

BAB I

PENDAHULUAN UMUM

1.1. Latar Belakang

Bahan bakar fosil merupakan bahan bakar yang paling dibutuhkan hingga kini. Permintaan energi di Indonesia maupun dunia terus meningkat dari tahun ke tahun, sedangkan data produksi cenderung menurun. *Statistical Review of World Energy* 2021 menggambarkan konsumsi bahan bakar terus meningkat yaitu 1.443 menjadi 1.449 barrel/hari dari tahun 2010 hingga tahun 2020. Sedangkan data produksi terus menurun dari 1.003 menjadi 743 barrel/hari. Ketidakseimbangan produksi dan konsumsi energi di Indonesia juga terjadi, dengan selisih semakin melebar setiap tahunnya (BP Energy, 2021). Kondisi ini mendorong pemanfaatan energi lainnya yang bersumber dari energi baru terbarukan (EBT), seperti penggunaan biomassa.

Kebijakan pemerintah dalam pengembangan EBT secara spesifik tercantum dalam Peraturan Pemerintah Nomor 79 Tahun 2014 tentang Kebijakan Energi Nasional. Pada peraturan tersebut, Indonesia menargetkan penggunaan energi baru dan terbarukan minimum 23% pada tahun 2025 dan 31% pada tahun 2050 (Kebijakan Energi Nasional, 2014; Sarante, 2024). Kebijakan ini menunjukkan keberhasilan yang signifikan, berdasarkan laporan bauran energi primer dalam 5 tahun terakhir. Pada Neraca Energi (2023) terlihat perubahan yang cukup signifikan, terutama penggunaan minyak bumi menurun dari 41,4% tahun 2017 menjadi 31,4% di tahun 2022. Peran EBT naik dari 6,7% tahun 2017 menjadi 12,3% tahun 2022. Peningkatan peran EBT ini didorong oleh bertambahnya pangsa bahan bakar nabati (BBN) dan penambahan pembangkit listrik EBT baru, serta mulai diakuinya pemanfaatan EBT untuk biomassa industri, penggunaan langsung panas bumi, dan pemanas air tenaga surya (Sekretariat Jenderal Dewan Energi Nasional, 2023a).

Penggunaan biomassa sebagai bahan energi terbarukan memiliki potensi yang menjanjikan, karena Indonesia adalah negara agraris yang memiliki sumber daya energi terbarukan yang melimpah. Bahan berlignoselulosa seperti sampah organik, limbah bahan tanaman, dan limbah kayu tersedia dalam jumlah besar dan dapat diolah menjadi bioetanol melalui proses biokimia. Hal ini menawarkan solusi energi berkelanjutan untuk masa depan. Pemanfaatan limbah pertanian dan sampah organik menjadi bioetanol, menjadikan Indonesia memiliki peluang signifikan untuk mempercepat transisi menuju energi bersih.

Meskipun Indonesia memiliki potensi besar dalam pengembangan energi terbarukan, termasuk bioetanol, pemanfaatannya masih terbatas akibat berbagai kendala seperti teknologi yang rumit dan biaya produksi yang tinggi. Peraturan Menteri ESDM No. 12 Tahun 2015 tentang kewajiban bertahap penggunaan bioetanol sebagai campuran bahan bakar untuk transportasi menyebutkan bahwa penggunaan bioetanol akan ditingkatkan secara bertahap dari 2% (E2) pada tahun 2015 hingga mencapai 20% (E20) pada tahun 2025 (Sudiyani et al., 2019). Pada periode 2008-2009 dan 2015-2016, pencampuran bioetanol telah dilakukan dalam

jumlah kecil, namun kemudian dihentikan karena kekurangan bahan baku. Selain itu, perkembangan bioetanol juga terhambat oleh tingginya harga bahan baku dan kurangnya infrastruktur pendukung program ini (Dio Dananjaya & Agung Kurniawan, 2023).

Pernyataan dari Deputi Bidang Koordinasi Infrastruktur dan Transportasi Kemenko Marves, Rachmat Kaimuddin, pada 14 September 2024, semakin mempertegas bahwa produksi etanol saat ini masih rendah. Penyebabnya adalah etanol berasal dari tebu dan jagung, namun Indonesia masih harus mengimpor gula dan jagung. Berdasarkan data CNBC Indonesia, impor gula Indonesia mencapai 5,8 juta ton pada periode 2022-2023. Sedangkan untuk jagung, meskipun impor mengalami penurunan, jumlahnya masih cukup besar, yaitu sekitar 450 ribu ton (Septian Farhan Nurhuda, 2024).

Selain tebu dan jagung, bahan baku lain berupa biomassa yang melimpah dapat dipertimbangkan untuk pemanfaatannya sebagai bioetanol. Akan tetapi, pemanfaatan biomassa menjadi bioetanol masih memiliki kendala berupa karakteristik bahan. Biomassa tumbuhan seperti kayu, jerami, dan limbah pertanian lainnya, seperti batang pisang, memiliki lignoselulosa yang tinggi. Bahan berlignoselulosa merupakan bahan yang kaya akan serat dan terdiri dari tiga komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Beberapa tahapan penting sangat diperlukan untuk mengubah lignoselulosa menjadi gula sederhana yang dapat diolah menjadi bioetanol. Proses ini bertujuan untuk memecah struktur kompleks lignoselulosa sehingga komponen gula yang tersembunyi dapat diakses oleh mikroorganisme atau enzim dalam proses fermentasi.

Secara garis besar terdapat beberapa tahapan dalam proses perubahan lignoselulosa menjadi gula sederhana. Proses tersebut adalah tahapan praperlakuan (prapengolahan), dan hidrolisis. Proses praperlakuan bertujuan untuk membuka struktur bahan dan memecah lignin yang mengikat selulosa dan hemiselulosa, serta memperluas permukaan biomassa. Lignin adalah polimer kompleks yang berperan melindungi selulosa dan hemiselulosa, sehingga menghambat akses enzim atau mikroorganisme. Praperlakuan dapat berupa perlakuan fisik, biologi dan kimia serta penggabungan beberapa perlakuan tersebut.

Berbagai teknik praperlakuan telah digunakan untuk biomassa berlignoselulosa berupa batang pisang, termasuk metode kimia, fisikokimia, dan biologi. Praperlakuan kimia biasanya menggunakan larutan kimia seperti asam dan basa kuat, peroksida cair, serta peroksida yang dikombinasikan dengan alkali atau asam (Aisah et al., 2013; Legodi et al., 2021; Low et al., 2015; Shimizu et al., 2018; Srivastava et al., 2019). Praperlakuan secara fisik menggunakan iradiasi dengan sinar gamma, sinar elektron, dan gelombang mikro. Praperlakuan fisikokimia dapat dilakukan dalam perlakuan hidrotermal menggunakan air panas atau *steam-explosion* dengan alkali dan asam (Fatehi, 2013). Khusus untuk batang pisang, beberapa praperlakuan secara fisik telah digunakan dengan gelombang mikro yang dikombinasikan dengan alkali atau asam (Chittibabu et al., 2014; Guerrero et al., 2017; Kusmiyati & Sukmaningtyas, 2018; Mabazza et al., 2020). Penggunaan garam beryodium dengan bantuan gelombang mikro pada air limbah kertas ditemukan

sebagai metode praperlakuan berbiaya rendah (Laltha et al., 2024). Praperlakuan secara biologi menggunakan jamur pelapuk putih seperti *Pycnoporus sanguineus*, *Oxyporus latemarginatus*, *Coriolus versicolor*, *Rigidoporus vinctus*, dan *Pleurotus ostreatus* (Norhaslida et al., 2014; Razali, 2015; Thakur et al., 2013).

Setelah proses praperlakuan, lignoselulosa akan menjalani proses hidrolisis, di mana selulosa dan hemiselulosa dipecah menjadi gula sederhana seperti glukosa dan xilosa. Hidrolisis dapat dilakukan melalui dua cara yakni hidrolisis enzimatik dan hidrolisis kimia. Hidrolisis enzimatik menggunakan enzim seperti selulase untuk memecah rantai panjang selulosa menjadi molekul glukosa. Hidrolisis kimia menggunakan asam, seperti H_2SO_4 untuk mempercepat pemecahan selulosa dan hemiselulosa menjadi gula sederhana. Meskipun lebih cepat, metode ini kadang menghasilkan produk sampingan yang dapat menghambat fermentasi.

Hidrolisis enzimatik menggunakan enzim-enzim seperti endoglukanase, selobiohidrolase, dan β -glukosidase, untuk memecah selulosa menjadi gula yang dapat difermentasi oleh mikroorganisme (Bu et al., 2019). *Trichoderma reesei* adalah jenis fungi yang paling sering digunakan karena kemampuannya memproduksi enzim selulase yang efisien (Binod et al., 2011; Seiboth et al., 2011). Selain *T. reesei*, digunakan pula jenis *Aspergillus* (Kusumaningati et al., 2013), ko-kultivasi *T. reesei* dan *A. niger* (Liu et al., 2012), *A. tubingensis* (Subsamran et al., 2019), *A. ellipticus*, dan *A. fumigatus* (Ingale et al., 2014) juga menunjukkan potensi dalam mendegradasi selulosa dalam proses sakarifikasi. Proses hidrolisis kimia yang sering digunakan adalah asam encer berupa HCl (Pasaribu et al., 2016; Sulfiani et al., 2018; Suryaningsih et al., 2018; Suryaningsih & Pasaribu, 2015) atau H_2SO_4 (Binod et al., 2011).

Pada beberapa kasus, hidrolisis kimia dapat menghasilkan senyawa penghambat seperti asam organik atau furfural yang dapat mengganggu jalannya fermentasi. Oleh karena itu, diperlukan tahap detoksifikasi untuk menghilangkan senyawa-senyawa tersebut sebelum gula sederhana digunakan dalam proses fermentasi. Detoksifikasi ini bisa dilakukan dengan cara netralisasi atau menggunakan metode penyerapan contohnya adalah penggunaan karbon aktif sebesar 2,5% w pada prahidrolisat mampu menghilangkan 42% asam format, 14% asam asetat, 96% hidrosimetilfurfural (HMF) dan 93% furfural (Lee et al., 2011).

Setelah gula sederhana terbentuk, selanjutnya dilakukan fermentasi untuk merubah gula menjadi bioetanol. Fermentasi dilakukan dengan bantuan mikroorganisme. Proses fermentasi banyak dicoba dengan *S. cerevisiae* (Nambunishida et al., 2017; Suryaningsih et al., 2018; Tesfaw & Assefa, 2014), bakteri *Z. mobilis* (Kusumaningati et al., 2013), dan mikroorganisme lainnya yang telah direkayasa seperti *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., lactic acid bacteria, *Corynebacterium glutamicum*, dan *S. cerevisiae* (Hasunuma et al., 2013).

Setelah fermentasi selesai, campuran yang dihasilkan masih mengandung air, sisa gula, dan etanol. Pemisahan etanol dari campuran ini dilakukan melalui proses distilasi. Pada tahapan ini, etanol dipanaskan hingga mencapai titik didihnya, kemudian uap etanol dikondensasikan kembali menjadi cairan dengan tingkat

kemurnian yang lebih tinggi. Hasil dari proses ini adalah bioetanol yang siap digunakan sebagai bahan bakar.

Proses produksi bioetanol yang panjang dan rumit menjadikan energi terbarukan ini kurang berkembang, meskipun memiliki potensi yang baik. Salah satu sumber bahan baku lignoselulosa yang berpotensi adalah batang pisang, termasuk pisang Dewaka yang banyak tumbuh di Merauke. Pisang Dewaka di Merauke memiliki potensi menghasilkan limbah dalam jumlah besar karena ukurannya yang lebih besar dibandingkan dengan jenis pisang serupa di wilayah lain di Papua.

Pisang Dewaka memiliki nama lain sesuai tempat tumbuhnya. Seperti di Maluku, pisang Dewaka disebut pula sebagai pisang Jawaka (Edison et al., 1996). Sedangkan di Papua, pisang Dewaka atau pisang Jawaka disebut pula sebagai pisang Boi (Edison et al., 2002). Kedua pustaka tersebut mencantumkan genom yang sama untuk jenis pisang tersebut yaitu ABB/BBB. Berdasarkan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan dari Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor nomor 766/IPH.1.01/If.07/VII/2019, tanggal 9 Juli 2019 bahwa pisang Dewaka dari Merauke termasuk jenis *M. acuminata* x *M. balbisiana* (Group "ABB") (lihat Lampiran 3).

Berdasarkan eksplorasi sebelumnya (Edison et al., 2002), tinggi pisang Dewaka dilaporkan mencapai 4,04 m, sedangkan di Merauke tingginya bisa mencapai hingga 7 m dengan diameter batang setinggi dada orang dewasa mencapai 45 cm (lihat Gambar 1), sehingga berpotensi menghasilkan limbah yang melimpah. Tanaman pisang juga dapat menimbulkan limbah dalam jumlah besar sekitar 80-85% dari total berat keseluruhan tanaman pisang (Suryaningsih et al., 2022).

Pada penelitian terdahulu tentang bioetanol pada pisang Dewaka telah dilakukan, baik dari buah (Pamungkas, 2017; Suryaningsih & Pasaribu, 2015) maupun dari limbah pisang berupa bonggol, batang dan daun (Pasaribu et al., 2016; Suryaningsih et al., 2018). Penelitian sebelumnya menggunakan HCl pada proses hidrolisis dan menggunakan *S. cerevisiae* dalam proses fermentasi. Hasil terbaik pada buah menunjukkan bahwa pisang Dewaka memiliki kandungan bioetanol sebesar 83,43%. Konsentrasi tersebut dihasilkan dari hasil fermentasi dengan *S. cerevisiae* selama 5 hari. Kondisi optimum diperoleh pada konsentrasi HCl 1,5 N pada suhu 90°C, waktu hidrolisis selama 70 menit (Suryaningsih & Pasaribu, 2015). Sedangkan hasil penelitian pada limbah pisang Dewaka menunjukkan bahwa konsentrasi bioetanol dari fermentasi bonggol pisang Dewaka adalah 17,60% dan setelah proses distilasi diperoleh bioetanol sebesar 51% (Suryaningsih et al., 2018).



Gambar 1. (a) Pohon pisang Dewaka di pekarangan, (b) batang pisang Dewaka belum berbuah yang telah dibersihkan, (c) anakan dan pohon pisang Dewaka muda, (d) bunga pisang Dewaka (foto searah jarum jam, koleksi pribadi).

Hingga saat ini, proses produksi bioetanol yang memanfaatkan mikroorganisme memerlukan persiapan khusus di laboratorium dan skala industri guna memastikan bahwa mikroorganisme tetap berada dalam kondisi optimal dan siap digunakan setiap saat. Persiapan ini mencakup pemeliharaan kultur mikroorganisme dalam kondisi yang terkontrol, termasuk pengaturan suhu, pH, dan media nutrisi yang sesuai, sehingga mikroorganisme dapat berkembang biak dan tetap aktif. Tanpa adanya persiapan yang cermat di laboratorium, efektivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi dapat mengalami penurunan, yang pada akhirnya dapat mengurangi efisiensi produksi bioetanol secara keseluruhan.

Beberapa kajian sebelumnya banyak mempelajari perilaku mikroorganisme dalam proses hidrolisis dan fermentasi bioetanol dengan bahan berkadar lignoselulosa tinggi. Beberapa mikroorganisme yang berperan dalam proses hidrolisis dapat menghasilkan enzim yang berperan dalam proses tersebut (Sukumaran et al., 2005). Diantara mikroorganisme penghasil selulase yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa menghasilkan tiga kelas enzim yang berbeda yaitu (1) Endoglucanases (EGs); (2) Cellobiohydrolases (CBHs); dan (3) β -glucosidases (BGs). *T. reesei* diketahui merupakan fungi yang memproduksi dua CBHs, lima EGs, dan dua BGs (Binod et al., 2011).

Mikroorganisme yang sering digunakan dalam proses fermentasi dari jenis jamur/fungi antara lain *S. cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* dan *Kluveromyces marxianus*. Sedangkan jenis bakteri antara lain *Z.*

mobilis, *Escherichia coli* serta beberapa jenis bakteri termofilik yaitu *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* dan *Clostridium thermocellum*. Dijelaskan pula bahwa *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* dan *Pichia stipitis*, dapat menghasilkan bioetanol lebih dari 80% (Limayem & Ricke, 2012).

Pengembangan bioetanol masih menghadapi berbagai tantangan, namun terdapat beberapa peluang yang dapat mendorong terbentuknya pasar bioetanol dalam negeri. Beberapa di antaranya adalah ketersediaan bahan baku yang beragam, potensi pengembangan dalam skala kecil, sebagian teknologi proses yang sudah dikuasai, penerimaan masyarakat yang tinggi terhadap produk bioetanol, serta produk yang ramah lingkungan dan mendukung ekonomi sirkular (Dewan Energi Nasional, 2022).

Buku Evaluasi Capaian Bauran Energi Nasional Tahun 2022 menyebutkan peluang pengembangan bioetanol berdasarkan ketersediaan bahan berlignoselulosa yang melimpah dan potensi pengembangan bioetanol dalam skala kecil dapat dilakukan dalam usaha pemenuhan kebutuhan energi masyarakat. Usaha ke arah ini dapat dilakukan dengan mengupayakan cara pengolahan yang lebih mudah untuk dilakukan oleh masyarakat.

Pada studi kasus ini digunakan bahan berlignoselulosa berupa batang pisang Dewaka, dengan menggunakan metode praperlakuan berupa pemanasan bertekanan atau ledakan uap, di mana bahan berlignoselulosa dipanaskan menggunakan uap bertekanan tinggi, kemudian secara cepat dilepaskan sehingga menyebabkan pemecahan ikatan dalam lignoselulosa. Proses ini membuat struktur lignin dan selulosa lebih mudah diakses oleh enzim. Untuk meningkatkan efektivitas pemanasan bertekanan, penambahan modifikasi dengan perendaman dengan larutan NaOH dapat dilakukan.

Keberhasilan fermentasi tidak hanya ditentukan oleh praperlakuan, tetapi juga oleh ketersediaan inokulum mikroorganisme yang siap digunakan. Inokulum dalam bentuk bubuk, yang dibuat dengan menonaktifkan sementara mikroorganisme pada bahan pembawa, memungkinkan inokulum disimpan dan diaktifkan kembali saat dibutuhkan. Pendekatan ini membuat fermentasi lebih mudah dan fleksibel, sehingga produksi bioetanol menjadi lebih efisien.

Mikroorganisme yang dilemahkan sementara dalam bentuk bubuk dapat menjadi solusi untuk memudahkan penggunaan mikroorganisme dalam produksi bioetanol, mirip dengan penggunaan ragi dalam pembuatan tape dan tempe. Ragi, yang mengandung konsorsium mikroorganisme, telah digunakan secara turun-temurun dalam fermentasi. Sebelumnya, Ratu Safitri, dkk pada tahun 2011 telah menguji inokulum jamur bubuk dari *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, dan *Trichoderma viride* untuk fermentasi kulit pisang kepok (Safitri et al., 2011).

Salah satu fungi penghasil selulase yang paling sering digunakan dalam meng-hidrolisis selulosa karena memiliki tiga kelas enzim yang berbeda adalah *T. reesei* yang diketahui merupakan fungi yang memproduksi dua CBHs, lima EGs, dan dua BGs (Binod et al., 2011). Sedangkan mikroorganisme yang sering digunakan dalam proses fermentasi adalah *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* yang dapat menghasilkan bioetanol lebih dari 80% (Limayem & Ricke, 2012).

Pembuatan inokulum bubuk memerlukan formulasi bahan pembawa yang tepat karena komposisinya mempengaruhi viabilitas dan aktivitas mikroba. Bahan pembawa harus menyediakan unsur penting seperti karbon, hidrogen, nitrogen, dan mineral lainnya untuk mendukung pertumbuhan mikroba. Pemilihan bahan yang tepat sangat penting untuk mendukung mikroba dalam produksi bioetanol (Stanbury et al., 2017a, 2017b). Pemilihan bahan pembawa dari bahan dasar beras, jagung, dan kedelai adalah berdasarkan kandungan nutrisi yang diperlukan oleh mikroorganisme. Berdasarkan Tabel Komposisi Pangan Indonesia 2017 yang dikeluarkan oleh Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat (2018), beras, jagung, dan kedelai merupakan sumber karbon, hidrogen dan nitrogen dalam bentuk karbohidrat dan protein. Demikian pula halnya dengan unsur mikro lainnya seperti kalsium, fosfor, kalium, natrium, besi, tembaga, dan seng, tersedia pada jagung, beras, dan kedelai.

Pembuatan dan pengembangan inokulum bubuk dari *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* pada bahan pembawa berupa campuran beras, jagung, dan kedelai telah dilakukan. Aplikasi penggunaannya dilakukan pada batang pisang Dewaka yang telah diberikan praperlakuan berupa pemanasan bertekanan menggunakan autoklaf dan modifikasi perendaman dengan NaOH.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana efektivitas inokulum bubuk dari ketiga jenis mikroba *T. reesei*, *S. Cerevisiae*, dan *Z. mobilis* memiliki daya hidup yang baik dalam bahan pembawa berupa campuran beras, jagung dan kedelai.
2. Bagaimana pengaruh praperlakuan dengan menggabungkan pemanasan bertekanan dan perendaman dengan NaOH dalam merubah hemiselulosa pada batang pisang Dewaka menjadi gula sederhana.
3. Bagaimana pengaruh inokulum bubuk yang dibuat dari biakan *T. reesei*, *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dapat mempersingkat waktu dan meningkatkan produksi bioetanol dari batang pisang dewaka.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bioetanol dari batang pisang dewaka melalui beberapa tahapan berupa:

1. Pembuatan inokulum bubuk dengan jenis mikroba *T. reesei*, *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dalam bahan pembawa berupa campuran beras, jagung dan kedelai.
2. Produksi gula sederhana dari batang pisang Dewaka dengan praperlakuan pemanasan bertekanan dilanjutkan dengan perendaman dengan NaOH.

3. Produksi bioetanol yang diperoleh dengan proses sakarifikasi dan fermentasi secara simultan menggunakan inokulum dengan konsorsium mikroorganisme *T. reesei*, *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*.

1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi:

1. **Bagi pengembangan ilmu pengetahuan:** Penelitian ini dapat meningkatkan pengetahuan tentang pemanfaatan biomassa berlignoselulosa, khususnya batang pisang Dewaka, sebagai bahan baku bioetanol dan meningkatkan pemahaman tentang teknik praperlakuan dan fermentasi.
2. **Bagi industri energi terbarukan:** Hasil penelitian ini dapat menjadi referensi bagi industri dalam mengembangkan proses produksi bioetanol yang lebih efisien dan berbasis bahan lokal yang melimpah.
3. **Bagi masyarakat:** Penelitian ini dapat mendukung penyediaan energi alternatif dalam skala kecil yang berkelanjutan, terutama di wilayah pedesaan yang kaya akan biomassa, menggunakan inokulum bubuk yang selalu tersedia serta memudahkan dalam pengaplikasiannya.

1.5. Ruang Lingkup Penelitian

Adapun ruang lingkup dalam penelitian ini adalah:

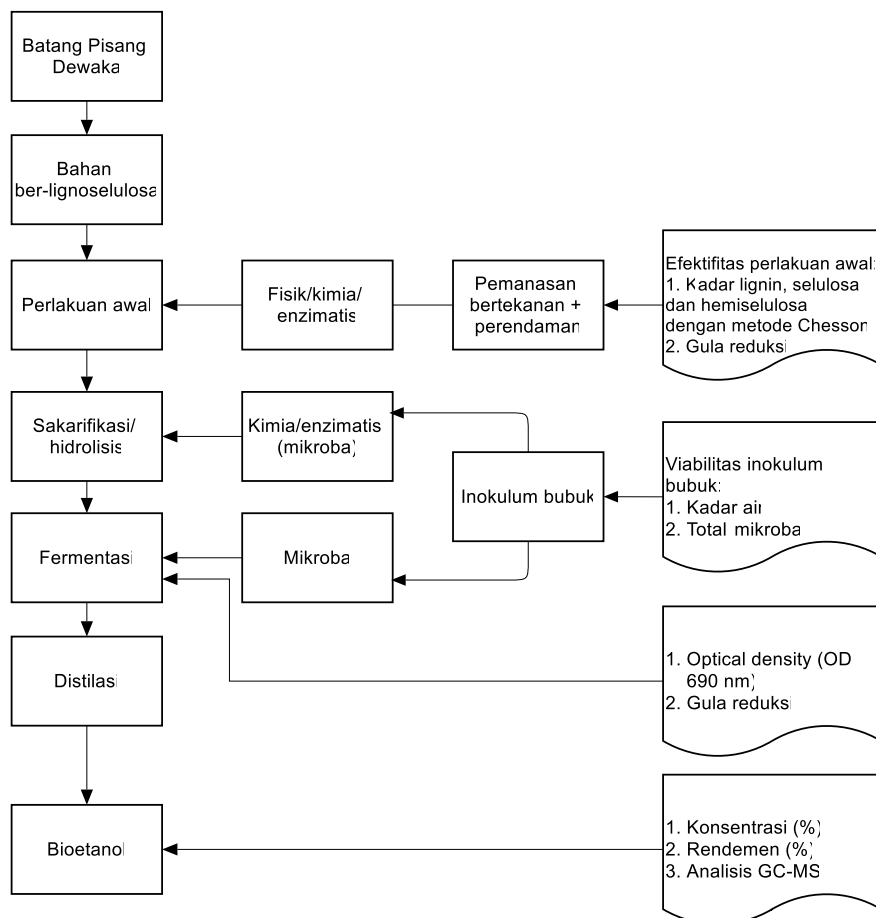
1. Fokus penelitian ini adalah batang pisang Dewaka sebagai salah satu bahan berlignoselulosa yang ada di Merauke.
2. Penggunaan praperlakuan yaitu pemanasan bertekanan dan perendaman dengan NaOH atau H₂O. Bahan, berupa batang pisang dewaka, terlebih dahulu dibersihkan dan dicacah menggunakan *chopper*. Bahan yang telah memiliki ukuran lebih kecil dan seragam kemudian diberikan perlakuan awal tahap pertama dan dilanjutkan dengan praperlakuan tahap kedua. Praperlakuan tahap pertama berupa pemanasan bertekanan menggunakan autoklaf dengan waktu pemanasan 1 dan 2 jam. Praperlakuan tahap kedua adalah perendaman dengan NaOH dan H₂O. Perendaman dilakukan dengan memperhatikan waktu perendaman 24 dan 48 jam dengan perbandingan massa bahan : volume NaOH sebesar 1:2.
3. Pengembangan inokulum dalam bentuk bubuk dari *T. reesei*, *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dalam bahan pembawa berupa campuran beras, jagung dan kedelai.
4. Pembuatan bioetanol dengan inokulum yang telah dibuat dilakukan dengan proses sakarifikasi dan fermentasi secara simultan dengan konsorsium ketiga mikroorganisme yang akan dilakukan sampai 15 hari.

1.6. Kebaharuan Penelitian (Novelty)

Penelitian ini menghasilkan kebaruan yaitu:

1. Pemanfaatan batang pisang Dewaka sebagai bahan lignoselulosa untuk produksi bioetanol yang belum banyak diteliti.
2. Penerapan metode pemanasan bertekanan yang dimodifikasi dengan NaOH pada batang pisang Dewaka belum diteliti sebelumnya.
3. Pengembangan inokulum bubuk dari *T. reesei*, *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* untuk fermentasi bioetanol memberikan inovasi dalam proses fermentasi yang lebih fleksibel dan praktis, khususnya dalam skala kecil.
4. Fokus pada pengembangan bioetanol dalam skala kecil karena pendekatan ini diharapkan dapat menjadi solusi praktis untuk energi terbarukan di tingkat lokal, terutama di wilayah dengan sumber biomassa melimpah.

1.7. Kerangka Pemikiran



Gambar 2. Kerangka pemikiran penelitian

BAB II

PEMBUATAN INOKULUM BUBUK

2.1. Abstrak

NI LUH SRI SURYANINGSIH. **Pembuatan inokulum bubuk** (dibimbing oleh Mursalim, Amran Laga, Hasnah Natsir).

Latar belakang. Penyediaan inokulum yang berkualitas dan selalu tersedia dapat menjadi solusi dalam pengembangan bioetanol dari bahan berlignoselulosa di Indonesia, yang memiliki sumber lignoselulosa melimpah. Kondisi ini membuka peluang bagi pengembangan bioetanol dalam skala kecil, yang berpotensi memenuhi kebutuhan energi masyarakat. Penggunaan mikroorganisme yang dilemahkan sementara dalam bentuk inokulum bubuk, seperti ragi, merupakan satu cara untuk mengatasi tantangan dalam penggunaan mikroorganisme pada proses produksi bioetanol. Pendekatan ini menawarkan kemudahan dan fleksibilitas dalam proses fermentasi, sehingga memungkinkan produksi bioetanol dilakukan lebih efisien dan praktis. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan inokulum bubuk dari *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Zymomonas mobilis* menggunakan bahan pembawa berupa campuran beras, jagung, dan kedelai, dengan tambahan 5% b/b glukosa. **Metode.** Viabilitas dan aktifitas mikroorganisme selama pembuatan dan penyimpanan, diketahui dengan pengukuran kadar air inokulum (% basis basah) dan analisis TPC (*Total Plate Count*). Penelitian ini menghasilkan tiga jenis inokulum: inokulum dari *T. reesei*, inokulum gabungan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*, serta inokulum dari ketiga mikroba tersebut (*T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis*). **Hasil.** Hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulum terbaik adalah yang terdiri dari ketiga mikroba tersebut, dengan bahan pembawa campuran beras, jagung, kedelai, serta tambahan 5% b/b glukosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulum terbaik adalah yang terdiri dari ketiga mikroba tersebut, dengan bahan pembawa campuran beras, jagung, kedelai, serta tambahan 5% b/b glukosa sebagai sumber nutrisi mikroba. Selama masa inkubasi 48 jam, viabilitas mikroba berkisar antara $1,26 \times 10^7$ hingga $2,85 \times 10^7$ CFU/gr. Selama penyimpanan, viabilitas mikroba meningkat hingga mencapai $9,42 \times 10^8$ CFU/gr. **Kesimpulan.** Dengan demikian, inokulum ini layak digunakan untuk produksi bioetanol melalui proses sakarifikasi dan fermentasi simultan (SSF).

Kata Kunci : Inokulum bubuk, viabilitas mikroba, *T. reesei*, *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*

2.3. Pendahuluan

Saat ini, kebutuhan akan bahan bakar fosil terus meningkat, sementara data produksi menunjukkan penurunan yang signifikan. Kondisi ini tidak hanya terjadi di Indonesia, tetapi juga di seluruh dunia. Menurut *Statistical Review of World Energy 2021*, konsumsi bahan bakar meningkat dari 1.443 menjadi 1.449 barrel/hari antara tahun 2010 hingga 2020, sedangkan produksi menurun dari 1.003 menjadi 743 barrel/hari (BP Energy, 2021). Ketidakseimbangan ini mendorong pemanfaatan sumber energi alternatif, salah satunya adalah energi baru terbarukan (EBT) seperti biomassa. Potensi pengembangan biomassa sebagai bahan baku EBT di Indonesia sangat besar. Seperti halnya pengembangan bioetanol yang dapat dihasilkan dari limbah pertanian.

Pembuatan bioetanol dari biomassa merupakan proses yang cukup kompleks dan panjang. Secara umum, terdapat tiga tahap utama yang harus dilalui, yaitu praperlakuan, hidrolisis, dan fermentasi. Tahap praperlakuan bertujuan untuk memisahkan selulosa yang secara alami terikat dengan hemiselulosa dan lignin. Setelah itu, tahap hidrolisis dilakukan untuk mengubah selulosa menjadi gula melalui proses sakarifikasi, sehingga gula tersebut siap untuk difermentasi menjadi bioetanol. Salah satu faktor utama yang mempengaruhi durasi proses ini adalah karakteristik bahan baku, terutama biomassa lignoselulosa, yang membutuhkan praperlakuan yang kompleks. Praperlakuan ini diperlukan untuk memecah struktur lignin yang keras dan rumit, yang melindungi selulosa dan hemiselulosa, agar enzim dapat mengakses dan menguraikannya (Chandel et al., 2012). Proses praperlakuan untuk memastikan biomassa siap diolah ke tahap berikutnya.

Proses pembuatan bioetanol dari biomassa memakan waktu lama dan memerlukan biaya yang cukup tinggi. Pada beberapa hasil penelitian diketahui bahwa biaya tertinggi adalah pada proses praperlakuan dan diikuti oleh proses hidrolisis secara enzimatik, kemudian diikuti oleh proses lainnya (S. S. S. Abdullah et al., 2016; Broda et al., 2022; Ceaser et al., 2024; Chiemerie Obiora, 2022; Dempfle et al., 2021). Secara sprsifik disebutkan bahwa proses praperlakuan membutuhkan 11-27% (Ceaser et al., 2024; Su et al., 2020) dari total biaya pembuatan bioetanol dan 16% dari total biaya adalah pada proses hidrolisis enzimatik (Ceaser et al., 2024).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Dempfle, et al. (2021) dijelaskan bahwa dengan pendekatan bioprocessing terkonsolidasi (CBP) dapat mengurangi panjangnya proses pembuatan bioetanol. Pendekatan ini menggabungkan produksi enzim, hidrolisis, dan fermentasi menjadi satu langkah. CBP mampu memberikan penghematan biaya dibandingkan dengan metode tradisional yang memerlukan beberapa langkah terpisah. Hal ini juga berlaku dengan proses sakarifikasi dan fermentasi simultan (SSF) dengan menggunakan (1) konsorsium mikroba untuk fermentasi gula C5 dan C6 sekaligus dan (2) campuran enzim hemiselulase dan atau selulase yang bekerja sama dalam proses sakarifikasi (Khajeeram & Unrean, 2017).

Proses-proses ini dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis mikroba sekaligus seperti mikroba dalam bentuk konsorsium mikroba, atau dalam bentuk mikroba rekombinan. Mikroba dalam bentuk konsorsium mikroba atau mikroba rekombinan digunakan untuk memanfaatkan mikroba yang memiliki karakteristik yang berbeda (Febrianti et al., 2017; Vats et al., 2013).

Penggunaan konsorsium mikroorganisme membutuhkan proses penyediaan inokulum pada kondisi yang sesuai. Mikroorganisme yang akan digunakan harus dipersiapkan dengan baik agar memiliki daya hidup yang optimal. Persiapan ini membutuhkan kondisi lingkungan yang tepat, peralatan laboratorium yang memadai, serta keterampilan tinggi dari orang yang mempersiapkannya.

Pemanfaatan konsorsium mikroba yang menjanjikan ini memerlukan kondisi khusus dalam penyediaan mikroba yang digunakan, seperti dalam laboratorium. Salah satu cara untuk menjawab masalah ini adalah dengan melemahkan mikroba sementara dalam bentuk inokulum, seperti ragi, saat membuat tape dan tempe. Secara turun temurun, inokulum atau ragi, yang merupakan konsorsium mikroorganisme, telah digunakan dalam proses fermentasi saat membuat tape dan tempe. Inokulum dengan konsorsium mikroorganisme, seperti ragi tape atau tempe, dapat menjawab kebutuhan inokulum atau starter yang selama ini harus dipersiapkan terlebih dahulu di dalam laboratorium.

Beberapa penelitian terdahulu telah mengeksplorasi penggunaan inokulum bubuk untuk penguraian bahan ber-lignoselulosa menjadi bioetanol. Penggunaan campuran tepung jagung, tapioca, tepung beras dan terigu, yang mengandung *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, dan *K. marxianus* dalam produksi bioetanol pada kertas koran bekas (Safitri et al., 2017). Selanjutnya adalah pembuatan inokulum bubuk untuk fermentasi dari tepung beras, jagung, kedele dan kulit pisang dengan jamur selulolitik berupa *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, dan *Trichoderma viridae* (Safitri et al., 2011).

Pembuatan inokulum bubuk memerlukan formulasi bahan pembawa yang tepat karena komposisinya mempengaruhi viabilitas dan aktivitas mikroba selama penyimpanan dan aplikasi. Bahan pembawa harus mengandung unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba secara umum. Unsur utama yang diperlukan oleh mikroba mencakup karbon, hidrogen, dan nitrogen, serta mineral lainnya. Pemilihan bahan pembawa yang tepat untuk produksi bioetanol harus memenuhi beberapa syarat dasar guna mendukung kehidupan mikroba yang terlibat dalam proses ini. Demikian pula halnya dengan unsur mikro lainnya seperti kalsium, fosfor, kalium, natrium, besi, tembaga, dan seng yang dibutuhkan oleh mikroba dalam menunjang kehidupannya (Stanbury et al., 2017a, 2017b).

Penelitian (Safitri et al., 2011, 2017) menggunakan tepung jagung, tepung beras, tapioca, kedelai, terigu, dan tepung kulit pisang sebagai bahan pembawa. Pada penelitian ini digunakan beras, jagung dan kedelai sebagai bahan pembawa. Campuran beras, jagung, dan kedelai dipilih sebagai bahan pembawa karena ketiganya kaya akan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Berdasarkan data pada Tabel Komposisi Pangan Indonesia Tahun 2017 (atau dapat dilihat pada Tabel 6), beras mengandung karbohidrat yang tinggi, sementara jagung dan kedelai kaya

akan protein dan mineral esensial seperti fosfor, kalsium, kalium, natrium, besi, tembaga, dan seng yang sangat penting untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme (Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat, 2018). Penambahan glukosa sebanyak 5% b/b juga diperlukan untuk memberikan sumber energi awal bagi mikroorganisme, sehingga mempercepat proses aktivasi dan fermentasi.

Mikroorganisme yang ditumbuhkan pada bahan pembawa berupa beras, jagung, dan kedelai dalam penelitian ini adalah *T. reesei*, *Z. mobilis*, dan *S. cerevisiae*. *T. reesei* merupakan fungi yang memproduksi dua Cellobiohydrolases (CBHs), lima Endoglucanases (EGs), dan dua β -glucosidases (BGs) (Binod et al., 2011). Aktivitas enzimatik yang kuat dari *T. reesei* menjadikannya pilihan utama dalam tahap sakarifikasi, karena enzim selulase-nya dapat beroperasi pada berbagai jenis biomassa, termasuk limbah pertanian, kayu, dan bahan lignoselulosa lainnya.

S. cerevisiae adalah jenis ragi yang paling umum digunakan dalam produksi bioetanol karena kemampuannya yang andal dalam memfermentasi glukosa dan fruktosa menjadi etanol. Meskipun tidak seefisien *Z. mobilis* dalam hal laju produksi etanol, *S. cerevisiae* memiliki toleransi yang lebih baik terhadap lingkungan fermentasi yang keras, seperti konsentrasi etanol tinggi, pH rendah, dan tekanan osmotik tinggi (Tesfaw & Assefa, 2014). Hal ini membuatnya ideal sebagai mikroorganisme fermentasi yang bekerja pada kondisi ekstrem.

Z. mobilis merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang dan bersifat anaerob fakultatif. *Z. mobilis* menempuh jalur Etner-Doudoroff dan menfermentasi glukosa, fruktosa, dan sukrosa menjadi etanol sebagai produk utamanya. *Z. mobilis* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan *S. cerevisiae* antara lain lebih tahan terhadap konsentrasi etanol kadar tinggi juga dapat tumbuh pada konsentrasi gula kadar tinggi (Kurniasari & Putra, 2011; Rogers et al., 2007).

Ketiga mikroorganisme ini diharapkan dapat bekerja secara sinergis dalam proses produksi bioetanol. *T. reesei* melanjutkan proses pemecahan selulosa menjadi glukosa, yang kemudian difementasi oleh *Z. mobilis* dan *S. cerevisiae*. Kombinasi ini mengoptimalkan setiap tahap dalam konversi biomassa lignoselulosa menjadi bioetanol, di mana enzim selulase dari *T. reesei* bekerja pada tahap awal, diikuti oleh fermentasi efisien oleh *Z. mobilis*, sementara *S. cerevisiae* memberikan stabilitas pada lingkungan fermentasi yang lebih keras.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan inokulum bubuk dari *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* dengan formulasi bahan pembawa yang terdiri dari campuran beras, jagung, kedelai, serta penambahan 5% b/b glukosa; mengkaji viabilitas dan aktivitas mikroorganisme dalam inokulum bubuk selama penyimpanan serta efektivitasnya dalam proses fermentasi bioetanol.

Penelitian ini diharapkan dapat memperkaya kajian ilmiah tentang pengembangan inokulum bubuk dan aplikasinya dalam proses fermentasi bioetanol. Inovasi inokulum bubuk diharapkan dapat memberikan solusi praktis bagi industri energi terbarukan berupa bioetanol dalam skala kecil dan menengah, serta diharapkan dapat menjadi solusi energi terbarukan berbasis biomassa lokal yang mudah diterapkan dan ramah lingkungan.

2.4. Metode

2.3.1. Waktu dan Tempat

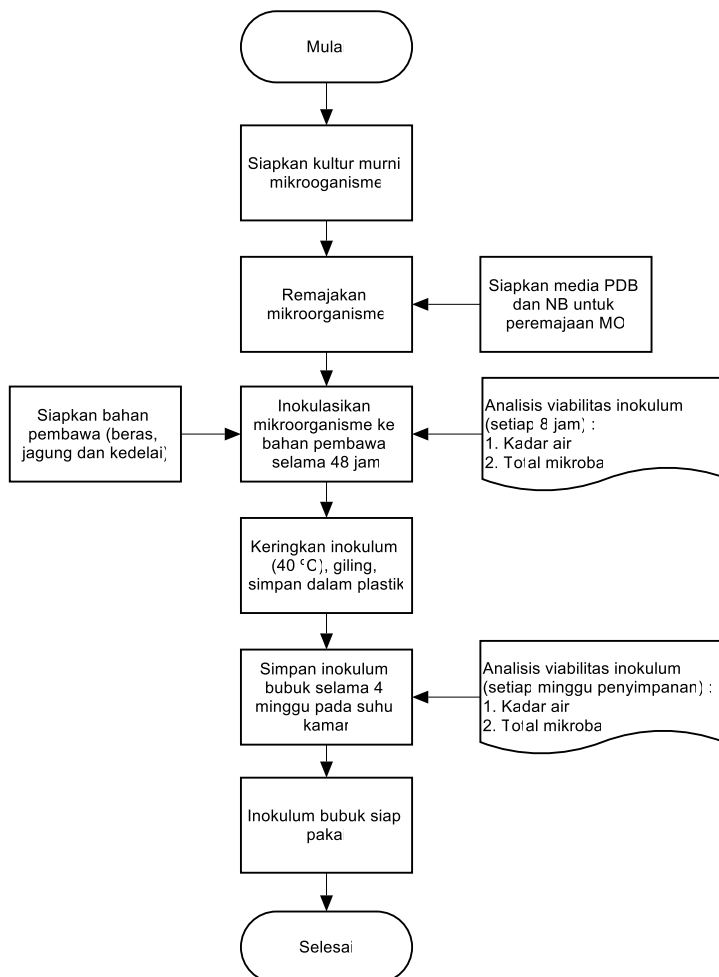
Seluruh tahap penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Pangan, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Departemen Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin. Penelitian berlangsung dari Agustus hingga Desember 2022.

2.3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis*, dengan spesifikasi seperti tercantum pada Lampiran 4. Media yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Plate Count Agar* (PCA), *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), dan *Nutrient Broth* (NB). Bahan yang digunakan untuk pembuatan inokulum bubuk adalah beras varietas Ciherang, jagung varietas Nasa 29, kedelai varietas Grobogan, akuades, dan larutan NaCl fisiologis steril 0,9%. Alat yang akan digunakan adalah hot plate dan pengaduk magnetik, autoklaf, cawan petri, jarum ose, bunsen, mortar, mikropipet, oven, blender, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas piala, timbangan, serta alat tulis.

2.3.3. Metode Penelitian

Pada tahapan ini akan dilakukan pembuatan inokulum bubuk dari *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* dengan formulasi bahan pembawa yang terdiri dari campuran beras, jagung, kedelai, serta penambahan 5% b/b glukosa. Adapun alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3 dengan pelaksanaan penelitian secara rinci dapat dilihat pada penjelasan peremajaan mikroorganisme, pembuatan inokulum, dan prosedur pengukuran dalam metode penelitian.



Gambar 3. Diagram alir penelitian tahap I

2.3.3.1. Peremajaan Mikroorganisme

Kultur murni *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis*, diperoleh dari Food and Nutrition Culture Collection (FNCC) pada Pusat Studi Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, digunakan. Kultur murni tersebut diremajakan dengan menggunakan Potato Dextrose Broth (PDB) dan Nutrient Broth (NB).

Adapun prosedur peremajaan *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* yang akan di-inokulasikan pada bahan pembawa adalah sebagai berikut:

1. Siapkan media agar yang akan digunakan yaitu media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan media *Nutrient Broth* (NB).
2. PDB dan NB yang digunakan merupakan produk Merck yang disiapkan sesuai petunjuk penggunaan pada kemasan.
3. Media di-masukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml dan ditutup rapat dengan kapas dan aluminium foil.

4. Media di-sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.
5. Kultur murni *T. reesei* dan *S. cerevisiae* diremajakan pada media PDB, sedangkan *Z. mobilis* diremajakan pada NB.
6. Setiap biakan murni sebanyak 1 ose dibiakkan pada 9 ml media steril.
7. Masa inkubasi *S. cerevisiae* adalah 2 hari pada suhu 30°C dalam media PDB (Kustyawati et al., 2013)
8. *Z. mobilis* di-inkubasi adalah selama 2 hari pada suhu 37°C (Wilkins, 2009)
9. Sedang *T. reesei* pada suhu 25°C selama 5 hari (Heng & Hamzah, 2022).

2.3.3.2. Pembuatan Inokulum Bubuk

Pada pembuatan inokulum bubuk terdapat beberapa tahapan pembuatan. Pertama-tama adalah persiapan bahan pembawa, dilanjutkan dengan inokulasi bahan pembawa dengan *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis*, hingga penyimpanan inokulum bubuk. Berdasarkan campuran media tumbuh yang telah ditambahkan jamur dan bakteri sesuai perlakuan, terdapat 9 (sembilan) kombinasi inokulum bubuk yang dapat dilihat pada Tabel 1 berikut, dan adapun prosedur secara terperinci dapat dilihat pada penjelasan berikut.

Tabel 1. Desain penelitian pembuatan inokulum bubuk

Campuran Media Jenis Mikroba	Kode Jenis Inokulum		
	BJ (A)	BK (B)	BJK (C)
TR (1)	A 1 (1)	B 1 (2)	C 1 (3)
SC & ZM (2)	A 2 (4)	B 2 (5)	C 2 (6)
TR, SC & ZM (3)	A 3 (7)	B 3 (8)	C 3 (9)

Keterangan :

1. Kode jenis mikroorganisme

- 1) *T. reesei* (TR)
- 2) *S. cerevisiae* (SC)
- 3) *Z. mobilis* (ZM)

2. Kode bahan pembawa

- 1) Beras-jagung (BJ)
- 2) Beras-kedelai (BK)
- 3) Beras-jagung-kedelai (BJK)

Bahan pembawa yang digunakan untuk pertumbuhan ketiga mikroba yang digunakan adalah campuran beras, tepung jagung dan kedelai dengan perbandingan 1:1:1. Media tumbuh inokulum akan dibuat dari campuran bahan (1) campuran beras dan jagung (BJ); (2) campuran beras dan kedelai (BK); dan (3) campuran beras, jagung dan kedelai (BJK), dengan perbandingan masing-masing 1:1.

Tahapan penyiapan bahan pembawa. Pertama-tama setiap bahan pembawa dicuci, kemudian direndam selama 6 jam. Setelah waktu perendaman tercapai, air rendaman dibuang, kemudian bahan dikeringkan dan digiling dengan mesin pengering pada suhu 60°C. Bahan kering disimpan dalam toples sebelum digunakan.

Tahapan inokulasi bahan pembawa dengan *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis*. Tahapan ini dilakukan sebagai berikut :

1. Campuran bahan pembawa dalam pembuatan inokulum dibuat sesuai desain penelitian pada Tabel 1. Campuran bahan pembawa dibuat dengan mencampur bahan seberat total 100 gr dengan perbandingan bahan 1:1 dan 1:1:1, tergantung jenis campuran yang dibuat.
2. Campuran bahan pembawa dimasukkan ke dalam wadah Erlenmeyer dan ditambahkan 5% b/b glukosa. Campur bahan hingga homogen, kemudian tutup Erlenmeyer dengan kapas dan aluminium foil.
3. Campuran bahan pembawa kemudian disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
4. Bahan media tumbuh steril tersebut kemudian ditambahkan hasil perbanyakan mikroorganisme sesuai desain penelitian pada Tabel 1.
5. Penambahan biakan jamur dan bakteri dalam media tumbuh dilakukan dengan menambahkan masing-masing sebanyak 9 ml biakan dalam 100 gram campuran media steril dan diaduk perlahan hingga homogen.
6. Adapun masing-masing inokulum akan dipergunakan untuk tujuan berbeda :
 - 1) Inokulum dengan *T. reesei* (Inokulum 1), digunakan untuk melanjutkan proses sakarifikasi.
 - 2) Inokulum dengan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* (Inokulum 2), setelah proses sakarifikasi selesai maka inokulum 2 ini akan ditambahkan untuk melanjutkan proses fermentasi.
 - 3) Inokulum dengan *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* (Inokulum 3), digunakan dalam proses fermentasi secara simultan.
7. Inokulum yang telah dibuat diinkubasi selama 48 jam. Selama 48 jam masa inkubasi awal, dilakukan pengujian viabilitas inokulum setiap 8 jam meliputi kadar air dan total mikroba.
8. Setelah masa inkubasi 48 jam, media yang telah ditumbuhi mikroorganisme kemudian dikeringkan dengan suhu 40°C selama 6 jam. Setelah waktu pengeringan tercapai, inokulum dihaluskan.
9. Inokulum bubuk kemudian disimpan pada suhu kamar selama 4 minggu. Setiap minggu pada masa penyimpanan dilakukan pengamatan viabilitas inokulum meliputi kadar air dan total mikroba.

2.3.3.3. Prosedur Pengukuran

Parameter yang akan diamati pada tahapan ini adalah viabilitas inokulum berupa kadar air dan total mikroba, dengan prosedur analisis atas parameter yang diamati adalah sebagai berikut :

- a. **Kadar air.** Pengujian kadar air dilakukan dengan mengeringkan inokulum saat pengamatan pada suhu 105°C selama 24 jam. Selanjutnya, kadar air diperhitungkan berdasarkan persen basis basah (% BB), dengan persamaan sebagai berikut:

$$KA (\%) = \frac{\text{Berat sampel}_{\text{awal}} - \text{Berat sampel}_{\text{akhir}}}{\text{Berat sampel}_{\text{awal}}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

b. **Pengujian total mikroba** dilakukan untuk melihat kemampuan bertahan hidup mikroba dalam bentuk inokulum. Perhitungan total mikroba dilakukan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Adapun prosedur pengujian total mikroba dilakukan sebagai berikut (Fardiaz, 1993; Safitri et al., 2011) :

- a) Sampel diambil sebanyak 1 gr kemudian dihancurkan dengan lumpang porselen dan ditambahkan 9 ml larutan NaCl fisiologis steril 0,9% sehingga diperoleh pengenceran pertama (10^{-1}).
- b) Sampel kemudian diencerkan secara bertahap dengan mengambil 1 ml sampel dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl fisiologis 0,9% dalam tabung reaksi lalu dikocok hingga homogen sehingga diperoleh pengenceran yang dikehendaki (10^{-n}).
- c) Dari pengenceran yang dikehendaki dipipet 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang berbeda. Ke dalam cawan tersebut dimasukkan agar cair steril PCA (*Plate Count Agar*) yang telah didinginkan hingga 50°C sebanyak 15 ml dan ditutup rapat.
- d) Segera setelah penuangan agar cawan petri digerakkan perlahan seperti membentuk angka delapan agar sel mikroorganisme dan agar tercampur rata.
- e) Setelah memadat, inkubasikan cawan tersebut dalam inkubator dengan posisi terbalik. Hitung jumlah koloni yang terbentuk dengan koloni counter setiap hari selama 7 hari.
- f) Setelah dihitung, nilai yang didapat dari setiap petri dimasukkan ke dalam rumus. Misalkan nilai yang dapat diandalkan ada pada pengenceran 10^{-3} (a), 10^{-4} (b) dan 10^{-5} (c), maka :

$$\text{Jumlah mikroorganisme} = \frac{(a \times 10^3) + (b \times 10^4) + (c \times 10^5)}{3} \quad \dots\dots\dots (2)$$

Dari perhitungan tersebut diperoleh jumlah mikroorganisme per gr atau per ml sampel. Inokulum yang baik adalah memiliki paling sedikit 10^7 mikroorganisme per gr inokulum.

2.5. Analisa Data

Seluruh sampel dalam penelitian ini diulang sebanyak 2 kali (duplo). Data yang dianalisis adalah kadar air inokulum dan total mikroba per gr inokulum yang dihitung masing-masing dengan Rumus (1) dan Rumus (2). Data yang diperoleh merupakan nilai rata-rata dari 2 ulangan dan disajikan dalam analisis grafis. Analisis secara statistik menggunakan rancangan acak lengkap faktorial $9 (I) \times 11 (T)$ dengan dua kali ulangan. Faktor pertama adalah konsorsium mikroba dalam bahan pembawa (I) dan faktor kedua adalah waktu pengambilan sampel (T) yang terdiri dari 11 waktu.

Apabila ada perbedaan dalam analisis varian, akan dilanjutkan dengan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT). Analisis ini dilakukan dengan program SmartstatXL versi 3.6.5.3 dari Microsoft Excel for Windows.

2.6. Hasil dan Pembahasan

Pada pembuatan inoculum, terdapat 3 (tiga) jenis inoculum yang dibuat dengan tujuan berbeda, yaitu (i) inoculum untuk melanjutkan proses hidrolisis; (ii) inoculum untuk proses fermentasi; dan (iii) inoculum untuk proses hidrolisis dan fermentasi secara simultan. Inoculum yang dibuat untuk tujuan melanjutkan proses hidrolisis secara enzimatik adalah inoculum yang dibuat dengan penambahan *T. reesei* pada bahan pembawa. Selanjutnya, inoculum untuk proses fermentasi, dengan penambahan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*. Inoculum ketiga adalah jenis inoculum untuk proses hidrolisis/sakarifikasi dan fermentasi secara simultan (SSF) dengan penambahan ketiga mikroorganisme yang digunakan (lihat Tabel 2).

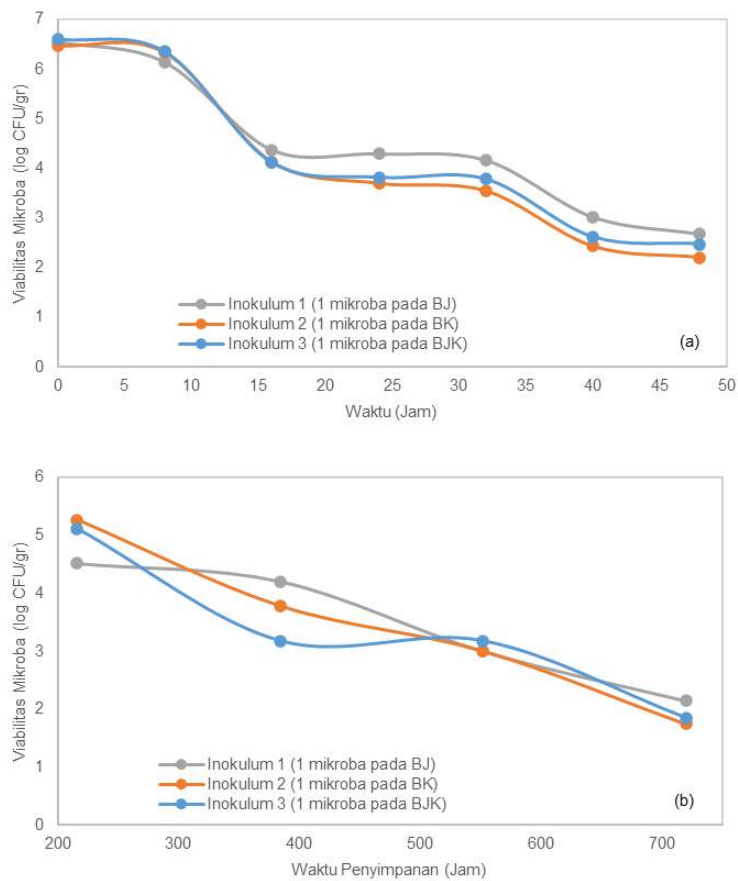
Tabel 2. Jenis dan tujuan pembuatan inoculum

Inokulum	Jenis mikroba	Tujuan
Inokulum 1, 2 dan 3	<i>T. reesei</i>	inokulum untuk melanjutkan proses hidrolisis
Inokulum 4, 5 dan 6	<i>S. cerevisiae</i> dan <i>Z. mobilis</i>	inokulum untuk proses fermentasi
Inokulum 7, 8 dan 9	<i>T. reesei</i> , <i>S. cerevisiae</i> , dan <i>Z. mobilis</i>	inokulum untuk proses hidrolisis dan fermentasi secara simultan

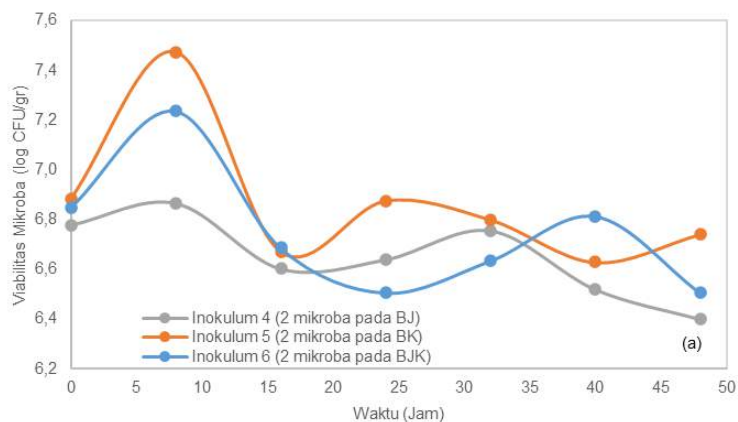
Selain untuk tujuan yang berbeda, inoculum yang telah dibuat menggunakan bahan pembawa yang berbeda pula. Bahan pembawa yang digunakan adalah beras, jagung, dan kedelai yang dikombinasikan menjadi 3 campuran bahan pembawa yaitu beras-jagung (BJ), beras-kedelai (BK) dan beras-jagung-kedelai (BJK). Bahan pembawa berupa beras, jagung, dan kedelai masing-masing dari varietas Ciherang, varietas Nasa 29, dan varietas Grobogan.

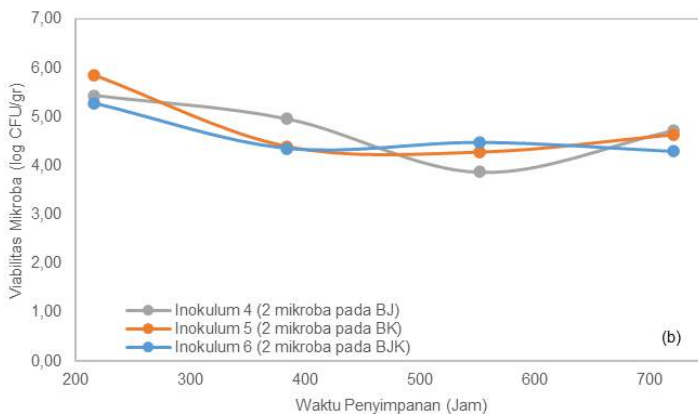
2.5.1. Pola Pertumbuhan Mikroorganisme dalam Inoculum

Pola pertumbuhan mikroba dalam inoculum dapat dilihat pada Gambar 4 s.d. Gambar 6. Kurva pertumbuhan mikroba dalam bentuk viabilitas mikroba (log CFU/gr) disajikan masing-masing dalam bentuk kurva pada saat pembuatan inoculum (a) dan pada masa penyimpanan (b). Kurva tersebut disajikan pula berdasarkan mikroba yang diinokulasikan pada berbagai bahan pembawa. Selain itu, disajikan data rata-rata viabilitas mikroba (log CFU/gr) setiap waktu pengambilan sampel (jam) pada Tabel 3.

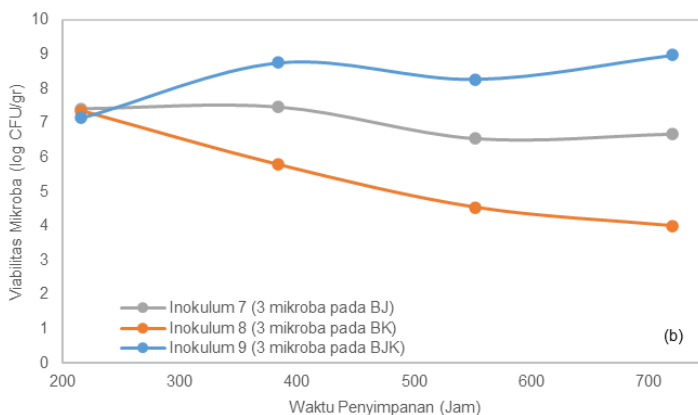
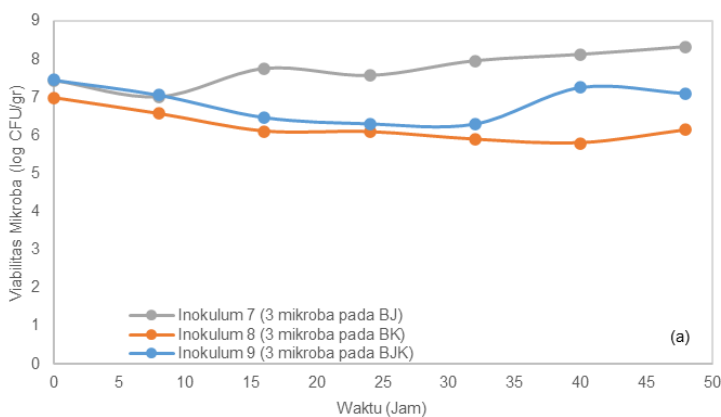


Gambar 4. Pola pertumbuhan *T. reesei* dalam pembuatan inokulum (a) dan saat penyimpanan (b) pada berbagai bahan pembawa





Gambar 5. Pola pertumbuhan *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* dalam pembuatan inokulum (a) dan saat penyimpanan (b) pada berbagai bahan pembawa



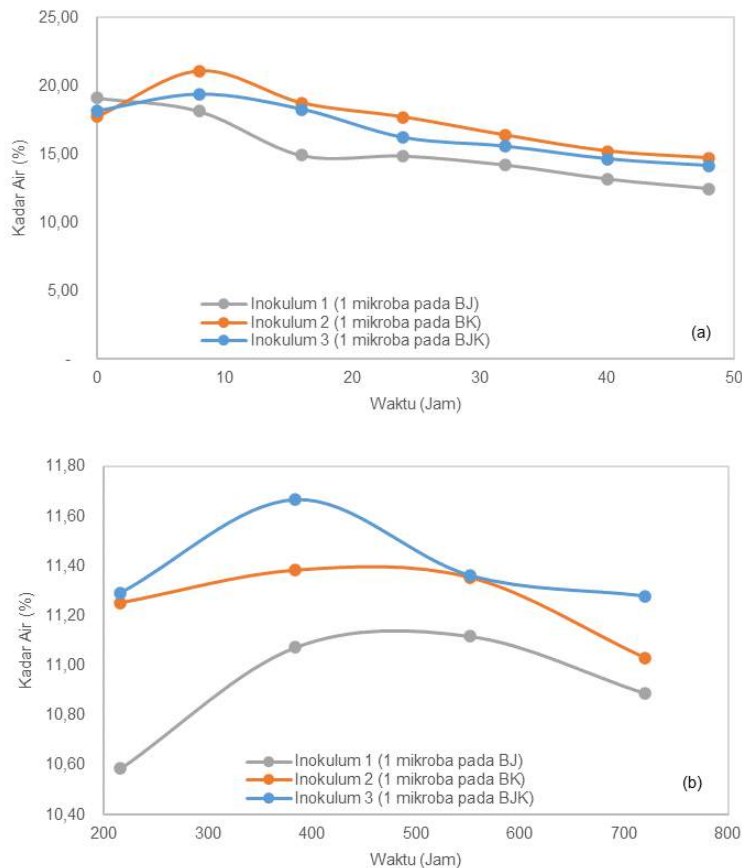
Gambar 6. Pola pertumbuhan *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* dalam pembuatan inokulum (a) dan saat penyimpanan (b) pada berbagai bahan pembawa

Tabel 3. Nilai rata-rata viabilitas mikroba (log CFU/gr) setiap waktu pengambilan sampel (jam)

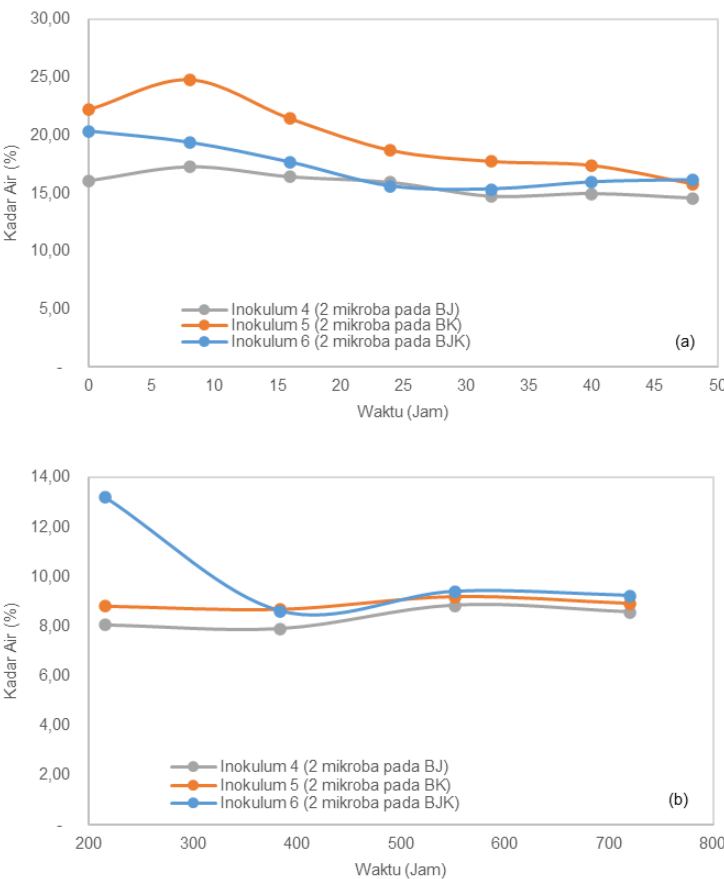
Jenis Inokulum (I)	Waktu Pengambilan Sampel (Jam)										
	0	8	16	24	32	40	48	216	384	552	720
Inokulum 1	6,54 ± 0,04 a D	6,13 ± 0,07 a D	4,37 ± 0,07 a C	4,29 ± 0,02 a C	4,16 ± 0,06 a C	3,02 ± 0,03 a B	2,67 ± 0,06 a AB	4,37 ± 0,52 a C	4,02 ± 0,60 bc C	3,00 ± 0,00 a B	2,03 ± 0,47 a A
Inokulum 2	6,47 ± 0,01 a G	6,33 ± 0,01 ab G	4,13 ± 0,07 a E	3,69 ± 0,12 a DE	3,54 ± 0,09 a DE	2,43 ± 0,05 a BC	2,20 ± 0,08 a AB	4,86 ± 0,97 abc F	3,52 ± 0,74 ab DE	3,00 ± 0,00 a CD	1,69 ± 0,30 a A
Inokulum 3	6,60 ± 0,03 a F	6,35 ± 0,04 ab F	4,11 ± 0,10 a DE	3,78 ± 0,25 a CD	3,77 ± 0,10 a CD	2,61 ± 0,06 a B	2,47 ± 0,01 a AB	4,70 ± 0,99 ab E	3,15 ± 0,21 a BC	3,15 ± 0,21 a BC	1,83 ± 0,18 a A
Inokulum 4	6,77 ± 0,12 ab D	6,86 ± 0,10 abc D	6,52 ± 0,38 b D	6,60 ± 0,25 bc D	6,75 ± 0,13 c D	6,52 ± 0,00 c D	6,40 ± 0,05 bc D	5,39 ± 0,27 bc C	4,80 ± 0,55 d BC	3,87 ± 0,08 b A	4,45 ± 0,75 b AB
Inokulum 5	6,87 ± 0,14 ab C	7,31 ± 0,56 c C	6,66 ± 0,13 b C	6,86 ± 0,16 c C	6,79 ± 0,10 c C	6,61 ± 0,17 c C	6,74 ± 0,08 bc C	5,53 ± 0,84 c B	4,36 ± 0,22 cd A	4,27 ± 0,04 b A	4,62 ± 0,05 b A
Inokulum 6	6,84 ± 0,11 ab C	6,94 ± 0,80 bc C	6,68 ± 0,12 b C	6,50 ± 0,02 bc C	6,63 ± 0,12 c C	6,80 ± 0,16 c C	6,51 ± 0,00 bc C	5,21 ± 0,33 bc B	4,34 ± 0,12 cd A	4,46 ± 0,15 b A	4,21 ± 0,39 b A
Inokulum 7	7,15 ± 0,80 ab BCD	6,83 ± 0,59 abc ABC	7,75 ± 0,07 c DEF	7,56 ± 0,08 d CDEF	7,95 ± 0,08 d EF	8,09 ± 0,22 d EF	8,32 ± 0,09 d F	7,42 ± 0,05 d BCDE	7,37 ± 0,42 f BCDE	6,39 ± 0,55 c A	6,68 ± 0,04 c AB
Inokulum 8	6,87 ± 0,48 ab E	6,57 ± 0,03 abc CDE	6,05 ± 0,33 b BCD	6,09 ± 0,04 b BCD	5,89 ± 0,02 b BC	5,75 ± 0,29 b B	6,14 ± 0,03 b BCDE	6,78 ± 1,21 d DE	5,75 ± 0,21 e B	4,51 ± 0,21 b A	4,00 ± 0,03 b A
Inokulum 9	7,45 ± 0,10 b CD	6,92 ± 0,52 bc ABC	6,45 ± 0,18 b AB	6,28 ± 0,20 bc A	6,30 ± 0,02 bc A	7,25 ± 0,09 c C	7,10 ± 0,02 c BC	7,13 ± 0,07 d BC	8,66 ± 0,41 g EF	8,06 ± 0,65 d DE	8,94 ± 0,23 d F

Keterangan:
Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut Uji Lanjut Duncan pada taraf nyata 0,05.
Huruf kecil dibaca arah vertikal, membandingkan antara 2 Jenis inokulum (I) pada Waktu Pengambilan Sampel (T) Jam yang sama.
Huruf kapital dibaca arah horizontal, membandingkan antara 2 Waktu Pengambilan Sampel (T) Jam pada jenis inokulum (I) yang sama.

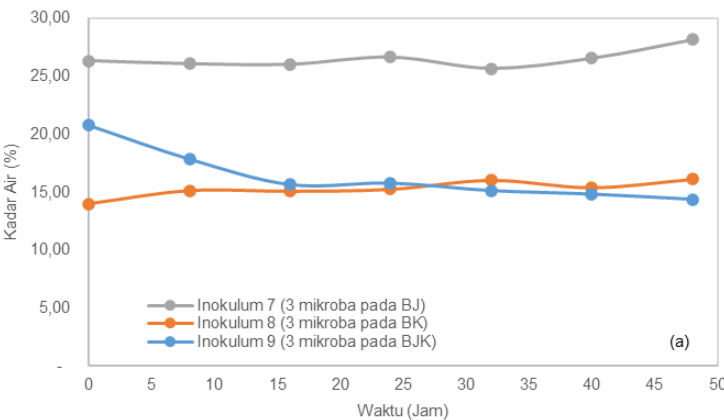
Selain itu, hasil pengukuran kadar air inokulum secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 7 s.d. Gambar 9. Kadar air dinyatakan dalam satuan (%) disajikan masing-masing dalam bentuk kurva pada saat pembuatan inokulum (a) dan pada masa penyimpanan (b). Secara umum, pada saat pembuatan berkisar antara 25% dan menurun terus hingga < 15% selama 48 jam masa inkubasi. Setelah masa inkubasi selesai, diikuti dengan proses pengeringan sebelum penyimpanan. Selama 1 bulan masa penyimpanan (720 jam), kadar air inokulum berada pada kisaran 10-11 %, kondisi yang sesuai untuk penyimpanan.

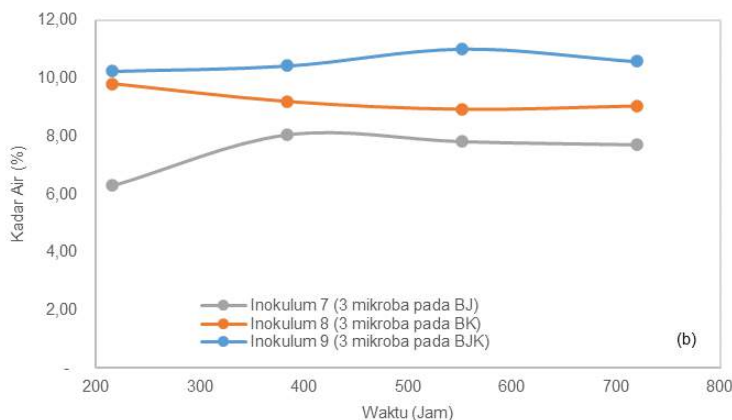


Gambar 7. Perubahan kadar air inokulum dengan 1 mikroba pada berbagai bahan pembawa dalam pembuatan inokulum (a) dan saat penyimpanan (b)



Gambar 8. Perubahan kadar air inokulum dengan 2 mikroba pada berbagai bahan pembawa dalam pembuatan inokulum (a) dan saat penyimpanan (b)





Gambar 9. Perubahan kadar air inokulum dengan 3 mikroba pada berbagai bahan pembawa dalam pembuatan inokulum (a) dan saat penyimpanan (b)

Pola pertumbuhan mikroba (dapat dilihat pada Gambar 4 s.d Gambar 6) erat kaitannya dengan kadar air dalam inokulum (Gambar 7 s.d Gambar 9). Pola pertumbuhan mikroba dapat dilihat berdasarkan hubungan waktu dengan viabilitas mikroba yang dihasilkan. Waktu pembuatan dan penyimpanan inokulum secara umum mempengaruhi viabilitas mikroba. Pada penelitian ini, inokulum diinkubasi selama 48 jam dengan pengujian viabilitas mikroba setiap 8 jam. Selain itu, dilakukan penyimpanan selama 720 jam dan dilakukan pengujian setiap sepekan atau 168 jam. Hasil menunjukkan adanya perbedaan viabilitas mikroba yang dihasilkan selama proses pembuatan maupun penyimpanan. Pada proses pembuatan atau penyimpanan inokulum, viabilitas mikroba dapat mengalami penurunan, stabil, serta peningkatan didasarkan pada jenis mikroba serta jenis campuran bahan pembawa yang digunakan.

Pada proses fermentasi gula sederhana menjadi etanol, beberapa mikroba yang sering digunakan termasuk *S. cerevisiae*, *Candida molischiana*, *Z. mobilis*, dan *Kluyveromyces marxianus*. Diantara mikroba ini, *S. cerevisiae*, *C. molischiana*, dan *K. marxianus* tergolong ragi yang umumnya digunakan dalam produksi etanol. Sementara, *Z. mobilis* bukan merupakan ragi melainkan bakteri Gram-negatif. Meskipun bukan ragi, *Z. mobilis* memiliki kemampuan fermentasi yang tinggi serta efisiensi yang baik dalam menghasilkan etanol, dan jalur metabolismenya lebih sederhana dibandingkan ragi, sehingga dapat mengubah glukosa menjadi etanol dengan cepat dan menghasilkan output yang tinggi (Liu et al., 2012).

K. marxianus lebih tahan terhadap suhu tinggi dibandingkan *S. cerevisiae*, yang membuatnya cocok untuk fermentasi di lingkungan dengan kondisi lebih ekstrem, seperti pada produksi etanol dari bahan baku yang kaya pati dan serat selulosa. Sementara itu, *C. molischiana* mampu memproduksi etanol dalam kondisi fermentasi tertentu, dan dapat digunakan bersama mikroba lain untuk meningkatkan hasil fermentasi. Penelitian Zuroff et al. (2013) menunjukkan bahwa kombinasi *S.*

cerevisiae dan *C. molischiana* dapat membentuk simbiosis stabil selama hampir dua bulan, di mana *S. cerevisiae* berperan mengonsumsi produk antara dari hidrolisis selulosa yang dilakukan oleh *C. molischiana* dan mengubahnya menjadi etanol dalam kondisi semi-aerobik. Ini menunjukkan adanya potensi sinergi antara kedua ragi tersebut dalam fermentasi selulosa menjadi etanol.

Kombinasi dari beberapa mikroba memungkinkan pemanfaatan bahan baku selulosa secara optimal untuk diubah menjadi produk. Jenis mikroba yang digunakan pada penelitian ini yaitu satu jenis mikroba *T. reesei*, kombinasi dua jenis mikroba yaitu *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis*, serta kombinasi tiga jenis mikroba *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis*.

Viabilitas mikroba pada penggunaan satu jenis mikroba *T. reesei* secara umum mengalami penurunan seiring dengan lama waktu pembuatan dan penyimpanan inokulum (Gambar 3). Selama pembuatan inokulum, viabilitas mikroba menurun secara bertahap hingga mencapai tingkat yang rendah, yaitu 10^2 CFU/gr pada jam ke-48 (Gambar 3a). Penurunan ini dapat disebabkan oleh tekanan lingkungan, seperti pengurangan kandungan air selama proses pengeringan atau pengaruh panas yang merusak struktur sel mikroba. Hal ini sejalan dengan penurunan kadar air (Gambar 6a) yang menunjukkan bahwa pada proses awal pembuatan inokulum memiliki kadar air rata-rata berkisar di atas 17% namun mengalami penurunan hingga di bawah 16% pada jam ke-48. Menurut (Chaves et al., 2020) pengurangan kelembaban selama proses pengeringan secara signifikan berdampak pada integritas sel mikroba, yang menyebabkan penurunan viabilitas.

Pada tahap penyimpanan, viabilitas mikroba juga terus mengalami penurunan, dengan jumlah mikroba mencapai 10^2 CFU/gr pada jam ke-720 (Gambar 3b). Penurunan viabilitas mikroba kemungkinan besar diakibatkan oleh efek stres oksidatif selama penyimpanan jangka panjang (Oswin et al., 2023). Sebagai mikroba tunggal, *T. reesei* juga adanya kemungkinan menghadapi keterbatasan dalam memanfaatkan sumber daya yang tersedia secara efisien, sehingga membuatnya lebih rentan terhadap kondisi lingkungan yang tidak mendukung.

Viabilitas mikroba pada penggunaan dua jenis mikroba *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* menunjukkan pola yang fluktuatif selama proses pembuatan inokulum, tetapi cenderung stabil selama masa penyimpanan (Gambar 4). Pada tahap pembuatan inokulum, viabilitas mikroba meningkat secara signifikan di awal, mencapai nilai 10^7 CFU/gr. Peningkatan ini mencerminkan fase eksponensial, di mana kedua jenis mikroba tumbuh aktif memanfaatkan nutrisi yang tersedia. Namun, setelah fase awal, viabilitas mulai menurun akibat habisnya substrat utama dan akumulasi produk metabolit yang menghambat pertumbuhan.

Selama penyimpanan, viabilitas mikroba menunjukkan penurunan secara bertahap hingga mencapai nilai 10^4 CFU/gr. Penurunan ini terkait dengan degradasi nutrisi dalam bahan pembawa serta perubahan lingkungan mikro, seperti penurunan kadar air. Kadar air yang diperoleh selama penyimpanan juga mengalami penurunan yaitu pada saat penyimpanan jam ke-216 berkisar 8-13%, namun setelah disimpan selama 720 jam diperoleh penurunan kadar air hingga berkisar 8-10% (Gambar 7b).

Kadar air yang memadai dapat menjaga kelembaban lingkungan mikro, sehingga mikroba tetap dalam kondisi fisiologis yang memungkinkan mereka bertahan meskipun tidak aktif bereproduksi. Stabilitas kadar air juga mencegah kondisi terlalu kering yang dapat menyebabkan kematian mikroba, atau kondisi terlalu lembab yang memicu pertumbuhan kontaminan. Oleh karena itu, kondisi penyimpanan yang mendukung kestabilan kadar air bahan pembawa menjadi salah satu faktor kunci dalam menjaga keberlanjutan populasi mikroba *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* selama proses penyimpanan inokulum. Hal ini disampaikan oleh D. Nkosi et al. (2021) bahwa stabilitas kadar air inokulum sangat penting karena mencegah kondisi kering yang berlebihan yang dapat membunuh mikroba dan kondisi terlalu lembab yang mendorong pertumbuhan kontaminan.

Viabilitas mikroba pada penggunaan kombinasi *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* menunjukkan nilai yang cenderung stabil baik selama proses pembuatan inokulum selama 48 jam maupun masa penyimpanan hingga 720 jam (Gambar 5). Selama pembuatan inokulum, stabilitas ini mencerminkan sinergi yang baik antara ketiga jenis mikroba dalam memanfaatkan nutrisi bahan pembawa tanpa adanya kompetisi yang signifikan. Selain itu, kelebihan dari kombinasi tiga jenis mikroba ini yaitu memiliki fungsi masing-masing untuk mengonversi substrat menjadi produk etanol. *T. reesei* berfungsi memecah selulosa menjadi gula sederhana, yang kemudian digunakan oleh *S. cerevisiae* dan *Z. mobilis* untuk proses fermentasi, sehingga setiap mikroba dapat menjalankan perannya secara optimal. Kadar air pada inokulum juga cenderung stabil selama proses pembuatan yaitu berkisar 14-28% dari 0 hingga 48 jam proses inkubasi (Gambar 8a).

Pada masa penyimpanan, viabilitas mikroba tetap stabil dengan hanya sedikit penurunan yang menunjukkan kemampuan adaptasi mikroba terhadap kondisi lingkungan penyimpanan. Stabilitas ini juga dapat dikaitkan dengan kadar air bahan pembawa yang terjaga selama penyimpanan (Gambar 8b) yaitu kadar air yang berkisar 8-11% selama penyimpanan hingga jam ke-720, menciptakan lingkungan yang cukup lembab untuk mendukung kelangsungan hidup mikroba tanpa memicu pertumbuhan kontaminan. Faktor ini penting dalam mempertahankan mikroba dalam kondisi dorman namun tetap viabel, memungkinkan mereka tetap aktif ketika kembali digunakan. Kombinasi ketiga mikroba ini tidak hanya efisien dalam proses fermentasi tetapi juga memiliki daya tahan yang baik selama penyimpanan inokulum.

Berdasarkan hal tersebut, penggunaan tiga jenis mikroba, yaitu dengan *T. reesei*, *S. cerevisiae*, dan *Z. mobilis* diperoleh viabilitas yang lebih stabil dibandingkan dengan penggunaan satu atau dua jenis mikroba pada saat pembuatan inokulum dan penyimpanan. Hal ini dikarenakan mikroba campuran kurang rentan terhadap fluktuasi kondisi lingkungan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh García-García et al. (2019), keanekaragaman intra-spesies atau mikroba campuran memungkinkan mereka untuk lebih tahan terhadap fluktuasi lingkungan dibandingkan dengan strain mikroba tunggal atau ganda selama pembuatan dan penyimpanan inokulum.

2.5.2. Pengaruh Campuran Media terhadap Pola Pertumbuhan Mikroorganisme dalam Inokulum

Media atau bahan pembawa yang baik dalam pembuatan inokulum adalah tidak beracun bagi inokulan, kapasitas kelembaban relatif baik, pH netral, murah, mudah diolah dan tersedia (Abd El-Fattah et al., 2013). Untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme yang terlibat dalam produksi bioetanol, bahan pembawa harus mengandung air, sumber energi, karbon, nitrogen, mineral, vitamin, dan oksigen jika fermentasi bersifat aerobik. Bahan pembawa juga harus memudahkan penanganan dan penyimpanan jangka panjang (Mukhtar et al. (2017).

Pemilihan bahan pembawa yang paling cocok untuk proses produksi bioetanol melibatkan beberapa persyaratan dasar untuk mendukung kehidupan mikroba yang terlibat dalam proses hidup mikroba. Mikroba membutuhkan air, sumber energi, karbon, nitrogen, unsur mineral, vitamin, serta oksigen jika fermentasi terjadi secara aerobik (Stanbury et al., 2017b). Penggabungan mikroorganisme dalam bahan pembawa memungkinkan penanganan yang mudah, penyimpanan jangka panjang, dan efektivitas tinggi, seperti yang diamati dalam produksi pupuk hayati (Mukhtar et al., 2017), serta dalam proses produksi bioetanol (Safitri et al., 2017).

Bahan pembawa harus berfungsi sebagai media pertumbuhan mikroba. Setelah dikeringkan, kepadatan sel mikroba mengalami penurunan, hal ini disebabkan oleh pemanasan pada saat proses pengeringan, kandungan air pada bahan pembawa formula berkurang dan mikroorganisme yang tidak terikat pada matriks formula mengalami kematian (Safitri et al., 2017). Menurut Alonso (2016), bahan pembawa juga harus berfungsi sebagai media untuk pertumbuhan mikroba. Setelah dibudidayakan selama 6 hari, bubuk inokulum kemudian dikeringkan menggunakan vacuum drying. Kepadatan sel yang tinggi dalam bubuk inokulum menunjukkan bahwa mikroorganisme dapat beradaptasi dengan baik. Setelah pengeringan, kepadatan sel mikroba menurun, hal ini disebabkan oleh pemanasan selama proses pengeringan, kadar air dalam formula mengurangi bahan pembawa dan mikroorganisme yang tidak terikat dengan kematian formula matriks (Safitri et al., 2017).

Formulasi bahan pembawa mempengaruhi kemampuan mikroorganisme untuk hidup dan berkembang serta seberapa baik mikroba berfungsi ketika diaplikasikan. Penurunan populasi mikroba fungsional dapat terjadi karena bahan pembawa yang tidak sesuai (Aksani et al., 2021). Oleh karena itu, bahan pembawa harus memiliki nutrisi yang diperlukan atau memiliki komposisi yang cocok untuk pertumbuhan mikroorganisme. Bahan pembawa yang dapat digunakan dalam pembuatan inokulum untuk produksi bioetanol adalah beras, jagung, dan kedelai.

Namun perlu diketahui formulasi campuran terbaik sehingga pada penelitian ini diberi perlakuan campuran beras dan jagung, campuran beras dan kedelai, serta campuran beras, jagung, dan kedelai. Kandungan pati dari setiap bahan akan melindungi mikroorganisme dari suhu selama pengeringan vakum yang tinggi. Pati tersusun atas 70-80% amilopektin yang memiliki kemampuan tinggi dalam mengikat

produk air, sehingga sel mikroba yang terperangkap dan terlindungi selama proses pemanasan akan lebih tinggi (Alonso, 2016).

Hasil pada parameter sebelumnya telah menunjukkan bahwa penggunaan tiga jenis mikroba dalam pembuatan inokulum dinilai lebih efektif dibandingkan penggunaan satu atau dua jenis mikroba dengan melihat pola pertumbuhan mikroba tersebut. Sehingga perbandingan antara campuran media yaitu campuran beras dan jagung, campuran beras dan kedelai, serta campuran beras, jagung, dan kedelai dapat selama proses pembuatan dan penyimpanan inokulum dapat dilihat pada Gambar 5 yang menggunakan tiga jenis mikroba.

Pada saat penyimpanan selama 48 jam, penggunaan tiap perlakuan campuran media atau bahan pembawa memberikan nilai yang relatif lebih stabil (Gambar 5a) dibandingkan dengan pada saat penyimpanan (Gambar 5b). Pada saat penyimpanan, pemberian bahan pembawa dengan campuran beras, kedelai, dan jagung memberikan peningkatan nilai viabilitas mikroba yang relatif jauh lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan bahan pembawa campuran beras dan jagung, serta campuran beras dan kedelai yang relatif mengalami penurunan nilai viabilitas mikroba.

Masing-masing nilai viabilitas mikroba dengan bahan pembawa campuran beras dan jagung, campuran beras dan kedelai, serta campuran beras, jagung, dan kedelai pada awal penyimpanan (jam ke-216) secara berturut-turut yaitu $2,61 \times 10^7$ CFU/gram, $2,22 \times 10^7$ CFU/gram, dan $1,37 \times 10^7$ CFU/gram. Namun setelah proses penyimpanan selama 720 jam, inokulum dengan bahan pembawa campuran beras dan jagung serta campuran beras dan kedelai mengalami penurunan. Inokulum dengan bahan pembawa campuran beras dan jagung menjadi $4,75 \times 10^6$ CFU/gram, sedangkan inokulum dengan bahan pembawa beras dan kedelai menurun hingga $1,00 \times 10^4$ CFU/gram.

Berbeda dengan kedua perlakuan di atas, perlakuan inokulum dengan pemberian bahan pembawa campuran beras, jagung, dan kedelai mengalami peningkatan nilai viabilitas mikroba mencapai $9,42 \times 10^8$ CFU/gram. Peningkatan ini terjadi karena tersedianya nutrisi esensial seperti karbon, hidrogen, nitrogen, dan mineral lain yang mendukung pertumbuhan mikroba (Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat, 2018; Stanbury et al., 2017b, 2017c). Berdasarkan hal tersebut, penggunaan campuran beras, jagung, dan kedelai memberikan nilai viabilitas mikroba terbaik dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan adanya kombinasi berbagai jenis tepung sebagai bahan pembawa lebih efektif melindungi mikroorganisme dibandingkan dengan satu jenis tepung dikarenakan nutrisi dalam tepung kombinasi dapat mendukung pertumbuhan sel mikroba lebih banyak.

Tabel 4 memperlihatkan ketersediaan N, P, S dan C-organik pada masing-masing bahan pembawa. Pada kedelai yang digunakan, ketersediaan N, P dan S lebih tinggi, oleh karenanya pertumbuhan mikroba pada bahan pembawa mengandung kedelai lebih baik dari lainnya.

Tabel 4. Kandungan N, P, S dan C-organik pada bahan pembawa

Parameter	Bahan pembawa			Metode pengujian
	Jagung	Kedelai	Beras	
N, %	1,93	3,54	0,40	IK PO 4/L-BPTP/10 (Kjeldahl)
P, %	0,05	0,09	0,02	IK PO 5/L-BPTP/10 (Spektrofotometri)
S, %	0,02	0,08	0,001	IK PO 6/L-BPTP/10 (AAS)
C-organik, %	53,75	53,40	30,85	IK PO 3/L-BPTP/10 (Churmies)

Sumber: Hasil analisa pada Laboratorium Tanah, Tanaman, Pupuk, Air, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, BPTP Sulawesi Selatan

Bahan pembawa harus berfungsi sebagai media pertumbuhan mikroba karena komposisi unsur-unsur bakteri, ragi dan jamur berdasarkan % BK terdiri dari karbon, hidrogen, nitrogen, fosfor, sulfur, kalium, natrium, kalsium, magnesium, klorida, dan besi, seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Komposisi unsur bakteri, ragi, dan jamur (berdasarkan % berat kering)

Elemen	Bakteri	Ragi	Jamur
Karbon	50–53	45–50	40–63
Hidrogen	7	7	
Nitrogen	12–15	7,5–11	7–10
Fosfor	2,0–3,0	0,8–2,6	0,4–4,5
Sulfur	0,2–1,0	0,01–0,24	0,1–0,5
Kalium	1,0–4,5	1,0–4,0	0,2–2,5
Natrium	0,5–1,0	0,01–0,1	0,02–0,5
Kalsium	0,01–1,1	0,1–0,3	0,1–1,4
Magnesium	0,1–0,5	0,1–0,5	0,1–0,5
Klorida	0,5	—	—
Besi	0,02–0,2	0,01–0,5	0,1–0,2

Sumber: Stanbury et al. (2017d)

Unsur-unsur yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan tersedia dalam beras, jagung, dan kedelai juga tertera pada Tabel Komposisi Pangan Indonesia (Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat, 2018). Karbon, nitrogen, dan hidrogen tersedia dalam bentuk karbohidrat dan protein. Pada beras, jagung, dan kedelai, karbon dan hidrogen ditemukan dalam bentuk karbohidrat, dengan jumlah masing-masing 77,1, 69,1, dan 24,9 mg per 100 gram bahan yang dapat dimakan (*edible materials*/EM). Nitrogen tersedia dalam bentuk protein, dengan beras, jagung, dan kedelai, masing-masing mengandung 8,4 mg, 9,8 mg, dan 40,4 mg protein per 100 gram EM. Unsur-unsur lain seperti kalsium, fosfor, kalium, natrium, besi, tembaga, dan seng juga tersedia pada ketiga bahan ini sehingga menjadikan penggunaan campuran tiga bahan pembawa yaitu beras, jagung, dan kedelai ini

lebih efektif dibandingkan perlakuan lain yang hanya menggunakan campuran dua jenis bahan pembawa, lihat Tabel 6.

Tabel 6. Komposisi zat gizi pada beras, jagung, dan kedelai

Komposisi Zat Gizi Makanan per 100 Gram Bahan Dapat Dimakan	Nama Bahan		
	Beras	Jagung	Kedelai
Air (g)	12,0	11,5	12,7
Energi (Kal)	357,0	366,0	381,0
Protein (g)	8,4	9,8	40,4
Lemak (g)	1,7	7,3	16,7
KH (g)	77,1	69,1	24,9
Serat (g)	0,2	2,2	3,2
Abu (g)	0,8	2,4	5,5
Kalsium (mg)	147,0	30,0	222,0
Fosfor (mg)	81,0	538,0	682,0
Besi (mg)	1,8	2,3	10,0
Natrium (mg)	27,0	5,0	210,0
Kalium (mg)	71,0	79,4	713,4
Tembaga (mg)	0,1	0,1	1,6
Seng (mg)	0,5	4,1	3,9
Retinol (mcg)	-	-	-
B-Kar (mcg)	-	636,0	237,0
Kar-Total (mcg)	-	641,0	31,0
Thiamin (mg)	0,2	0,1	0,5
Riboflavin (mg)	0,1	0,1	0,1
Niasin (mg)	2,6	1,8	1,2
Vit-C (mg)	-	3,0	-
BDD (%)	100,0	100,0	100,0

Sumber: Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat (2018)

2.7. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa inokulum terbaik adalah inokulum yang terdiri dari ketiga mikroba, dan berbahan dasar campuran beras, jagung dan kedelai, serta penambahan 5% b/b glukosa yang dapat digunakan oleh mikroba sumber kehidupannya. Selama masa pembuatannya dalam 48 jam masa inkubasi, viabilitas mikrobanya berkisar antara $1,26 \times 10^7$ hingga $2,85 \times 10^7$ CFU/gr. Selama penyimpanan viabilitas mikroba menunjukkan peningkatan hingga $9,42 \times 10^8$ CFU/gr.

2.8. Daftar Pustaka

- Abd El-Fattah, D. A., Eweda, W. E., Zayed, M. S., & Hassanein, M. K. (2013). Effect of carrier materials, sterilization method, and storage temperature on survival and biological activities of *Azotobacter chroococcum* inoculant. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2013.07.001>
- Abdullah, S. S. S., Shirai, Y., Ali, A. A. M., Mustapha, M., & Hassan, M. A. (2016). Case study: Preliminary assessment of integrated palm biomass biorefinery for bioethanol production utilizing non-food sugars from oil palm frond petiole. *Energy Conversion and Management*, 108, 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.11.016>
- Aksani, D., Surono, Ginting, R. C. B., & Purwani, J. (2021). The assay of carrier material and bacteria isolate formula as a biofertilizer on soybean in Inceptisols from West Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 648(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/648/1/012193>
- Alonso, S. (2016). Novel Preservation Techniques for Microbial Cultures. In K. S. Ojha & B. K. Tiwari (Eds.), *Novel Food Fermentation Technologies (Food Engineering Series)* (pp. 7–33). https://doi.org/10.1007/978-3-319-42457-6_2
- Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (2011). Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In *Biofuels* (1st ed., pp. 229–250). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3>
- BP Energy. (2021). Statistical Review of World Energy 2021. In Statistical Review of World Energy (Ed.), *BP Energy outlook 2021* (70th ed., Vol. 70). Whitehouse Associates, London.
- Broda, M., Yelle, D. J., & Serwańska, K. (2022). Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass—Challenges and Solutions. *Molecules*, 27(24). <https://doi.org/10.3390/molecules27248717>
- Ceaser, R., Montané, D., Constantí, M., & Medina, F. (2024). Current progress on lignocellulosic bioethanol including a technological and economical perspective. In *Environment, Development and Sustainability*. Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s10668-024-04792-2>
- Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Silva, M. B., & Silvério Da Silva, S. (2012). The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(3), 187–202. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.595385>
- Chaves, P. J. L., Cepeda, J. T. F. J. G. Á., & Orzáez, and M. J. H. (2020). Influence of Moisture, Temperature and Microbial Activity in Biomass Sustainable Storage. Special Focus on Olive Biomasses. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 25(3), 115–126. <https://doi.org/10.19080/ijesnr.2020.25.556165>

- Chiemerie Obiora. (2022). Optimal Cost of Production of Bioethanol: A Review. *Social Science Research Network*, 1–13. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4171036>
- D. Nkosi, B., N. Ncobela, C., S. Thomas, R., M.M. Malebana, I., Muller, F., Álvarez, S., & Meeske, R. (2021). Microbial Inoculation to High Moisture Plant By-Product Silage: A Review. In László Babinszky, Juliana Oliveira, & Edson Mauro Santos (Eds.), *Advanced Studies in the 21st Century Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98912>
- Dempfle, D., Kröcher, O., & Studer, M. H. P. (2021). Techno-economic assessment of bioethanol production from lignocellulose by consortium-based consolidated bioprocessing at industrial scale. *New Biotechnology*, 65, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.07.005>
- Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat. (2018). Tabel Komposisi Pangan Indonesia 2017. In *Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat Direktorat Gizi Masyarakat*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. <https://doi.org/10.29103/averrous.v2i2.412>
- Fardiaz, S. (1993). *Analisis Mikrobiologi Pangan* (Pertama). PT RajaGrafindo Persada.
- Febrianti, F., Syamsu, K., & Rahayuningsih, M. (2017). BIOETHANOL PRODUCTION FROM TOFU WASTE BY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION (SSF) USING MICROBIAL CONSORTIUM. *International Journal of Technology*, 5, 898–908.
- García-García, N., Tamames, J., Linz, A. M., Pedrós-Alió, C., & Puente-Sánchez, F. (2019). Microdiversity ensures the maintenance of functional microbial communities under changing environmental conditions. *The ISME Journal*, 13(12), 2969–2983. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0487-8>
- Heng, J. L. S., & Hamzah, H. (2022). Effects of different parameters on cellulase production by *Trichoderma harzianum* TF2 using solid-state fermentation (SSF). *Indonesian Journal of Biotechnology*, 27(2), 80–86. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.66549>
- Khajeeram, S., & Unrean, P. (2017). Techno-economic assessment of high-solid simultaneous saccharification and fermentation and economic impacts of yeast consortium and on-site enzyme production technologies 3. *Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.090>
- Kurniasari, T. M., & Putra, S. R. (2011). KARAKTERISASI BERDASARKAN UJI ASPEK MORFOLOGI DAN BIOKIMIA SERTA PENGARUH AERASI TERHADAP PERTUMBUHAN *Zymomonas mobilis* GALUR LIAR (ZM JPG). *MJoCE*, 1(2), 129–141.

- Kustyawati, M. E., Sari, M., & Haryati, T. (2013). Efek fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* terhadap karakteristik biokimia tapioka. *Jurnal Agritech*, 33(3), 281–287.
- Liu, Y., Yang, C., Chen, W., & Wei, Y. (2012). Producing bioethanol from cellulosic hydrolyzate via co-immobilized cultivation strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.03.005>
- Mukhtar, S., Shahid, I., Mehnaz, S., & Malik, K. A. (2017). Assessment of two carrier materials for phosphate solubilizing biofertilizers and their effect on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Microbiological Research*, 205(May), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.011>
- Oswin, H. P., Haddrell, A. E., Hughes, C., Otero-Fernandez, M., Thomas, R. J., & Reid, J. P. (2023). Oxidative Stress Contributes to Bacterial Airborne Loss of Viability. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03347-22>
- Rogers, P. L., Jeon, Y. J., Lee, K. J., & Lawford, H. G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108(May), 263–288. https://doi.org/10.1007/10_2007_060
- Safitri, R., Fauzana, N. A., & Fauziah, P. N. (2011). Pembuatan Starter Inokulum Jamur *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* dan *Trichoderma viridae* untuk Bibit Fermentasi Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana* Colla). In A. Ismail, A. Karuniawan, D. Ruswandi, F. Damayanti, H. M. R., N. Wicaksana, S. Amien, & W. Chandria (Eds.), *Prosiding Seminar Nasional Pemanfaatan Sumber Daya Genetik (SDG) Lokal Mendukung Industri Perbenihan Nasional dalam Rangka Purna Bakti Staf Pengajar Pemuliaan Tanaman UNPAD dan Kongres PERIPI Komda Jabar* (pp. 249–261). Program Studi Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran.
- Safitri, R., Miranti, M., Astuti, I. D., Kartiawati, L., & Nurhayati, J. (2017). Efficiency of Powder Inoculum and Microorganism Encapsulation on Hydrolyzate Sugar Fermentation of Newspaper Cellulose for Bioethanol Production. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, XXI, 216–222.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017a). Culture preservation and inoculum development. In *Principles of Fermentation Technology* (3rd ed., pp. 335–399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00006-5>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017b). Media for industrial fermentations. In *Principles of Fermentation Technology* (3rd ed., pp. 213–272). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00004-1>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017c). Microbial growth kinetics. In *Principles of Fermentation Technology* (3rd ed., pp. 21–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00002-8>

- Su, T., Zhao, D., Khodadadi, M., & Len, C. (2020). Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 24, pp. 56–60). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.005>
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
- Vats, S., Maurya, D. P., Shaimoon, M., Agarwal, A., & Negi, S. (2013). Development of a microbial consortium for production of blend of enzymes for hydrolysis of agricultural wastes into sugars. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72(9–10), 585–590.
- Wilkins, M. R. (2009). Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, 33(3), 538–541. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.08.010>
- Zuroff, T. R., Xiques, S. B., & Curtis, W. R. (2013). Consortia-mediated bioprocessing of cellulose to ethanol with a symbiotic *Clostridium phytofermentans*/yeast co-culture. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-59>