

ISOLASI DAN KARAKTERISASI KHAMIR POTENSIAL PENGHASIL BIOETANOL DARI INDUSTRI ARAK DI KARANGASEM BALI

*Isolation and Characterization of Potential Yeast of Bioethanol Producer
from Arak Industri in Karangasem Bali*

Nebay Cronika Simbolon, I Made Mahaputra Wijaya*, Ida Bagus Wayan Gunam
PS Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana,
Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Kode pos : 80361; Telp/Fax : (0361) 701801.

Diterima 25 Oktober 2018 / Disetujui 05 Nopember 2018

ABSTRACT

*This research aimed to isolate and identify potential yeast of bioethanol-producer from arak industri in Karangasem Bali. The isolated sample was taken from 3 different points from 2 villages in Karangasem Bali. Isolation was carried out using PYG media then purified to obtain pure isolates. The pure isolates were screened with several stages, namely a qualitative test of gas production, growth selection with the addition of antibiotics, and quantitative tests with an alcohol oxidation reaction. Determined by UV visible spectroscopy, 9 potential isolates was obtained to continue to the identification stage. At this stage fermentation was carried out in PYG media for 10 days using a starter from a potential isolate with a media glucose level of 20% of the media volume. Fermentation results were then distilled. Of the obtained 9 potential isolates the best isolate. IS 258 isolates are determined the best isolates with 86.85 mL ethanol. The total ethanol produced by IS 258 is higher than with 60.73 mL alcohol control experiment (Alcotec). Isolate IS 258 was isolated from bayur skin samples taken from the sap fermentation process. IS 258 then identified macroscopically and microscopically. Based on the results of macroscopic and microscopic identification, IS 258 has many similarities with previous studies on yeast isolation, isolate IS 258 is presumably the yeast genus *Saccharomyces* sp. Further research is needed to optimize ethanol production of IS 258 and identify species from isolates IS 258.*

Keyword : *bioethanol, Balinese wine, lau, yeast, isolation and identification of yeast, UV visible spectroscopy*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi khamir potensial penghasil bioetanol dari industri arak di Karangasem Bali. Sampel yang diisolasi diambil dari tiga titik berbeda dari dua desa di Karangasem Bali. Isolasi dilakukan menggunakan media PYG kemudian dimurnikan untuk memperoleh isolat murni. Isolat yang telah murni kemudian ditapis. Pada proses penapisan ada beberapa tahapan yaitu uji kualitatif produksi gas, seleksi penumbuhan dengan penambahan antibiotik dan uji kuantitatif dengan reaksi oksidasi alkohol. Hasil scanning UV visible spectroscopy ada 9 isolat potensial untuk dilanjutkan ketahap identifikasi morfologi. Pada tahap ini dilakukan fermentasi di media PYG

*Korespondensi Penulis:
Email: mahaputrawijaya@unud.ac.id

selama 10 hari menggunakan starter dari isolat potensial dengan kadar glukosa media 20% dari 900 mL media. Hasil fermentasi kemudian didistilasi dan satu isolat terbaik. Isolat IS 258 menjadi isolat terbaik karena dapat menghasilkan etanol tertinggi yaitu 86,85 mL. Total etanol yang dihasilkan IS 258 lebih tinggi dari total etanol dari *dry yeast* Alcotec sebagai *control experiment* yaitu 60,73 mL. Isolat IS 258 diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Berdasarkan hasil identifikasi morfologi, IS 258 memiliki kemiripan banyak dengan penelitian-penelitian sebelumnya tentang isolasi khamir, sehingga diperkirakan isolat IS 258 adalah khamir genus *Saccharomyces* sp. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengoptimasi produksi etanol IS 258 dan mengidentifikasi spesies dari isolat IS 258.

Kata kunci : *bioetanol, arak, lau, khamir, isolasi dan identifikasi khamir, UV-visible spectroscopy*

PENDAHULUAN

Kebutuhan energi yang semakin meningkat sekarang ini, tidak sesuai dengan ketersediaan sumber energi fosil sebagai sumber energi utama yang sudah mencapai kondisi keterbatasan (Senam, 2009). Krisisnya sumber energi fosil seperti minyak bumi, gas dan batu bara saat ini menimbulkan kebutuhan untuk diversifikasi energi dengan cara pengembangan sumber energi sebagai energi alternatif (Kholiq, 2015). Energi alternatif merupakan istilah yang merujuk pada semua energi yang dapat digunakan dengan tujuan sebagai pengganti bahan bakar konvensional tanpa menimbulkan akibat yang tidak diharapkan (Perlaviciute *et al.*, 2015). Energi alternatif atau energi pengganti diharapkan dapat mencukupi atau paling tidak dapat mengurangi penggunaan energi dari bahan bakar fosil. Salah satu pengembangan energi alternatif adalah dengan mengembangkan bioenergi (Senam, 2009).

Bioenergi merupakan salah satu jenis bahan bakar alternatif terbaru dengan prospektif tinggi untuk dikembangkan. Kondisi energi yang dimiliki Indonesia sekarang membuat pengembangan bioenergi semakin mendesak untuk segera dilakukan (Kholiq, 2015). Selain bisa diperbaharui, bioenergi memiliki kelebihan seperti ramah lingkungan, dapat terurai, mampu mengeliminasi efek rumah kaca, kontinuitas bahan bakunya terjamin (Hambali *et al.*, 2007). Bioenergi dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu bioenergi konvensional dan

bioenergi modern (Mulyani dan Irsal, 2008). Bioenergi konvensional atau tradisional sudah sering digunakan masyarakat, contohnya kayu bakar. Sedangkan bioenergi modern contohnya bioetanol, biodiesel, *pure vegetable oil* (PPO) / *straight vegetable oil* (SVO), minyak bakar, biogas dan biosyngas (Sari *et al.*, 2013).

Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi glukosa (gula) kemudian dilanjutkan dengan proses destilasi (Dörfler *et al.*, 2007). Bioetanol merupakan energi yang sumbernya dari bahan baku tanaman yang menghasilkan glukosa, contohnya ubi jalar, singkong, tebu, jagung, gandum dan limbah pertanian seperti jerami lalu difermentasi dengan menggunakan khamir sehingga menghasilkan alkohol. Selanjutnya dilakukan proses destilasi untuk memperoleh alkohol yang murni (Nisa, 2014). Khamir memiliki kemampuan potensial untuk produksi etanol. Ada beberapa jenis khamir yang dapat memproduksi etanol seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvaru* atau *Saccharomyces carlsbergensis*, *Candida utilis*, *Torulasporea delbrueckii*, *Torulasporea globosa*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia kudriavzevii* dan *Saccharomyces anamensis* (Suharto, 2017). Salah satu jenis khamir penghasil etanol yang intensif diteliti adalah *Saccharomyces cerevisiae* (Sumerta *et al.*, 2016).

Arak merupakan salah satu minuman tradisional yang terkenal di Bali dimana Kabupaten Karangasem dikenal sebagai penghasil utamanya (Sukadana *et al.*, 2014).

Arak adalah minuman beralkohol yang dihasilkan dari tumbuhan yang menghasilkan glukosa (karbohidrat) yang dibantu oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae* secara fermentasi dan di destilasi. Bahan yang memiliki kandungan karbohidrat seperti nira kelapa, enau, lontar dan lain-lain (Prastowo, 2007). Berdasarkan hasil wawancara dari produsen arak bali, kadar alkohol yang terkandung dalam arak bali sekitar 15–40%. Masyarakat Karangasem memproduksi arak bali menggunakan bahan yang berasal dari alam tanpa penggunaan kultur starter yang dijual dipasaran seperti *dry yeast* Alcotec. Pada saat produksi arak bali, masyarakat menambahkan *lau* sebagai starter pada nira. *Lau* yang digunakan berasal dari serabut kelapa (*Cocos nucifera*) dan ada juga dari kulit pohon bayur (*Pterospermum javanicum*). Kadar alkohol yang dihasilkan pada saat fermentasi tradisional ini, apabila diaplikasikan pada destilasi bertingkat sangat tinggi dapat lebih besar dari 80%, sehingga tidak disarankan untuk dikonsumsi, melainkan dijadikan bahan bakar alternatif (Muku *et al.*, 2009).

Tingginya konsentrasi alkohol yang mampu dihasilkan dari arak dengan metode fermentasi nira secara tradisional menjadi alasan untuk mengisolasi khamir yang ada pada *lau*. Sumber khamir ini berasal dari bahan baku produksi, bahan setengah jadi produksi dan hasil akhir dari produksi. Setelah isolasi dilakukan identifikasi untuk mengetahui jenis khamir, sehingga pada akhir penelitian ini diperoleh jenis khamir penghasil alkohol yang tinggi yang dapat digunakan sebagai penghasil bioetanol. Pada penelitian ini juga dikembangkan metode oksidasi alkohol menggunakan spektrofotometer untuk penentuan kadar etanol.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain kulit pohon bayur, serabut kelapa, nira yang diambil dari lokasi pengambilan sampel yaitu di Kabupaten Karangasem. Media *pepton yeast glukosa* (PYG) yaitu *pepton, yeast extract*, glukos, akuades, kalium dikromat, H₂SO₄, antibakteri *Streptomycin sulphate, dry yeast* sebagai pembanding pada saat produksi alkohol.

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain UV-VIS Spektrofotometer, mikroskop, *laminar flow*, incubator, *autoclave, magnetic stirrer, shaker, centrifuge*, destilator.

Pelaksanaan Penelitian

Isolasi Khamir

Pada penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel pada dua desa yang ada di Kabupaten Karangasem Bali. Sampel yang sudah diambil kemudian dibawa ke Laboratorium Bioindustri untuk dilakukan isolasi dengan pengenceran sampai 10⁻⁷. Isolat yang telah didapatkan dari hasil isolasi kemudian dimurnikan untuk memperoleh kultur murni dengan menggores kembali di media PYG padat menggunakan metode *quadrant streak* kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam.

Penapisan Isolat

Kultur murni kemudian ditapis untuk memperoleh isolat potensial. Pada saat penapisan ada beberapa tahapan yaitu uji kualitatif produksi gas dengan menampung gas yang dihasilkan pada saat inkubasi 3 hari menggunakan plastik penampung, seleksi penambahan antibakteri *Streptomycin sulphate* dan uji morfologi, kemudian uji kuantitatif dengan menambahkan reagen kalium dikromat pada media yang telah diinokulasikan dengan isolat dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30°C. Pada uji kuantitatif, kurva standar dibuat dengan mereaksikan alkohol dengan reagen kalium dikromat dan media mengandung alkohol

dengan reagen kalium dikromat lalu diinkubasi selama 30 menit kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer. Untuk isolat, terlebih dahulu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C kemudian disentrifugasi, kemudian supernatannya diambil 1ml dan ditambahkan reagen kalium dikromat 1mL, diinkubasi 30 menit, lalu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer.

Karakterisasi Isolat Khamir Potensial

Setelah isolat potensial diperoleh, dilakukan fermentasi glukosa selama 10 hari pada suhu ruang menggunakan isolat potensial sebagai agen fermentasi. Hasil fermentasi kemudian didestilasi untuk menghitung total etanol yang diperoleh. Setelah itu dilakukan pengecekan morfologi koloni dan sel dari satu isolat potensial.

Analisis Data dan Variabel Yang Diamati

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah gas hasil fermentasi, nilai absorbansi pada uji kuantitatif, total etanol, morfologi koloni dan morfologi sel khamir yang meliputi warna, bentuk, tepian koloni, dan ukuran untuk identifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan pemurnian isolat

Sampel yang diperoleh kemudian diisolasi dengan pengenceran sampai 10^{-7} . Pada saat isolasi metode yang digunakan adalah metode *streak plating* secara aseptik ke media agar yang telah disterilisasi (Tarigan, 1988). Penggunaan metode *streak plating* dilakukan agar diperoleh biakan murni dengan spesifik. Biakan murni diperoleh dari satu koloni terpisah yang memiliki kesamaan dengan koloni lain seperti warna, bentuk, dan ukuran (Pelczar, 1998). Pengamatan yang dilakukan untuk pemurnian adalah koloni yang tumbuh terpisah, tidak berlendir dan

warna. Dari 95 isolat yang telah dimurnikan diperoleh 71 isolat yang memenuhi kriteria khamir secara makroskopis. Ada beberapa isolat yang ditumbuhi kapang dan ada beberapa isolat yang menyerupai bakteri yaitu koloninya berlendir. Untuk khamir sendiri, secara makroskopis memiliki ciri-ciri koloni berwarna putih susu atau putih kekuningan, memiliki spora dan tidak berlendir (Pelczar, 1988). Selain dari bentuk dan warna, khamir dapat diamati juga dengan bau yang dihasilkan isolat tersebut yaitu bau tape (alkohol).

Penapisan Isolat

Hasil Uji Kualitatif Dengan Produksi gas

Hasil pengamatan secara kuantitatif diperoleh 66 isolat yang menghasilkan gas. Hasil *screening* ini didasarkan pada banyaknya gas diperoleh yang dapat dilihat dari plastik yang digunakan sebagai penampung gas. Produksi gas diamati selama tiga hari berturut-turut. Semua plastik yang awalnya tidak mengembang akan mengembang karena CO₂ yang diproduksi pada saat proses fermentasi. Isolat yang menghasilkan gas yang lebih banyak sehingga bagian plastik yang mengembang lebih banyak menjadi kelompok isolat gas banyak dan diperkirakan memiliki konsentrasi alkohol tinggi. Untuk kelompok isolat gas sedang dilihat dari gas yang dihasilkan di plastik penampung yang mengembang sedikit lebih lambat dari kelompok isolat gas banyak. Pada kelompok isolat gas sedikit, plastik mengembang tidak lebih banyak dari kelompok isolat gas sedang. Ada beberapa isolat yang juga menghasilkan gas yang sangat sedikit pada plastik penampung, sehingga pada plastik penampung terlihat mengembang sedikit. Isolat ini dikelompokkan menjadi kelompok isolat gas sangat sedikit. Beberapa isolat juga ada yang tidak menghasilkan gas sama sekali, sehingga plastik penampung tidak mengembang sama sekali.

Pada dasarnya proses fermentasi glukosa akan menghasilkan alkohol dan gas CO₂, dimana menurut Hambali *et al.* (2007) perbandingan stokiometri antara gas CO₂ dan etanol yang dihasilkan adalah 1:1. Walaupun demikian, gas yang dapat diukur volumenya hanya sekitar 70–80% (Richana, 2011). Produksi gas pada saat proses fermentasi dapat menghambat pertumbuhan isolat walaupun isolat masih dalam keadaan hidup. Alkohol akan kembali diproduksi apabila gas CO₂ sudah dihilangkan (Datar *et al.*, 2004). Media PYG yang mengandung gula dihidrolisis oleh enzim yang dihasilkan khamir menjadi etanol dan karbondioksida (Richana, 2011).

Hasil Seleksi Penambahan Antibakteri Dan Pengamatan Makrokopis

Isolat ditumbuhkan pada media yang telah ditambahkan dengan antibakteri *Streptomycin sulphate*. *Streptomycin sulphate* merupakan antibiotik yang dihasilkan jamur tanah *Streptomyces griseus* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Enterobacter* sp. (Wikipedia, 2018). Sebanyak 66 isolat yang telah diseleksi pada tahap sebelumnya ada 64 isolat yang tumbuh dan ada dua isolat yang tidak tumbuh. Antibakteri mengandung zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau membunuh bakteri dengan mengganggu proses metabolisme dari bakteri (Didjoseputro, 1980). Penambahan antibakteri tidak terlalu berpengaruh pada isolat-isolat yang telah diisolasi. Hal ini dikarenakan pada produksi arak bali, sebelum proses fermentasi ditambahkan *lau* yang mungkin bertindak sebagai antimikroba.

Lau terdiri dari dua jenis bahan baku yang berbeda yaitu dari kulit pohon bayur (*Pterospermum javanicum*) dan serabut kelapa. Menurut Camporese (2003) ekstrak heksan kulit batang bayur dapat menurunkan laju pertumbuhan bakteri *Escherchia coli*,

sedangkan bakteri *Pseudomonas* dapat dihambat laju pertumbuhannya dengan kandungan ekstrak methanol kulit pohon bayur. Pernyataan ini didukung juga dari hasil penelitian Reid *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa fraksi etil asetat dari salah satu family dari pohon bayur yaitu tumbuhan cola dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Lau jenis kedua adalah serabut kelapa. Menurut Thakur *et al.* (2015) serabut kelapa mentah dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Kandungan fenolik pada serabut kelapa dapat menghambat fungsi seluler dari bakteri sehingga menghambat aliran nutrisi untuk bakteri yang menyebabkan bakteri itu mati. Bakteri *Escherchia coli* dan *Shigella dysenteriae* dapat dihambat laju pertumbuhannya dengan ekstrak etanol dari serabut kelapa (Dalimunthe, 2006).

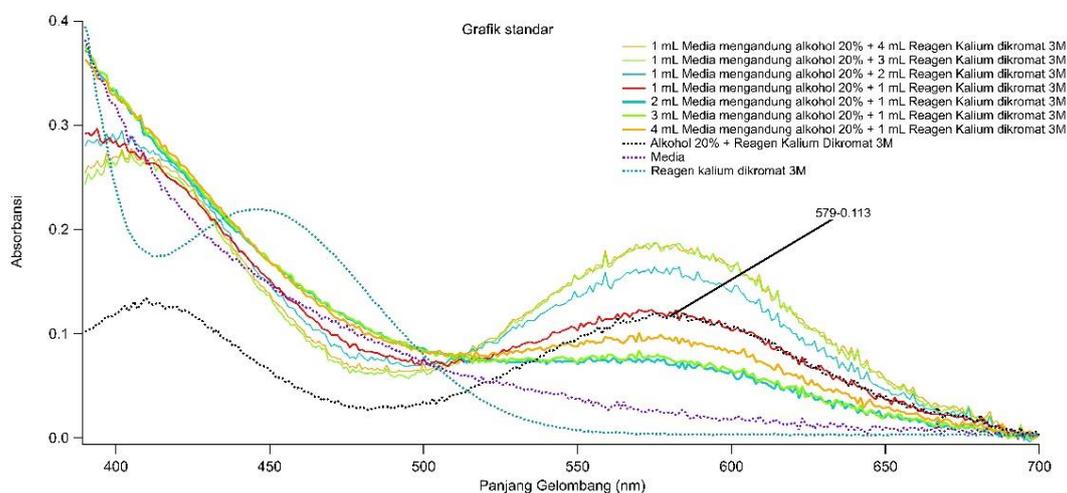
Secara umum, dari hasil pengamatan makrokopis dari isolat yang telah diisolasi memiliki bentuk *circular* (bundar), dengan diameter 1 mm, berwarna putih susu, tepiannya entire (rata atau halus), dan sudut elevasi cembung seperti tetesan air (*convex*). Hasil pengamatan morfologi koloni ini juga mirip dengan hasil penelitian Fitriati *et al.* (2013) pada saat mengisolasi khamir dengan warna koloni krem atau putih, elevasi koloni datar atau cembung, bentuk tepian halus atau bergelombang dan bentuk sel berantai, oval atau bulat.

Hasil Penentuan Etanol Secara Kuantitatif

Pada uji kuantitatif sebelum pengujian terhadap isolat, dilakukan terlebih dahulu pembuatan grafik standar yang terdiri dari penambahan aquades + reagen kalium dikromat 3M, alkohol 20% + reagen kalium dikromat 3M, media PYG cair dengan antibakteri yang mengandung alkohol 20% + reagen kalium dikromat 3M. Alkohol ditambahkan dengan reagen kalium dikromat terjadi perubahan warna dari campuran dari orange menjadi biru kehijauan (Hyun-Beom *et al.*, 2009). Grafik standar disajikan pada

gambar 2.

Pada grafik dapat dilihat bahwa reagen kalium dikromat memiliki satu *peak* di panjang gelombang 450 nm (garis biru putus-putus). Ketika reagen kalium dikromat direaksikan dengan alkohol 20% terbentuk dua *peak* baru di panjang gelombang 420 dan 580 nm (garis hitam putus-putus). Kemudian pengujian juga dilakukan pada media mengandung alkohol 20% direaksikan dengan kalium dikromat menghasilkan satu *peak* di posisi yang sama ketika reagen kalium dikromat direaksikan dengan alkohol 20%.



Gambar 2. Grafik hasil *scanning* standar dengan konsentrasi alkohol pada media sebesar 20%

Pada grafik di atas dapat dilihat bahwa perbandingan 1:1 antara media yang mengandung alkohol + reagen kalium dikromat (garis merah) memiliki *peak* yang hampir sama reaksi antara alkohol + reagen kalium dikromat (garis hitam) dengan perbandingan 1:1. Berdasarkan grafik di atas, untuk perbandingan pada uji kuantitatif isolat, perbandingan volume antara supernatant hasil fermentasi isolat dan reagen kalium dikromat adalah 1:1. Hal ini didukung juga dengan penelitian Lou dan Zhi (2002) perbandingan antara reagen kalium dikromat dengan substrat yang akan diuji adalah 1:1. Grafik di atas juga menunjukkan bahwa pembacaan *peak* tertinggi dapat dilakukan pada panjang gelombang 560–600 nm. Hal

Meskipun volume dari reagen kalium dikromat atau media mengandung alkohol divariasikan, tetapi posisi panjang gelombangnya pada daerah yang sama yaitu 560–600 nm. Nilai *peak*nya berubah, tetapi panjang gelombangnya tidak berubah. Ketika reagen kalium dikromat kehabisan alkohol untuk dioksidasi maka nilai *peak* tidak naik lagi. Hal ini terjadi ketika perbandingan media mengandung alkohol dan reagen kalium dikromat 1:4.

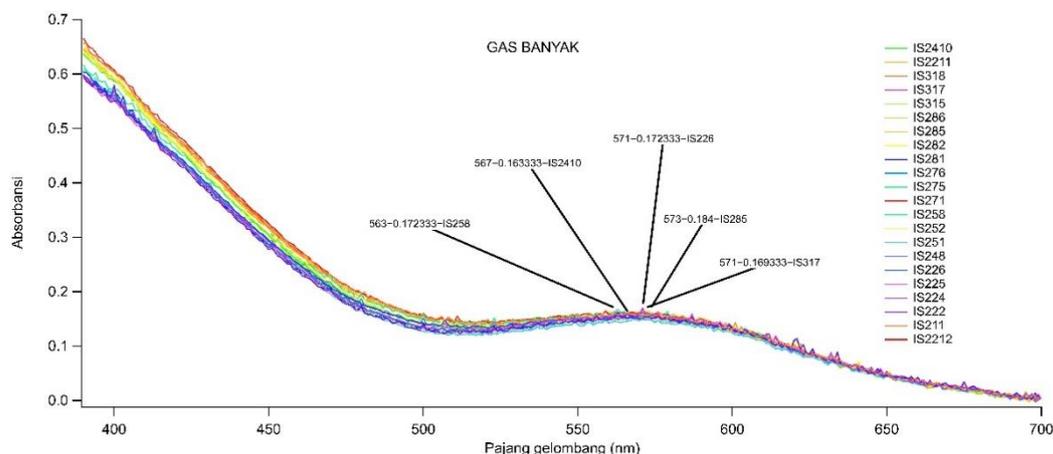
ini sesuai dengan penelitian Horria *et al.* (2014) untuk mengetahui nilai absorbansi dari alkohol dengan reagen kalium dikromat dibaca pada panjang gelombang 520–610 nm.

Pada grafik di bawah dapat dilihat grafik hasil *scanning* dari kelompok isolat dengan produksi gas banyak, IS 285 memiliki *peak* tertinggi pada panjang gelombang 573 nm dengan nilai absorbansi 0,184. Setelah semua isolat diuji dengan reagen kalium dikromat maka diperoleh sembilan isolat potensial berdasarkan *peak* tertinggi. Isolat dengan *peak* tertinggi disajikan pada tabel berikut ini.

Isolat potensial dari kelompok gas banyak diperoleh sebanyak lima isolat, pada kelompok gas sedang diperoleh dua isolat dan

dari kelompok dengan gas sangat sedikit diperoleh dua isolat potensial. Hasil uji kuantifikasi ini tidak linier dengan hasil produksi gas sebelumnya. IS 274 dengan absorpsi tertinggi berasal dari kelompok produksi gas sedang. Menurut Hyun-Beom *et al.* (2009) komposisi dari media yang

digunakan pada saat inkubasi dapat mempengaruhi reaksi oksidasi kalium dikromat, sehingga akan mempengaruhi hasil pembacaan *scanning* dari isolat. Menurut Koshy *et al.* (2014), metode oksidasi ini menjadi metode awal untuk kuantifikasi etanol.



Gambar 3. Grafik hasil *scanning* isolat kelompok produksi gas banyak (panjang gelombang-absorbansi-kode isolat)

Tabel 1. Panjang gelombang dengan absorbansi maksimum pada penentuan etanol secara kuantitatif untuk 9 isolat khamir potensial.

Kode Isolat	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Keterangan
IS2410	567	0.163	Produksi gas banyak
IS317	571	0.169	Produksi gas banyak
IS258	563	0.172	Produksi gas banyak
IS226	571	0.172	Produksi gas banyak
IS285	573	0.184	Produksi gas banyak
IS253	574	0.177	Produksi gas sedang
IS274	574	0.207	Produksi gas sedang
IS123	562	0.179	Produksi gas sangat sedikit
IS244	582	0.192	Produksi gas sangat sedikit

Karakterisasi Isolat Khamir Potensial Produksi Etanol Untuk Isolat Khamir Potensial

Untuk mengetahui total etanol yang dapat dihasilkan maka dilakukan fermentasi media PYG cair dengan kadar glukosa 20% selama 10 hari pada suhu ruang dengan nilai $OD_{660} \pm 5$. Nilai OD ini menjadi indikator untuk

mengetahui jumlah starter yang di inokulasikan. Jumlah starter yang tidak sama mempengaruhi proses fermentasi dan etanol yang diproduksi. Menurut Gunam *et al.* (2018) jumlah starter dapat mempengaruhi produksi etanol, apabila konsentrasi gula terlalu tinggi akan tetapi starter yang dimasukkan sedikit, maka total etanol yang

dihasilkan tidak optimal. Hal ini dikarenakan gula dapat menghambat laju pertumbuhan dari starter tersebut. Total etanol yang diperoleh dari hasil destilasi disajikan pada tabel 2.

Total etanol tertinggi dihasilkan dari isolat dengan kode IS 258 yaitu sebanyak 86,85 mL. Total etanol dari isolat IS 285 juga lebih

tinggi dari total etanol dari kontrol yang menggunakan *dry yeast* Alcotec yaitu 60,73 mL. Penurunan total padatan terlarut atau persentase glukosa yang dikonsumsi khamir pada fermentasi IS 285 juga cukup tinggi dibandingkan dengan isolat lain yaitu dari 18,93% brix menjadi 6,53% brix mengalami penurunan sebesar 12,4% brix.

Tabel 2. Produksi etanol dari 9 isolat khamir potensial

Kode Isolat	Total padatan terlarut (%brix) awal	Total padatan terlarut (%brix) akhir	Δ padatan terlarut (brix)	Total (%) Total etanol (mL)
IS 258	18.93 \pm 0.06	6.53 \pm 0.90	12.4	86.85 \pm 2.74
Alcotec	18.97 \pm 0.06	10.40 \pm 0.40	8.57	60.73 \pm 4.55
IS 317	18.00 \pm 0.35	16.87 \pm 0.12	1.13	7.21 \pm 1.95
IS 253	17.93 \pm 0.23	16.07 \pm 1.81	1.86	6.29 \pm 0.11
IS 274	18.47 \pm 0.12	17.33 \pm 0.50	1.14	4.50 \pm 0.77
IS 285	19.80 \pm 0.10	18.17 \pm 0.49	1.63	3.26 \pm 0.96
IS 2410	18.33 \pm 0.12	17.47 \pm 0.31	0.86	2.63 \pm 0.99
IS 123	18.47 \pm 0.12	16.87 \pm 0.12	1.6	2.37 \pm 0.95
IS 244	17.90 \pm 0.10	17.53 \pm 0.42	0.37	1.82 \pm 1.58
IS 226	18.13 \pm 0.12	17.67 \pm 0.23	0.46	0.98 \pm 0.19

Keterangan: Isolat hasil *screening* dan *dry yeast* Alcotec di *scale up* dengan yang perlakuan sama

Menurut Winarno *et al.* (1990) total padatan terlarut adalah persentasi jumlah gula pereduksi yang terkandung pada suatu media atau bahan. Terjadinya penurunan total padatan terlarut sebelum fermentasi dan sesudah fermentasi disebabkan karena gula yang terkandung pada media fermentasi diubah oleh enzim yang dihasilkan khamir menjadi alkohol (Sartika, 2010). Menurut penelitian Reed *et al.* (1991) dalam Yuda (2018) penurunan total padatan terlarut akan terjadi pada saat proses fermentasi. Semakin sedikit total padatan terlarut maka semakin banyak juga etanol yang diproduksi. Penurunan total padatan terlarut dan hasil produksi gas linier dengan total etanol yang diperoleh.

Morfologi Isolat Khamir Potensial

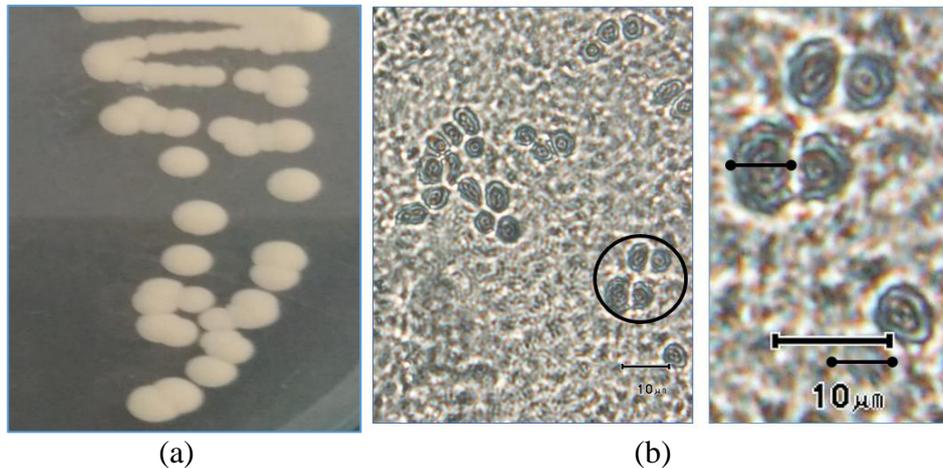
Identifikasi morfologi IS 258 sebagai

isolat khamir potensial dilakukan dengan dua cara yaitu secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis, koloni IS 258 memiliki bentuk bulat, dengan tepian rata, dan sudut elevasi koloni cembung seperti tetesan air. Hasil ini mirip dengan identifikasi Lasmi (2016) tentang khamir memiliki ciri koloni dengan bentuk bulat, tepian rata, dan elevasi yang rata. Secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada gambar berikut ini.

Ukuran dari sel hasil uji mikroskopis diperkirakan 3–5 μ m, berbentuk oval, dan tidak memiliki hifa. Menurut Nurhariyati *et al.* (2004) dalam penelitiannya, *Saccharomyces* mempunyai karakteristik sel dengan bentuk bulat, oval pendek dan oval, pertunasan multilateral, ukuran sel [(2,5–5) x (3,5–5) – [(3–6) x (5–7,5)] μ m, pseudohifa dan hifa sejati tidak ada. Menurut Rafiqah

(2010) dalam Jumiya *et al.* (2012) *Saccharomyces* memiliki ciri seperti bentuk sel tidak ogival, asci tidak mudah pecah, memiliki askospora berbentuk bulat-oval dan

tidak memiliki ballistopora. Berdasarkan kemiripan morfologi koloni dan sel, dapat diperkirakan isolat IS 258 adalah khamir genus *Saccharomyces* sp.



Gambar 4. (a) Morfologi makroskopis (b) morfologi mikroskopis perbesaran 1000x

KESIMPULAN

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

Isolat yang telah diisolasi dari industri arak merupakan isolat penghasil etanol dengan kemampuan memproduksi etanol yang berbeda-beda dan diperoleh satu isolat yang paling potensial. Isolat IS 258 menjadi isolat paling potensial dalam memproduksi etanol yaitu 86.85 mL setelah fermentasi 10 hari. Isolat IS 258 merupakan isolat diisolasi dari sampel bayur yang diambil dari proses fermentasi nira. Berdasarkan identifikasi morfologi koloni dan morfologi sel yang memiliki banyak kemiripan dengan penelitian-penelitian sebelumnya, dapat diperkirakan isolat IS 258 adalah khamir genus *Saccharomyces* sp.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan perlu dilakukan identifikasi sekuensing DNA IS 258 untuk mengetahui

spesies dari khamir potensial penghasil bioetanol. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pH, suhu, dan jumlah starter optimum untuk produksi bioetanol yang lebih optimal menggunakan IS 258.

DAFTAR PUSTAKA

- Camporese, A., Balick, M.J., F., Arvigo, R., Esposito, R.G., Marsellino, N., De Simone, F. Tubaro, A. 2003. Screening of anti-bacterial of medicinal plants from Belize (Central America). *Ethnopharmacologi*. 87: 103-107.
- Dalimunthe, A., dan M. Nainggolan. 2006. Pengujian Ekstrak Etanol Serabut Kelapa (*Cocos Nucifera* Linn) Terhadap Bakteri *Echerichia coli* dan *Shigella dysenteriae*. *Jurnal Komunikasi Penelitian*. 18(3):40-43.
- Datar, R. P., R. M. Shenkman, B. G. Catani, R. L. Huhnke, R. S. Lewis. 2004. Fermentation of Biomass Generated Producer Gas to Ethanol. *Biotechnology*

- and Bioengineering. 86 (5):587–594.
- Dwidjoseputro, D. 1980. Pengantar fisiologi tumbuhan. Jakarta: Gramedia.
- Hambali, E., S. Mujdalifah, A. H. Tambunan, A. W. Pattiwiri, dan R. Hendroko. 2007. Teknologi bioenergi. Agro Media Pustaka, Jakarta.
- Hidayat, A. S. 2005. Konsumsi BBM dan peluang pengembangan energi alternatif. Inovasi. 5(12): 11-17.
- Horria A, Mohamed, Pakinaz Y. Khashaba, Reem Y. Shahim. 2014. Spectrophotometric Determination of Some Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors by Potassium Dichromate and Potassium Permanganate in Tablet Dosage Form. Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. 04 (39): 16-24.
- Hyun-Beom, S., K. Hyun-Joo, L. Oh-Kyu, H. Ji-Hye, L. Hyeon-Yong, J. Kyung-Hwan. 2009. Measurement of Ethanol Concentration Using Solvent Extraction and Dichromate Oxidation and Its Application to Bioethanol Production Process. J Ind Microbiol Biotechnol. 36: 285–292.
- Jumiyati, S. H. Bintari, I. Mubarak. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir Secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. Biosaintifika. 4(1): 27-35.
- Kholiq, I. 2015. Pemanfaatan energi alternatif sebagai sumber energi terbarukan untuk mendukung substitusi BBM. Jurnal IPTEK. 19: 75–91.
- Komarayati, S., I. Winarni, and Djarwanto. 2011. Bioethanol production from Sago (Metroxylon spp.) core by using enzymes. Jurnal penelitian hasil hutan. 29(1): 20-32.
- Koshy, B. E., F. K. Pandey, and T. Bhatnagar. 2014. Quantitative Estimation of Bioethanol Produced from Lignocellulosic & Household Wastes. International Journal of Life Sciences Research. 2 (4): 130-145.
- Lasmi, Y., S. Wiyono, dan I. O. Sumarrauw. 2013. Khamir Antagonis untuk Pengendalian Penyakit Antraknosa pada Buah Avokad Selama Penyimpanan. Jurnal Fitopatologi Indonesia. 9(5): 153-159.
- Lou, Ji-Doung, and Zhi-Nan Xu. 2002. Selective Solvent-Free Oxidation of Alcohols with Potassium Dichromate. Tetrahedron Letters. 43 (2002): 8843–8844.
- Muku, I. D. M. K., dan I. G. K. Sukadana. 2009. Pengaruh Rasio Kompresi Terhadap Unjuk Kerja Mesin Empat Langkah Menggunakan Arak Bali Sebagai Bahan Bakar, Jurnal Ilmiah Teknik Mesin, Jurusan Teknik Mesin, Universitas Udayana.
- Mulyani, A., dan I. Las. 2008. Potensi sumber daya lahan dan optimalisasi pengembangan komoditas penghasil bioenergi di Indonesia. Jurnal litbang pertanian. 27(1): 31-41.
- Nisa, W. W. 2014. Produksi bioetanol dari onggok (limbah padat Tapioka) dengan proses sakarifikasi dan fermentasi serentak menggunakan khamir hasil isolat dari tetes Tebu. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulan Malik Ibrahim, Malang.
- Nurhariyati T, Ni'matuzahroh & Surtiningsih T. 2004. Keanekaragaman khamir pendegradasi minyak hasil isolasi dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. Berk. Penelitian Hayati 9: 87-91.
- Pelczar, M. J., and E. S. C. Chan. 1998. Dasar-dasar mikrobiologi. UI-Press, Jakarta.
- Perlaviciute, G., and L. Steg. 2015. The influence of values on evaluations of

- energy alternatives. *Renewable Energy an international journal*. 77: 259-267.
- Reid, K.A., Jager, A.K., Light, M.E., Mulholland, D.A., Van Staden, J. 2005. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compounds. *Ethnopharmacologi*. 97: 285-29.
- Richana, N. 2011. *Bioetanol: bahan baku, teknologi, produksi dan pengendalian mutu*. Nuansa, Bandung.
- Sari, D. A., dan Hadiyanto. 2013. Proses produksi bioenergi berbasis bioteknologi. *Jurnal aplikasi teknologi pangan*. 2(3): 108-113.
- Sartika, R. (2010). *Pengaruh Suhu dan Kelembaban Udara Terhadap Shelf-Life Dan Karakteristik Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) Selama Penyimpanan*. Bogor: Fakultas Pertanian. IPB.
- Senam. 2009. *Prospek bioetanol sebagai bahan bakar yang terbarukan dan ramah lingkungan*. Jurusan Pendidikan Kimia. Fakultas FMIPA. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Suharto, I. 2017. *Bioteknologi dalam bahan bakar nonfosil*. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Sukadana, I. G. K., dan I. G. N. P. Tenaya. 2016. *Pengaruh penggunaan arak bali sebagai bahan bakar pada mesin empat langkah dengan rasio kompresi bervariasi*. *Jurnal teknik mesin Untirta*. 2(1): 1-8.
- Sumerta, I. N., and A. Kanti. 2016. Diversity of ethanol producing yeasts isolated from fermented foods in Riau islands. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(1): 61-69.
- Tarigan, J. 1988. *Pengantar mikrobiologi*. Depdikbud Pendidikan tinggi proyek pengembangan Lembaga Pendidikan, Jakarta.
- Thakur, K., S. Kalia, N. Sharma, and D. Pathania. 2015. Laccase-mediated biografting of p-coumaric acid for development of antibacterial and hydrophobic properties in coconut fibers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 122: 289-295.
- Wikipedia. 2018. Streptomycin. <https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>. Diakses tanggal: 21 Agustus 2018.
- Winarno, F. G., S. Fardiaz, dan D. Fardaiz. 1990. *Pengantar Teknologi Pangan*. PT. Gramedia, Jakarta.
- Yuda, I G.Y.W. 2018. *Pengaruh pH Awal Media dan Konsentrasi Substrat pada Proses Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Tepung Biji Kluwih dengan menggunakan Saccharomyces cerevisiae*. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana.