

ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN PRODUKSI ETANOL KHAMIR *INDIGENOUS* NIRA SIWALAN (*Borassus flabellifer* L.) DARI TUBAN, JAWA TIMUR, INDONESIA

Ekwan Nofa Wiratno^{1)*}, Novi Soleman Rupilu¹⁾

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

^{*)}Alamat korespondensi: ekwanwiratno@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dan mengidentifikasi isolat khamir dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) serta mengetahui potensinya dalam produksi etanol. Tahapan penelitian ini meliputi isolasi, enumerasi, karakterisasi, identifikasi dan produksi etanol serta pengukuran konsentrasi etanol dan keasaman media selama proses fermentasi. Total khamir yang berhasil diisolasi dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) adalah $5,06 \times 10^5$ CFU/mL dan diperoleh satu isolat (U2) yang teridentifikasi secara fenotipik sebagai *Candida tropicalis* (% ID 95,7% dan T = 1). Selama proses fermentasi etanol terjadi penurunan keasaman media. Khamir isolat U2 mampu memproduksi etanol sebesar 140,1 g/L menggunakan glukosa 50 g/L dan tidak berbeda secara signifikan dibandingkan hasil produksi etanol dari *Saccharomyces cerevisiae* (148,6 g/L).

Kata kunci: *Borassus flabellifer* L., *Candida tropicalis*, etanol, khamir

ISOLATION, IDENTIFICATION AND ETHANOL PRODUCTION OF INDIGENOUS YEAST OF TODDY PALM (*BORASSUS FLABELLIFER* L.) JUICE FROM TUBAN, EAST JAVA, INDONESIA

Ekwan Nofa Wiratno^{1)*}, Novi Soleman Rupilu¹⁾

¹⁾Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya

^{*)}Email: ekwanwiratno@gmail.com

ABSTRACT

This study aimed to obtain and identify the indigenous yeasts isolated from *Borassus flabellifer* L. juice and its potency in ethanol production. Steps of this study included isolation, enumeration, characterization, identification and ethanol production and measurement of ethanol concentrations and medium acidity during fermentation. The yeast total isolated from *Borassus flabellifer* L. juice was 5.06×10^5 CFU/mL and the isolate U2 was phenotypically identified as *Candida tropicalis* (95.7% ID and T = 1). The pH level of medium decreased during the ethanol fermentation. Yeast isolate U2 was able to produce ethanol by 140.1 g/L using 50 g/L of glucose and it was not significantly different with ethanol yield fermented by *Saccharomyces cerevisiae* (148.6 g/L).

Keywords: *Borassus flabellifer* L., *Candida tropicalis*, ethanol, yeast

PENDAHULUAN

Isu sentral berkaitan dengan lingkungan dan energi dalam dekade terakhir ini adalah pemanasan global dan penurunan produksi bahan bakar fosil. Penggunaan bahan bakar fosil mengakibatkan polusi karbondioksida (CO₂) yang membahayakan kehidupan manusia [1]. Penurunan produksi bahan bakar

fosil juga terjadi di Indonesia. Tahun 2011, produksi bahan bakar fosil Indonesia menurun sebesar 36,36 % dibandingkan dengan tahun 2000 [2].

Hal tersebut mendorong perkembangan eksplorasi bahan bakar alternatif yang tidak mengakibatkan polusi dan bersifat terbarukan. Salah satu bahan bakar alternatif yang aman adalah etanol. Etanol berfungsi sebagai penambah volume

Bahan Bakar Minyak (BBM), peningkat angka oktan dan sebagai sumber oksigen untuk pembakaran yang lebih bersih [3].

Salah satu metode pembuatan etanol yang umum dilakukan adalah fermentasi. Bahan baku proses fermentasi berupa mono/disakarida (gula tebu, tetes tebu), bahan berpati (padi, jagung atau umbi) dan bahan berselulosa (kayu dan limbah pertanian) [4].

Selama ini nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) hanya dimanfaatkan sebagai minuman dan tidak dimanfaatkan secara luas dalam pemenuhan kebutuhan energi alternatif. Nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) memiliki kadar gula sebesar 10-20 % dan produktivitasnya mencapai 20 ton per hektar per tahun [5].

Produksi etanol secara umum menggunakan khamir dan bakteri. Khamir yang paling umum dimanfaatkan dalam produksi etanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Eksplorasi khamir *indigenous* dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) perlu dilakukan untuk mendapatkan khamir yang lebih adaptif dalam proses produksi etanol.

METODE PENELITIAN

Isolasi Khamir. Nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) asal Kota Tuban, Jawa Timur sebanyak 25 mL dimasukkan ke dalam akuades steril sebanyak 225 mL secara aseptis (pengenceran 10^{-1}). Suspensi tersebut dibuat pengenceran bertingkat dalam akuades steril hingga 10^{-6} . Suspensi nira sebanyak 0,1 mL pada tiap pengenceran diinokulasikan secara *pour plate* pada media Yeast Malt Agar (3 g/L *yeast extract*, 3 g/L *malt extract*, 5 g/L pepton, 50 g/L glukosa dan 20 g/L agar) [6].

Enumerasi dan Karakterisasi Khamir. Khamir yang tumbuh setelah inkubasi selama 48 jam dihitung jumlahnya menggunakan metode TPC dan dikarakterisasi berdasarkan karakter morfologi koloni (warna, bentuk, pinggiran, tekstur, elevasi) dan sel (bentuk, diameter, pseudohifa, askospora).

Identifikasi Khamir. Khamir murni hasil isolasi diidentifikasi secara fenotipik menggunakan API 20C AUX.

Produksi Etanol. Etanol diproduksi menggunakan media fermentasi etanol (50 g/L glukosa, 1 g/L *yeast extract*, 5 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5,0) [7]. Fermentasi dilakukan selama 72 jam pada suhu 30 °C, 120 rpm dalam kondisi anaerob.

Produksi etanol khamir hasil isolasi dibandingkan dengan isolat kontrol yaitu *Saccharomyces cerevisiae*.

Pengukuran Etanol. Etanol diukur menggunakan metode asam dikromat [8] pada awal fermentasi dan akhir fermentasi. Perubahan pH awal fermentasi dan akhir fermentasi ditentukan menggunakan pH meter.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enumerasi dan Karakterisasi Khamir Berdasarkan penghitungan diketahui bahwa khamir yang tumbuh dari nira berjumlah $5,06 \times 10^5$ CFU/mL. Hasil karakterisasi morfologi koloni dan sel khamir didapatkan satu isolat dengan karakter yang sama seperti pada Tabel 1 dan diberikan kode isolat U2.

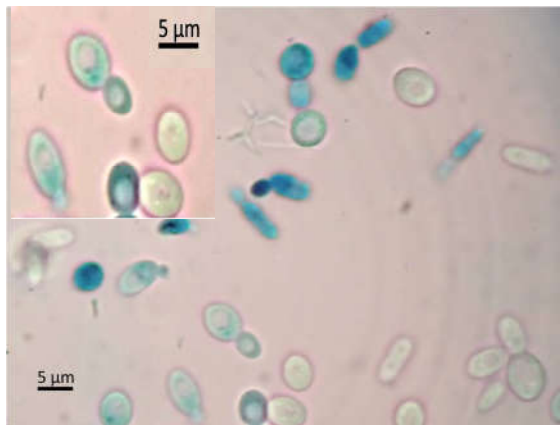
Identifikasi Khamir. Hasil identifikasi secara fenotipik isolat U2 menggunakan API 20C AUX menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki kesamaan dengan *Candida tropicalis* dengan % ID 95,7% dan T sebesar 1. Hasil identifikasi tersebut tergolong valid karena % ID lebih dari 95 % dan T antara 0,5-1.

Candida tropicalis ditemukan juga pada nira *Borassus flabellifer* L. dari Thailand bersama dengan *Kloeckera apiculata*, *Kloeckera japonica*, *Candida krusei*, dan *Candida valida* [9]. Nira *Borassus akeassii* dari Burkina Faso, Afrika Barat juga terdapat khamir *Candida tropicalis* bersama dengan beberapa khamir lain seperti *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida pararugosa* [10].

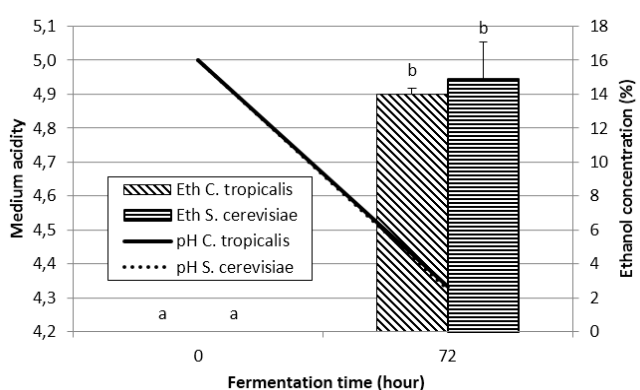
Produksi Etanol. Khamir isolat U2 mampu memproduksi etanol sebesar 140,1 g/L menggunakan glukosa 50 g/L. Hasil tersebut tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi etanol hasil produksi *Saccharomyces cerevisiae* (148,6 g/l) ($\alpha=0,05$). Produksi etanol menggunakan bahan pati ketela pohon oleh *Candida tropicalis* BCC7755 sebesar 143 g/L [12] sedangkan menggunakan glukosa 100 g/L oleh *C. tropicalis* TERI SH 110 menghasilkan etanol dengan konsentrasi 214,2 g/L [13].

Tabel 1. Karakter morfologi koloni dan sel khamir isolat U2

Karakter Khamir		
Koloni	Warna	Putih
	Bentuk	<i>Circular</i>
	Elevasi	<i>Convex</i>
	Tepi	<i>Entire</i>
	Tekstur	<i>Smooth</i>
Sel	Bentuk	Oval
	Diameter	5 μ m
	<i>Pseudohypha</i>	Ada
	<i>Ascospore</i>	Tidak ada



Gambar 1. Sel khamir isolat U2 dari *Borassus flabellifer* L.



Gambar 2. Konsentrasi etanol dan keasaman media selama proses fermentasi oleh isolat U2 (*C. tropicalis*) dan *S. cerevisiae*

Selama proses fermentasi etanol terjadi proses penurunan keasaman media. Perubahan keasaman media kedua isolat tersebut tidak berbeda signifikan ($\alpha=0,05$). Setelah 72 jam fermentasi, keasaman media isolat U2 (*Candida tropicalis*) sebesar 4,33 sedangkan

keasaman media *Saccharomyces cerevisiae* sebesar 4,32. Penurunan keasaman medium tersebut mengindikasikan terjadinya proses fermentasi yang menghasilkan CO₂, asam asetat dan asam formiat. Penurunan keasaman medium berhubungan dengan konsumsi nitrogen dan pelepasan ion H⁺ [11].

KESIMPULAN

Khamir isolat U2 dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.) berjumlah 5,06 x 10⁵ CFU/mL dan teridentifikasi sebagai *Candida tropicalis* (% ID 95,7 % dan T=1). Khamir isolat U2 (*Candida tropicalis*) mampu memproduksi etanol sebesar 140,1 g/L menggunakan glukosa 50 g/L yang tidak berbeda secara signifikan dengan hasil produksi *Saccharomyces cerevisiae* (148,6 g/L). Oleh karena itu, isolat U2 (*Candida tropicalis*) berpotensi sebagai agen fermentasi untuk produksi etanol dari nira siwalan (*Borassus flabellifer* L.).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] De Oliveira, M.E.D., B.E. Vaughan, & E.J. Rykiel. 2005. Ethanol as fuel: Energy, carbon dioxide balances, and ecological footprint. *BioScience*. 55(7): 593-602.
- [2] Pusdatin ESDM. 2012. Handbook of energy and economic statistics of Indonesia 2012. Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral. Jakarta.
- [3] Goksungur, Y. & N. Zorlu. 2001. Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. *Turkey Journal of Biology*. 25: 265-275.
- [4] Bailey, J.E. & D.F. Ollis. 1986. Biochemical engineering fundamentals, 2nd edition. McGraw-Hill Book Co. Singapore.
- [5] Naknean, P., Meenune, M. & Roudaut, G. 2010. Characterization of palm sap harvested in Songkhla Province, Southern Thailand. *International Food Research Journal*. 17: 977-986.
- [6] Aung, W., Y. Watanabe & F. Hashinaga. 2012. Isolation and phylogenetic analysis of two thermotolerant, fermentative yeast strains from liquid tapé ketan (Indonesian rice wine). *Food Science and Technology Research*. 18(2): 143-148.
- [7] Cheng, N.G., M. Hasan, A. C. Kumoro, C.F. Ling & M. Tham. 2009. Production of ethanol by fed-batch fermentation. *Pertanika*

- Journal of Science & Technology*. 17(2): 399-408.
- [8] Caputi, A Jr, M. Ueda & T. Brown. 1968. Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *American Journal Enologi and Viticulture*. 3(19): 160-165.
- [9] Tuntiwongwanich, S. & B. Leenanon. 2009. Morphology and identification of yeasts isolated from toddy palm in Thailand. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 23(1): 34-37.
- [10] Ouoba, L. I., C. Kando, C. Parkouda, H. Sawadogo-Lingani, B. Diawara & J. P. Sutherland. 2012. The Microbiology of bandji, palm wine of *Borassus Akeassii* from Burkina Faso: Identification and genotypic diversity of yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 113(6): 1428-1441.
- [11] Wiratno, E.N., T. Ardyati & A.K. Wardani. 2014. Effect of reducing sugar and total nitrogen to ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Experimental Life Science*. 4(2): 50-55.
- [12] Rattanachomsri, U., S. Tanapongpipat, L. Eurwilaichitr & V. Champreda. 2009. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 107(5): 488–493.
- [13] Patlea, S. & B. Lalb. 2008. Investigation of the potential of agro-industrial material as lowcost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*. 32: 596 – 602.