

## Optimasi persentase volume total matriks alginat dan konsentrasi dekstroza menggunakan khamir IS258 terimobilisasi untuk fermentasi bioetanol dari analog nira kelapa

Indah Sri Rejeki Naibaho, I M. Mahaputra Wijaya\*, I Wayan Arnata, Ida Bagus Wayan Gunam

*Teknologi Industri Pertanian, Universitas Udayana, Badung, Indonesia*

### Article history

*Diterima:*

10 Januari 2024

*Diperbaiki:*

1 November 2024

*Disetujui:*

5 Desember 2024

### Keyword

*alginate;*

*ethanol;*

*fermentation;*

*immobilization;*

*response surface*

*methodology;*

*yeast IS258;*

### ABSTRACT

*Cell immobilisation is a process to stop the movement of cells at a certain place in a reaction chamber that is used as a catalyst. Cell immobilisation is commonly used for various biotechnology applications, one of which is ethanol fermentation because it has the advantage of being more efficient and effective compared to using free culture. Yeast isolate IS258 is a superior isolate taken from the arak industry in Karangasem Bali which function as bioethanol fermentation agent. The immobilisation of IS258 yeast cells was made using sodium alginate which functions as an entrapment media. The calcium alginate matrix of IS258 was then used for ethanol fermentation of coconut sap analogue to replace the need of new starter. This study aimed to determine the optimal total alginate volume and dextrose concentration using immobilised IS258 yeast for bioethanol fermentation of coconut sap analogue using Response Surface Methodology (RSM). In this study, 13 variations of total volume of alginate with immobilised IS258 yeast within and dextrose concentration in coconut sap analogue media. The results showed that dextrose as a substrate was more influential than the alginate-IS258 matrix on the ethanol produced. The highest total ethanol was obtained from the treatment with matrix volume concentration of 25% (v/v) and dextrose concentration of 15% (w/v) with an average total ethanol of 93.8 ml. The D-optimally test results show that the total matrix volume concentration value has an optimal point of 19% and dextrose concentration of 24% and is expected to produce more than 80 ml of ethanol. The use of alginate-IS258 matrix has been used in ethanol fermentation for 3 times distillation for more than 25 days continuously, the results show that the ethanol produced continues to increase and the fermentation time decreases.*



*This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

\* Penulis korespondensi

Email : [mahaputrawijaya@unud.ac.id](mailto:mahaputrawijaya@unud.ac.id)

DOI 10.21107/agrointek.v19i2.24170

## PENDAHULUAN

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 *yeast* kering merek Alcotec dengan etanol sebesar 7,26% (v/v) (Simbolon et al. 2018). Berdasarkan penelitian (Wulandari et al. 2019) dan (Prameshwari et al. 2024), khamir IS258 dapat memproduksi etanol dengan optimal media fermentasi pada pH 6 dan suhu fermentasi 28 °C.

Pada penelitian ini digunakan analog nira kelapa sebagai media fermentasi. Analog nira adalah media fermentasi dari bahan *peptone*, *yeast*, dan *glucose* (PYG) yang komposisinya telah disesuaikan dengan komposisi nira kelapa alami dari alam. Adapun komposisi analog nira pada penelitian ini mengacu pada hasil penelitian (Prameshwari et al., 2024) didapat bahwa media PYG (*peptone* 3,6 g; *yeast* 2 g; *glucose* 14% per liter) dengan pH 6 memiliki kandungan protein dan gula yang sama dengan nira kelapa, dimana perbedaan jumlah unsur mikroskopis lainnya diabaikan.

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. Dalam

proses distilasi dengan menggunakan suhu tinggi etanol akan menguap pada suhu 78,4 °C dimana khamir pada cairan hasil fermentasi pun akan mati karena terpapar oleh suhu dan lingkungan yang panas sehingga tidak dapat digunakan kembali sebagai agen fermentasi (Hamdiyati 2011), sehingga starter baru terus-menerus diperlukan setiap memulai fermentasi *batch* berikutnya. Dari permasalahan yang dipaparkan di atas, penelitian ini ditujukan untuk mencari solusi dalam mengurangi ketidakefisienan penggunaan kultur sel khamir bebas pada sistem fermentasi *batch process* yaitu dengan mengimobilisasi khamir IS258 dalam matriks alginat untuk fermentasi etanol dari analog nira kelapa dan beralih ke sistem fermentasi *fed batch process*.

Imobilisasi adalah suatu teknik yang memerangkap enzim atau sel dalam suatu ruang reaksi atau matriks sebagai katalis dan dapat digunakan berulang kali (Dharmawan et al. 2018). Pada penelitian ini imobilisasi sel menggunakan *beads* matriks kalsium-alginat (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 *fed batch* karena media fermentasi 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.

Sebelum melaksanakan penelitian, terlebih dahulu sudah melakukan pra-penelitian dengan optimasi konsentrasi alginat dan khamir IS258. Persentase volume total matriks alginat-IS258 yang digunakan sebanyak 20% dan media fermentasi sebanyak 720 ml dengan konsentrasi dekstrosa 14%. Konsentrasi alginat yang dicobakan sebesar 2% (b/v), 3% (b/v), dan 4% (b/v) dengan hasil 3% (b/v) merupakan kadar alginat yang didapat sebagai kadar maksimal yang dapat digunakan pada metode pencetakan menggunakan metode *gravity drops* yang dilakukan menggunakan ion  $\text{Ca}^{+}$  sebagai agen pengeras gel (*ionotropic gelation*) *beads*. Khamir IS258  $\text{OD}_{660}=5$  dengan jumlah koloni sel tumbuh sebanyak  $5,32 \times 10^{11}$  CFU/gram, yang diujikan sebesar 1% (v/v), 2% (v/v) dan 3% (v/v) dari media analog nira dengan hasil konsentrasi khamir IS258 sebesar 2% (v/v) yang terbaik dikarenakan hasil etanol yang dihasilkan paling optimal, konsentrasinya terus meningkat, dan stabil, sehingga pada penelitian ini diputuskan untuk

menggunakan konsentrasi na-alginat sebesar 3% ( $b/v$ ) dan konsentrasi khamir IS258 sebesar 2% ( $v/v$ ).

Berdasarkan permasalahan di atas, penelitian ini ditujukan untuk mengetahui persentase volume total *beads* matriks alginat-IS258 dan konsentrasi dekstrosa pada proses fermentasi etanol yang optimal menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) agar penelitian lebih efisien, dan untuk mengetahui kemampuan penggunaan berulang matriks alginat-IS258 dalam menghasilkan etanol. Penelitian ini menggunakan *Central Composite Design* (CCD). Umumnya, CCD memiliki faktorial  $2^k$  dengan jumlah data ( $n_f$ ), sumbu ( $2_k$ ), dan pusat ( $n_c$ ) dimana CCD sangat efisien untuk kecocokan model orde dua. Dua parameter dalam desain khusus adalah jarak sumbu  $\alpha$  dua faktor = 1,414 yg dijalankan dari sentra desain serta jumlah titik pusat  $n_c$  (Montgomery 2001). Optimasi volume *beads* matriks alginat-IS258 (faktor X1) dan konsentrasi dekstrosa (faktor X2) digunakan sebagai taraf perlakuan untuk mengetahui perbandingan antara volume *beads* dan media analog nira dengan konsentrasi dekstrosa yang berbeda-beda untuk menghasilkan etanol tertinggi.

## METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain stok isolat khamir IS258, *peptone* (Merck), *yeast extract* (Himedia), dekstrosa (Merck), akuades (Brataco), NaCl (Merck), gliserol 85% (Supelco), Na-Alginate 3% (Himedia),  $\text{CaCl}_2$  1,5% (Merck), dan natrium metabisulfat 4% (Merck).

### Alat

Alat yang digunakan pada 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, tabung reaksi, erlenmeyer, *vortex* (Joanlab Multi Plate), spatula, dan alkohol meter yang telah dikalibrasi dengan etanol ( $p.a$ ).

## Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Central Composite Design* (CCD) dua faktor. Nilai CCD dua faktor yang diperoleh dari model RSM sebesar 1,414, hasil rancangan menggunakan CCD selanjutnya menjadi variasi perlakuan yang diperoleh sebanyak 13 unit dilakukan 2 kali pengulangan sehingga diperoleh 26 unit percobaan, dan dilakukan fermentasi ulang menggunakan matriks alginat-IS258 sebanyak 3 kali fermentasi.

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Koefisien-koefisien pada model empirik diestimasi dengan menggunakan analisis regresi multi arah. Kesesuaian model empirik dengan data eksperimen ditentukan dari koefisien determinasi ( $R^2$ ). Kode variabel-variabel yang akan diuji dapat dilihat pada Tabel 1. Sedangkan rancangan percobaan dengan sistem pengkodean dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil penelitian yang telah dianalisis selanjutnya dilakukan uji ANOVA untuk menunjukkan pengaruh interaksi dan pengaruh kuadrat (Anwar et al. 2021). Nilai yang dilihat pada uji ini adalah jika  $p\text{-value} \leq \alpha$  (0,05) maka nilai hasil penelitian berpengaruh signifikan terhadap model RSM. Selain itu, dilakukan uji kesesuaian model dengan melihat *Lack-of-Fit* hasil analisis RSM dengan ketentuan jika  $p\text{-value} \geq \alpha$  (0,05) maka model dapat diterima (valid).

Data yang valid kemudian dianalisis persamaan regresinya untuk memprediksi total etanol yang dihasilkan terhadap dua perlakuan yaitu konsentrasi volume matriks alginat-IS258 dan konsentrasi dekstrosa.

Analisis data selanjutnya disajikan dalam bentuk grafik yaitu grafik *contour plot* dan grafik *response surface plot* yang menunjukkan variasi perlakuan yang saling memengaruhi hasil total etanol dengan warna yang berbeda. Pengolahan data RSM menggunakan rerata etanol hasil distilasi pengulangan 1 dan 2, dilakukan distilasi sebanyak 3 kali setelah pemakaian berulang matriks alginat IS258 sebagai sumber data. Uji *D-Optimally* selanjutnya dilakukan untuk mengetahui nilai optimal konsentrasi volume matriks dan konsentrasi dekstrosa yang diprediksi dapat meningkatkan total etanol tertinggi.

Tabel 1 Model desain CCD

| Variabel (X)        | Kode dan Nilai |    |    |    |         |
|---------------------|----------------|----|----|----|---------|
|                     | -1,414         | -1 | 0  | +1 | +1,414  |
| Volume matriks (X1) | 12,9289        | 15 | 20 | 25 | 27,0710 |
| Dekstrosa (X2)      | 0,8578         | 5  | 15 | 25 | 29,1412 |

Tabel 2 Variasi perlakuan persentase volume total matriks alginat-IS258 dan konsentrasi dekstrosa

| No | Variabel kode |        | Variasi perlakuan  |               |
|----|---------------|--------|--------------------|---------------|
|    | X1            | X2     | Volume matriks (%) | Dekstrosa (%) |
| 1  | 0             | 1,414  | 20                 | 29,14         |
| 2  | 1             | -1     | 25                 | 5             |
| 3  | 1,414         | 0      | 27,07              | 15            |
| 4  | -1            | 1      | 15                 | 25            |
| 5  | 0             | 0      | 20                 | 15            |
| 6  | 1             | 1      | 25                 | 25            |
| 7  | 0             | -1,414 | 20                 | 0,86          |
| 8  | 0             | 0      | 20                 | 15            |
| 9  | 0             | 0      | 20                 | 15            |
| 10 | 0             | 0      | 20                 | 15            |
| 11 | -1            | -1     | 15                 | 5             |
| 12 | -1,414        | 0      | 12,93              | 15            |
| 13 | 0             | 0      | 20                 | 15            |

## Pelaksanaan Penelitian

### Peremajaan Kultur Khamir IS258

Peremajaan kultur dilakukan dengan menumbuhkan 3 ml stok kultur isolat khamir IS258 dalam gliserol pada 100 ml media cair PYG pH 5 dengan komposisi *peptone* 7,5 g, glukosa 20 g, *yeast extract* 4,5 g, lalu diinkubasi pada suhu 28 °C menggunakan *shaker rotator* selama 24 jam (Wulandari et al., 2019).

### Perbanyakan Kultur Khamir IS258

Perbanyakan kultur sel 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.

### Penyamaan Kepadatan Sel Isolat Khamir IS258

Pelet (sel) yang dihasilkan dari proses pencucian kemudian disamakan (*di-adjust*) tingkat kekeruhannya atau *optical density* menggunakan *spektrofotometer* pada panjang gelombang 660 nm ( $OD_{660}$ ) sebanyak absorbansi = 5.

### Pembuatan Analog Nira

Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini adalah analog nira yang terbuat dari

larutan *peptone yeast extract glucose* (PYG) dengan komposisi *peptone* 9gr/L, *yeast extract* 5gr/L (Wulandari et al., 2019), dan *glucose* atau dekstrosa sesuai dengan 13 variasi perlakuan hasil rancangan percobaan *Central Composite Design* (CCD) dua faktor. Kadar dekstrosa digunakan sebagai faktor pembatas terhadap khamir IS258 dalam menghasilkan etanol ketika proses fermentasi berlangsung. Analog nira kemudian disterilisasi ke dalam *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit.

### Imobilisasi Sel Khamir IS258 pada Beads Na-Alginat

*Beads* matriks alginat-IS258 dibuat dengan menambahkan natrium alginat 3% (b/v) pada media PYG optimal (9 gr *peptone*; 5 gr *yeast*; 20% 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 matriks *beads* alginat-IS258, sebanyak 2% suspensi sel khamir IS258 yang sebelumnya sudah di-*adjust* ( $OD_{660}=5$ ) ditambahkan ke dalam PYG-alginat 3% (b/v) dan diaduk secara perlahan sampai merata. Campuran alginat-IS258 dan PYG kemudian diteteskan secara perlahan menggunakan *disposable syringe* dengan *nozzle* 2 mm dengan metode *gravity drops* ke dalam larutan  $CaCl_2$  1,5 % (b/v), dan dibiarkan mengeras

selama 1 jam pada suhu 4 °C dengan pengadukan perlahan menggunakan stirrer.

### **Uji Fermentasi Analog Nira Kelapa menggunakan IS258 Terimobilisasi**

Khamir IS258 yang sudah terimobilisasi dalam *beads* matriks alginat kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca fermentasi yang kedap udara dengan kapasitas 900 ml. Volume matriks alginat-IS258 ditambahkan sesuai dengan 13 variasi perlakuan hasil rancangan percobaan *Central Composite Design* (CCD) dua faktor. Adapun cara menghitung volume total alginat ialah dengan menggunakan akuades sebagai pengukur selisih dengan *beads* alginat menggunakan gelas ukur 100 ml dan 200 ml. Analog nira kemudian ditambahkan ke dalam botol kaca fermentasi sampai *beads* matriks alginat-IS258 sepenuhnya terendam dan udara yang tersisa (*headspace*) seminimal mungkin untuk meminimalisir oksigen di dalam botol fermentasi dengan total volume masing-masing botol sampai menjadi 900 ml. Botol fermentasi yang sudah terisi oleh analog nira dan matriks alginat-IS258 kemudian ditutup dengan tutup botol yang diberi selang sebagai penyalur gas CO<sub>2</sub> hasil fermentasi dan ujung selang yang lain dipasangkan ke dalam botol yang berisi larutan metabisulfat 4% (Prameshwari et al. 2024) untuk mencegah terjadinya kontaminasi dari mikroba lain yang dapat terjadi selama proses fermentasi.

Fermentasi dilakukan sampai gas CO<sub>2</sub> tidak lagi dihasilkan kemudian cairan fermentasi dialirkan ke luar fermentor dan matriks alginat-IS258 disaring untuk digunakan kembali sebagai agen fermentasi dengan media analog nira yang baru ditambahkan ke dalam botol fermentasi. Cairan hasil fermentasi didistilasi menggunakan distilator 2-tingkat untuk mengekstraksi etanol. Fermentasi terus dilakukan secara kontinyu dan telah berlangsung selama kurang lebih 35 hari dengan penggunaan berulang matriks alginat-IS258.

