

JURNAL METAMORFOSA
Journal of Biological Sciences
ISSN: 2302-5697
<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Fermentasi Etanol Jangka Panjang Khamir IS258 Terimobilisasidalam *Beads* Matriks Alginat Metode *Fed-Batch* untuk Pengurangan Penggunaan Kultur Starter

Long-Term Ethanol Fermentation by IS258 Yeast Immobilized in Alginate Matrix Using Fed-Batch Method for the Reduction of the Culture Starter Usage

Ida Ayu E. P. Wulandari¹, Indah S. R. Naibaho¹, Desi N. I. Izzabilah¹, I M. Mahaputra Wijaya^{1,2,*}, Ida Bagus W. Gunam^{1,2}, I W. Arnata¹

¹Program Studi Teknologi Industri Pertanian, ²Laboratorium Bioindustri, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Kode pos : 80361; Telp/Fax : (0361) 701801

*e-mail: mahaputrawijaya@unud.ac.id

INTISARI

Imobilisasi sel menggunakan matrik penjerat (*matrix entrapment*) merupakan suatu proses untuk menghentikan pergerakan dari sel pada tempat tertentu dalam suatu ruang reaksi dan digunakan sebagai katalis, umumnya digunakan dalam bioteknologi seperti fermentasi etanol karena lebih efisien dan efektif dibandingkan dengan menggunakan kultur bebas. Isolat khamir IS258 adalah isolat unggul yang diambil dari industri arak di Karangasem Bali berfungsi sebagai agen fermentasi bioetanol. Pada penelitian ini, imobilisasi sel khamir IS258 dibuat dengan menggunakan natrium alginat yang berfungsi sebagai bahan penjerat atau pemerangkap (*entrapment*) sel khamir IS258 untuk membentuk matriks alginat-IS258. Matriks alginat-IS258 yang dibuat kemudian digunakan untuk fermentasi etanol berulang dari analog nira kelapa yang ditujukan untuk mengganti penggunaan starter baru setiap fermentasi baru dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan analisis bagaimana kemampuan kondisi fermentasi awal dan kondisi fermentasi berjalan oleh khamir IS258 selama fermentasi analog nira berlangsung. Hasil yang diperoleh bahwa semakin lama khamir IS258 dalam *beads* matriks alginat digunakan maka ukuran struktur butiran (*beads*) matriks semakin mengembang. Ini dikarenakan populasi sel khamir IS258 yang meningkat di dalam *beads* matriks, sehingga ukuran *beads* membesar dan kemungkinan kekuatan struktur pada alginat semakin melemah. Hasil perhitungan jumlah khamir IS258 menggunakan metode *total plate count* menunjukkan pada *beads* baru sebanyak $1,6 \times 10^5$ CFU/g, dan *beads* matriks alginat-IS258 setelah pemakaian berulang selama 140 hari sebanyak $6,7 \times 10^5$ CFU/g, sel khamir yang mengendap sebanyak $1,5 \times 10^6$ CFU/g, dan cairan hasil fermentasi sebanyak $1,1 \times 10^6$ CFU/g. Konsentrasi etanol yang diproduksi semakin lama semakin meningkat konsentrasinya dan imobilisasi IS258 pada kalsium alginat dianggap mampu menggantikan penambahan starter IS258 dan menggantikan metode fermentasi sistem *batch*.

Kata kunci: khamir IS258, imobilisasi, etanol, fermentasi.

ABSTRACT

Cell immobilization using entrapment matrix is a process to stop the movement of cells at a certain place in a reaction chamber that is used as a catalyst, has been commonly used for various biotechnology

applications, one of which is ethanol fermentation because of being more efficient and effective in comparison with free culture. Yeast isolate IS258 is a superior isolate taken from the arak industry in Karangasem Bali functions as bioethanol fermentation agent. The immobilization of IS258 yeast cells was made using sodium alginate which functions as an entrapment. The calcium alginate matrix of IS258 was then used for ethanol fermentation of coconut sap analogue to replace the use of new starter. In this study, the ability of initial fermentation conditions and running fermentation conditions by IS258 yeast during the fermentation of coconut sap analogue was analyzed. The results obtained that the longer the IS258 yeast in the alginate matrix beads is used, the size of the matrix beads structure expands due to the increasing IS258 population in the matrix beads so that the possibility of structural strength in alginate is weakened. The results of the number of IS258 yeast colonies using the total plate count method showed that the new beads were 1.6×10^5 CFU/g, beads after repeated use for 140 days were 6.7×10^5 CFU/g, precipitated yeast cells were 1.5×10^6 CFU/g, and the fermented liquid was 1.1×10^6 CFU/g. The ethanol produced increased in concentration over time and the immobilization of IS258 on calcium alginate was considered capable of replacing the addition of IS258 starter and replacing the batch system fermentation method.

Keywords: yeast IS258, immobilization, ethanol, fermentation.

PENDAHULUAN

Biofuel merupakan bioenergi yang dapat digunakan untuk mensubstitusi energi fosil, dan saat ini paling banyak dikembangkan. Biofuel biasanya dimanfaatkan sebagai bahan bakar kendaraan khususnya di Indonesia. Salah satu biofuel yang paling banyak dikembangkan ialah bioetanol (Effendi, 2009). Bioetanol biasanya dihasilkan dari proses fermentasi bahan alam yang banyak mengandung monosakarida maupun polisakarida (Effendi, 2009) menggunakan bantuan mikroorganisme untuk mengubah gula menjadi etanol (Sebayang, 2006). Mikroorganisme yang umumnya digunakan dalam proses fermentasi bioetanol ialah khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

Sebelumnya pada penelitian Simbolon *et al.* (2018) telah ditemukan khamir potensial penghasil bioetanol hasil isolasi khamir dari industri arak di Karangasem, Bali. Khamir potensial tersebut diberi nama khamir IS258 merupakan khamir yang diperkirakan bergenus *Saccharomyces* sp. Khamir IS258 dapat memproduksi etanol sebesar 10,38% (v/v) lebih banyak apabila dibandingkan dengan khamir kering (*dried yeast*) merk Alcotec dengan etanol sebesar 7,26% (v/v) (Simbolon *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian Wulandari (2018) dan Prameshwari *et al.*, (2024), khamir IS258 dapat memproduksi etanol dengan optimal pada pH media fermentasi 6 dan suhu fermentasi 28°C.

Fermentasi etanol yang dilakukan pada masyarakat tradisional umumnya fermentasi spontan menggunakan sistem fermentasi *batch process*. Sistem *batch process* merupakan proses fermentasi yang dilakukan dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi (Rusmana, 2008). Namun sistem fermentasi ini memiliki beberapa kekurangan selain biaya starter yang kemungkinan cukup tinggi yaitu produktivitas yang rendah, waktu yang dibutuhkan lama, dan biaya tenaga kerja tinggi (Bohnet, 2003). Setelah proses fermentasi selesai, cairan hasil fermentasi bersama dengan khamir di dalamnya akan didistilasi untuk mendapatkan etanol. Proses distilasi etanol menggunakan suhu yang tinggi karena etanol akan menguap pada suhu 78,4°C. Khamir yang terdapat pada cairan hasil fermentasi pun akan mati karena terpapar oleh suhu dan lingkungan yang panas sehingga tidak dapat digunakan kembali sebagai agen fermentasi (Yanti *et al.*, 2019), sehingga starter baru terus-menerus diperlukan setiap memulai fermentasi *batch* berikutnya.

Imobilisasi adalah suatu teknik yang memerangkap enzim atau sel dalam suatu ruang reaksi atau matriks sebagai katalis dan dapat digunakan berulang kali (Darmawan *et al.*, 2010). Pada penelitian ini imobilisasi sel menggunakan *beads* matriks Ca-alginat dibuat berbentuk butiran (*beads*) dengan memerangkap (*entrapment*) khamir IS258 dalam *beads* matriks Ca-alginat. Sistem fermentasi yang digunakan pada penelitian ini adalah sistem *batch-fed* karena media fermentasi secara *batch* akan dialirkan ke dalam botol fermentasi setiap proses fermentasi akan dimulai dan *beads* matriks alginat IS258

secara terus-menerus akan digunakan kembali sebagai agen fermentasi. Fermentasi etanol menggunakan IS258 terimobilisasi dalam *beads* matriks alginat menggunakan media analog nira dari Peptone, Yeast, Glukosa (PYG) dilakukan selama lebih dari 140 hari dengan pemakaian berulang *beads* matriks IS258 terimobilisasi. Selama proses fermentasi, perubahan fisik pada *beads* matriks dan populasi sel khamir IS258 diamati pada: *beads* matriks alginat baru, *beads* lama atau sudah digunakan berulang, cairan hasil fermentasi, dan endapan yang terdapat dalam botol fermentasi. Populasi khamir IS258 diamati menggunakan metode *total plate count* pada media agar PYG. Performa *beads* matriks alginat-IS258 dalam menghasilkan etanol dari proses fermentasi analog nira PYG selama 140 hari juga diamati.

Pada penelitian ini digunakan analog nira kelapa sebagai media fermentasi. Analog nira adalah media fermentasi dari bahan PYG yang komposisinya telah disesuaikan dengan komposisi nira kelapa alami dari alam. Analog nira digunakan dalam penelitian untuk dapat menyeragamkan kondisi awal nira pada setiap perlakuan karena nira kelapa alami rentan mengalami perubahan karakteristik tergantung dengan cuaca saat nira diambil. Nira kelapa yang dihasilkan pada saat musim hujan memiliki karakteristik lebih encer dan berpotensi tercemar lebih tinggi, sedangkan nira pada saat musim kemarau memiliki karakteristik kental dan manis. Adapun komposisi analog nira pada penelitian ini mengacu pada hasil penelitian Prameshwari *et al*, (2024) didapat bahwa media PYG (peptone 3,6 g/L, yeast extract 2 g/L, dan dekstrosa 140g/L) dengan pH 6 memiliki kandungan protein dan gula yang sama dengan nira kelapa, dimana unsur mikroskopis lainnya diasumsikan sama.

Dari permasalahan yang dipaparkan di atas, penelitian ini ditujukan untuk melihat apakah metode imobilisasi sel khamir IS258 dalam *beads* matriks alginat yang dikembangkan mampu menjadi solusi masa depan dalam mengurangi penggunaan starter pada fermentasi *batch process* sehingga biaya fermentasi etanol dapat menjadi lebih efisien.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah stok isolat khamir IS258, *peptone*, (Merck), *yeast extract* (Himedia), *glucose*, (Merck), aquades, NaCl (Merck), gliserol 85% (Supelco), Na-Alginat 3% (Himedia), aquades, dan agar serbuk (Himedia).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer (Libra), *laminar flow* (WINA), *incubator* (Memmert), *autoclave* (All American Model 1925X), *Magnetic Stirrer* (Iwaki Stirrer BS 38), *shaker* (Health), *centrifuge* (Oregon), fermentor kustom, destilator 2 tingkat, cawan petri (Pirex-Iwaki), tabung reaksi, labu Erlenmeyer, vortex (Joanlab Multi Plate), spatula, dan alkohol meter yang telah dikalibrasi dengan etanol (*p.a*).

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan percobaan eksperimental dengan variasi kadar khamir IS258 yaitu 1%, 2%, dan 3% (*v/v*) $OD_{660} = 5$ yang kemudian ditambahkan ke dalam larutan PYG Na-Alginat 3% (*b/v*) sebagai agen fermentasi etanol dalam analog nira kelapa dengan pengulangan sebanyak 2 kali replikasi, dan hasilnya dirata-ratakan. Kadar alginat 3% didapat sebagai kadar maksimal yang dapat digunakan pada metode pencetakan menggunakan metode *gravity drops* yang dilakukan menggunakan ion Ca^{+} sebagai agen pengeras gel (*ionotropic gelation*) *beads*. Analisis propagasi isolat khamir IS258 dilakukan pada *beads* matriks alginat-IS258 baru, dan *beads* lama matriks IS258, endapan sel IS258 di akhir fermentasi dan cairan hasil fermentasi.

Pelaksanaan Penelitian

Peremajaan dan Perbanyak Kultur Khamir IS258

Peremajaan kultur dimulai dengan menumbuhkan 3 mL stok kultur isolat khamir IS258 pada 100 mL media cair PYG pH 5 dengan komposisi *peptone* 7.5 g, *yeast extract* 4.5 g dan 5 g glukosa ditambahkan akuades sampai dengan 100 mL untuk kemudian disterilisasi, lalu diinkubasi pada suhu 28

°C menggunakan *shaker rotator* selama 24 jam (Prameshwari *et al.*, 2024). Perbanyakannya dilakukan dengan memindahkan kultur hasil peremajaan ke dalam 1000 mL media PYG baru dengan perbandingan kultur terhadap media yaitu 1:10 kemudian diinkubasi kembali pada suhu 28 °C menggunakan *shaker rotator* selama 24 jam.

Pencucian Kultur Khamir IS258

Hasil perbanyakannya kemudian dipresipitasi dengan *centrifugator* (3.000 rpm) selama 5 menit. Pencucian pelet sel dilakukan dengan penambahan larutan NaCl 0,85% (*b/v*) sampai batas tabung sentrifugasi, dihomogenisasi dengan menggunakan vortex, dan disentrifugasi kembali sebanyak 2-3 kali pengulangan. Hasil pencucian kemudian disamakan (*di-adjust*) kepadatan selnya melalui penyamaan tingkat kekeruhan sel (*optical density*) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm ($OD_{660} = 5$).

Pembuatan Analog Nira

Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini adalah analog nira yang dibuat dari larutan *peptone yeast extract glucose* (PYG) (peptone 3,6 g/L, yeast extract 2 g/L, dan dekstrosa 140g/L) dengan pH 6 dan kemudian disterilisasi (Prameshwari *et al.*, 2024).

Imobilisasi Sel Khamir IS258 pada Ca-Alginat

Beads matriks alginat-IS258 dibuat dengan menambahkan Na-alginat 3% (*b/v*) pada media PYG optimal (9 g/L *peptone*; 5 g/L *yeast*; 200 g/L dekstrosa) kemudian diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan disimpan semalaman pada suhu 4°C untuk de-aerasi. Untuk mengimobilisasi khamir IS258 dan membentuk *beads* matriks alginat-IS258, masing-masing 1%, 2%, dan 3% (*v/v*) suspensi sel khamir IS258 yang sebelumnya sudah *di-adjust* ($OD_{660} = 5$) ditambahkan ke dalam PYG-alginat 3% (*b/v*) dan diaduk perlahan sampai merata. Campuran alginat-IS258 dan PYG kemudian diteteskan secara perlahan menggunakan *nozzle* 2 mm dengan metode *gravity drop* ke dalam larutan CaCl₂ 1,5 % (*b/v*), dan dibiarkan mengeras selama 1 jam pada suhu 4 °C dengan pengadukan perlahan menggunakan *stirrer*.

Fermentasi Analog Nira Menggunakan Khamir IS258 Terimobilisasi

Beads matriks alginat-IS258 yang telah dibuat sebelumnya kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca fermentor kedap udara berisi analog nira dengan kapasitas 900 mL (20% *beads* matriks alginat-IS258 dan 720 mL analog nira) lalu ditutup dengan tutup botol yang diberi selang sebagai penyalur gas CO₂ hasil fermentasi dan ujung selang yang lain dipasangkan ke dalam larutan natrium metabisulfit 4% untuk mencegah kontaminasi selama proses fermentasi. Fermentasi dilakukan sampai gas CO₂ tidak lagi dihasilkan kemudian cairan fermentasi dialirkan ke luar fermentor dan *beads* matriks alginat-IS258 disaring untuk digunakan kembali sebagai agen fermentasi pada media analog nira yang baru. Cairan hasil fermentasi didistilasi menggunakan distilator 2-tingkat untuk mengekstraksi etanol. Fermentasi terus dilakukan secara kontinyu dan telah berlangsung selama kurang lebih 140 hari dengan penggunaan berulang *beads* matriks alginat IS258.

Analisis Propagasi Sel Khamir IS258 Terimobilisasi dalam Fermentasi Etanol

Analisis propagasi isolat khamir IS258 dilakukan dengan metode *Total Plate Count* untuk menunjukkan jumlah populasi sel yang terdapat dalam sampel dengan cara menghitung koloni sel yang tumbuh pada media agar (Rizki *et al.*, 2022), jumlah sel dinyatakan sebagai *Colony Farming Unit* (CFU) (Lestari *et al.*, 2016).

Pada penelitian ini digunakan media agar PYG yang sudah disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit kemudian dituangkan secara aseptik ke cawan Petri masing-masing 20 mL. Adapun propagasi populasi khamir IS258 pada *beads* matriks diamati pada 4 sampel yaitu *beads* matriks alginat yang baru dibuat, dan *beads* lama atau sudah digunakan berulang berumur 140 hari yang

dihomogenisasi menggunakan spatula dan diencerkan dalam tube sentrifugasi, cairan hasil fermentasi yang akan didistilasi, dan endapan yang terdapat pada botol fermentasi.

Perhitungan jumlah populasi sel khamir IS258 dilakukan pengenceran sampel dari 10^{-1} sampai 10^{-7} menggunakan larutan NaCl 0,85% (b/v) pada masing-masing sampel kemudian sebanyak 0,1 mL hasil pengenceran disebar diatas media agar PYG lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Jumlah koloni yang diperoleh dikalikan dengan dengan faktor pengencerannya.

Berikut rumus untuk menghitung *Total Plate Count* (TPC) :

$$\text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}} \quad (\text{Laili et al., 2022})$$

Setelah dihitung koloni IS258 pada tiap cawan petri, kemudian dapat ditentukan jumlah khamir tiap mL atau gram, misalnya untuk pengenceran 1:10.000 terdapat 55 koloni khamir maka tiap mL atau gram bahan mengandung 550.000 khamir (Thayib dan Amar, 1986).

Total Etanol dan Analisis Efisiensi Fermentasi

Pada penelitian ini, konsentrasi etanol awal pada media hasil fermentasi dan distilat hasil distilasi diukur menggunakan alkoholmeter yang sudah dikalibrasi dengan rumus perhitungan:

- Total etanol= total distilat x persentase etanol
- Konsentrasi etanol awal pada media= $\frac{\text{total etanol}}{\text{volume fermentasi}} \times 100\%$

Perhitungan efisiensi etanol hasil fermentasi dilakukan dengan cara membandingkan total etanol dengan hasil konversi teoritis maksimum 0,51 gr etanol per gr glukosa (Gombert *et al.*, 2014) dan CO₂ menggunakan rumus berikut:

$$\text{Efisiensi Etanol } (\eta) = \frac{\text{total etanol}}{\text{etanol maksimum teoritis}}$$

Sehingga $\eta =$

$$\frac{\text{konsentrasi} \times \text{volume distilat (mL)}}{0,51 \times \frac{\text{berat glukosa (g)}}{0,789 \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)}}$$

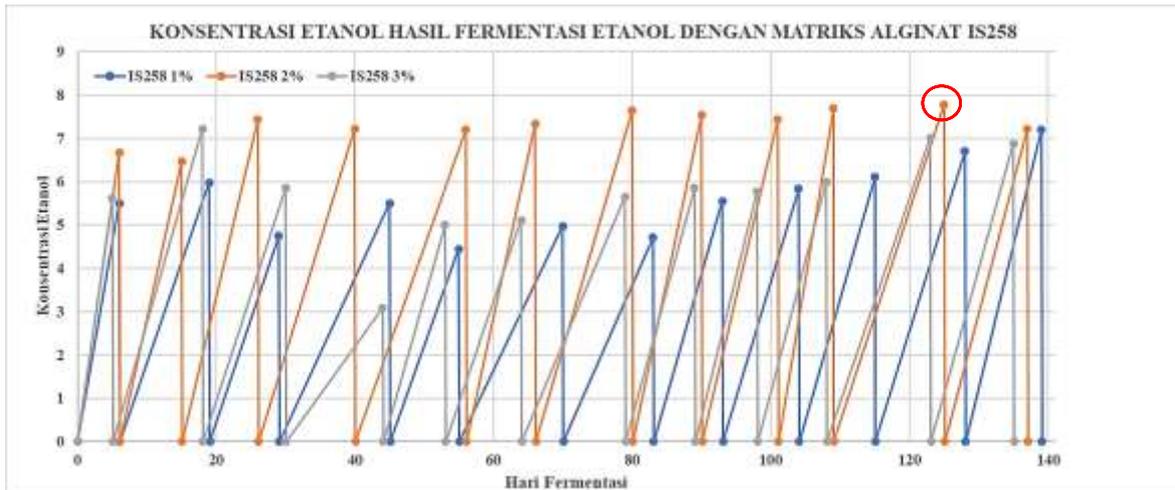
Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu data hasil etanol fermentasi *fed-batch*, dan jumlah populasi khamir IS258 pada *beads* matriks baru dan lama, cairan hasil fermentasi, dan endapan dalam botol fermentor menggunakan metode *total plate count*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi Etanol

Pada penelitian ini produksi etanol dilakukan dengan rata-rata lama fermentasi selama 13 hari. Plot konsentrasi etanol hasil distilasi fermentasi etanol dan lama fermentasi dengan menggunakan IS258 terimobilisasi dalam *beads* matriks alginat disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Konsentrasi Etanol Hasil Fermentasi Etanol Menggunakan *Beads* matriks Alginat IS258

Gambar 1 merupakan plot data konsentrasi etanol hasil fermentasi menggunakan *beads* matriks alginat-IS258 yang telah dipanen kemudian didistilasi untuk mengekstraksi etanol. *Beads* matriks alginat-IS258 pada botol fermentor ditambahkan media baru untuk fermentasi kembali dan diulang secara kontinyu. Fermentasi telah berlangsung selama kurang lebih 140 hari dengan penggunaan berulang *beads* matriks alginat IS258.

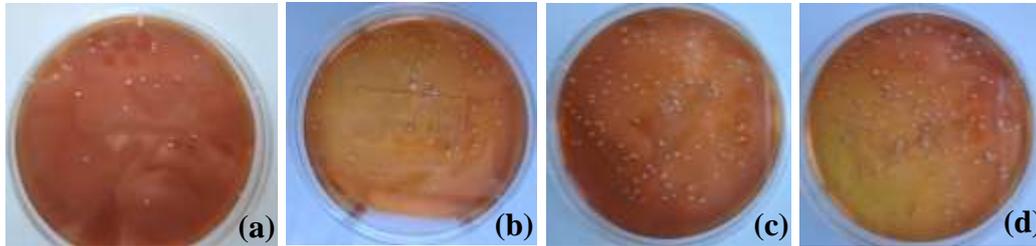
Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa semakin lama fermentasi berlangsung semakin tinggi konsentrasi etanol yang dihasilkan. Plot hasil fermentasi menunjukkan pola segitiga dikarenakan pada setiap pergantian media baru untuk memulai fermentasi ulang dengan menggunakan berulang *beads* matriks alginat-IS258 konsentrasi etanol kembali menjadi 0. Hasil konsentrasi etanol tertinggi dapat dilihat pada plot dengan lingkaran merah, yaitu diperoleh dari proses fermentasi pada hari ke-125 dengan *beads* matriks alginat dengan jumlah starter IS258 sebanyak 2% sebesar 7,8% (v/v) dengan efisiensi teoritis 85%.

Pada plot hasil proses fermentasi dengan *beads* matriks alginat-IS258 1% dapat dilihat bahwa konsentrasi etanol pertama yang dihasilkan masih rendah dan semakin lama semakin meningkat tetapi proses fermentasi menjadi lebih lama. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan proses pertumbuhan dengan populasi awal khamir IS258 1% selama fermentasi berlangsung membutuhkan waktu untuk berkembangbiak dengan baik dan glukosa sebagai sumber karbohidrat yang terkandung pada media analog nira pun sangat cukup apabila dibandingkan dengan populasi awal khamir IS258 2% dan 3% yang fermentasinya lebih cepat berhenti karena konsentrasi glukosa yang tidak cukup banyak untuk digunakan tumbuh dan berkembang. Kebutuhan akan glukosa bagi pertumbuhan khamir sangat penting karena glukosa merupakan sumber karbohidrat bagi khamir seperti khamir IS258. Konsentrasi glukosa yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan khamir sedangkan konsentrasi glukosa yang rendah akan mengurangi kemampuan khamir untuk tumbuh dan berkembang (Prameshwari *et al.*, 2024). Oleh karena itu proses fermentasi dengan konsentrasi IS258 3% dalam *beads* matriks alginat lebih cepat berakhir dibandingkan dengan khamir IS258 1% dan 2% karena konsentrasi glukosa yang tidak cukup untuk digunakan tumbuh dan berkembang.

Maka dilakukan uji analisis untuk mengetahui propagasi populasi khamir IS258 yang terjadi pada *beads* baru atau akan digunakan, *beads* lama yang telah digunakan 140 hari, endapan sel pada botol fermentor, dan cairan hasil fermentasi menggunakan metode *Total Plate Count*.

Analisis Propagasi Jumlah Populasi Khamir IS258 menggunakan *Total Plate Count* (TPC)

Jumlah koloni pertumbuhan khamir IS258 pada pengenceran 10^{-3} dapat dilihat pada Gambar 2 berikut menunjukkan Gambar (a) sampel beads baru, Gambar (b) sampel beads lama, Gambar (c) sampel endapan sel khamir IS258 dalam botol fermentasi, dan Gambar (d) sampel cairan hasil fermentasi.



Gambar 2. Koloni Khamir IS258 yang tumbuh pada media PYG Agar Diperoleh dari (a) Sampel Beads Baru, (b) Sampel Beads Lama, (c) Sampel Endapan Khamir IS258 dalam Botol Fermentasi, dan (d) Sampel Cairan Hasil Fermentasi

Metode perhitungan cawan atau *Total Plate Count* (TPC) dilakukan berdasarkan asumsi bahwa setiap sel yang dapat hidup akan berkembang menjadi satu koloni, sehingga jumlah koloni yang muncul pada cawan merupakan suatu indikator bagi jumlah sel yang dapat hidup terkandung dalam sampel lalu mencawakan hasil pengenceran tersebut. Setelah diinkubasi, jumlah koloni pada masing-masing cawan diamati. Untuk memenuhi persyaratan statistik *Total Plate Count*, cawan yang dipilih untuk perhitungan koloni ialah cawan yang mengandung koloni antara 30 sampai 300 koloni (Thayib dan Amar, 1986).

Hasil perhitungan jumlah koloni khamir IS258 dapat dilihat pada Gambar 2 yang diambil dari sampel proses fermentasi menggunakan *beads* matriks-alginat IS258 dengan starter 2% karena dianggap hasil etanol yang dihasilkan paling optimal, konsentrasinya terus meningkat, dan stabil. Sampel yang digunakan untuk uji *Total Plate Count* adalah *beads* baru *beads* matriks alginat-IS258 2%, *beads* dengan umur 140 hari, endapan pada botol fermentor, dan cairan hasil distilasi yang diperoleh dari proses fermentasi dengan hasil konsentrasi etanol tertinggi sebanyak 7,8% pada hari ke-125.

Pada penelitian ini, semua sampel dengan jumlah koloni >30 koloni tumbuh pada cawan hasil pengenceran 10^{-3} . Gambar 2(a) merupakan sampel *beads* baru diperoleh jumlah koloni khamir IS258 yang tumbuh sebanyak $1,6 \times 10^5$ CFU/g. Gambar 2(b) adalah sampel *beads* dengan lama pemakaian 140 hari diperoleh sebanyak $6,7 \times 10^5$ CFU/g. Perbandingan pertumbuhan koloni khamir IS258 pada *beads* baru dan *beads* lama menunjukkan bahwa populasi IS258 meningkat di dalam *beads* matriks alginat. Seiring berjalannya waktu, endapan khamir IS258 pada setiap botol fermentasi mulai terlihat pada hari ke-30 setelah pemakaian berulang *beads* matriks alginat khamir IS258 dapat dilihat pada Gambar 2(c) adalah sampel endapan khamir IS258 yang ada didasar cairan fermentasi diperoleh jumlah sebanyak $1,5 \times 10^6$ CFU/g. Banyaknya jumlah populasi khamir IS258 yang mengendap menjadi alasan fermentasi kemungkinan kurang efisien sehingga lebih baik dilakukan agitasi atau pengadukan selama proses fermentasi. Gambar 2(d) adalah sampel cairan hasil fermentasi dan akan didistilasi terjadi perubahan warna dimana saat mulai fermentasi masih bening dan diakhir fermentasi warna media sudah keruh. Dari sampel cairan hasil fermentasi diperoleh jumlah koloni khamir IS258 sebanyak $1,1 \times 10^6$ CFU/g.

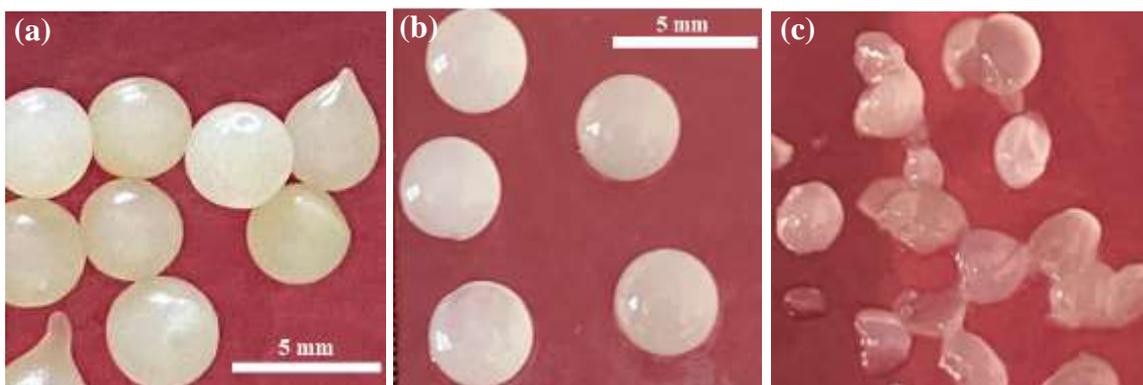
Pada penelitian sebelumnya oleh Simbolon *et al.* (2018), dilakukan fermentasi *batch* dengan starter khamir IS258 $OD_{660}=5$ sebanyak 1% diperoleh jumlah koloni tumbuh sebanyak $5,35 \times 10^{11}$ CFU/g apabila dibandingkan dengan hasil jumlah populasi khamir IS258 yang dapat tumbuh di dalam *beads* matriks alginat dan cairan fermentasi memerlukan waktu untuk mencapai jumlah tersebut dengan starter yang bersumber dari *beads* *beads* matriks yang jumlah populasinya $6,7 \times 10^5$ dapat dilihat pada Gambar 2(b).

Analisis Fisik *Beads* matriks Alginat-IS258

Perubahan dan ukuran yang terjadi pada *beads* matriks alginat-IS258 dapat dilihat pada Gambar 3(a) dan (b) dimana semakin lama *beads* digunakan, ukuran *beads* semakin membesar.

Rata-rata ukuran diameter *beads* baru pada Gambar 3(a) atau sebelum digunakan adalah sebesar 3–4 mm dan ukuran diameter *beads* pada Gambar 3(b) yang sudah digunakan berulang kali selama 140 hari lebih sebesar 5–6 mm. Selain ukuran diameter *beads* yang semakin membesar, dapat dilihat pada Gambar 3(c) sebagian besar *beads* sudah pecah dikarenakan kemungkinan struktur *beads* matriks alginat yang semakin melemah disebabkan oleh kandungan etanol yang semakin tinggi pada analog nira yang telah mengalami proses fermentasi dan populasi IS258 terus bertambah dalam *beads* matriks, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan penambahan polivinil alkohol (PVA) sebagai *gelling agent* untuk memperkuat ikatan *beads* matriks alginat dan bagaimana pengaruhnya terhadap starter di dalamnya karena polivinil alkohol-alginat diikat silang menggunakan asam borat yang bersifat beracun sehingga dapat menghambat morfogenesis selama sitokinesis pada khamir (Schmidt *et al.*, 2010).

Setelah dilakukan pemakaian *beads* matriks alginat-IS258 selama lebih dari 140 hari maka kemampuan khamir IS258 terimobilisasi sangat tinggi untuk dapat digunakan berulang kali sebagai agen fermentasi dan hasilnya mendekati hasil fermentasi pada penelitian sebelumnya oleh Simbolon *et al.* (2018). Semakin lama *beads* matriks digunakan, *beads* matriks alginat akan pecah dan khamir IS258 keluar dari *beads* matriks ke dalam media fermentasi menjadi kultur bebas dan mengendap sehingga sebaiknya dilakukan agitasi untuk fermentasi yang lebih efisien. Khamir IS258 yang terus bertumbuh dan berkembang juga berpengaruh pada hasil konsentrasi etanol yang dihasilkan semakin meningkat dan lama waktu fermentasi lebih cepat berakhir.



Gambar 3. (a) Beads Baru, (b) Beads Lama, dan (c) Beads Lama dan Sudah Pecah

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbaik dari variasi konsentrasi khamir IS258 untuk fermentasi etanol terimobilisasi dalam *beads* matriks alginat adalah sebanyak 2% dikarenakan memproduksi etanol dengan konsentrasi tertinggi yaitu sebanyak 7,8%. Sel khamir IS258 selama fermentasi etanol mengalami pertumbuhan dari yang semula pada *beads* baru terdapat $1,6 \times 10^5$ CFU/g menjadi $6,7 \times 10^5$ CFU/g pada *beads* lama. Analog nira sebagai media fermentasi setelah mengalami proses fermentasi dan sel khamir IS258 mulai memperbanyak diri dengan jumlah koloni yang mengendap dibawah permukaan analog nira sebanyak $1,5 \times 10^6$ CFU/g dan cairan hasil fermentasi sebanyak $1,1 \times 10^6$ CFU/g, sehingga *beads* matriks alginat IS258 dapat terus digunakan secara berulang kali sebagai agen fermentasi dikarenakan populasi khamir IS258 terus meningkat pada setiap proses fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bohnet, Matthias et al, 2003, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th Completely Revised Edition Vol. 12, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. K Ga A, Weinheim.
- Darmawan, R., Tri, Widjaja., E. T. Ardiansyah. (2010). Studi Perbandingan Produksi Etanol secara Kontinyu menggunakan *Z.mobilis* Termutasi Teknik Immobilisasi Sel : Ca-Alginat dan K-Karaginan. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro Semarang. B-13:1-6.
- Effendi, H. (2009). Biofuel dari Microfungi dan Microalga. Artikel Ilmiah. <http://web.ipb.ac.id/~lppm/download/Biofuel.pdf>. Diakses pada 22 Desember 2022.
- Gombert, A.K., van Maris, A.J. (2014). Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;33:81-86. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.012.
- Laili, N. H., Abida, I. W., & Junaedi, A. S. (2022). Nilai Total Plate Count (TPC) Dan Jumlah Jenis Bakteri Air Limbah Cucian Garam (bittern) dari tambak garam Desa Banyuajuh kecamatan Kamal Kabupaten bangkalan. *Juvenil:Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan*, 3(1), 26-31. doi:10.21107/juvenil.v3i1.15075
- Lestari, N. W., Budiharjo, A., Pangastuti, A. (2016). Bakteri Heterotrof Aerobic Asal Saluran Pencernaan Ikan Sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) Dan Potensinya Sebagai Probiotik. *Jurnal Bioteknologi*, 13(1), 9-17.
- Mashud, N., & Matana, Y. R. (2014). Produktivitas Nira Beberapa Aksesori Kelapa Genjah. *Buletin Palma*, 15(2).
- Prameshwari, J., Mahaputra Wijaya, I. M., & Gunam, I. B. W. (2024). Produksi etanol pada media pyg dengan variasi suhu dan perbandingan media fermentasi menggunakan isolat IS258. 18, pp-pp. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v18i2.17641> (in-press)
- Rizki, Zuriani., Fitriana., Asri, Jumadewi. (2022). Identifikasi jumlah angka kuman pada dispenser metode TPC (*Total Plate Count*). *Jurnal SAGO gizi dan kesehatan*. Poltekkes Kemenkes Aceh. DOI: <http://dx.doi.org/10.30867/gikes.v4i1.1052>
- Rusmana, Iman. (2008). Sistem Operasi Fermentasi. Departemen Biologi FMIPA IPB, Bogor, Jawa Barat.
- Schmidt, M.,Jaron Z. Schaumberg., Courtney M. Steen., & Michael P. Boyer. (2010). Boric Acid Disturbs Cell Wall Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Microbiology*. doi: [10.1155/2010/930465](https://doi.org/10.1155/2010/930465).
- Sebayang, F. (2006). Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses Media Publikasi Karya Ilmiah Teknik Kimia*, 5(2), 75-80.
- Simbolon, N. C., Mahaputra Wijaya, I. M., & Wayan Gunam, I. B. (2018). Isolasi dan Karakterisasi Khamir Potensial Penghasil Bioetanol dari Industri Arak Di Karangasem Bali. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 6(4). <https://doi.org/10.24843/jrma.2018.v06.i04.p06>
- Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi, R., Ramesh, V., Kumar, Hari, A., Meenakshi, N., Nidhiya, K.A., Kavitha, G., & Lakshmi, R. (2011). Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agricultural wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 3(2):1756-1763
- Supriatin, Y., & Rahayyu, M. (2016). Modification of carry-blair transport media for storage *Salmonella typhi*. *Jurnal Teknologi Laboratorium* 5(2): 72-73.
- Thayib, S. dan Amar, A. (1986). Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Teknologi Indonesia, Bogor

Yanti, A., Sri, Mursiti., Nuni, Widiarti., Bowo, Nurcahyo., & M. Alauhdin. (2019). Optimalisasi Metode Penentuan Kadar Etanol dan Metanol pada Minuman Keras Oplosan Menggunakan Kromatografi Gas (KG). *Indonesian Journal of Chemical Science* 8 (1): 53-59