

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Etanol dari Lingkungan Industri Arak Bali di Desa Merita dan Tri Eka Buana, Karangasem-Bali
Isolation and Characterization of Ethanol-Producing Bacteria From Environment Arak Bali Industry in the Villages of Merita and Tri Eka Buana, Karangasem, Bali

Azis Akbar Hakim, I M. 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 30 Desember 2019 / Disetujui 22 Januari 2020

ABSTRAK

The purpose of this research is isolation and characterization to find potential bacteria which can produce the most optimal ethanol from the Arak Bali industry in Karangasem Regency, Bali. Bacteria were isolated by exposure method in open air using selective media Zymomonas Sucrose Medium (ZSMA) with the addition of nystatin as much as 0.18 g / L as an antifungal then samples were taken at three different points in one Arak Bali production location, namely the distillation place, the fermentation room for roomie, and the place of taking coconut juice under the coconut tree and the variation of time is 15, 30, and 60 minutes of exposure. Gas checking is done on the bacteria obtained to select its ability to produce ethanol. The results of the scanning of 11 best isolates using UV-visible spectrophotometry were fermented on 500 mL ZSM media for 10 days. BM1-CP14 is the best isolate to produce total ethanol of 15.33 mL through the fermentation process. The results of the characterization of BM1-CP14 isolates were Gram-positive bacteria in the form of bacilli, anaerobic and non-motile bacteria. The results showed that bacteria isolated from open-air also can produce ethanol.

Keyword: ethanol, Arak Bali, airborne bacterial exposure, isolation, characterization, UV-Visible spectrophotometry

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

PENDAHULUAN

Salah satu energi alternatif yang dapat dimanfaatkan sebagai pengganti sumber energi fosil adalah bioetanol. Keuntungan dari pemanfaatan bioetanol sebagai pengganti sumber energi dapat diproduksi secara kontinyu, ramah lingkungan serta dapat digunakan sebagai bahan baku perindustrian maupun sebagai bahan bakar (Masfufatun, 2012). Bioetanol merupakan salah satu jenis bahan bakar ramah lingkungan dan dapat diproduksi dengan cara fermentasi menggunakan bahan baku nabati (Akhir *et al.*, 2015). Fermentasi merupakan suatu proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak atau lainnya melalui kegiatan enzim atau mikroba spesifik (Usmana *et al.*, 2012).

Salah satu contoh pemanfaatan sumber daya hasil pertanian untuk menghasilkan etanol melalui proses fermentasi adalah Arak Bali. Pada umumnya pembuatan arak di Kabupaten Karangasem menggunakan nira kelapa yang didalamnya terkandung glukosa (karbohidrat) lalu difermentasi dengan bantuan mikroorganisme untuk menghasilkan minuman beralkohol melalui proses distilasi. Pada proses pembuatannya, masyarakat setempat biasanya menambahkan *lau* (serabut kelapa atau kulit pohon bayur) sebagai kultur starter pada nira karena diperkirakan terdapat mikroorganisme yang mampu mengkonversi gula menjadi etanol di dalamnya (Simatupang *et al.*, 2018). Jika didistilasi, arak yang diproduksi secara tradisional memiliki kandungan alkohol 15-45% (Sukadana, 2014). Apabila dilakukan distilasi bertingkat, konsentrasi etanol yang dapat dihasilkan sangat tinggi, yaitu lebih dari 80% sehingga berpotensi untuk dijadikan bahan bakar alternatif (Muku *et al.*, 2009).

Pada umumnya mikroorganisme yang biasa dimanfaatkan dalam fermentasi gula menjadi etanol dalam skala besar adalah

Saccharomyces cerevisiae yang berasal dari golongan *khamir* (Yudoamidjoyo, 1992). Pada penelitian lain ditemukan bahwa golongan bakteri seperti *Zymomonas mobilis* memiliki beberapa kelebihan dibanding *khamir*, diantaranya produktivitas etanol 3-5 kali lebih tinggi dengan *yield* etanol yang dihasilkan secara teoritis sebesar 97% dan waktu fermentasi yang lebih cepat (Ernes *et al.*, 2014). Bakteri tersebut juga memiliki laju pertumbuhan yang jauh lebih tinggi, toleran terhadap suhu, pH rendah, dan tahan terhadap etanol pada konsentrasi tinggi (Zhang *et al.*, 2010), sehingga bakteri lebih berpotensi dalam menghasilkan etanol dan lebih ekonomis (Dien *et al.*, 2003).

Karena itu perlu dilakukan isolasi untuk menemukan bakteri potensial yang dapat dimanfaatkan dalam menghasilkan bioetanol yang optimal dari industri Arak Bali secara tradisional, khususnya di Kabupaten Karangasem, Bali. Bakteri yang diinginkan diperoleh dengan metode pemaparan media pada udara terbuka yang berada di sekitar lingkungan produksi arak dan dilakukan isolasi serta identifikasi untuk mencari isolat bakteri yang paling unggul berdasarkan kemampuannya dalam menghasilkan etanol paling optimal untuk mendukung ketersediaan energi terbarukan di masa depan.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan pada dua tempat yaitu di Desa Merita, Kecamatan Abang dan Desa Tri Eka Buana, Kecamatan Sidemen, Kabupaten Karangsem Bali. Pada setiap desa dipilih masing-masing tiga lokasi industri Arak Bali untuk pengambilan sampel udara pada lingkungan sekitar tempat pengolahan Arak Bali yang masih menggunakan cara tradisional. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode pemaparan udara pada media agar dan dilakukan pada

tiga titik berbeda dalam satu lokasi industri Arak Bali. Ketiga titik tersebut yaitu tempat proses penyulingan arak, tempat proses fermentasi nira, dan di dekat tempat pengambilan nira yaitu di bawah pohon kelapa. Pada setiap titik pengambilan sampel dilakukan variasi waktu pemaparan yaitu 15, 30, dan 60 menit serta dilakukan pengulangan (*duplo*) pada setiap variasi waktu tersebut. Total sampel yang diperoleh dari keenam tempat tersebut sebanyak 108 *plate* kemudian dibawa ke Laboratorium Bioindustri dan Lingkungan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana untuk selanjutnya diteliti. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Mei sampai Oktober 2019.

Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan yaitu bakteri dari pemaparan udara dengan menggunakan media pertumbuhan *Zymomonas Sukrosa Medium* (ZSM) dengan bahan 2 g/L *amonium sulfate* ((NH₄)₂ SO₄), 2 g/L *potassium phosphate* (KH₂PO₄), 0,5 g/L *magnesium sulfate* (MgSO₄ 7H₂O₄), 10 g/L *yeast extract*, 20 g/L glukosa, *aquades* dan media ZSMA dibuat dengan penambahan agar *powder* sebanyak 15 g/L (Mohseni *et al.*, 2013). Media selektif dibuat dengan penambahan 0,18 g/L *nystatin* yang berfungsi sebagai antifungal. Bahan tambahan untuk pengujian yaitu gliserol 40%, NaCl, *sulfuric acid* (H₂SO₄), *potassium dichromate* (K₂Cr₂O₇), media *Sulfide Indole Motility* (SIM), hidrogen peroksida (H₂O₂), bahan pewarnaan Gram yang terdiri dari kristal violet, lugol, alkohol, dan safranin, juga bahan habis berupa aluminium foil, kapas, pelastik panjang, dan isolator.

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain Spektrofotometer *UV-visible*, destilator refluks, mikroskop, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *autoclave*, *laminar air flow*, bunsen, inkubator, gunting,

centrifuge, *vortex*, *shaker*, jarum ose, *micro tubes*, pipet mikro, Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, dan botol kaca (Duran).

Analisis Data dan Variabel yang Diamati

Aplikasi yang digunakan dalam pengolahan dan penyajian data berbentuk tabel yaitu *Ms. Excel*, dan aplikasi *Igor Pro 8.0* untuk menyajikan data dalam bentuk grafik yang akan dibahas secara deskriptif. Variabel yang diamati yaitu terbentuknya gas hasil fermentasi, nilai absorbansi pada uji kuantitatif, perubahan warna pada uji kualitatif, pertumbuhan koloni pada media selektif, morfologi (makroskopis dan mikroskopis), biokimia (katalase dan motilitas), dan total etanol.

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dimulai dengan pengambilan sampel dari udara sekitar lokasi industri pengolahan Arak Bali di Kabupaten Karangasem, Bali kemudian sampel yang diperoleh dibawa ke laboratorium untuk diisolasi. Sampel yang diperoleh diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam lalu dilakukan konfirmasi gas menggunakan media selektif ZSM dengan penambahan *nystatin* sebanyak 0,18 g/L. Media selektif yang digunakan ditambahkan dengan antifungal jenis *nystatin* yang berfungsi menyeleksi mikroorganisme lain agar hanya bakteri yang tumbuh (Mohseni *et al.*, 2013). Isolat yang menghasilkan gas kemudian ditumbuhkan pada media ZSMA dengan konsentrasi glukosa 2% menggunakan metode *quadrant streak*. Untuk mendapatkan kultur murni dilakukan *quadrant streak* kembali dengan media selektif ZSMA. Kultur murni yang diperoleh kemudian dicek kembali kemampuannya dalam menghasilkan gas menggunakan media selektif ZSM untuk menyeleksi isolat potensial. Isolat potensial yang diperoleh kemudian digunakan untuk uji kuantitatif dan kualitatif etanol hingga

diperoleh isolat terbaik untuk ditumbuhkan pada media fermentasi 500 mL dengan kadar glukosa 20% dan difermentasi selama sepuluh hari (Simatupang *et al.*, 2018). Hasil fermentasi kemudian didistilasi dan dihitung total etanol yang dihasilkan. Tahap terakhir penelitian dilakukan pengamatan morfologi dan biokimia pada isolat terbaik yang diperoleh untuk melihat karakteristik dari setiap isolat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi dan Pemurnian Isolat

Setelah sampel diinkubasi, dilakukan uji konfirmasi awal bakteri penghasil etanol dengan mengamati terbentuknya gas yang diasumsikan sebagai CO₂ hasil proses fermentasi. Dalam proses fermentasi secara anaerob, terjadi perubahan senyawa gula oleh mikroorganisme menjadi alkohol, gas CO₂, dan energi (Muin *et al.*, 2015). Uji konfirmasi gas dilakukan dengan mengambil lima koloni bakteri yang tumbuh terpisah dari setiap *plate* kemudian diinokulasi pada media selektif ZSM dalam tabung reaksi yang ditutupi kapas dan pada mulut tabung disambungkan dengan plastik panjang untuk menampung gas CO₂ yang dihasilkan lalu diinkubasi. Hasil uji konfirmasi gas dari 540 koloni bakteri diperoleh sebanyak 108 sampel yang kemungkinan merupakan mikroba penghasil etanol yang ditandai dengan terbentuknya gelembung gas CO₂ pada plastik panjang. Sampel yang lolos uji konfirmasi gas kemudian ditumbuhkan pada media ZSMA dengan metode *quadrant streak* dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam.

Koloni yang tumbuh kemudian diskripping dengan metode *quadrant streak* pada media selektif ZSMA dengan menggores koloni pada plate dari empat sisi yang berbeda sehingga pada goresan terakhir didapat koloni bakteri yang terpisah. Setelah didapat 108 isolat dari tahap isolasi, diperoleh

141 isolat yang berhasil tumbuh pada media selektif ZSMA. Untuk mendapatkan isolat murni dilakukan konfirmasi gas kembali pada 141 isolat tersebut pada media selektif ZSM dan diperoleh 56 isolat bakteri potensial murni dengan kemampuan kualitatif menghasilkan gas relatif sedikit hingga sedang kemudian disimpan dengan penambahan gliserol 40% sebagai kultur stok.

Penentuan Kuantitatif Etanol

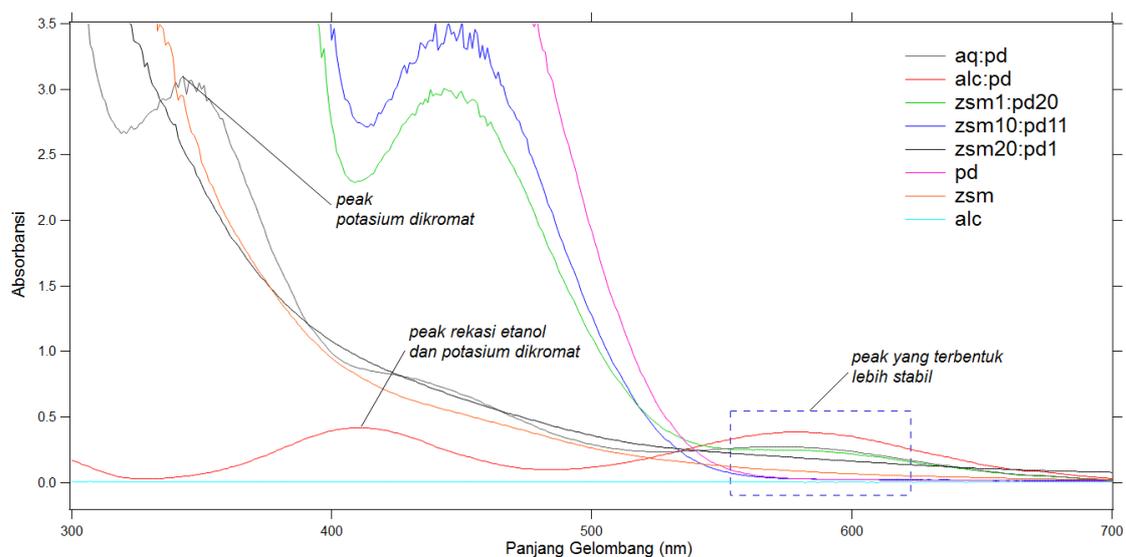
Pengujian kuantitatif etanol digunakan untuk mendapatkan isolat terbaik penghasil etanol dengan metode *scanning* menggunakan spektrofotometer *UV-visible*. Uji konfirmasi standar dilakukan sebelum uji kuantitatif pada isolat yang diperoleh untuk menentukan perbandingan terbaik dan pembacaan nilai absorbansi menggunakan media uji potasium dikromat, media ZSM dan alkohol (Simatupang *et al.*, 2018). Adapun spektra hasil pemindaian spektrofotometer *UV-visible* standar uji kuantitatif etanol dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil pemindaian pada Gambar 1 menunjukkan bahwa spektra yang terbentuk pada perbandingan setiap media uji hasil reaksi potasium dikromat dengan alkohol dan media ZSM memiliki spektra yang sama dengan standar dilakukan oleh Simatupang *et al.* (2018). Dapat dilihat pada gambar bahwa terdapat dua *peak* yang terbentuk pada reaksi etanol dengan reagen potasium dikromat (warna merah) yaitu pada panjang gelombang 411 dan 480 nm. Kedua *peak* tersebut terbentuk di atas panjang gelombang 400 nm yang menggeser *peak* potasium dikromat (abu-abu) yang terbentuk pada panjang gelombang di bawah 400 nm.

Pada standar uji kuantitatif etanol yang dilakukan oleh Simatupang *et al.* (2018) pemindaian dilakukan pada perbandingan media mengandung alkohol (supernatan) dengan reagen potasium dikromat (1:20)

karena *peak* yang terbentuk dari media dominan potasium dikromat (1:20) membentuk *peak* yang sama dengan media mengandung alkohol. Sebelum dilakukan uji kuantitatif etanol, dilakukan pencampuran media sesuai standar yang didapat yaitu perbandingan supernatan dan reagen potasium dikromat (1:20) pada tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang untuk uji kualitatif etanol dengan mengamati perubahan warna yang terjadi pada 56 isolat potensial yang diperoleh. Perubahan warna dari jingga menjadi hijau, lalu menjadi biru jika supernatan terindikasi mengandung etanol. Reagen potasium dikromat akan mengoksidasi alkohol primer

maupun alkohol sekunder menjadi asam karboksilat dan keton (Harahap, 2012). Hal tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan Oktafiani *et al.* (2011), dimana etanol yang terdapat pada supernatan akan menguap saat terjadi reaksi antara potasium dikromat dan etanol. Berkurangnya warna dikromat sebanding dengan kadar etanol yang dihasilkan. Berdasarkan hal tersebut, dapat diasumsikan bahwa seiring dengan perubahan warna pada reagen, mengindikasikan semakin tinggi jumlah etanolnya. Perubahan warna hasil uji kualitatif etanol pada reagen potasium dikromat dengan media ZSM mengandung alkohol dapat dilihat pada Gambar 2.



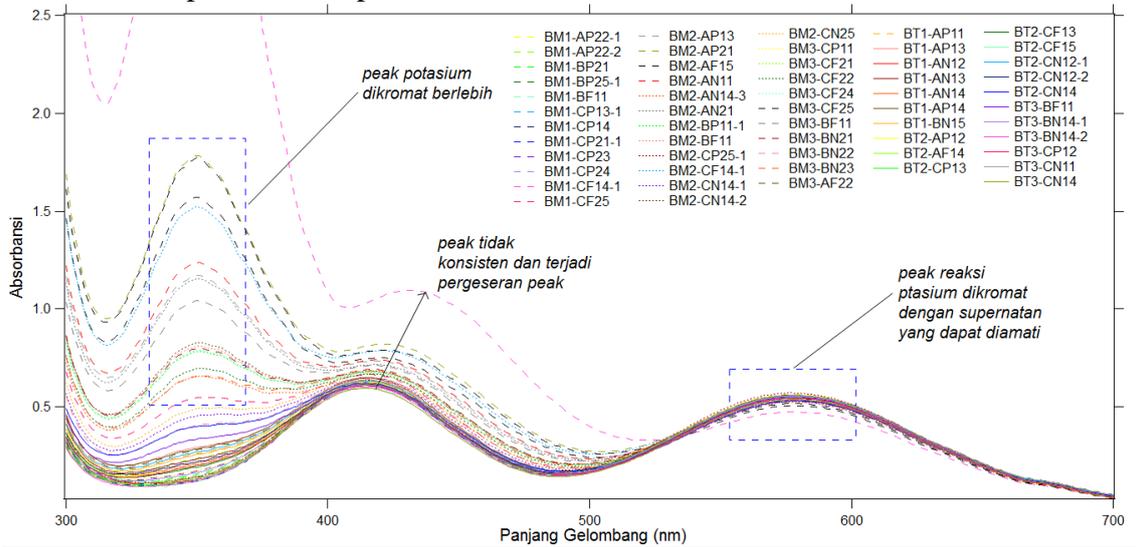
Gambar 1. Spektra konfirmasi larutan standar uji kuantitatif etanol



Gambar 2. Perubahan warna hasil reaksi uji kualitatif etanol (kiri ke kanan) jingga; jingga kehijauan; hijau; hijau kebiruan; biru

Setelah dilakukan pengamatan pada perubahan warna hasil rekasi oksidasi media beralkohol dengan reagen potasium dikromat, dilakukan uji kuantatif etanol dengan melakukan pembacaan spektra nilai

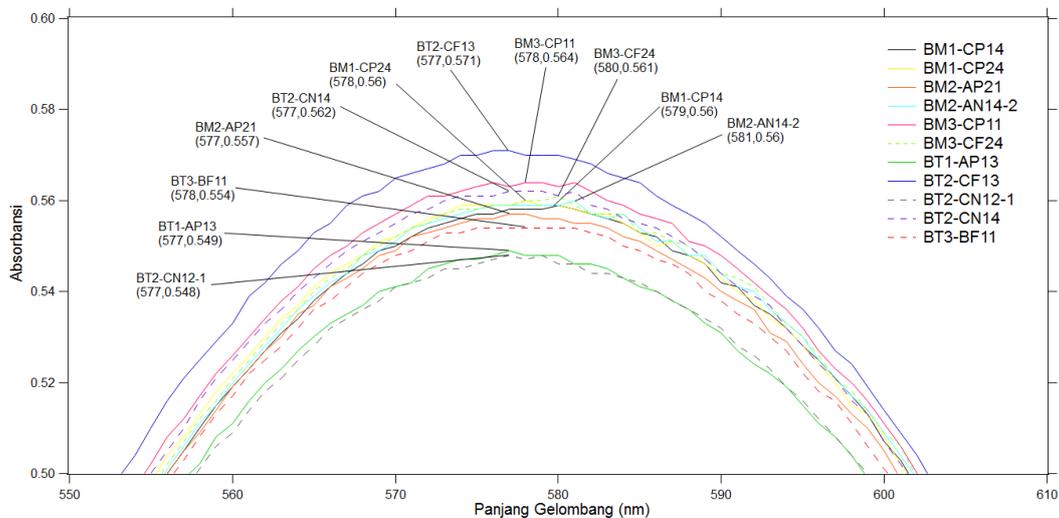
absorbansi pada 56 isolat potensial menggunakan spektrofotometer *UV-visible*. Hasil pembacaan Uji kuantitatif etanol pada 56 isolat potensial dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektra uji kuantitatif hasil pemindaian 56 isolat bakteri potensial

Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa terjadi pergeseran *peak* yang terbentuk pada panjang gelombang 411 nm yang terlihat masih tidak stabil dibandingkan dengan *peak* yang terbentuk pada panjang gelombang 580 nm. Berdasarkan hal tersebut maka pembacaan *peak* tertinggi pada reaksi supernatan mengandung alkohol dengan potasium dikromat dapat dilakukan pada

panjang gelombang 580 nm karena *peak* yang terbentuk terlihat lebih konsisten. Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Horia *et al.* (2014), bahwa pengamatan absorbansi potasium dikromat dapat diamati pada panjang gelombang 520 – 610 nm. Adapun hasil pemindaian 11 isolat terbaik hasil uji kuantitatif etanol dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektra uji kuantitatif etanol hasil pemindaian 11 isolat bakteri terbaik

Dapat dilihat pada Gambar 4 bahwa tidak semua spektra membentuk titik puncak pada panjang gelombang yang sama, namun berdasarkan nilai absorbansi tertinggi maka

dipilih sebelas isolat terbaik. Hasil pembacaan spektra uji kuantitatif etanol dan pengamatan kualitatif etanol dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai absorbansi, panjang gelombang, produksi gas, dan warna supernatan setelah ditambahkan potasium dikromat pada 11 isolat bakteri terbaik

Kode	Panjang gelombang (nm)	Nilai absorbansi	Kualitatif	Produksi gas
BM1-CP14	579	0,56	Biru	Sedang
BM1-CP24	578	0,56	Jingga kehijauan	Sedang
BM2-AP21	578	0,56	Hijau kebiruan	Sedang
BM2-AN14-2	581	0,56	Hijau	Sedang
BM3-CP11	581	0,56	Jingga kehijauan	Sedikit
BM3-CF24	580	0,56	Hijau	Sedang
BT1-AP13	576	0,55	Biru	Sedang
BT2-CF13	577	0,57	Biru	Sedang
BT2-CN12-1	576	0,55	Biru	Sedikit
BT2-CN14	576	0,56	Hijau kebiruan	Sedang
BT3-BF11	579	0,55	Biru kehijauan	Sedang

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa dari 11 isolat potensial tersebut diketahui bahwa isolat BT2-CF13 memiliki nilai absorbansi tertinggi yaitu 0,57 dan pada pengecekan gas isolat tersebut termasuk dalam isolat yang menghasilkan gas sedang. Penentuan gas yang dihasilkan berdasarkan volume yang dihasilkan pada plastik panjang. Apabila volume gas yang terbentuk terisi $\frac{1}{4}$ dari volume plastik panjang maka dikategorikan produksi gas sedikit, apabila terisi $\frac{1}{2}$ dari volume plastik panjang tersebut termasuk produksi gas sedang, dan bila kepadatan gas yang dihasilkan terisi penuh maka dikategorikan sebagai produksi gas banyak.

Untuk mengetahui kemampuan sebenarnya dari 11 isolat dalam menghasilkan etanol maka dilakukan uji produksi etanol pada media fermentasi 500 mL dengan kadar glukosa 20% ditambahkan 1% *starter* sel ($OD_{660} \pm 5$) agar jumlah starter yang diinokulasi sama jumlahnya (Gunam *et al.*, 2018). Setelah itu dilakukan fermentasi selama 10 hari kemudian dihitung total etanolnya.

Produksi Etanol dari Isolat Bakteri Terbaik

Setelah dilakukan fermentasi selama 10 hari, media fermentasi kemudian didistilasi untuk memperoleh etanol murni dan dilakukan perhitungan total etanol yang dihasilkan. Total etanol yang diperoleh dari hasil distilasi media fermentasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari hasil produksi 11 isolat dapat dilihat bahwa total etanol tertinggi dihasilkan dari isolat terbaik BM1-CP14 yang merupakan bakteri pada udara dari Desa Merita di tempat penyulingan arak dengan waktu 60 menit pemaparan udara. BM1-CP14 juga termasuk dalam bakteri dengan produksi gas sedang dan menghasilkan warna biru pada uji kualitatif. Nilai selisih total padatan terlarut tertinggi adalah 2,17% brix berbanding lurus dengan total etanol yang dihasilkan yaitu 15,33 mL dari isolat terbaik BM1-CP14. Nilai selisih total padatan terlarut terendah sebesar 0,33% brix berbanding lurus dengan total etanol yang dihasilkan yaitu 2,31 mL dari isolat BM1-CP24.

Padatan terlarut merepresentasikan penurunan kadar glukosa terlarut dalam media pertumbuhan. Pada proses fermentasi terjadi perubahan gula menjadi etanol sehingga seiring dengan meningkatnya produksi etanol menyebabkan penurunan gula (Wibowo, 1990). Namun dapat dilihat pada Tabel 2 bahwa selisih total padatan terlarut pada media fermentasi masih terbilang rendah dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari (2019) yang melakukan optimasi pada media fermentasi menggunakan *khamir* dengan

selisih total padatan terlarut mencapai 16% brix dengan yield yang dihasilkan sebesar 6,11% dari total etanol sebanyak 97,82 mL, dimana hal tersebut menunjukkan bahwa proses penguraian gula saat proses fermentasi yang dilakukan selama 10 hari pada penelitian ini masih kurang sempurna karena selisih total padatan terlarut yang dihasilkan hanya 2,17% brix dengan yield sebesar 0,46% dari total etanol sebanyak 15,33 mL yang dihasilkan dari proses fermentasi isolat terbaik BM1-CP14.

Tabel 2. Produksi etanol dari 11 isolat bakteri terbaik

KODE ISOLAT	Padatan Terlarut Awal (%brix)	Padatan terlarut akhir (%brix)	Δ Selisih total padatan terlarut (%brix)	Total etanol (mL)	Total etanol/ Δ %brix
BM1-CP14	18,57 \pm 0,35	16,40 \pm 1,40	2,17 \pm 1,40	15,33 \pm 4,39	7,08
BM2-AN14-2	18,57 \pm 0,25	17,20 \pm 0,70	1,37 \pm 0,70	5,76 \pm 2,10	4,21
BM3-CF24	18,50 \pm 0,17	17,43 \pm 1,26	1,07 \pm 1,26	5,27 \pm 1,42	4,94
BM2-AP21	18,27 \pm 0,31	17,07 \pm 0,32	1,20 \pm 0,32	4,57 \pm 1,29	3,81
BT2-CN12-1	18,40 \pm 0,17	18,03 \pm 0,35	0,37 \pm 0,35	4,37 \pm 1,19	11,93
BM3-CP11	18,53 \pm 0,21	18,27 \pm 0,25	0,27 \pm 0,25	4,01 \pm 1,72	15,02
BT2-CN14	19,10 \pm 0,17	17,13 \pm 0,81	1,97 \pm 0,81	4,00 \pm 2,38	2,03
BT1-AP13	18,73 \pm 0,31	18,30 \pm 0,10	0,43 \pm 0,10	3,42 \pm 0,68	7,89
BT2-CF13	18,43 \pm 0,15	18,07 \pm 0,12	0,37 \pm 0,12	3,33 \pm 0,58	9,09
BT3-BF11	18,77 \pm 0,21	17,97 \pm 0,25	0,80 \pm 0,25	2,33 \pm 0,58	2,92
BM1-CP24	18,63 \pm 0,25	18,30 \pm 0,30	0,33 \pm 0,30	2,31 \pm 0,96	6,93

Dari hasil produksi 11 isolat dapat dilihat bahwa total etanol tertinggi dihasilkan dari isolat terbaik BM1-CP14 yang merupakan bakteri pada udara dari Desa Merita di tempat penyulingan arak dengan waktu 60 menit pemaparan udara. BM1-CP14 juga termasuk dalam bakteri dengan produksi gas sedang dan menghasilkan warna biru pada uji kualitatif. Nilai selisih total padatan terlarut tertinggi adalah 2,17% brix berbanding lurus dengan total etanol yang dihasilkan yaitu 15,33 mL dari isolat terbaik BM1-CP14. Nilai selisih total padatan terlarut terendah sebesar 0,33% brix berbanding lurus dengan total etanol yang dihasilkan yaitu 2,31 mL dari isolat BM1-

CP24.

Padatan terlarut merepresentasikan penurunan kadar glukosa terlarut dalam media pertumbuhan. Pada proses fermentasi terjadi perubahan gula menjadi etanol sehingga seiring dengan meningkatnya produksi etanol menyebabkan penurunan gula (Wibowo, 1990). Namun dapat dilihat pada Tabel 2 bahwa selisih total padatan terlarut pada media fermentasi masih terbilang rendah dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari (2019) yang melakukan optimasi pada media fermentasi menggunakan *khamir* dengan selisih total padatan terlarut mencapai 16% brix dengan yield yang dihasilkan sebesar

6,11% dari total etanol sebanyak 97,82 mL, dimana hal tersebut menunjukkan bahwa proses penguraian gula saat proses fermentasi yang dilakukan selama 10 hari pada penelitian ini masih kurang sempurna karena selisih total padatan terlarut yang dihasilkan hanya 2,17% brix dengan yield sebesar 0,46% dari total etanol sebanyak 15,33 mL yang dihasilkan dari proses fermentasi isolat

terbaik BM1-CP14.

Karakterisasi 11 Isolat Bakteri Terbaik Penghasil Etanol

Identifikasi dilakukan dengan pengamatan morfologi meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Hasil pengamatan makroskopis 11 isolat terbaik dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengamatan makroskopis 11 isolat terbaik

Kode Isolat	Karakteristik				
	Ukuran (mm)	Warna	Bentuk	Elevansi	Tepian
BM1-CP14	2	Putih Kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>
BM1-CP24	>4	Putih Kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Unbonate</i>	<i>Lobate</i>
BM2-AP21	>4	Putih Susu	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Lobate</i>
BM2-AN14-2	2	Putih Kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Convex</i>	<i>Undulate</i>
BM3-CP11	>4	Putih Kekuningan	<i>Irregular</i>	<i>Unbonate</i>	<i>Lobate</i>
BM3-CF24	2	Putih Kekuningan	<i>Punch</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>
BT1-AP13	4	Putih Susu	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>
BT2-CF13	3	Putih Susu	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>
BT2-CN12-1	1	Putih Susu-Merah	<i>Punch</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>
BT2-CN14	2	Putih Susu	<i>Punch</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>
BT3-BF11	>4	Putih Susu	<i>Rizhoid</i>	<i>Convex</i>	<i>Undulate</i>

Hasil uji makroskopis menunjukkan karakter bakteri yang bervariasi. Isolat terbaik BM1-CP14 memiliki ukuran 2 mm dengan bentuk *irregular* (tidak beraturan), elevansi *convex* (permukaan sedikit

(a)

(b)

menonjol, hampir rata), tepian *entire* (berbentuk melengkung rapih), dan berwarna putih kekuningan. Hasil pengamatan morfologi dan biokimia isolat bakteri terbaik dapat dilihat pada Gambar 5.

(c)

(d)



Gambar 5. Hasil pengamatan morfologi dan biokimia isolat bakteri terbaik BM1-CP14 (a) koloni bakteri; (b) katalase negatif; (c) non motil; (d) Gram-negatif (basil)

Uji katalase dilakukan untuk identifikasi kemampuan isolat dalam menghasilkan enzim katalase ditandai dengan pemevahan katan H_2O_2 menjadi air

dan oksigen yang dapat diamati dengan munculnya gelembung udara (Kitai *et al.*, 2005). Pada pengamatan biokimia melalui penambahan katalase menunjukkan bahwa

isolat tersebut bersifat anaerob (katalase negatif), pada pengamatan motilitas isolat terbaik BM1-CP14 tidak memiliki alat gerak (non-motil), dan termasuk kedalam bakteri Gram positif dengan bakteri berbentuk basil melalui pengamatan mikroskopis.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan, antara lain:

1. Bakteri yang diisolasi dari industri arak di Kabupaten Karangasem Bali mempunyai kemampuan yang berbeda-beda untuk memproduksi etanol. Bakteri dengan kemampuan menghasilkan etanol tertinggi yaitu bakteri BM1-CP14 dengan total etanol 15,33 mL. Bakteri BM1-CP14 merupakan bakteri pada pemaparan udara dari Desa Merita di tempat penyulingan arak dengan waktu 60 menit pemaparan udara.
2. Hasil pengamatan morfologi isolat bakteri BM1-CP14 dengan koloni berukuran 2 mm berwarna putih kekuningan, berbentuk *irregular*, elevansi *convex*, tepian *entire*, dan merupakan bakteri Gram positif berbentuk basil. Pada uji biokimia isolat bakteri BM1-CP14 merupakan bakteri katalase negatif (anaerob) dan non motil (tidak memiliki alat gerak). Berdasarkan karakteristik tersebut masih belum ditemukan kesamaan isolat bakteri BM1-CP14 dengan spesies bakteri lainnya, sehingga bakteri ini dapat dikategorikan sebagai bakteri dengan spesies baru.

Saran

Berdasarkan hasil dari total padatan terlarut pada media fermentasi yang kurang optimal diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kondisi optimum pada waktu fermentasi dan

konsentrasi gula yang tepat pada media fermentasi dari isolat bakteri penghasil etanol yang telah ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhir, Y.M., Chairul, dan Drastinawati. 2015. Pembuatan bioetanol dari fermentasi nira aren (*arenga pinnata*) menggunakan yeast *Saccharomyces cerevisiae* dengan pengaruh variasi konsentrasi nutrisi dan waktu. JOM FTEKNIK 2(1): 1-5.
- Dien, B.S., M.A. Cotta, dan T.W. Jeffries. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. Appl. Microbiol. Biotechnol 63: 258-266.
- Ernes, Atmiral., Rahmawati, Lia., Wardani, A.K., dan Kusnadi, Joni. 2014. Optimasi fermentasi bagas tebu oleh *zymomonas mobilis* CP4 (NRRL B-14023) untuk produksi bioetanol. AGRITECH 34(3): 247-256.
- Gunam, I.B.W., N.N.S. Ardani, dan N.S. Antara. 2018. Pengaruh konsentrasi starter dan gula terhadap karakteristik wine salak. Jurnal Ilmiah Teknologi Pertanian Agrotechno 3(1): 287-297.
- Harahap, N.R.P. 2012. Analisa methanol, ethanol, dan triklosan dalam sabun cair siri sumber ayu orchid secara kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi. Universitas Sumatera Utara, Medan. Skripsi (tidak dipublikasikan).
- Horria, A., P.Y. Mohamed., Khashaba, and Y.S. Reem. 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.

- Kitai, S., A. Shimizu., J. Kawano., E. Sato., C. Nakano., H. Kitagawa., K. Fujio., K. Matsumura., R. Yasuda, dan Inamoto, T. 2005. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Retail raw chicken meat throughout Japan. *Journal Vet Med Sci* 67(3): 269-274.
- Mauku, 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 Cakra M* 3(1):26-32.
- Masfufatun. 2012. Produksi Etanol dari Hidrolisat Carboxy Methyl Cellulose (CMC). Fakultas Kedokteran, Universitas Wijaya Kusuma, Surabaya.
- Mohseni, M., H. Ebrahimi, dan M.J. Chaich. 2013. Isolation and optimization of ethanol producing bacteria from natural environments of mazandaran province in Iran. *Journal of Genetic Resources* 1(1): 35-44.
- Simatupang, Y.V., I M.M. Wijaya, dan N.S. Antara. 2018. Isolasi dan karakterisasi bakteri potensial penghasil etanol dari industri Arak Bali di Karangasem-Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri* 7(1): 58–71.
- Sukadana, I.G.K, dan Tenaya. 2014. Pengaruh jumlah destilasi terhadap kualitas dan kapasitas produksi Arak Bali sebagai bahan bakar alternatif. *Jurnal Energi dan Manufaktur* 7(2): 211-216.
- Usmana, A. Sofyan., S. Rianda, dan Novia. 2012. Pengaruh volume enzim dan waktu fermentasi terhadap kadar etanol (bahan baku tandan kosong kelapa sawit dengan pretreatment alkali). *Jurnal Teknik Kimia. Jurusan Teknik Kimia, Universitas Sriwijaya* 18(2): 17-25.
- Wulandari, I.A.E.P. 2019. Optimasi konsentrasi *yeast extract* dan *peptone* pada media tumbuh *khamir* potensial isolat IS 258 untuk produksi etanol optimal. Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Universitas Udayana, Bali. Skripsi (tidak dipublikasikan).
- Wibowo, D. 1990. Teknologi Fermentasi. Penerbit Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Yudoamidjoyo, M., A.A. Darwis., dan E.G. Sa'id. 1992. Teknologi Fermentasi. Edisi 1 cetakan 1. Rajawali Press, Jakarta.
- Zhang, K., dan H. Feng. 2010. Fermentation potentials of *Zymomonas mobilis* and its application in ethanol production from low-cost raw sweet potato. *Biotechnology* 9(37): 6122-6128.