

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI POTENSIAL PENGHASIL ETANOL DARI INDUSTRI ARAK BALI DI KARANGASEM-BALI

*Isolation and Identification of Ethanol-Producing High Potential Bacteria from Bali Arak
Industry in Karangasem - Bali*

Yeni Veronika Simatupang, I Made Mahaputra Wijaya*, Nyoman Semadi Antara

PS Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit
Jimbaran, Badung, Kode pos : 80361; Telp/Fax : (0361) 701801.

Diterima 06 November 2018 / Disetujui 07 Desember 2018

ABSTRACT

The aim of this reasearch was to isolate and identify ethanol-producing bacteria from the Balinese arak industry. Samples were taken from three places in Bali's Karangasem Regency. Isolation was conducted by growing microorganisms from samples on Zymomonas Sukrosa Mobilis (ZSM) media to obtain pure isolates. The pure isolates were then screened using selective media to obtain pure bacteria isolates. The isolates were then screened for ethanol producing bacteria. The ethanol determenation were carried out qualitatively and quantitatively using potassium dichromate and scanning readings using UV-visible spectrophotometry. In the UV-visible spectra, the highest peak is observed at 579 nm. Seven best isolates were then grown in a 900 mL ZSM media and fermented for 10 days. The fermentation results were then distilled using a multilevel distillator. The best distillation alkohol result is $5.04 \pm 0,71$ mL of ethanol produced by isolates with the code of BE-2410. Isolate BE-2410 were obtained from coconut fibers during fermentation. From the identification results, isolates BE-2410 was Grami-negative bacteria, rod bacteria, have the ability to produce catalase enzymes, and non-motile bacteria. This study proved that the bacteria had the ability to produce ethanol.

Keywords : *Arak, ethanol, fermentation, bacteria, bacteria isolation and identification, UV visible spectroscopy*

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi bakteri penghasil etanol dari industri arak Bali. Sampel diambil dari tiga titik di Kabupaten Karangasem Bali. Isolasi dilakukan dengan menumbuhkan mikroorganisme dari sampel pada media *Zimomonas Sukrosa Medium* (ZSM) untuk memperoleh isolat murni. Isolat murni ini kemudian diskruining dengan menggunakan media selektif untuk memdapatkan bakteri. Bakteri yang berhasil tumbuh kemudian diuji dan dikarakterisasi. Pengujian dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan potasium dikromat dan pembacaan spektra menggunakan spektrofotometri *UV-visible*. Pada spektra dilakukan pengamatan terhadap *peak* tertinggi pada 579 nm. Sebanyak tujuh isolat terbaik kemudian ditumbuhkan dalam skala 900 mL dan difermentasi selama 10 hari. Hasil fermentasi kemudian didistilasi menggunakan distilator bertingkat. Hasil distilasi terbaik yaitu 5,04 mL etanol yang diproduksi oleh isolat dengan kode BE-2410. Isolat BE-2410 ini merupakan isolat yang diisolasi dari sampel sisa serabut kelapa pada saat proses fermentasi. Dari hasil karakterisasi, isolat BE-2410 merupakan bakteri Gram-negatif, berbentuk batang, memiliki

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

kemampuan menghasilkan enzim katalase, dan merupakan bakteri non-motil. Penelitian ini membuktikan bahwa terdapat bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan etanol.

Kata kunci : Arak Bali, etanol, fermentasi, bakteri, isolasi dan karakterisasi bakteri, *UV-visible spectroscopy*

PENDAHULUAN

Peningkatan jumlah penduduk mengakibatkan konsumsi energi semakin besar. Sumber energi yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan energi nasional saat ini masih didominasi oleh sumber energi fosil (Hardjosoemantri, 2000). Sumber energi fosil ini, merupakan sumber energi yang tidak dapat diperbaharui bila digunakan terus-menerus (Komarayati *et al.*, 2011). Sumber daya fosil membutuhkan waktu ribuan bahkan jutaan tahun untuk dapat terbentuk kembali (Oscar, 2014). Hasil pembakaran senyawa pada sumber energi fosil mengandung senyawa beracun yang dapat membahayakan makhluk hidup (Gunam *et al.*, 2009).

Indonesia memiliki beragam sumber daya alam (Lubis, 2017). Iklim tropis di Indonesia memungkinkan berbagai tanaman tumbuh sepanjang tahun (Umam, 2007). Tanaman merupakan salah satu bahan baku energi terbarukan (Oscar, 2014). Kondisi alam Indonesia memungkinkan banyak mikroorganisme tumbuh menyebar di alam dengan berbagai karakteristik (Hutapea, 2016). Mikroorganisme ini telah banyak dimanfaatkan masyarakat secara tradisional.

Masyarakat Bali mengetahui metode fermentasi dalam pembuatan arak menggunakan mikroorganisme. Arak bali diproduksi dengan menfermentasi nira lalu didistilasi, dan memiliki kandungan alkohol 15–45% (Sukandana, 2017). Pada proses pembuatannya, masyarakat Bali biasanya hanya menambahkan *lau* (serabut kelapa dan kulit pohon bayur) pada nira sebagai *starter* alami. Dari fakta tersebut, diperkirakan pada *lau* terdapat mikroorganisme yang mampu mengkonversi zat gula menjadi etanol.

Pada distilasi bertingkat, arak bali dapat menghasilkan etanol mencapai kadar lebih dari 80% dan berpotensi sebagai bahan bakar alternatif (Muku, 2009). Bioetanol merupakan alkohol hasil fermentasi dari bahan alami menggunakan mikroorganisme dan pada kadar tinggi dapat menjadi energi alternatif (Febriyanti *et al.*, 2016). Bioetanol dapat diproduksi dengan menfermentasi bahan mengandung glukosa. Menurut Irvan (2015), kadar etanol optimal diperoleh bukan dari konsentrasi gula tertinggi, melainkan lebih kepada peranan mikroorganisme yang digunakan.

Yudoamijoyo (1992), menemukan bahwa fermentasi skala besar paling banyak menggunakan mikroba dari golongan khamir (*yeast*) yaitu *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan alkohol. Zhang *et al.*, (2010) menemukan bahwa mikroba dari golongan bakteri seperti *Zymomonas mobilis*, memiliki beberapa kelebihan dibanding khamir, diantaranya lebih toleran terhadap pH rendah, suhu, serta terhadap etanol konsentrasi tinggi. Menurut penelitian Dien *et al.*, 2013 bakteri penghasil etanol memiliki potensi produksi etanol yang lebih efektif dan efisien. Berdasarkan fakta-fakta tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengisolasi bakteri potensial penghasil etanol dari industri arak di Bali.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan pada penelitian ini antara lain sampel yang terdiri dari nira aren, serabut kelapa, dan kulit pohon bayur. Bahan yang digunakan adalah media pertumbuhan menggunakan *Zimomonas Sukrosa Medium* (ZSM) dengan bahan 2 mg/mL *amonium*

sulfate ((NH₄)₂ SO₄), 2 mg/mL *potassium phosphate* (KH₂PO₄), 0,5 mg/mL *magnesium sulfate* (MgSO₄ 7H₂O₄), 10 mg/mL *yeast extract*, 20 mg/mL glukosa, dan akuades. ZSMA dibuat dengan penambahan 15 mg/mL agar. Media selektif dibuat dengan penambahan 0,083 mg/mL *nysatin* sebagai antifungal. Bahan pengujian dan tambahan yaitu NaCl, gliserol 40%, 0,22 g *kalium dichromate* (K₂Cr₂O₇), 100 mL *Sulfuric acid* (H₂SO₄), 14 g/L Media *sulfide indole motility* (SIM), bahan pewarnaan Gram terdiri dari kristal violet, safranin, iodin dan alkohol.

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain botol kaca sebagai wadah (duran), gelas ukur, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, plastik *high density polyethylene* (HDPE), gunting, *coolbox*, sarung tangan, plastik, *laminar flow*, perekat, inkubator, *vortex*, pipet mikro, bunsen, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, *shaker*, mikroskop, *spektrofotometri UV-visible*.

Pelaksanaan Penelitian

Preparasi Media

Media pertumbuhan disiapkan terlebih dahulu menggunakan *Zymomonas Sukrosa Medium* (ZSM) yang dibuat dengan bahan 2 mg/mL *amonium sulfate* ((NH₄)₂ SO₄), 2 mg/mL *potassium phosphate* (KH₂PO₄), 0,5 mg/mL *magnesium sulfate* (MgSO₄ 7H₂O₄), 10 mg/mL *yeast extract*, 20 mg/mL glukosa, dan akuades. ZSMA dibuat dengan penambahan 15 mg/mL agar. Media selektif dibuat dengan penambahan 0,083 mg/mL *nysatin* sebagai antifungal. Reagen pengujian menggunakan potasium dikromat yang dibuat dengan melarutkan 0,22 g *kalium dichromate* (K₂Cr₂O₇) yang telah dioven selama 180 menit (200 °C) dalam 100 mL *Sulfuric acid* (H₂SO₄).

Isolasi Bakteri dari Industri Arak

Sampel bahan padat dipotong kecil terlebih dahulu untuk memperoleh berat 1 g dan sampel cair dihomogenkan sebelum

diinokulasi pada media cair ZSM. Sampel kemudian diinokulasi pada media cair ZSM dalam tabung reaksi, bagian mulut tabung reaksi ditutup kapas steril dan diberi plastik HDPE panjang yang berfungsi sebagai penampung gas CO₂ lalu bagian mulut tabung reaksi tersebut disegel rapat dengan *rubber tape* agar diperoleh kondisi kedap udara. Sampel kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C dan dilakukan pengamatan produksi gas CO₂. Setelah masa fermentasi selesai sampel dihomogenkan menggunakan *voetex*, setelah itu dilakukan pengenceran bertingkat 10⁻¹ hingga 10⁻⁷. Pengenceran dilakukan dengan cara mengambil 0,5 mL sampel dan dimasukkan dalam 4,5 mL NaCl 0,85% steril lalu dihomogenkan dengan *vortex* dan didapatkan hasil pengenceran 10⁻¹. Dari hasil pengenceran 10⁻¹ diambil 0,5 mL dan dimasukkan dalam 4,5 mL NaCl 0,85% steril kemudian dihomogenkan sehingga didapatkan hasil pengenceran 10⁻² dan begitu selanjutnya hingga diperoleh hasil pengenceran 10⁻⁷. Hasil pengenceran 10⁻⁵, 10⁻⁶, dan 10⁻⁷ kemudian diinokulasi pada media ZSM padat dengan metode sebar menggunakan batang gelas bengkok dan diinkubasi 48 jam pada suhu 30 °C (Pugazhendy *et al* 2013).

Mikroba yang tumbuh berbeda secara fisik (bentuk, warna, tepian dan elevansi) selanjutnya dimurnikan dengan metode kuadran gores (*quadran streak*) menggunakan jarum ose untuk mengambil mikroba kemudian digores pada media ZSM padat yang telah diberi antifungal sebagai media selektif (Moheni *et al.*, 2016). Hasil goresan isolat kemudian diinkubasi 48 jam pada suhu 30 °C. Penambahan antifungal pada media bertujuan untuk penapisan mikroorganisme agar hanya bakteri yang dapat tumbuh pada media selektif.

Uji Bakteri Penghasil Etanol

Uji bakteri penghasil etanol bertujuan untuk menapisan bakteri yang diperoleh

pada tahap isolasi sehingga diperoleh bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan etanol. Setelah diperoleh bakteri yang dapat tumbuh pada media selektif, bakteri tersebut kemudian diinokulasi pada media ZSM cair dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30 °C untuk selanjutnya dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif menggunakan potasium dikromat.

Pembuatan Standar

Sebelum melakukan uji kualitatif dan kuantitatif menggunakan potasium dikromat, terlebih dahulu dilakukan pembuatan standar. Standar dibuat untuk mengetahui perbandingan pencampuran yang tepat antara supernatan dan reagen potasium dikromat juga untuk menentukan panjang gelombang pembacaan absorbansi pada uji kuantitatif. Pertama, dilakukan pemindaian menggunakan *UV-visible* spektrofotometer pada media ZSM, potasium dikromat, etanol yang telah dicampur dengan reagen potasium dikromat, media ZSM yang telah dicampur dengan potasium dikromat, dan media ZSM mengandung alkohol yang dicampur dengan reagen potasium dikromat. Hasil pemindaian kemudian dianalisis untuk menentukan perbandingan pencampuran dan pembacaan *peak* yang tepat.

Uji Kualitatif

Setelah masa fermentasi selesai, supernatan isolat diambil menggunakan metode sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit. Pada uji kualitatif, supernatan dicampurkan dengan reagen potasium dikromat sesuai perbandingan yang diperoleh dari hasil pembuatan standar, kemudian diinkubasi selama 30 menit dan diamati perubahan warna yang terjadi.

Uji Kuantitatif

Isolat hasil uji kualitatif kemudian digunakan untuk uji kuantitatif dengan pemindaian *UV-visible* untuk memperoleh

spektra yang dihasilkan pada 300-700 nm dan dibaca menggunakan aplikasi *Igor pro 8.1*. Dari spektra yang dihasilkan ditentukan tujuh kandidat isolat penghasil etanol terbaik melalui pengamatan *peak* tertinggi pada spektra yang selanjutnya akan digunakan pada tahap produksi etanol.

Produksi Etanol

Sebanyak tujuh kandidat isolat yang telah dipilih berdasarkan uji kuantitatif etanol digunakan untuk produksi etanol pada skala substrat 900 mL. Substrat menggunakan media ZSM steril dengan kandungan glukosa 20% dan difermentasi selama 10 hari pada suhu ruang dengan kondisi anaerob. Tujuh isolat terpilih diremajakan terlebih dahulu pada masing-masing 4 tabung reaksi berisikan media ZSM 5 mL dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30 °C. Setelah masa inkubasi pada tabung reaksi selesai, hasil peremajaan kemudian diinokulasikan masing-masing pada 2 erlenmeyer berisikan media ZSM 900 mL lalu diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan masa peremajaan.

Isolat yang tumbuh hasil perbanyakkan sel pada erlenmeyer disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit. Pelet (sel) dicuci dengan membuang supernatan terlebih dahulu lalu menambahkan larutan NaCl 0,85% dan disentrifugasi kembali dengan metode yang sama sampai dua kali. Kemudian pelet (sel) di *adjust* (tingkat kekeruhan) dengan $OD_{660} \pm 5$ agar jumlah starter yang diinokulasikan sama jumlahnya (Gunam *et al.*, 2018). Sel isolat sebanyak 9 mL diinokulasikan pada masing-masing 3 botol substrat yang telah disediakan (900 mL), lalu dilakukan masa inkubasi selama 10 hari pada suhu ruang dan kondisi anaerob. Hasil fermentasi kemudian didistilasi menggunakan destilator bertingkat (2 *stage*). Distilat yang diperoleh kemudian dianalisis kadar etanolnya dan dihitung total etanol.

Karakterisasi Bakteri Potensial Penghasil Etanol

Isolat terbaik berdasarkan hasil produksi etanol kemudian dikarakterisasi berdasarkan morfologi (makroskopis dan mikroskopis) dan biokimia. Pengkarakterisasian morfologi diamati secara makroskopis, mikroskopis dan motilitas. Pengkarakterisasian biokimia dilakukan dengan uji katalase untuk mengetahui kemampuan isolat menghasilkan enzim katalase.

Uji Morfologi

Pada pengkarakterisasian morfologi dilakukan uji makroskopis, uji mikroskopis, dan uji motilitas. Uji makroskopis dilakukan dengan mengamati penampakan bakteri yang tumbuh sesuai tabel panduan Castell-Polychromos 9216 meliputi ukuran, warna, bentuk koloni, elevansi, dan tepian koloni (Cappucino, 2013).

Uji mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan Gram. Pada pengujian ini terlebih dahulu disiapkan kaca preparat dan ditandai dengan spidol membentuk lingkaran dengan garis tengah sekitar 0,5 cm pada sisi bawah kaca preparat. Kultur murni yang tumbuh pada permukaan media padat diambil dengan menggunakan jarum ose dan dioles pada permukaan kaca preparat kemudian ditetesi akuades steril untuk menyebarkan sel secara merata pada lingkaran kaca preparat. Olesan bakteri difiksasi dengan menggunakan bunsen hingga menjadi kering. Kemudian ditetesi larutan kristal ungu pada olesan bakteri hingga semua olesan terendam dan didiamkan selama satu menit. Setelah satu menit, olesan dicuci dengan akuades steril dan dikeringkan dengan tisu. Setelah itu, diberi larutan lugol dan didiamkan selama dua menit. Kemudian dicuci menggunakan etanol selama 4–5 detik, dan selanjutnya dibilas menggunakan akuades. Setelah kering larutan safranin ditetaskan pada preparat dan dibiarkan terendam selama satu menit.

Kemudian dicuci menggunakan akuades steril dan dikeringkan. Kaca preparat kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali (Madaniyah, 2013).

Pengamatan motilitas dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri bergerak (memiliki alat gerak). Uji motilitas dilakukan dengan menginokulasikan isolat bakteri dengan cara menusukkan jarum ose secara tegak lurus hingga setengah tinggi media *Sulfit Indol Motility* (SIM) pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C, setelah itu diperhatikan jejak pergerakan bakteri (Hanafiarti, 2015).

Uji Biokimia

Pada uji biokimia dilakukan dengan metode uji enzim katalase. Pengujian enzim katalase dilakukan menggunakan hidrogen peroksida (H₂O₂). Isolat yang tumbuh pada permukaan media ZSM padat diambil menggunakan jarum ose dan dioleskan pada cawan petri steril lalu ditetesi hidrogen peroksida (H₂O₂) dan diamati. Jika pada isolat bakteri yang ditetesi terbentuk gelembung-gelembung udara, maka bakteri tersebut memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase (positif katalase) (Kitai *et al.*, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Bakteri dari Industri Arak

Pengambilan sampel dilakukan di 3 lokasi, dari lokasi pertama (Desa Tri Eka Buana) sebanyak 3 sampel, dari lokasi kedua (Desa Tri Eka Buana) sebanyak 8 sampel, dan dari lokasi ketiga (Desa Seraya Barat) sebanyak 3 sampel. Dari 14 sampel tersebut hanya 10 sampel yang mengandung mikroorganisme dan dapat dilanjutkan ke tahap berikutnya. Sepuluh sampel tersebut adalah sampel yang menunjukkan karakteristik pertumbuhan seperti menghasilkan gas CO₂ dan perbanyakan sel

pada media ZSM cair. Dari sepuluh sampel ini diperoleh 74 isolat mikroorganisme dan diberi kode berdasarkan lokasi pengambilan masing masing isolat. Kemudian 74 mikroorganisme tersebut ditumbuhkan pada media selektif ZSM padat yang telah diberi antifungal (Nystatin) untuk penapisan isolat bakteri. Sebanyak 33 isolat bakteri berhasil tumbuh pada tahapan ini dengan kemampuan pertumbuhan yang berbeda (Tabel 1).

Tabel 1. Kemampuan tumbuh isolat yang lolos penapisan pada media selektif

No	Kode Isolat	Keterangan Pertumbuhan
1.	BE-115	++
2.	BE-227 A	++++
3.	BE-226	++
4.	BE-2210	+++
5.	BE-253	++++
6.	BE-2211	+++
7.	BE-122	+++
8.	BE-123	+++
9.	BE-225	+++
10.	BE-224	+++
11.	BE-124	+
12.	BE-125	++++
13.	BE-242	++++
14.	BE-284	++++
15.	BE-272	++++
16.	BE-282	++++
17.	BE-276	++++
18.	BE-246	++++
19.	BE-244	++++
20.	BE-227	++++
21.	BE-2410	++
22.	BE-279	++++
23.	BE-285	++++
24.	BE-229	+++
25.	BE-274	++++
26.	BE-217	++++
27.	BE-221	++
28.	BE-126	+
29.	BE-228 A	++++
30.	BE-228 B	++++
31.	BE-223 A	+++
32.	BE-223 B	+++

33. BE-273 +

Antifungal akan menghambat pertumbuhan jamur (Hamidah, 2013). Antifungal akan menghambat pertumbuhan jamur dengan merusak dinding sel jamur (Muchler, 1999). Antifungal bekerja dengan menghambat biosintesis kitin sehingga fungsi dinding sel terganggu (Frangkin *et al.*, 2005). Selain itu anti fungal juga dapat menghambat biosintesis glukosa yang berfungsi mensintesis glukosa sebagai sumber energi (Frangkin *et al.*, 2005). Selain merusak dinding sel, antifungal akan merusak membran sel dengan cara merusak fungsi mannoprotein, berinteraksi dengan ergosterol sehingga menyebabkan kebocoran membran sel (Jawetz *et al.*, 2005). Dengan demikian, pada penapisan yang dilakukan hanya bakteri yang tumbuh.

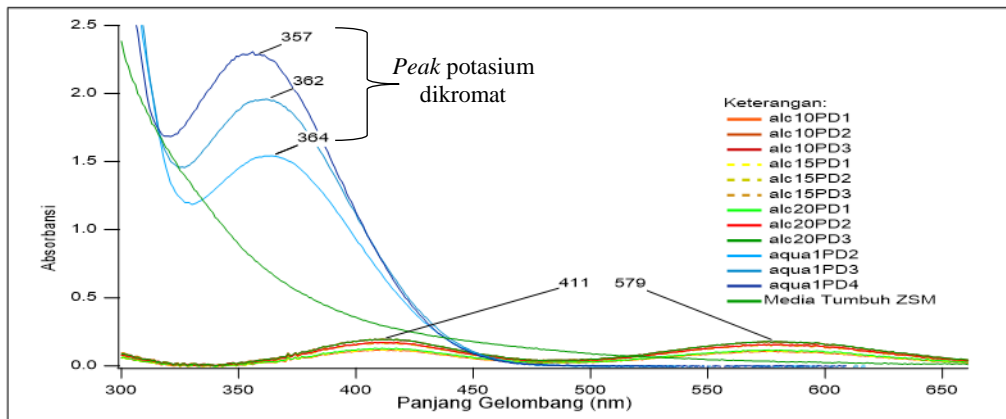
Hasil Uji Bakteri Penghasil Etanol Standar pengamatan

Pembuatan standar dilakukan sebelum pengujian kuantitatif alkohol dilakukan. Standar dibuat dengan mengamati perubahan puncak (*peak*) pada larutan potasium dikromat, media, dan alkohol menggunakan *Spektrofotometri UV-visible*. Pada Gambar 1 *peak* potasium dikromat berada di bawah 400 nm dan grafik media memiliki spektra. Pada gambar diatas juga diperlihatkan bahwa reaksi antara alkohol dan reagen terbentuk dua *peak* pada titik 411 nm dan 579 nm. Namun pada grafik tersebut belum dipastikan panjang gelombang yang dapat digunakan untuk analisis karena tidak terdapat perbedaan signifikan pada grafik yang terbentuk. Maka dilakukan percobaan dengan kombinasi perbandingan volume antar ZSM dan reagen (Gambar 2).

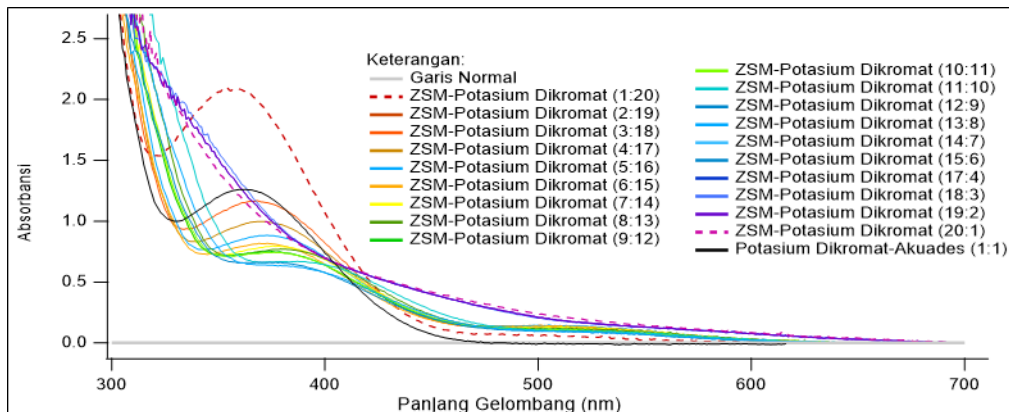
Pada spektra *UV-visible* (Gambar 2) dapat diamati bahwa spektra campuran dengan volume ZSM dominan (20:1) akan menyerupai bentuk spektra ZSM begitu juga pada spektra dengan volume potasium dikromat dominan (1:20). Pada spektra

dengan perbandingan lain dapat dilihat bahwa media dapat bereaksi dengan reagen dan menyebabkan pergeseran *peak* spektra. Perbandingan volume campuran ZSM dan potasium dikromat yang terbaik dapat diamati pada perbandingan 3:18-18:3.

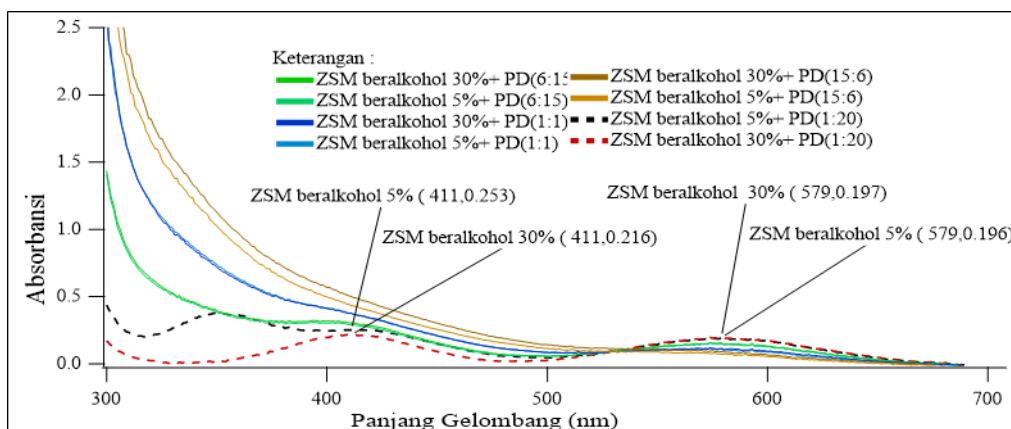
Berdasarkan hasil tersebut, kemudian dipilih perbandingan volume 6:15; 1:1; dan 15:6 untuk diuji coba pada media mengandung alkohol 5% dan 30%. Spektra hasil percobaan tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 1. *Spectra* reaksi antara alkohol dan potasium dikromat



Gambar 2. *Spectra* reaksi antara ZSM dan reagen.



Gambar 3. *Spectra* reaksi ZSM beralkohol dengan reagen

Pada diatas dilihat bahwa terbentuk *peak* pada 411 nm dan 579 nm. Namun, *peak* pada 411 nm tidak konsisten, kemudian dilakukan penambahan reagen sehingga perbandingan volume reagen dan media menjadi 1:20. Setelah dilakukan penambahan potasium dikromat hingga perbandingan 1:20, dari gambar di atas dapat diamati terbentuk *peak* baru pada spektra media mengandung alkohol 5% yang menunjukkan gugus potasium dikromat berlebih dan *peak* tersebut tidak terdapat pada spektra media mengandung alkohol 30% yang berarti tidak ditemukan gugus potasium berlebih. *Peak* yang terbentuk pada 411 nm juga tetap tidak konsisten. Berdasarkan hasil spektra di atas kemudian ditentukan titik pembacaan *peak* yang akan digunakan, yaitu pada 579 nm, karena pada titik ini spektra alkohol 30% memiliki *peak* tertinggi. Hal ini juga didukung oleh penelitian Horia *et al.*(2014) yang menyatakan bahwa nilai absorbansi alkohol dan potasium dikromat dapat diamati pada 520 nm–610 nm. Berdasarkan hal-hal tersebut maka pencampuran supernatan dan potasium dikromat dilakukan dengan perbandingan 1:20 dan pembacaan *peak* spektra dilakukan di panjang gelombang 579 nm.

Hasil Uji Kualitatif Etanol

Pada pengujian kualitatif, supernatan hasil fermentasi yang direaksikan dengan potasium dikromat akan berubah warna dari jingga menjadi hijau kebiruan bila supernatan terindikasi mengandung gugus etanol. Adapun hasil uji kualitatif dapat dilihat pada Table 2.

Dari hasil pengamatan etanol kualitatif tersebut, terdapat lima warna pada hasil akhir diantaranya tetap berwarna jingga (tidak menunjukkan perubahan warna), jingga kehijauan, hijau, hijau kebiruan, dan biru. Dari keempat warna yang menunjukkan perubahan warna dapat dilihat bahwa supernatan mengalami perubahan akibat

reaksi kimia. Reaksi kimia ini dapat terjadi karena rantai karbon pada reagen potasium dikromat berikatan dengan gugus -OH pada supernatan hasil fermentasi bakteri dan merubah warna zat yang semula jingga menjadi hijau ataupun biru.

Tabel 2. Hasil Uji Kualitatif Etanol

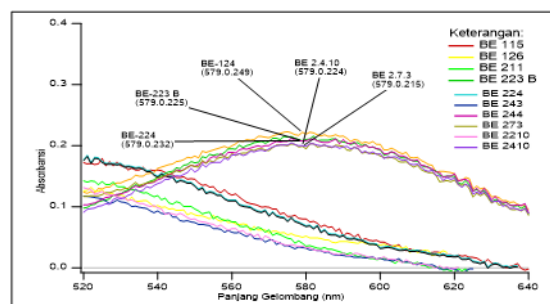
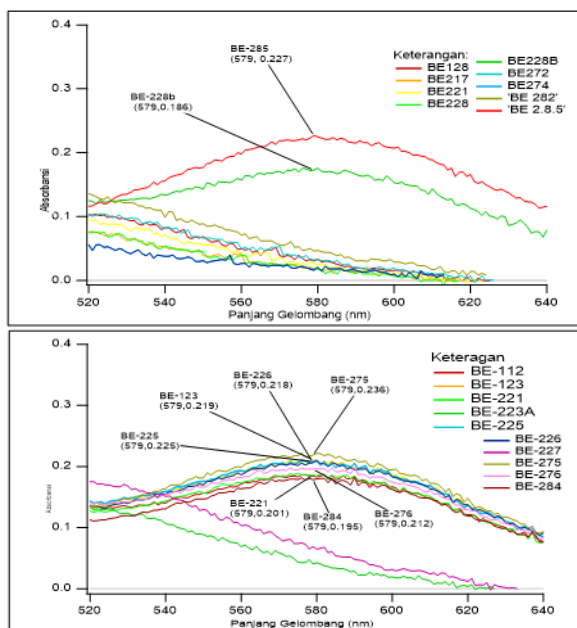
No	Kode Isolat	Warna	
		Awal	Warna Akhir
1.	BE-115	Jingga	Jingga Kehijauan
2.	BE-227A	Jingga	Jingga
3.	BE-226	Jingga	Biru
4.	BE-2210	Jingga	Jingga
5.	BE-253	Jingga	Jingga
6.	BE-2211	Jingga	Jingga Kehijauan
7.	BE-122	Jingga	Jingga Kehijauan
8.	BE-123	Jingga	Biru
9.	BE-225	Jingga	Biru
10.	BE-224	Jingga	Jingga
11.	BE-124	Jingga	Hijau Kebiruan
12.	BE-125	Jingga	Jingga
13.	BE-242	Jingga	Jingga
14.	BE-284	Jingga	Biru
15.	BE-272	Jingga	Jingga
16.	BE-275	Jingga	Biru
17.	BE-276	Jingga	Hijau
18.	BE-246	Jingga	Hijau Kebiruan
19.	BE-244	Jingga	Biru
20.	BE-227	Jingga	Hijau Kebiruan
21.	BE-2410	Jingga	Biru
22.	BE-279	Jingga	Jingga
23.	BE-285	Jingga	Biru
24.	BE-229	Jingga	Jingga
25.	BE-274	Jingga	Hijau
26.	BE-217	Jingga	Jingga
27.	BE-221	Jingga	Jingga
28.	BE-126	Jingga	Jingga
29.	BE-228A	Jingga	Jingga
30.	BE-228B	Jingga	Jingga
31.	BE-223A	Jingga	Jingga
32.	BE-223B	Jingga	Biru
33.	BE-273	Jingga	Jingga

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Jamaliah (2011) bahwa potasium dikromat akan berikatan pada gugus -OH pada ikatan

rantai karbon dan membentuk aldehid yang kemudian teroksidasi lebih lanjut membentuk asam karboksilat dan ion $Cr_2O_7^{2-}$ yang berwarna jingga tereduksi menjadi ion Cr^{3+} berwarna hijau kebiruan.

Hasil Uji Kuantitatif Etanol

Uji kuantitatif alkohol dilakukan dengan mencampurkan supernatan hasil fermentasi dengan potasium dikromat kemudian dilakukan pemindaian menggunakan spektrofotometri *UV-visible*. Hasil spektra spektrofotometri *UV-visible* dapat dilihat pada Gambar 4 yang telah dibagi berdasarkan kelompok pengerjaan. Pada uji kuantitatif alkohol sebanyak 14 spektra diindikasikan menghasilkan gugus alkohol (-OH), sedangkan spektra lain menyerupai spektra potasium dikromat (tidak terindikasikan mengandung gugus alkohol). Dari hasil spektra kemudian dipilih tujuh isolat yang memiliki nilai *peak* tertinggi pada 579 nm. Tujuh isolat terbaik tersebut dikorelasikan dengan data analisis uji kualitatif alkohol yang telah dilakukan sebelumnya. Hasil pemilihan tujuh isolat terbaik ini dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 4. *Grup* pengamatan *spectra* reaksi supernatan isolat dengan reagen

Tabel 3. Isolat Potensial Hasil Uji Kuantitatif

No	Kode	Nilai Absorbansi	Keterangan kualitatif
1.	BE-124	0,249	Hijau Kebiruan
2.	BE-275	0,236	Biru
3.	BE-244	0,232	Biru
4.	BE-285	0,227	Biru
5.	BE-223B	0,225	Biru
6.	BE-225	0,225	Biru
7.	BE-2410	0,224	Biru

Dari 14 spektra yang terindikasikan mengandung gugus etanol (-OH) kemudian dipilih tujuh spektra dengan nilai absorbansi tertinggi. Pada data di atas dapat dilihat bahwa nilai absorbansi tujuh isolat terbaik linier dengan hasil uji kualitatif yang sebelumnya telah dilakukan, dan secara kimiawi dapat diamati terjadi oksidasi gugus -OH pada supernatan yang mengakibatkan terjadinya perubahan warna. Tujuh isolat ini kemudian ditumbuhkan pada skala produksi yang lebih besar (900 mL) selama 10 hari.

Hasil Produksi Etanol

Produksi etanol dilakukan dengan menfermentasi substrat berupa media ZSM dengan kadar glukosa 20% menggunakan isolat terpilih dengan $OD_{660} \pm 5$ agar jumlah starter yang diinokulasikan sama jumlahnya (Gunam *et al.*, 2018). Hasil fermentasi selama 10 hari ini kemudian didistilasi bertingkat (dua stage) dan dihitung total etanolnya. Dari hasil produksi dapat dilihat bahwa selisih total padatan terlarut

berbanding lurus dengan total etanol hasil produksi. Hal tersebut dapat terjadi karena glukosa yang terlarut dalam media dikonversi oleh mikroorganisme menjadi etanol. Nilai selisih total padatan terlarut tertinggi adalah

$2,01 \pm 0,21\%$ brix linier dengan total etanol yang dihasilkan $5,04 \pm 0,71$ mL pada isolat BE-2410. Hasil total etanol dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Analisis Etanol

Kode Isolat	Padatan Terlarut Awal (%brix)	Padatan Terlarut Akhir (%brix)	Selisih Total Padatan Terlarut (%brix)	Total Etanol (mL)
BE-224	$18,75 \pm 0,05$	$18,53 \pm 0,20$	$0,22 \pm 0,16$	$0,43 \pm 0,28$
BE-275	$18,76 \pm 0,12$	$17,73 \pm 0,13$	$1,03 \pm 0,13$	$2,91 \pm 0,61$
BE-244	$18,23 \pm 0,06$	$17,02 \pm 0,59$	$1,20 \pm 0,59$	$4,67 \pm 0,98$
BE-285	$17,86 \pm 0,05$	$16,97 \pm 0,29$	$0,89 \pm 0,29$	$3,53 \pm 1,14$
BE-223 B	$18,05 \pm 0,05$	$17,76 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,12$	$0,79 \pm 0,36$
BE-225	$17,75 \pm 0,08$	$17,56 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,21$
BE-2410	$18,53 \pm 0,03$	$16,53 \pm 0,24$	$2,01 \pm 0,21$	$5,04 \pm 0,71$

Nilai selisih total padatan terlarut terendah adalah $0,19 \pm 0,07\%$ brix berbanding lurus dengan total etanol yang dihasilkan. Nilai selisih padatan terlarut merupakan penurunan kadar glukosa terlarut dalam media pertumbuhan. Menurut Reed *et al.* (1991) dalam Fadilah (2018) penurunan total padatan terlarut terjadi karena proses pemecahan glukosa menjadi alkohol sehingga kandungan glukosa mengalami penurunan yang mengakibatkan nilai total padatan terlarut juga menurun. Menurut Yang *et al.*, (2009) mikroorganisme dari kelompok bakteri, seperti *Zymomonas* mampu menfermentasi glukosa, menghasilkan etanol dan karbondioksida. Dari keseluruhan hasil produksi dapat diamati bahwa nilai total etanol yang diperoleh cenderung kecil. Terdapat dua kemungkinan yang menyebabkan hal ini terjadi, kemungkinan pertama adalah bakteri yang diisolasi telah banyak berkurang akibat penambahan serabut kelapa pada awal fermentasi, kandungan fenolik pada serabut kelapa bersifat anti bakteri (Thakur *et al.*, 2015). Kemungkinan lain adalah tidak terdapatnya bakteri yang berpotensi memproduksi

alkohol kadar tinggi di lokasi pengambilan sampel.

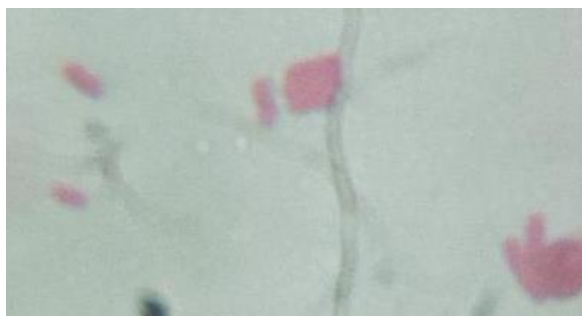
Hasil Karakterisasi Bakteri Potensial Penghasil Etanol

Bakteri paling potensial yang diperoleh dari serangkaian proses isolasi adalah bakteri dengan kode BE-2410. Pengkarakterisasian bakteri paling potensial dilakukan dengan uji morfologi dan uji biokimia.

Hasil uji morfologi meliputi makroskopis, mikroskopis dan motilitas. Pengamatan makroskopis pada isolat bakteri BE-2410 menunjukkan bahwa bakteri memiliki karakteristik makroskopis berwarna bening kekuningan, berukuran <1 mm, berbentuk bulat (*circular*), permukaan sedikit menonjol, hampir rata (*convex*), dan tepian berbentuk melengkung rapih.

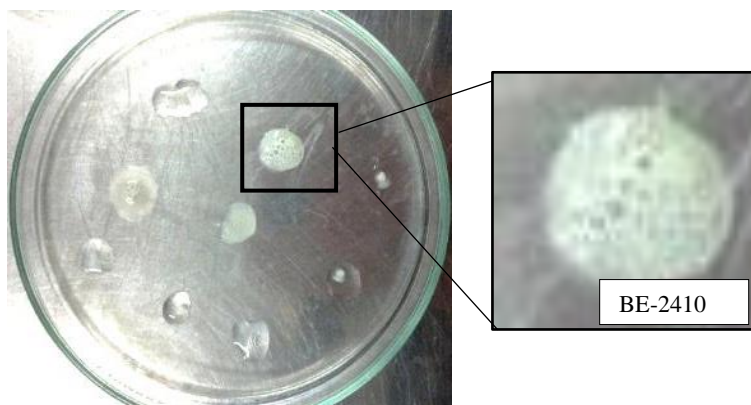
Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan Gram bertujuan untuk menentukan suatu bakteri termasuk Gram-positif ataupun Gram-negatif. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan bakteri BE-2410 merupakan bakteri Gram-negatif. Hal ini dapat dilihat karena hasil pewarnaan Gram menunjukkan bakteri BE-

2410 tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet sehingga warna yang tampak pada mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali adalah warna merah muda, selain itu dari hasil pewarnaan Gram dapat dilihat bentuk bakteri dan BE-2410 merupakan bakteri berbentuk batang (basil). Hasil pewarnaan isolat bakteri BE-2410 dapat dilihat pada Gambar 5.

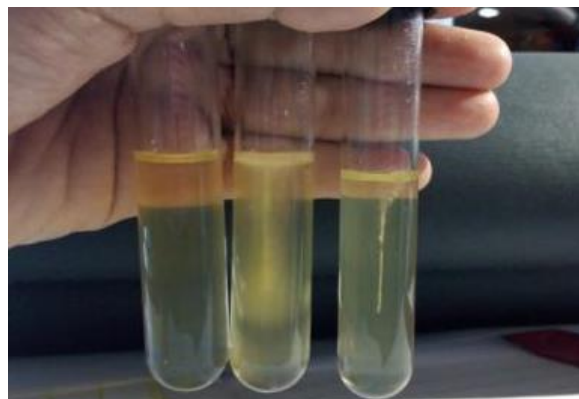


Gambar 5. Hasil pewarnaan Gram isolat bakteri BE-2410

Pada uji motilitas, bakteri yang memiliki alat gerak (kemampuan untuk bergerak) akan ditandai dengan hasil pertumbuhan pada media *Sulfide Indole Motility* (SIM). Bakteri yang memiliki alat gerak akan tumbuh menyebar dari garis tusukan dan meninggalkan jejak menyerupai akar, sedangkan bakteri yang tumbuh tidak menyebar (hanya tetap pada garis tusukan) diindikasikan merupakan bakteri non-motil. Bakteri BE-2410 merupakan bakteri non-motil karena hanya tumbuh pada garis tusukan saat diinokulasi pada media SIM seperti gambar berikut ini.



Gambar 7. Hasil uji katalase



Gambar 6. Hasil uji motilitas bakteri BE-2410 pada media SIM

Uji biokimia dilakukan dengan metode uji katalase. Uji katalase dilakukan untuk mengidentifikasi kemampuan isolat menghasilkan enzim katalase. Isolat bakteri yang dioles pada cawan petri steril dan ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) kemudian dilakukan pengamatan. Enzim katalase akan memecah ikatan H_2O_2 menjadi air dan oksigen. Terbentuknya oksigen ini dapat ditandai dengan munculnya gelembung udara pada hasil test (Kitai *et al.*, 2005). Kemampuan isolat memecah H_2O_2 yang bersifat toksik dan terbentuk saat fermentasi ini menandakan bahwa isolat dapat tumbuh pada kondisi anaerob (Dewi, 2013). Berdasarkan hasil uji katalase, bakteri BE-2410 merupakan bakteri penghasil enzim katalase karena, saat ditetesi hidrogen peroksida (H_2O_2) isolat memberi respon terbentuknya gelembung seperti Gambar 7.

