfaatan Limbah Kulit Ubi Kayu (*Manihot utilissima* Pohl.) dan Kulit Nanas (*Ananas comosus* L.) Pada Produksi Bioetanol Menggunakan *Aspergillus niger*”. *Skripsi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. UNS*

Pengaruh Diammonium Hidrogen Fosfat $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ pada Eksplorasi Khamir Indegenous Nira Aren, Kelapa, Nipah, dan Siwalan Terhadap Produksi Bioetanol

- Riyanti, E.I. 2011. Beberapa Gen Pada Bakteri yang Bertanggung Jawab Terhadap Produksi Bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*, 30(2): 23-25.
- Riyanti, E.I. and P.L. Rogers. 2009. Kinetic evaluation of bioethanol-tolerant thermophile *Geobacillus thermoglucosidasius* M10EXG for ethanol production. *Indones. J. Agric. Sci.* 10(1): 34–41.
- Saputra, Ali Ridlo, I. Widowati. 2012. Kajian Rumput Laut *Sargassum duplicatum* J. G. Agardh sebagai Penghasil Bioetanol dengan Proses Hidrolisis Asam dan Fermentasi. *Journal Of Marine Research*. 1 (2): 145-151
- Sebayang. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase secara Fermentasi menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses* 5 (2):75-80.
- Shafiee, S. and Topal, E. 2009. When will fossil fuel reserves be diminished *Energy Policy*. 37 (1): 181–189.
- Stephanopoulos, G. 2007. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science* 315 (1): 801–804.
- Wardani dan F. N.E. Pertiwi. 2013. Produksi Etanol Dari Tetes Tebu Oleh *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok (Nrrl – Y 265). *Agritech*, 33(2): 131-139

Wijaya dan I G. K. A. Arthawan.2012.Potensi Nira Kelapa Sebagai Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Bumi Lestari*, 12(1): 85 – 92.

Yuwono, Triwibowo, 2006. *Fisiologi Mikrobia*. Yogyakarta : Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada