

## Variasi Konsentrasi Glukosa pada Media Tumbuh dan Lama Fermentasi Dalam Memproduksi Etanol oleh Isolat BM1-CP14

### *Variation of Glucose Concentration in Growing Media and Fermentation Time in Producing Ethanol By Isolate BM1-CP14*

**Nurul Lita Ajizah, I M. 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 01 Februari 2021 / Disetujui 29 Maret 2021

#### ABSTRACT

*This study was aimed determine the effect of glucose concentration on ethanol producing BM1-CP14 isolate media and to determine to optimum fermentation time to producing ethanol and to determine the growth phase curve of BM1-CP14 isolates. This study uses 4 glucose concentration (8, 12, 16 and 20%) and 3 fermentation time (14, 17 and 20 days). The experimental-explorative research process was carried out in several stages, namely rejuvenation of BM1-CP14 cultures, culture grow, cell isolates adjustment, glucose level on fermentation media measurement, fermentation, and distillation. The glucose concentration which are at the range of 10–18% have an optimum effect in producing ethanol. The highest total ethanol was obtained from the glucose concentration of 16% with a fermentation time of 10 days having a difference in total dissolved solids of 8.30 ( $\Delta\%$  brix) resulting in the highest total ethanol of 38.75 mL. The glucose concentration of 8% resulted in a less than optimal total ethanol, which was 18.00 mL with a difference in total solids of 4.20 ( $\Delta\%$  brix), while the glucose concentration of 20% has a difference in total dissolved solids of 6.20 ( $\Delta\%$  brix) and produced a total ethanol of 26.50 mL. The Fermentation time of 14, 17, and 20 days was effected in producing ethanol, namely if the fermentation was longer, the total ethanol produces would be lower. The fermentation time of 14 days resulted in a total ethanol of 37.50 mL with a difference in total dissolved solids of 5.05 ( $\Delta\%$  brix). In longer fermentation of 17 and 20 days, the total ethanol produced was decreased, produced smaller total ethanol. The growth curve of BM1-CP14 isolates showed the growth isolates of BM1-CP14 with a growth time of 54 hours, starts from the exponential phase for 12 hours, the stationary phase for 18 hours and ends in the death phase.*

**Keywords:** *Bacteria, BM1-CP14 isolate, ethanol, fermentation time, glucose concentration*

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi glukosa terhadap media isolat BM1-CP14 penghasil etanol dan pengaruh lama fermentasi untuk menghasilkan etanol serta menentukan kurva fase pertumbuhan isolat BM1-CP14. Penelitian ini menggunakan 4 konsentrasi glukosa (8, 12, 16 dan 20%) dan 3 waktu fermentasi (14, 17 dan 20 hari). Proses penelitian eksperimental-eksploratif dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu peremajaan kultur BM1-CP14, perbanyakan kultur, *adjust* (kekeruhan) isolat sel,

---

\*Korespondensi Penulis:

Email: mahaputrawijaya@unud.ac.id

pengukuran konsentrasi glukosa pada media fermentasi, fermentasi dan distilasi. Konsentrasi glukosa yang kurang atau lebih dari kisaran 10–18% berpengaruh dalam menghasilkan etanol, dimana total etanol yang dihasilkan tidak optimal. Total etanol tertinggi diperoleh dari konsentrasi glukosa 16% dengan lama fermentasi 10 hari yang memiliki selisih total padatan terlarut 8,30 ( $\Delta\%$  brix) menghasilkan total etanol tertinggi yaitu 38,75 mL. Konsentrasi glukosa 8% menghasilkan total etanol yang kurang optimal yaitu 18,00 mL dengan selisih total padatan 4,20 ( $\Delta\%$  brix), sedangkan konsentrasi glukosa 20% memiliki selisih total padatan terlarut 6,20 ( $\Delta\%$  brix) dan menghasilkan total etanol 26,50 mL. Lama fermentasi 14, 17 dan 20 hari berpengaruh dalam produksi etanol yaitu semakin lama fermentasi maka total etanol yang dihasilkan semakin menurun. Lama fermentasi 14 hari menghasilkan total etanol 37,50 mL dengan selisih total padatan terlarut 5,05 ( $\Delta\%$  brix). Pada fermentasi yang lebih lama yaitu 17 dan 20 hari, total etanol yang dihasilkan semakin berkurang sehingga total etanol yang dihasilkan semakin kecil. Kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 menunjukkan isolat pertumbuhan BM1-CP14 dengan waktu tumbuh 54 jam, dimulai dari fase eksponensial selama 12 jam, fase stasioner selama 18 jam dan berakhir pada fase kematian.

**Kata kunci:** Bakteri, isolat BM1-CP14, konsentrasi glukosa, lama fermentasi.

## PENDAHULUAN

Sumber bahan bakar fosil yang semakin menipis ketersediaannya menjadi fokus utama untuk menemukan sumber energi terbarukan, bersih dan murah (Afifa *et al.*, 2011). Bioetanol merupakan salah satu sumber energi alternatif yang berpotensi sebagai *biofuel* untuk menggantikan bahan bakar fosil (Byeonghwan, 2007), memiliki kandungan gas oksigen yang tinggi 35% sehingga terbakar lebih sempurna, bernilai oktan lebih tinggi (118), dan ramah lingkungan karena mengandung emisi gas CO lebih rendah 19–25% (Hening dan Zeddies, 2006), serta dapat diproduksi terus menerus oleh mikroorganisme (Kusumaningati *et al.*, 2003).

Bioetanol ( $C_2H_5OH$ ) biasanya diperoleh melalui proses fermentasi gula sederhana/glukosa yang terdapat pada bahan alami (tumbuh-tumbuhan) dengan memanfaatkan kemampuan mikroorganisme tertentu (Silaban, 2017). Cara fermentasi lebih banyak digunakan dalam dunia industri saat ini dibandingkan sintesis kimiawi, dikarenakan kondisi operasi yang aman, yakni menggunakan suhu ruangan (*ambient*) dan tidak memerlukan tekanan operasi yang tinggi, cukup tekanan atmosferik (Puspita *et al.*, 2010). Pada proses fermentasi etanol melibatkan mikroorganisme untuk mengubah komponen sederhana (glukosa) menjadi etanol, mikroorganisme yang umum

digunakan dalam fermentasi etanol yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) (Panesar *et al.*, 2006). Selain yeast terdapat bakteri yang umum digunakan dalam menghasilkan etanol salah satunya bakteri *Zymomonas mobilis* (Ernes *et al.*, 2014).

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hakim *et al.* (2020), didapatkan isolat potensial penghasil bioetanol yaitu bakteri BM1-CP14 yang diperoleh dari Desa Merita, Karangasem di tempat penyulingan arak dengan waktu 60 menit pemaparan udara. Isolat BM1-CP14 merupakan bakteri gram positif, berbentuk basil (batang), bersifat anaerob (katalase negatif) dan pada pengamatan motilitas tidak memiliki alat gerak (non-motil). Media tumbuh atau fermentasi isolat BM1-CP14 dalam memproduksi etanol menggunakan media ZSM (*Zymomonas Sukrosa Medium*) dengan konsentrasi glukosa 20% serta lama proses fermentasi 10 hari, dari proses fermentasi etanol bakteri BM1-CP14 memiliki kemampuan menghasilkan etanol tertinggi dengan total etanol 15,33 mL dengan selisih total padatan terlarut 2,17% brix.

Total padatan terlarut dapat digunakan untuk menginterpretasikan jumlah gula yang terkandung pada bahan (Bayu *et al.*, 2017), sementara dari hasil selisih total padatan terlarut 2,17% brix yang didapatkan oleh

Hakim *et al.* (2020) menunjukkan adanya penggunaan glukosa yang tidak maksimal oleh bakteri BM1-CP14, dimana jumlah total padatan awal sebesar 18,57% brix dengan total padatan akhir sebesar 16,40% brix memiliki selisih yang masih terbilang rendah, mengindikasikan glukosa pada media fermentasi tidak digunakan dengan maksimal. Serta dalam proses fermentasi dengan konsentrasi glukosa 20% setelah 10 hari fermentasi masih terbentuk gelembung-gelembung yang diduga gas CO<sub>2</sub> yang menandakan bahwa kemungkinan masih terjadi proses fermentasi. Namun bakteri BM1-CP14 belum mencapai kondisi maksimal dalam memproduksi etanol, hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan penambahan variasi konsentrasi glukosa dan lama fermentasi agar mendapatkan kondisi optimal pada fermentasi serta untuk mengetahui kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14.

Penambahan variasi konsentrasi glukosa serta lama fermentasi menjadi hal yang utama untuk dioptimalkan agar etanol yang dihasilkan diharapkan optimal dan waktu produksi yang efisien. Glukosa memiliki peranan penting bagi sel bakteri sebagai sumber energi untuk metabolisme dan berpengaruh terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan. (Kusumaningati *et al.*, 2013). Konsentrasi glukosa optimum untuk proses fermentasi berkisar antara 10–18% (Khurniawati *et al.*, 2019), serta lama proses fermentasi pada produksi bioetanol sangat mempengaruhi konsentrasi bioetanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi konsentrasi bioetanol yang dihasilkan (Azizah *et al.*, 2012). Namun bila fermentasi terlalu lama maka nutrisi dalam substrat menjadi habis (Nasrun *et al.*, 2015).

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi glukosa (8, 12, 16 dan 20%) pada media tumbuh, serta pengaruh lama fermentasi (14, 17 dan 20 hari) untuk produksi etanol oleh

bakteri isolat BM1-CP14 serta untuk mengetahui kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14. Hasil yang diperoleh diharapkan dengan adanya penambahan konsentrasi glukosa dan lama fermentasi dapat menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang tinggi.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biondustri dan Lingkungan serta Laboratorium Analisis Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana. Waktu pelaksanaan dilakukan pada bulan Juli–Oktober 2020.

### Bahan dan Alat Penelitian

Kultur bakteri yang digunakan adalah isolat BM1-CP14 (Hakim *et al.*, 2020) dengan menggunakan media *Zymomonas Sukrosa Medium* (ZSM) dengan bahan-bahan 10 g/L *yeast extract* (Himedia), 2 g/L *amonium sulfate* ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck), 2 g/L *potassium phosphate* (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Merck), 0,5 g/L *magnesium sulfate* (MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (Merck), glukosa (Brataco), NaCl 0,85% (KgaA), aquades, natrium metabisulfat (Aloin Labora) dan gliserol 40%.

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer *UV-visible* (Libra), refraktometer (*manual refractometer Rhb-32atc brix*), alkoholmeter, pH meter, destilator refluks, *centrifuge* (UniCen MR-Herolab GmbH), *autoclave* (Daihan Scientific), *shaker rotator* (HEALTH), timbangan analitik (Camry), *vortex* (Thermo Scientific), *laminar air flow* (WINA Instruments), kompor listrik, tabung reaksi (PYREX), erlenmeyer (IWAKI), gelas beker (Pirex-Iwaki), botol kaca (Duran), gelas ukur (PYREX), pipet mikro, aluminium foil, bunsen, kapas, serta alat dokumentasi

### Tahapan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yang ditujukan untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi glukosa dan lama

fermentasi pada media tumbuh isolat BM-CP14 dalam memproduksi etanol. Penelitian dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahap pertama penentuan konsentrasi glukosa untuk menghasilkan alkohol dengan total etanol terbaik pada media tumbuh fermentasi isolat BM1-CP14. Tahap kedua konsentrasi glukosa optimal diuji pada berbagai lama waktu fermentasi pada media tumbuh isolat BM1-CP14 dalam memproduksi etanol dan tahap ketiga dilakukan pengamatan kurva fase pertumbuhan pada isolat BM1-CP14.

### **Pelaksanaan Penelitian Persiapan Kultur BM1-CP14**

Tahapan pelaksanaan penelitian yang pertama dimulai dengan proses peremajaan isolat BM1-CP14 dengan menggunakan media *Zymomonas Sukrosa Medium* (ZSM). Isolat BM-CP14 diinkubasi di suhu ruang dengan menggunakan *shaker rotator* selama 48 jam dengan kecepatan 100 rpm. Perbanyak kultur dilakukan dengan menginokulasikan ke dalam volume yang lebih besar dan diinkubasi di suhu ruang menggunakan *shaker rotator* selama 72 jam dengan kecepatan 100 rpm. Hasil dari perbanyak isolat BM1-CP14 disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. pencucian pelet sel dilakukan dengan larutan NaCl 0,85% dan disentrifugasi kembali. Pencucian dengan NaCl 0,85% dilakukan pengulangan 2 kali. Pelet sel bakteri yang terkumpul akan disamakan tingkat kekeruhannya (*adjust*) yang diatur dengan nilai OD660 + 5 menggunakan pembacaan spektrofotometer.

### **Fermentasi Etanol dengan Varian Konsentrasi Glukosa**

Proses fermentasi dilakukan dengan media yang lebih besar yaitu 500 mL menggunakan konsentrasi glukosa bervariasi yaitu 8, 12, 16 dan 20% serta dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Proses tindalisasi dilakukan dengan suhu 80 °C selama 1 jam dilakukan 3 kali berturut-turut, untuk menghindari browning pada glukosa (Hafsan, 2014) dan

dihomogenkan dengan media yang lainnya di dalam laminar *air flow*. Setelah media fermentasi siap, pelet sel isolat yang sudah sesuai tingkat kekeruhannya (*adjust*) diinokulasikan sebanyak 1% starter dari banyaknya media fermentasi yang digunakan dan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 hari dalam keadaan anaerob. Hasil fermentasi selama 10 hari selanjutnya didistilasi menggunakan distilasi uap pada suhu 78–85 °C dan dihitung total etanolnya.

### **Fermentasi Etanol Menggunakan Konsentrasi Glukosa Diperoleh dari Pengujian Terdahulu dengan Variasi Lama Fermentasi**

Konsentrasi glukosa terbaik yang diperoleh dari perlakuan sebelumnya selanjutnya dilakukan proses fermentasi etanol dengan menggunakan konsentrasi glukosa terbaik ke dalam media fermentasi 500 mL dengan 1% starter dan dilakukan perlakuan lama fermentasi 14, 17 dan 20 hari dalam keadaan anaerob. Hasil dari fermentasi 14,17 dan 20 hari, kemudian dilakukan proses distilasi menggunakan distilator refluks dan dihitung total etanolnya.

### **Pengamatan Kurva Pertumbuhan**

Pengamatan kurva pertumbuhan terhadap isolat BM1-CP14 menggunakan media ZSM dengan konsentrasi glukosa 2% dan diinokulasikan sel isolat BM1-CP14 sebanyak 1%. Pengamatan kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 dilakukan dengan melakukan *scanning* terhadap nilai absorbansi dari isolat BM1-CP14 dengan menggunakan *spectrofotometry* setiap 3 jam pada fase pertama yaitu fase lag dan dilanjutkan tiap 6 jam pada fase berikutnya.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Variasi Konsentrasi Glukosa pada Media Fermentasi**

Produksi etanol dilakukan pada media 500 mL menggunakan konsentrasi glukosa (8, 12, 16 dan 20%) dengan lama fermentasi 10

hari, kemudian didistilasi agar mendapatkan etanol murni dan dilakukan perhitungan total etanol yang dihasilkan. Nilai total etanol

setelah didistilasi disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Total Etanol Hasil Distilasi Variasi Konsentrasi Glukosa

Presentase Glukosa	Padatan terlarut awal (%brix)	Padatan terlarut akhir (%brix)	Selisih total padatan terlarut ( $\Delta$ % brix)	Total etanol (mL)	Total etanol / $\Delta$ %brix
G 8%	8,10 $\pm$ 0,14	3,90 $\pm$ 0,14	4,20 $\pm$ 0,14	18,00 $\pm$ 1,41	4,29
G 12%	10,50 $\pm$ 0,14	4,90 $\pm$ 0,42	5,60 $\pm$ 0,42	31,00 $\pm$ 2,12	5,54
<b>G 16%</b>	<b>13,40 <math>\pm</math> 0,57</b>	<b>5,10 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>8,30 <math>\pm</math> 0,42</b>	<b>38,75 <math>\pm</math> 1,77</b>	<b>4,67</b>
G 20%	16,10 $\pm$ 0,14	9,90 $\pm$ 0,99	6,20 $\pm$ 0,99	26,50 $\pm$ 5,66	4,27

Berdasarkan data pada Tabel 1, dapat dilihat penurunan total padatan terlarut atau presentasi glukosa tertinggi terjadi pada konsentrasi glukosa 16% memiliki selisih total padatan terlarut tertinggi sebesar 8,30% ( $\Delta$ %brix) dengan padatan terlarut awal 13,40% brix turun menjadi 5,10% brix serta menghasilkan total etanol tertinggi pula sebesar 38,75 mL. Total padatan terlarut dapat digunakan untuk menginterpretasikan jumlah glukosa yang terkandung pada bahan atau media (Bayu *et al.*, 2017). Pada proses fermentasi terjadi perubahan glukosa menjadi etanol sehingga seiring dengan meningkatnya produksi etanol menyebabkan penurunan glukosa yang terkandung dalam media fermentasi (Wibowo, 1990).

Hasil dari penelitian ini sesuai dengan Khurniawati *et al.* (2019) dimana konsentrasi glukosa yang baik digunakan berkisar 10–18%. Apabila konsentrasi glukosa di bawah 10% maka total etanol yang dihasilkan kurang optimal, dapat dilihat dari hasil proses fermentasi menggunakan konsentrasi 8% hanya menghasilkan etanol sebesar 18,00 mL memiliki selisih total padatan 4,20 ( $\Delta$ %brix) dengan total padatan terlarut awal 8,10% brix turun menjadi 3,90% brix, kondisi ini terjadi disebabkan glukosa yang terkandung dalam media fermentasi terlalu sedikit, sehingga bakteri kekurangan bahan utama yaitu glukosa untuk diubah menjadi etanol. Jika konsentrasi glukosa terlalu tinggi dan pekat, aktivitas

bakteri dapat terhambat (Casida, 1980) atau berakibat mengganggu metabolisme sehingga menghambat pembelahan sel selanjutnya berpengaruh terhadap etanol yang dihasilkan (Wigyanto *et al.*, 2001), hal ini dapat dilihat pada konsentrasi glukosa 20% memiliki selisih total padatan terlarut 6,20% brix dengan total padatan terlarut awal 16,10% brix turun menjadi 9,90% brix serta menghasilkan total etanol sebesar 26,50 mL. Penurunan total etanol yang terjadi pada konsentrasi glukosa berlebih merupakan efek dari inhibisi substrat yaitu pada kondisi substrat yang berlebih maka akan terjadi kejenuhan pembentukan kompleks enzim substrat yang mengakibatkan substrat tidak diubah menjadi etanol (Arbianto, 1995). Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa konsentrasi glukosa yang kurang atau lebih dari kisaran 10–18% berpengaruh dalam menghasilkan etanol.

Hakim *et al.* (2020) dalam penelitiannya menggunakan konsentrasi glukosa 20% menghasilkan 15,35 mL dengan selisih total padatan 2,17% brix sedangkan dalam penelitian ini menggunakan konsentrasi glukosa 20% menghasilkan 26,50 mL dengan selisih total padatan 6,20% brix. Terjadinya perbedaan total etanol yang dihasilkan diperkirakan disebabkan oleh perbedaan perlakuan dalam tahapan pembuatan media fermentasi, dalam penelitian Hakim *et al.* (2020) media fermentasi langsung disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C

selama 15 menit yang kemungkinan menyebabkan glukosa mengalami karamelisasi (*browning*) sedangkan dalam penelitian ini dilakukan pemisahan proses sterilisasi media fermentasi, pada glukosa dilakukan perlakuan tindalisasi dengan suhu 80 °C selama 1 jam dilakukan 3 kali berturut-turut sedangkan bahan lainnya disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Adapun faktor lainnya yang dapat mempengaruhi hasil total etanol yang diperoleh seperti pH media dan suhu selama proses fermentasi berlangsung (Wulandari, 2019).

Tabel 2. Total Etanol Hasil Distilasi Lama Fermentasi

Lama Fermentasi	Padatan terlarut awal (%brix)	Padatan terlarut akhir (%brix)	Selisih total padatan terlarut ( $\Delta$ % brix)	Total etanol (mL)	Total etanol / $\Delta$ %brix
10 Hari	13,40 $\pm$ 0,57	5,10 $\pm$ 0,42	8,30 $\pm$ 0,42	38,75 $\pm$ 1,77	4,67
14 Hari	13,80 $\pm$ 0,00	8,75 $\pm$ 1,77	5,05 $\pm$ 1,77	37,50 $\pm$ 2,83	7,43
17 Hari	13,90 $\pm$ 0,14	9,30 $\pm$ 0,99	4,60 $\pm$ 0,99	20,75 $\pm$ 10,96	4,51
20 Hari	13,90 $\pm$ 0,14	10,50 $\pm$ 0,71	3,40 $\pm$ 0,71	9,00 $\pm$ 2,12	2,65

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat pada lama fermentasi 14 hari menghasilkan total etanol sebesar 37,50 mL dengan selisih total padatan terlarut 5,05 ( $\Delta$ %brix) dari total etanol yang dihasilkan masih lebih rendah dari hasil perlakuan lama fermentasi 10 hari yaitu sebesar 38,75 mL dengan selisih total padatan terlarut 8,30 ( $\Delta$ %brix). Pada perlakuan selanjutnya yaitu lama fermentasi 17 hari menghasilkan total etanol 20,75 mL dengan selisih total padatan 4,60 ( $\Delta$ %brix) dan 20 hari hanya mendapatkan 9,00 mL dengan selisih total padatan 3,40 ( $\Delta$ %brix). Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa semakin lama waktu fermentasi maka total etanol yang dihasilkan semakin menurun. Kemungkinan penyebab terjadinya penurunan total etanol disebabkan karena etanol telah dikonversi menjadi senyawa lain. Lama fermentasi juga dipengaruhi oleh faktor-faktor yang secara langsung maupun tidak langsung berpengaruh terhadap proses fermentasi. Ada banyak faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain

### Lama Fermentasi dalam Produksi Etanol

Konsentrasi glukosa optimal yang menghasilkan total etanol tertinggi yaitu konsentrasi glukosa 16%, kemudian dilakukan perlakuan selanjutnya yaitu fermentasi dengan lama fermentasi 14, 17 dan 20 hari untuk mengetahui waktu fermentasi optimal dalam memproduksi etanol. Nilai total etanol setelah distilasi dengan menggunakan konsentrasi glukosa 16% serta variasi lama fermentasi dapat dilihat pada Tabel 2.

substrat, pH, suhu, dan lain-lain (Kunaepah, 2008).

Pada umumnya semakin lama fermentasi, konsentrasi glukosa yang ada semakin berkurang, penurunan glukosa terjadi karena bakteri membutuhkan substrat untuk pertumbuhan, glukosa digunakan oleh bakteri untuk beraktivitas sehingga menghasilkan etanol sebagai metabolit primer (Nasrun *et al.*, 2015). Dalam penelitian ini total padatan terlarut akhir tidak mengalami penurunan selama proses fermentasi 14, 17 dan 20 hari yang dapat dilihat pada Tabel 2, hal ini diperkirakan aktivitas bakteri terhambat dikarenakan produk metabolisme yang dihasilkan berupa senyawa asam atau bakteri BM1-CP14 sebaliknya menghasilkan sisa metabolit organik dan gula yang dikonsumsi tidak lagi dikonversi menjadi etanol.

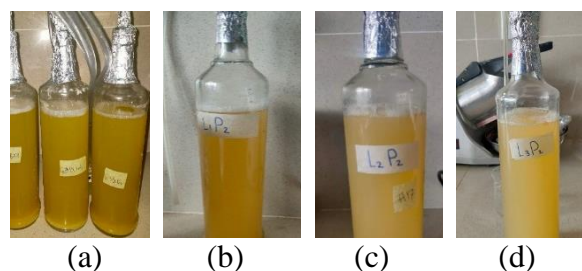
Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang perlu untuk diperhatikan pada saat proses fermentasi. Derajat keasaman (pH) dapat mempengaruhi

pertumbuhan bakteri BM1-CP14. Oleh karena itu, pada awal pelaksanaan penelitian, substrat yang akan dipakai terlebih dahulu diuji pHnya, berdasarkan hasil uji pH media fermentasi (ZSM), masing-masing media fermentasi menghasilkan pH awal rata-rata dengan nilai 5,6 setelah proses fermentasi 10, 14, 17 dan 20 hari media fermentasi diuji pH untuk mengetahui nilai pH akhir media, nilai pH awal dan akhir media fermentasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji pH media fermentasi

Lama Fermentasi	pH Awal	pH Akhir
10 Hari	5,6	4,1
14 Hari	5,6	3,4
17 Hari	5,5	3,25
20 Hari	5,6	3,0

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa semakin lama proses fermentasi maka nilai pH media fermentasi mengalami penurunan. Hal tersebut disebabkan pada proses fermentasi berlangsung, glukosa dalam medium dimetabolisme oleh Isolat BM1-CP14 menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub> dan juga menghasilkan produk berupa senyawa asam. Menurut Rachmawati *et al.* (2019), kondisi tersebut berkaitan dengan semakin lama waktu fermentasi maka semakin banyak alkohol yang diubah menjadi asam oleh mikroba sehingga kondisi fermentasi menjadi asam yang menyebabkan pH menurun. Hal ini diperkuat oleh Wardani (2018), yang menyatakan bahwa pada fermentasi etanol menghasilkan etanol sebagai produk utama dan produk sampingan seperti karbondioksida dan asam-asam organik seperti asam priuvat, asam laktat dan asam-asam lainnya. Pada media fermentasi yang telah diinokulasikan dengan Isolat BM1-CP14 masih terjadi proses fermentasi pada hari ke- 10, 14, 17 dan 20 yang ditandai oleh keluarnya gelembung-gelembung udara yaitu CO<sub>2</sub>. Kondisi media selama proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Media Fermentasi dengan perlakuan lama fermentasi (a) 10 hari; (b) 14 hari; (c) 17 hari; (d) 20 hari

Dari Gambar 1 diketahui bahwa fermentasi etanol di atas hari ke-10 masih terjadi proses fermentasi, namun isolat BM1-CP14 tidak memproduksi etanol sebagai produk utama sebaliknya memproduksi produk sampingan yang berupa asam-asam organik dilihat dari pH akhir media fermentasi yang menurun. Hal tersebut menunjukkan bahwa fermentasi lebih dari 10 hari kurang optimal untuk menghasilkan etanol.

Isolat BM1-CP14 memperoleh kondisi optimal pada fermentasi dengan konsentrasi glukosa 16% dan lama fermentasi 10 hari mendapatkan selisih total padatan terlarut 8,30% ( $\Delta\%$ brix) dengan *yield* alkohol yang dihasilkan 7,75% (*v/v*) dengan total etanol 4,67% ( $\Delta\%$ brix) dan total etanol 38,75 mL dari 500 mL media fermentasi, hal tersebut dapat dikatakan masih terbilang lebih rendah dibandingkan dengan strain bakteri lainnya seperti penelitian yang dilakukan oleh Ernes *et al.* (2014) melakukan pembuatan etanol dari pati biji nangka menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* CP4 dengan konsentrasi gula reduksi 14% per 100 mL mediafermentasi dapat menghasilkan etanol 9,06% (*b/v*), serta penelitian yang dilakukan oleh Wulandari (2019) yang melakukan optimasi pada media fermentasi menggunakan khamir IS 258 dengan konsentrasi glukosa 20% selama 10 hari, selisih total padatan terlarut mencapai 16,00% ( $\Delta\%$ brix) dengan *yield* alkohol 9,86% (*v/v*) dan total etanol 6,11% ( $\Delta\%$ brix) dari total etanol sebesar 98,61 mL dari 1000 mL media. Perbedaan pada hasil etanol yang diperoleh

kemungkinan disebabkan karena mikroorganisme yang digunakan memiliki kondisi optimal yang berbeda dalam memproduksi etanol. Selain itu lama fermentasi juga mempengaruhi hasil total etanol yang dihasilkan. Kemungkinan pada penelitian ini lama fermentasi diatas 10 hari masih kurang optimal karena pH pada media sudah mengalami penurunan dapat dilihat pada Tabel 3, hal ini menunjukkan bahwa isolat BM1-CP14 sudah memproduksi produk samping yang dapat mempengaruhi total etanol yang dihasilkan.

#### **Pengamatan Kurva Pertumbuhan**

Pengamatan kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 dilakukan dengan menggunakan *scanning* terhadap nilai absorbansi dari isolat BM1-CP14 menggunakan *spectrophotometry*. Pengamatan kurva pertumbuhan menggunakan media fermentasi ZSM dengan konsentrasi glukosa 2%. Tabel hasil pengamatan kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 dapat dilihat pada Tabel 4 dan grafik kurva pertumbuhan pada Gambar 2. Pengamatan kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 disajikan pada Tabel 4 sebagai berikut:

Tujuan pengamatan kurva pertumbuhan pada isolat BM1-CP14 adalah untuk mengetahui waktu tumbuh optimum dari bakteri tersebut. Setiap mikroorganisme memiliki bentuk kurva pertumbuhan yang spesifik dapat dilihat dari tabel hasil pengamatan kurva pertumbuhan diperoleh lama pertumbuhan isolat BM1-CP14 yaitu selama 54 jam. Pada Tabel 4 dapat dilihat terdapat fase pertumbuhan pertama yaitu fase lag atau fase adaptasi. Pada fase ini isolat BM1-CP14 menyesuaikan diri dengan kondisi lingkungan disekitarnya. Jika sebelum diinokulasi dilakukan peremajaan pada media yang sama maka mikroorganisme tidak memerlukan fase lag dalam upaya penyesuaian diri dengan lingkungannya (Setyati *et al.*, 2015), sehingga pada kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 tidak memerlukan fase lag atau fase adaptasi karena isolat BM1-CP14

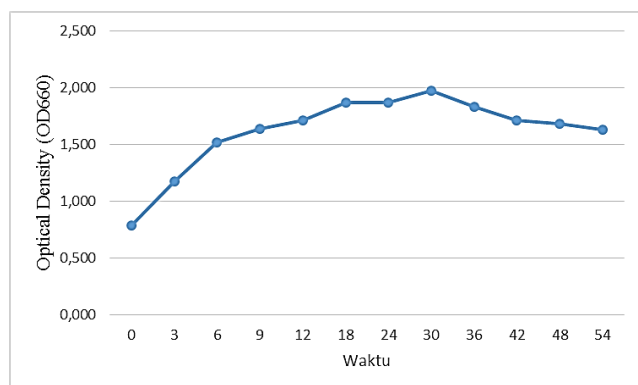
sudah melewati fase peremajaan. Pertambahan sel dan terus menanjak pada kurva pertumbuhan isolat BM1-CP14 terjadi pada jam ke-3 hingga ke-18.

Tabel 4. Tabel Hasil Pengamatan Kurva Pertumbuhan Isolat BM1-CP14

No.	Waktu (Jam)	<i>Optical Density</i> (OD)	Fase Pertumbuhan
1	0	0,79	Fase Lag
2	3	1,18	Fase Eksponensial
3	6	1,52	Fase Eksponensial
4	9	1,64	Fase Eksponensial
5	12	1,71	Fase Eksponensial
6	18	1,87	Fase Stasioner
7	24	1,87	Fase Stasioner
8	30	1,98	Fase Stasioner
9	36	1,83	Fase Kematian
10	42	1,71	Fase Kematian
11	48	1,68	Fase Kematian
12	54	1,63	Fase Kematian

Pada fase eksponensial sel-sel mikroba mulai aktif membelah dan jumlah sel meningkat (Nester *et al.*, 2007). Pertumbuhan optimum dicapai pada jam ke-18 (fase awal stasioner) pada waktu ini isolat sangat baik untuk dijadikan inokulum karena jumlah dan aktivitasnya optimal. Pada jam ke-18 sampai ke-30 isolat BM1-CP14 mengalami fase stasioner dimana laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya. Mangunwidjaja dan Suryani (1994), menyatakan bahwa ukuran sel pada fase stasioner menjadi lebih kecil-kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Pada jam ke-30 sampai ke-54 isolat BM1-CP14 mengalami fase kematian, fase ini jumlah sel bakteri yang mati lebih banyak dari jumlah bakteri yang hidup. Sehingga dengan membuat kurva pertumbuhan ini dapat ditentukan waktu yang optimal untuk starter dalam memproduksi etanol. Starter isolat BM1-CP14 mendapatkan waktu optimal pada jam ke- 18 hingga jam ke- 30. Grafik kurva pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 2.





Gambar 2. Grafik Kurva Pertumbuhan Isolat BM1-CP14

Grafik pada Gambar 2 di atas terlihat bahwa fase pertumbuhan isolat BM1-CP14 terdiri dari 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Dapat diketahui bahwa kurva fase pertumbuhan isolat BM1-CP14 menghasilkan pertumbuhan dengan waktu tumbuh selama 54 jam, dimulai dari fase eksponensial selama 12 jam, fase stasioner selama 18 jam dan diakhiri pada fase kematian.

Di masa depan diharapkan strain bakteri BM1-CP14 dapat menjadi alternatif starter fermentasi dalam memproduksi etanol dengan memperhatikan faktor-faktor yang berpengaruh dalam pertumbuhan BM1-CP14 seperti lama fermentasi di bawah 10 hari, suhu inkubasi, pH awal media dll untuk menghasilkan etanol yang lebih besar dibandingkan dengan penelitian sebelumnya.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi glukosa yang kurang atau lebih dari kisaran 10–18% berpengaruh dalam menghasilkan etanol. Total etanol tertinggi diperoleh dari konsentrasi glukosa 16%.
2. Lama fermentasi 14, 17 dan 20 hari dalam produksi etanol berpengaruh terhadap total etanol yang dihasilkan, semakin lama

fermentasi maka total etanol yang dihasilkan semakin menurun.

3. Kurva fase pertumbuhan isolat BM1-CP14 menghasilkan pertumbuhan dengan waktu tumbuh selama 54 jam, dimulai dari fase eksponensial selama 12 jam, fase stasioner selama 18 jam dan diakhiri pada fase kematian.

### Saran

Adapun saran dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi pertumbuhan optimum isolat BM1-CP14 seperti lama fermentasi dibawah 10 hari, pH media fermentasi dan suhu selama proses fermentasi berlangsung.
2. Perlunya dilakukan identifikasi spesies dan sub spesies dari isolat BM1-CP14.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afifi, M. M., T. M. A E. Ghany, M. A. Al Abboud, T. M. Taha dan K. E Ghaleb. 2011. Biorefinery of industrial potato wastes to ethanol by solid state fermentation. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 7(1): 126–134.
- Angelia. 2020. Studi Awal Fermentasi Etanol dari *Dextrose Monovydrate* dengan Kondisi *Very High Gravity*. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Universitas Katolik Parahyangan. Bandung.
- Arsa, M. 2016. Proses pencoklatan browning process pada bahan pangan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Udayana.
- Azizah, N., A. N. Al-Baari dan S. Mulyani. 2012. Pengaruh lama fermentasi terhadap konsentrasi alkohol, pH dan produksi gas pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. *jurnal aplikasi teknologi pangan*. 1(2): 72–77.

- Bayu, M. K., H. Risqiati dan Nurwantoro. 2017. Analisis total padatan terlarut, keasaman, konsentrasi lemak, dan tingkat viskositas pada kefir optimal dengan lama fermentasi yang berbeda. *Jurnal Teknologi Pangan* 1(2): 33–38.
- Bagaskara, A., I. M. M. Wijaya dan N. S. Antara. 2020. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil bioetanol dari lingkungan industri arak di Desa Tri Eka Buana, Kecamatan Sidemen, Karangasem Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 8 (2): 290–300.
- Byeonghwan. 2007. Optimization Production Etanol from Concentrated Substrate. Disertasi. Tidak Dipublikasikan. Auburn University. Alabama.
- Ernes, A dan A. K. Wardani. 2014. Pembuatan bioetanol dari pati biji nangka oleh *Zymomonas mobilis* CP4 (kajian konsentrasi inokulum dan amonium sulfat). *Jurnal Agrina*. 1(1): 5–13.
- Hafsan. 2014. Mikrobiologi Analitik. Alauddin University Press.
- Hakim, A.A., I. M. M. Wijaya dan I. B. W. Gunam. 2020. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil etanol dari lingkungan industri arak bali di Desa Merita dan Tri Eka Buana, Karangasem-Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 8 (2): 279–289.
- Handayani, G. 2016. Pengaruh Suhu dan Volume Starter dalam Pembuatan Bioetanol dari Nira Aren (*Arenga Pinnata* Merr). Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Fakultas Teknik. Universitas Sumatra Utara.
- Hening and Zeddies. 2006. Bioengineering and agriculture. Promises and Challenges International Food Policy Research Institute.
- Khurniawati., M. U. Fathoni dan N. K Sari. 2019. Pembuatan bioetanol berbasis glukosa off grade dengan proses fermentasi menggunakan fermiol. *Jurnal Teknik Kimia*. 13(2): 48–52.
- Kusumaningati, M. A., S. Nurhatika dan A. Muhibuddin. 2013. Pengaruh konsentrasi inokulum bakteri *Zymomonas mobilis* dan lama fermentasi pada produksi etanol dari sampah sayur dan buah pasar wonokromo Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(2): 2337–3520.
- Kunaepah, U. 2008. Pengaruh lama fermentasi dan konsentrasi glukosa terhadap aktivitas antibakteri, polifenol total dan mutu kimia kefir susu kacang merah. Tesis. Tidak Dipublikasikan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Mangunwidjaja, D dan Suryani, A. 1994. Teknologi Bioproses. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Nasrun., Jalahuddin dan Mahfuddhah. 2015. Pengaruh jumlah ragi dan waktu fermentasi terhadap konsentrasi bioetanol yang dihasilkan dari fermentasi kulit pepaya. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*. 4(2): 1–10.
- Nester. E., D. Anderson., C. E. Roberts., M. Nester. 2009. *Microbiology a human perspective 6th edition*. McGraw-Hill. New York.
- Puspita, E. M., H. Silviana dan T. Ismail. 2010. Fermentasi etanol dari molasses dengan *Zymomonas mobilis* A3 yang diamobilisasi pada κ-karaginan. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. Universitas Diponegoro Semarang. 1–4.
- Panasar, P. S., S. S. Marwaha dan J. F. Kennedy. 2006. *Zymomonas mobilis*: an alternative etanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 8(1): 623–635.

- Rachmawati, N., F.A. Nurlaili dan B.D. Wijatniko. 2019. Pengaruh waktu fermentasi dan penambahan konsentrasi inokulum (*Acetobacter aceti*) terhadap kualitas asam cuka dari buah kersen (*Muntingia calabura L.*). Indonesian Journal of Halal Science. 001(01): 12–17.
- Silaban, B. M. J. 2017. Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* Dengan Response Surface Methodology. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Fakultas Teknologi Industri. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- 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.
- Simbolon, N. C., I. M. M. Wijaya dan I. B. W. Gunam. 2018. Isolasi dan karakterisasi khamir potensial penghasil bioetanol dari industri arak di Krangasem Bali. Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri. 6(4): 316–326.
- Wardani, A. K. 2018. Pengaruh Lama Fermentasi pada Pembuatan Bioetanol dari *Sargassum* sp Menggunakan Metode Hidrolisis Asam dan Fermentasi Menggunakan Mikroba Asosiasi (*Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* dalam Ragi Tape dan Ragi Roti. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Widyanti, E. M dan B. I. Moehadi. 2016. Proses pembuatan etanol dari gula menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* amobil. Jurnal Metana. 12(2): 31–38.
- Wulandari, I. A.. E. P. 2019. Optimasi Konsentrasi Yeast Extract dan Peptone pada Media Tumbuh Khamir Potensial Isolat IS 258 untuk Produksi Etanol Optimal. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Fakultas Teknologi Industri. Universitas Udayana. Bali.
- Yuda, I.G. Y. W., I. M. M. Wijaya dan N. P. Suwariani. 2018. Studi pengaruh pH awal media dan konsentrasi substrat pada proses fermentasi produksi bioetanol dari hidrolisat tepung biji kluwih (*Actinocarpus communis*) dengan menggunakan *Saccaromyces cerevisiae*. Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri. 6(2): 115–124.