KESIMPULAN

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Terdapat bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan etanol dari proses fermentasi. Isolat bakteri yang diisolasi dari industri arak Bali di Kabupaten Karangasem memiliki kemampuan menghasilkan etanol yang berbeda.
2. Kemampuan isolat bakteri yang tertinggi adalah 5,04 mL setelah fermentasi selama 10 hari oleh isolat BE-2410 yang diisolasi dari serabut kelapa saat fermentasi nira berlangsung pada lokasi kedua.
3. Setelah dikarakterisasi, isolat bakteri BE-2410 merupakan bakteri Gram-negatif berbentuk batang non-motil dan memiliki kemampuan menghasilkan enzim katalase. Karena isolat mampu menghasilkan enzim katalase, BE-2410 merupakan bakteri yang optimum hidup pada kondisi aerobik atau aerobik fakultatif.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disarankan untuk dilakukan penelitian lanjutan guna mengetahui spesies isolat bakteri penghasil bioetanol yang diisolasi dari industri arak Bali. Selain itu, bila penelitian baru dilakukan untuk mengisolasi bakteri dari lokasi lain, disarankan agar sampel yang diperoleh tidak mengandung senyawa fenolik yang memiliki sifat antibakteri alami dan pengambilan sampel sebaiknya dilakukan secara anaerobik.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriwi, N.L. 2015. Bioenergi: Biodiesel dan Bioetanol. Fakultas MIPA Universitas Udayana, Bali.
- Cappucino, J.G., S.Natalie. 2001. A Labory Manual. Pearson. London.
- Dadds, M.J.S., dan P.A. Martin. 1973. The Genus *Zymomonas*- A Review. Tropical Product Institute.p. 386-391.
- Dewi, A. Krishna. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas *staphylococcus aureus* terhadap *amoxicilin* dari sampel susu kambing peranakan ettawa (pe) penderita mastitis di wilayah girimulyo, kulonprogo. Yogyakarta.
- Eddy, C.K., K.D. Noel, dan O.H. Smith. 1998. Isolation of auxotrophs and analysis of regulation of tryptophan biosynthesis in *zymomonas mobilis*. Arch microbiol. 149: 561-564.
- Elevri, P.A, dan S.R.Putra.2006. Produksi etanol menggunakan *saccharomyces cerevisiae* yang diamobilisasi dengan akar batang. Akta kimindo. Akta kimindo. 1(2):105-114.
- Estevez, C., C. Muro., C.M. Abate., D.A., ad F.Sinerriz. 1997. Improved Tecnicue for the Isolation of Stable Mutants of *Zymomonas mobilis*. Folia Microbiol Journal . 42(6): 562-564).
- Febriyanti, E.A., C. N. Sari., dan Adisyahputra. 2016. Efektivitas Media Pertumbuhan Khamir Komersial (*Saccharomyces cerevisiae*) untuk Fermentasi Bioetanol dari Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*). Biologi UNJ Press.
- Fadilah, U. 2018. Pengaruh pH awal media dan lama fermentasi terhadap produksi etanol dari tepung biji nangka dengan menggunakan *saccharomyces cereviceae*. Fakultas Teknologi Pertanian Unud.

- Franklin, T.J. & G.A. Snow., 2005, Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action., Edisi 6 Spinger Science and Business Media, Inc Inggris.
- Gunam, I.B.W., A.S Duniaji., dan I.G.A.L Triani. 2009. Biodesulfurisasi minyak bumi dengan menggunakan bakteri pendegradasi sulfur dengan teknik sel terimobilisasi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahap II. Universitas Udayana
- Gunam, I.B.W., N.N.S. Ardani, N.S. Antara. 2018. Pengaruh konsentrasi starter dan gula terhadap karakteristik wine salak. Jurnal Ilmiah Teknologi Pertanian AGROTECHNO. 3(1):287-297
- Haffie, Thomas L., P.W. Louie dan G.G. Khachatourians. 1985. Isolation of noninhibitiro, strain *zymomonas mobilis*. Applied and Enviromental Mictobiology Journal. 49 (4): 1007-1009.
- Hamidah. 2013. Isolasi dan identifikasi isolat actinomycetes dari rhizosfer padi (*Oriza sativa L.*) sebagai penghasil antifungi. Fakultas Framasi Universitas Mahamadyah Surakarta.
- Hardjasono, K. 2000. Hukum Tata Lingkungan: Gajah Mada University Press
- Hutapea, M. 2016. Solusi Listrik of Grid Berbasis Energi Terbarukan di Indonesia: Kerangka Regulasi Program. Kementrian Energi dan Sumber Daya Mineral.
- Irvan., P. P., dan B. Trisakti. 2015. Pembuatan bioetanol dari tepung ampas tebu melalui proses hidrolisis termal dan fermentasi: pengatuh ph, jenis ragi dan wajtu fermentasi. Jurnal Teknik Kimia USU. 4(2): 27-31
- Ivanova, V., P. Petrova, dan J. Hristov. 2011. Application in the ethanol fermentation of immobilized yeast cell in matrix of alginate/magnetic nanopartiles, on chitosan-magnetite microparticle and cellulose-nanopartivles. Internatioal Review of Chemical Engineering Journal. 3 (2): 289-299.
- Jamliah, M. 2011. Sintesis etanol melalui reaksi hidrogrnasi heksil asetat dengan menggunakan berbagai katalis. Jurnal Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta
- Kitai, S., Shimizu, A., kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R., dan Inamoto, T. 2005. Prevalense and characterization of *staphylococcus aureus* and Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in Retail raw chicken Meat Throughout. Japan Journal Vet Med Sci. Vol. 67, No. 3, hal. 269-74.
- Kholiq, I. 2015. Pemanfaatan energi alternatif sebagai sumber energi terbarukan untuk mendukung subsitusi 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.
- Lohenapessy, S., I.B.W. Gunam., I.W. Arnata. 2017. Pengaruh berbagai merek Dried yeast (*saccharomyces sp.*) dan pH awal fermentasi terhadap karakteristik wine salak Bali. Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian.

22(2): 63-72

- Lubis, A. 2007. Energi terbarukan dalam pembangunan berkelanjutan. *Jurnal Teknik Lingkungan*. Jakarta. 8(2):115-162.
- Mohamed, H.A., P.Y. Khashabaa., dan R.Y. Shahin. 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.
- Mosheni, M., H. Ibrahim., dan M.J. Chsichi. 2016. Isolation and optimization of ethanol producing bacteria from natural environments of mazandaran province in Iran. *Jurnal of Genetic Resources*. 1(1): 35-44
- Muku, I.D., M. Krisna dan I Gusti K.S. 2009. Pengaruh rasio komposisi terhadap unjuk kerja mesin empat langkah menggunakan arak bali sebagai bahan bakar. *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin*. Universitas Udayana Cakra M. 3(1): 26-32.
- Oscar, A.W. 2014. Penetapan prioritas penyediaan energi primer komersial di Indonesia berdasarkan pendekatan metoda analytical hierarchy process. *Seminar Nasional Fakultas Teknik Geologi Universitas Padjajaran*,

Bandung.

- Sukadana, I.G.K. 2017. Combustion characteristics of gas fuel basic materials arak Bali. *Journal of Mechanical and Civil Engineering*. 14 (3): 81-85.
- Umam, K. 2007. Analisis potensi sumber energi alternatif dan implikasinya terhadap sosial ekonomi masyarakat Indonesia. *Fakultas Teknik Universitas Negeri Semarang*.
- Waluyo, L., 2009. *Mikrobiologi Lingkungan*. Malang. UMM Press.
- 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.
- Yudoamidjoyo, M., A.A. Darwis., dan E.G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Edisi 1 cetakan 1. Rajawali Press, Jakarta.
- Zhang. 2010. Effect of sex on meat quality characteristics of qinchuan cattle. *African Journal Biotech*. 9(28): 4504-4509.