### **Variabel yang diamati**

#### **Total Etanol dan Analisis Efisiensi Fermentasi**

Konsentrasi etanol hasil distilasi diukur menggunakan alkohol meter yang sudah dikalibrasi untuk mengetahui total etanol yang sudah didistilasi kemudian didapat hasil konsentrasi etanol dengan rumus perhitungan pada Persamaan (1) dan (2).

$$\text{Total etanol} = \frac{\text{Total distilat}}{\text{etanol}} \times \text{persentase etanol} \quad (1)$$

$$\text{Konsentrasi etanol} = \frac{\text{Total etanol}}{\text{Vol fermentasi}} \times 100\% \quad (2)$$

Perhitungan efisiensi total etanol hasil fermentasi dilakukan dengan membandingkan dengan efisiensi teoritis konversi glukosa menjadi etanol dan CO<sub>2</sub> (Gombert and van Maris 2015) dengan Persamaan (3) dan (4).

$$\text{Efisiensi etanol}(\eta) = \frac{\text{total etanol}}{\text{etanol maksimum teoritis}} \quad (3)$$

$$\eta = \frac{\text{konsentrasi} \times \text{Vol distilat(ml)}}{\text{berat}} \quad (4)$$

$$0.51 \times \frac{\text{glukosa(g)}}{0.789\text{g/ml}}$$

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Total Etanol yang didapatkan dari Proses Fermentasi**

Penelitian ini dilakukan berdasarkan rancangan *Central Composite Design* (CCD) dan menghasilkan nilai-nilai total etanol dari masing-masing kombinasi perlakuan yang dapat dilihat dari data pada Tabel 3. Masing-masing kombinasi perlakuan dilakukan sebanyak dua kali pengulangan, dengan lama hari fermentasi berkisar 2–10 hari. Masing-masing perlakuan telah dilakukan fermentasi ulang cairan analog nira kelapa yang baru menggunakan matriks alginat-IS258 berulang sebagai agen fermentasi sebanyak 3 kali fermentasi dan diperoleh rata-rata data pada Tabel 3.

Rata-rata total etanol tertinggi sebanyak 93,8 ml dengan konsentrasi sebesar 10,4% diperoleh dari hasil fermentasi dengan persentase volume matriks alginat-IS258 sebesar 15% dan konsentrasi dekstrosa sebesar 25%, sedangkan rata-rata total etanol terendah sebanyak 3,0 ml dengan konsentrasi sebesar 0,3% diperoleh dari hasil fermentasi dengan persentase volume matriks alginat-IS258 sebesar 20% dan konsentrasi dekstrosa sebesar 0,86%.

Pada penelitian ini, semakin tinggi konsentrasi dekstrosa pada analog nira kelapa yang digunakan, ditemukan semakin tinggi total etanol yang dihasilkan, walaupun pada kadar

glukosa yang terlalu tinggi hasil total etanol yang dihasilkan menurun. Disamping itu, kemungkinan jumlah khamir IS258 yang direpresentasikan oleh matriks alginat-IS258, juga memberikan pengaruh terhadap total etanol yang dihasilkan dengan bergantung pada konsentrasi gula yang tersedia untuk proses metabolisme. Hal ini dapat dilihat pada perlakuan dengan konsentrasi dekstrosa tertinggi yaitu sebesar 29,14% (26 °Brix) dan persentase volume matriks alginat-IS258 sebesar 20% menghasilkan rerata etanol sebanyak 69,9 ml dengan konsentrasi sebesar 7,8%. (Wulandari et al., 2019) dalam penelitiannya menyatakan bahwa pada proses fermentasi etanol dari analog nira kelapa, konsentrasi optimal gula pada substrat yang digunakan adalah 16-24 °Brix. Apabila konsentrasi substrat berada di titik yang terlalu jauh dari itu maka tekanan osmotik di lingkungan khamir IS258 akan meningkat sehingga menyebabkan terjadinya lisis pada sel dan mengurangi efisiensi dalam proses fermentasi

### Hasil Total Etanol berdasarkan Model *Response Surface Methodology* (RSM)

Nilai tertinggi rata-rata total etanol hasil distilasi pertama, kedua, dan ketiga yang ditunjukkan pada Tabel 3 merupakan data yang belum diolah dengan metode *Response Surface Methodology* (RSM) untuk diperoleh nilai konsentrasi volume matriks dan konsentrasi dekstrosa yang paling optimal sehingga diperoleh persamaan regresi yang ditunjukkan pada Persamaan (5).

$$Y = -48,9 + 3,94X_1 + 8,05X_2 - 0,095X_1^2 - 0,1630X_2^2 - 0,0126X_1X_2 \quad (5)$$

Keterangan:

Y = Rata-rata total etanol yang dihasilkan

X<sub>1</sub> = Persentase volume matriks alginat-IS258

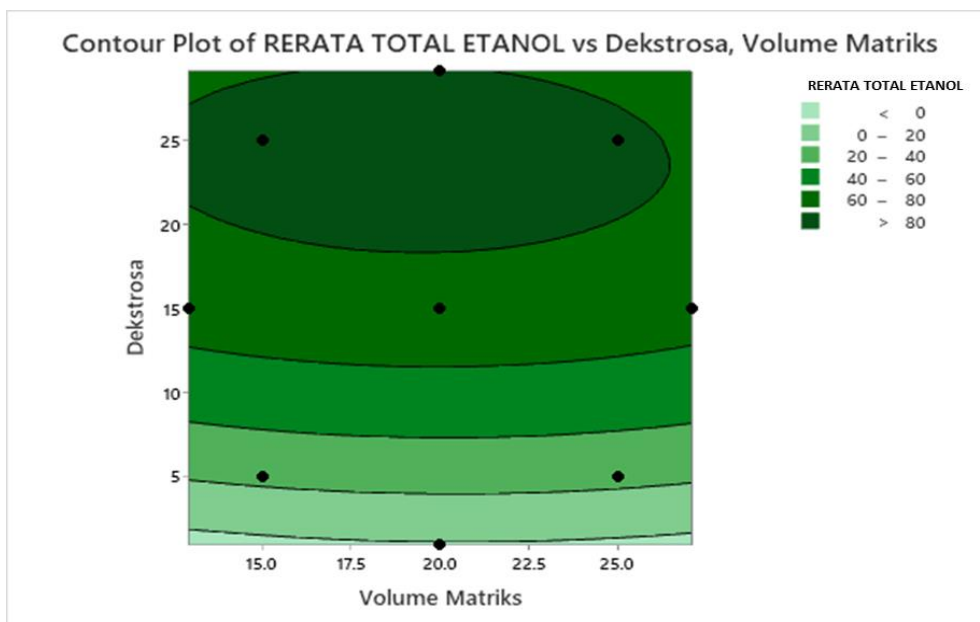
X<sub>2</sub> = Konsentrasi dekstrosa

Tabel 3 Hasil rata-rata etanol

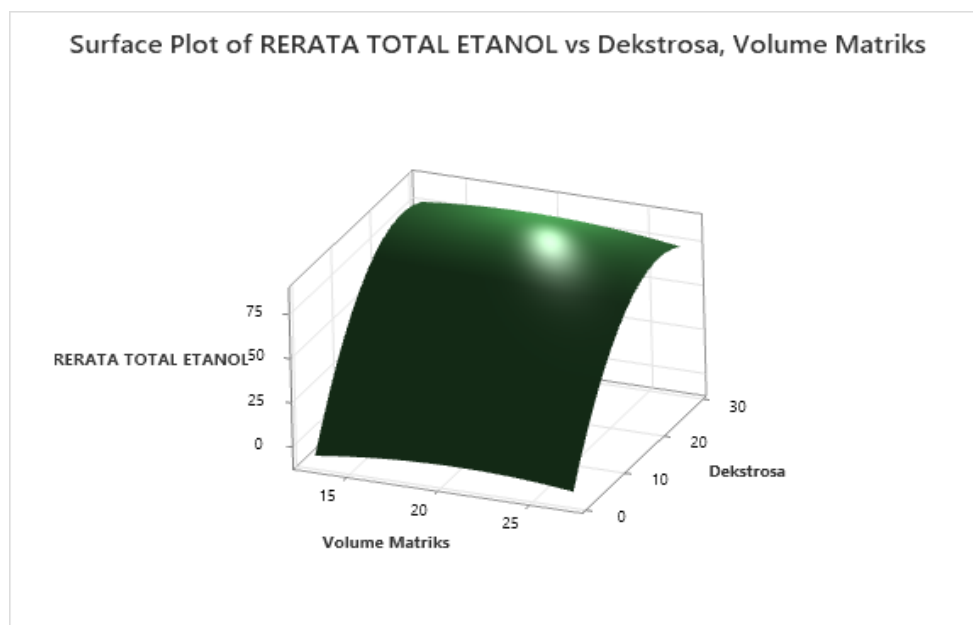
| No | Variasi Perlakuan      |               | Rata-rata         |                 |               |                        |
|----|------------------------|---------------|-------------------|-----------------|---------------|------------------------|
|    | Persentase Matriks (%) | Dekstrosa (%) | Total Etanol (ml) | Konsentrasi (%) | Efisiensi (%) | Lama Fermentasi (hari) |
| 1  | 20                     | 29,14         | 69,9              | 7,8             | 41            | 10,3                   |
| 2  | 25                     | 5             | 20,6              | 2,3             | 71            | 4,3                    |
| 3  | 27,07                  | 15            | 66,6              | 7,4             | 76            | 4,7                    |
| 4  | 15                     | 25            | 93,8              | 10,4            | 64            | 9,8                    |
| 5  | 20                     | 15            | 73,6              | 8,2             | 84            | 7,3                    |
| 6  | 25                     | 25            | 88,2              | 9,8             | 61            | 7,3                    |
| 7  | 20                     | 0,86          | 3,0               | 0,3             | 60            | 3,0                    |
| 8  | 20                     | 15            | 71,8              | 8,0             | 82            | 7,5                    |
| 9  | 20                     | 15            | 71,5              | 7,9             | 82            | 7,5                    |
| 10 | 20                     | 15            | 71,9              | 8,0             | 82            | 7,5                    |
| 11 | 15                     | 5             | 23,7              | 2,6             | 81            | 5,8                    |
| 12 | 12,93                  | 15            | 61,9              | 6,9             | 71            | 8,0                    |
| 13 | 20                     | 15            | 71,9              | 8,0             | 82            | 7,2                    |

Tabel 4 Analisis ragam model RSM

| Sumber                        | p-value |
|-------------------------------|---------|
| Model                         | 0,000   |
| Linear                        | 0,000   |
| Volume matriks                | 0,920   |
| Dekstrosa                     | 0,000   |
| Kuadrat                       | 0,001   |
| Volume matriks*Volume matriks | 0,399   |
| Dekstrosa*Dekstrosa           | 0,000   |
| Interaksi 2 arah              | 0,862   |
| Volume matriks*Desktrrosa     | 0,862   |
| Galat                         |         |
| Ketidaksesuaian Model         | 0,000   |
| Total                         |         |



Gambar 1 Contour plot model RSM



Gambar 2 Surface plot model RSM

Hasil persamaan regresi RSM menunjukkan bahwa konsentrasi dekstrosa ( $X_2$ ) memiliki pengaruh terbesar terhadap total etanol hasil distilasi. Pengaruh tersebut dapat dilihat dari koefisien dekstrosa ( $X_2$ ) yang memiliki nilai 8,05 dibandingkan volume alginat ( $X_1$ ) memiliki nilai yaitu sebesar 3,94. Selain itu nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 96,18% menunjukkan bahwa 96,18% respon dipengaruhi oleh volume matriks dan dekstrosa, sedangkan 3,82% dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak diamati pada penelitian.

Data hasil *Analysis of Variance* (ANOVA) pada Tabel 4 digunakan untuk menguji kecocokan model dengan data hasil penelitian. ANOVA menginterpretasi data parameter dengan menerjemahkan ke dalam nilai probabilitas (*p-value*) (Nofiana 2017).

Pada penelitian ini, proses fermentasi etanol dari analog nira kelapa menggunakan khamir IS258 terimobilisasi dalam matriks alginat diperoleh *p-value* sebesar 0,000. Apabila *p-value* < 0,05 maka parameter tersebut menunjukkan sifat yang signifikan, sedangkan

jika  $p\text{-value} > 0,05$  sifat parameter tersebut tidak signifikan (Nofiana, 2017). Nilai model persamaan regresi yang dihasilkan berpengaruh signifikan karena nilai  $p\text{-value}$  model  $< 0,05$ .

Nilai *Lack of fit* atau ketidaksesuaian pada penelitian ini menunjukkan bahwa  $p\text{-value} < 0,05$  yaitu sebesar 0,000. Dengan nilai *Lack of fit*  $< \alpha$  maka dapat dikatakan bahwa penelitian ini menolak hipotesis awal ( $H_0$ ) dan menerima  $H_1$  yang menyatakan adanya *Lack of fit* artinya model yang dibuat tidak akurat merepresentasikan data yang diperoleh.

Grafik *Contour Plot* pengaruh volume total alginat dan konsentrasi dekstrosa terhadap rerata total etanol yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 1. Grafik *Contour Plot* pada Gambar 1 menunjukkan perbedaan hasil pada setiap perlakuan volume total alginat dan konsentrasi dekstrosa. Perbedaan hasil ini kemudian digradasikan pada warna dari warna hijau muda dengan hasil terendah hingga warna hijau tua dengan hasil tertinggi. Titik hitam yang ada pada plot adalah titik masing-masing perlakuan dengan titik hitam yang berada di tengah plot adalah titik pusat (*central point*) perlakuan, dan titik pada area lingkaran hijau tua adalah perlakuan dengan hasil total etanol tertinggi lebih dari 80 ml. Hal ini dapat diartikan pada grafik contour plot pada bagian lingkaran berwarna hijau tua yang ditetapkan sebagai daerah optimal oleh metode RSM yang diprediksi dapat menghasilkan total etanol lebih dari 80 ml.

Secara keseluruhan pertemuan garis lingkaran optimal pada grafik contour plot yang berwarna hijau tua memiliki area persentase volume total matriks alginat-IS258 berada pada area 9–26% dan konsentrasi dekstrosa berada di area 17–31%, hal ini merupakan area optimal media fermentasi etanol menggunakan matriks alginat-IS258 secara *fed-batch* yang dilakukan memiliki titik tengah sebagai titik optimal media fermentasi etanol. Pada grafik *contour plot* juga dapat dilihat bahwa perbedaan warna yang signifikan pada setiap perlakuan menunjukkan adanya pengaruh signifikan perlakuan terhadap hasil.

Selain hasil analisis RSM disajikan pada grafik *Contour Plot*, hasil juga disajikan pada grafik *Response Surface Plot* yang divisualisasikan secara 3 dimensi dapat dilihat pada Gambar 2. Lembaran plot yang cembung menunjukkan volume total matriks dan

konsentrasi etanol memberi pengaruh terhadap total etanol hasil fermentasi hingga mencapai titik optimum berwarna putih

Lembaran plot yang cembung menunjukkan konsentrasi etanol memberi pengaruh signifikan terhadap total etanol hasil fermentasi hingga mencapai titik optimum berwarna putih. Pada grafik Gambar 2 dapat dilihat bahwa hasil etanol sebelum dan sesudah mencapai titik optimum memiliki hasil yang lebih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa khamir dan dekstrosa yang sedikit ataupun berlebih tidak akan memaksimalkan hasil etanol sehingga titik optimum adalah komposisi yang telah sesuai dengan kebutuhan mikroorganisme dalam aktivitas selnya termasuk metabolisme dan proses fermentasi dengan hasil maksimal. Faktor lainnya seperti fisiologis sel dan metabolisme sel yang berbeda-beda pada tiap genus juga dapat menjadi penyebab kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan tumbuh khamir pada tiap genus berbeda-beda (Rahmana et al. 2016).

Penentuan titik optimal secara spesifik dapat dilakukan dengan pengujian *D-Optimally* dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil uji *D-optimally* menunjukkan bahwa nilai persentase volume total matriks memiliki titik optimal sebesar 19% dan konsentrasi dekstrosa sebesar 24% serta diperkirakan akan menghasilkan etanol sebanyak 85 ml.

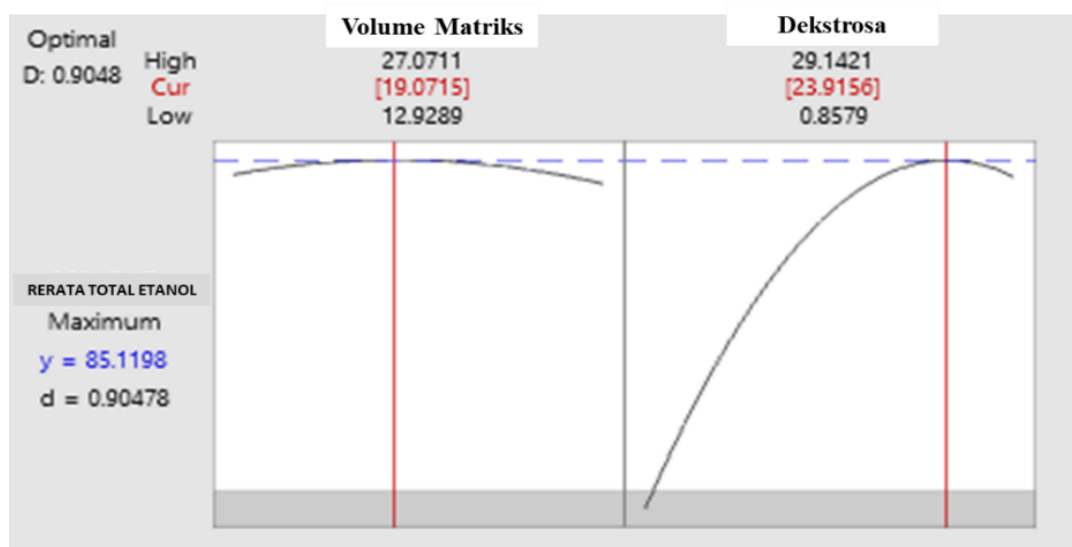
Grafik uji *D-optimally* rerata total etanol yang dihasilkan dari fermentasi analog nira dengan penggunaan matriks alginat-IS258 berulang menunjukkan bahwa total etanol yang dihasilkan berpengaruh lebih besar pada konsentrasi dekstrosa atau kandungan gula dalam analog nira dibandingkan persentase volume matriks alginat IS258.

Rentang titik optimal yang lebar pada persentase volume matriks alginat-IS258 sebesar 9–26% tidak dapat ditentukan secara akurat berapa titik optimal yang tepat untuk fermentasi etanol dari analog nira kelapa. Hal ini dikarenakan populasi sel khamir IS258 yang tersuspensi dalam Ca-alginat terus meningkat. Ini dilihat dari adanya adanya perubahan warna pada analog nira yang digunakan sebagai media fermentasi dimana saat mulai fermentasi masih bening dan di akhir fermentasi warna media sudah keruh, serta fermentasi yang telah berlangsung selama 25 hari terdapat endapan sel khamir IS258 pada botol fermentor. Pada matriks alginat-IS258 juga terjadi

perubahan fisik dimana ukuran matriks semakin membesar hal ini dapat diartikan bahwa sel khamir IS258 juga dapat tumbuh dengan baik pada lapisan alginat.

Pada penelitian ini telah dilakukan pemakaian berulang matriks alginat-IS258 sebanyak 3 kali dengan perbandingan hasil rata-rata total etanol yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5 dimana total etanol yang dihasilkan terus meningkat. Jumlah populasi khamir IS258 yang terimobilisasi di dalam matriks alginat juga kemungkinan berpropagasi semakin banyak. Fase pertumbuhan khamir IS258 terimobilisasi dalam matriks alginat kemungkinan masih pada fase lag

atau fase adaptasi terjadi pada proses fermentasi yang pertama dengan hasil distilasi I. Fermentasi kedua dengan hasil distilasi II kemungkinan sudah memasuki fase eksponensial khamir IS258 dimana dapat dilihat pada tabel hasil total etanol meningkat dari hasil distilasi I. Fase eksponensial adalah fase dimana khamir membelah dengan cepat dan konstan setelah melalui fase adaptasi. Fermentasi ketiga dengan hasil distilasi III kemungkinan sudah memasuki fase stasioner yaitu fase dimana pertumbuhan isolat tetap, populasi sel tetap hal ini terjadi karena jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel yang mati dan total etanol yang dihasilkan meningkat dibandingkan hasil distilasi sebelumnya.



Gambar 3 Grafik d-optimally model RSM

Tabel 5 Perbandingan hasil rata-rata total etanol yang diperoleh dari fermentasi etanol dengan pemakaian berulang matriks alginat-IS258 sebanyak 3 kali

| No | Persentase matriks (%) | Dekstrosa (%) | Rata-Rata Total Etanol (ml) |              |               |
|----|------------------------|---------------|-----------------------------|--------------|---------------|
|    |                        |               | Distilasi I                 | Distilasi II | Distilasi III |
| 1  | 20                     | 29,14         | 65,40 ± 0,57                | 70,67 ± 2,64 | 73,50 ± 2,12  |
| 2  | 25                     | 5             | 20,00 ± 2,26                | 19,58 ± 0,32 | 22,25 ± 0,35  |
| 3  | 27,07                  | 15            | 65,65 ± 4,45                | 66,50 ± 4,95 | 67,70 ± 4,67  |
| 4  | 15                     | 25            | 91,44 ± 4,64                | 92,45 ± 3,61 | 97,40 ± 2,26  |
| 5  | 20                     | 15            | 72,00 ± 2,69                | 73,50 ± 2,12 | 75,43 ± 2,02  |
| 6  | 25                     | 25            | 86,95 ± 4,17                | 87,10 ± 1,21 | 90,45 ± 0,49  |
| 7  | 20                     | 0,86          | 2,23 ± 0,04                 | 3,10 ± 0,14  | 3,65 ± 0,21   |
| 8  | 20                     | 15            | 68,55 ± 4,17                | 71,70 ± 2,26 | 75,10 ± 0,14  |
| 9  | 20                     | 15            | 67,23 ± 5,34                | 72,33 ± 237  | 75,50 ± 0,71  |
| 10 | 20                     | 15            | 69,58 ± 2,02                | 71,20 ± 1,84 | 74,80 ± 2,86  |
| 11 | 15                     | 5             | 21,95 ± 2,19                | 23,70 ± 0,42 | 25,40 ± 0,57  |
| 12 | 12,93                  | 15            | 52,00 ± 2,83                | 63,10 ± 0,14 | 70,70 ± 0,71  |
| 13 | 20                     | 15            | 68,70 ± 0,28                | 71,45 ± 0,64 | 75,40 ± 0,57  |

## KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa data hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil uji *D-optimally* menunjukkan bahwa nilai persentase volume total matriks memiliki titik optimal sebesar 19% dan konsentrasi dekstrosa sebesar 24% serta diperkirakan akan menghasilkan total etanol sebanyak 85 ml. Khamir IS258 terimobilisasi dalam matriks alginat berdasarkan pada penelitian sudah dilakukan 3 kali pemakaian berulang sehingga diperoleh hasil rata-rata data penelitian dari hasil 3 kali pemakaian berulang matriks alginat-IS258. Semakin lama waktu fermentasi dengan menggunakan matriks alginat-IS258 secara kontinyu, total etanol yang dihasilkan dari setiap variasi perlakuan semakin meningkat. Matriks alginat-IS258 kemungkinan masih dapat digunakan untuk fermentasi berulang yang lebih banyak dengan hasil yang tinggi, walaupun hipotesa ini masih harus diujikan kembali di masa depan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Unud atas dukungan dana yang diberikan untuk membiayai penelitian ini melalui skema hibah penelitian PUU (B/1.294/UN14.4.A/PT.01.03/2023).

## DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, K., F. Istiqamah, S. H. Program, S. Farmasi, L. Mangkurat, and K. Selatan Indonesia. 2021. Optimasi Suhu dan Waktu Ekstraksi Akar Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* jack.) Menggunakan Metode RSM (response surface methodology) dengan Pelarut Etanol 70%. *Jurnal Pharmascience* 8(1):53–64.
- Bohnet, M. 2003. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 6th edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, K Ga A, Weinheim.
- Dharmawan, A. H. Nuva., S. D.A., P. A.A., A. R., and D. A. 2018. Pengembangan bioenergi di Indonesia: Peluang dan tantangan kebijakan industri biodiesel. *Pengembangan bioenergi di Indonesia: Peluang dan tantangan kebijakan industri biodiesel*.
- Effendi, H. 2009. Biofuel dari Microfungi dan Micoalga.
- Gombert, A. K., and A. J. A. van Maris. 2015. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. *Current opinion in biotechnology* 33:81–86.
- Hamdiyati, Y. 2011. *Pertumbuhan dan Pengendalian Mikroorganisme II*. Universitas Pendidikan Indonesia Bandung.
- Montgomery, D. C. 2001. *Design and Analysis of Experiments*. 8 Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Nofiana, Y. 2017. Optimasi Fermentasi Bioetanol Holoselulosa Tandan Kosong Sawit dengan Co-Culture *Saccharomyces cerevisiae* dan *Scheffersomyces stipitis* Terimobilisasi Alginat. UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Prameshwari, J., I. M. Mahaputra Wijaya, and I. B. W. Gunam. 2024. Produksi etanol pada media pyg dengan variasi suhu dan perbandingan media fermentasi menggunakan isolat IS258 18(2):352–359.
- Rahmana, S. F., S. Nurhatika, and A. Muhibuddin. 2016. Uji Potensi Fermentasi Etanol Beberapa Yeast yang Diisolasi dari Daerah Malang, Jawa Timur dengan Metode SDN (Soil Drive Nutrient). *Jurnal Sains dan Seni ITS* 5(2).
- Rusmana, I. 2008. *Sistem Operasi Fermentasi*. Departemen Biologi FMIPA IPB, Bogor.
- 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., I. M. Mahaputra Wijaya, and I. B. Wayan Gunam. 2018. ISOLASI DAN KARAKTERISASI KHAMIR POTENSIAL PENGHASIL BIOETANOL DARI INDUSTRI ARAK DI KARANGASEM BALI. *JURNAL REKAYASA DAN MANAJEMEN AGROINDUSTRI* 6(4):316.
- Wulandari, I. A. E. P., IM. M. Wijaya, and I. B. W. Gunam. 2019. Optimasi konsentrasi yeast extract dan peptone pada media tumbuh khamir potensial isolat ISATCC untuk produksi etanol optimal. Universitas Udayana.