

DETEKSI KADAR ETANOL PADA MAKANAN TRADISIONAL LEMANG TAPAI MENGGUNAKAN MIKROBIAL BIOSENSOR

Nadratul Hanifah, Rahmondia Nanda Setiadi, Yanuar, Vira Annisa Rosandi, Lazuardi Umar*

Jurusan Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Indonesia

* email: lazuardi@unri.ac.id

ABSTRAK

Konsumsi etanol memiliki konsekuensi bagi kesehatan, dimana penentuan etanol sangat relevan dengan uji toksikologi klinis yang mempengaruhi sistem saraf, sistem peredaran darah, sistem pencernaan sehingga perlu dideteksi. Biosensor amperometris merupakan alternatif untuk deteksi etanol dalam makanan yang diamati melalui nilai tegangan output, diperoleh dari oksigen terlarut yang tertinggal dari hasil metabolisme sel. Pada penelitian ini dilakukan deteksi etanol secara kuantitatif memanfaatkan biosensor berbasis sel ragi *Saccharomyces cerevisiae* untuk mengetahui kadar etanol yang terdapat pada makanan tradisional lemang tapai dengan nilai <5%. Larutan etanol standar dengan konsentrasi 1.2%, 2.43%, 3.64% dan 4.86% v/v sebagai kalibrasi sensor yang menunjukkan korelasi (r) yang baik yaitu 0.9937. Hasil pengukuran lemang tapai yang dideteksi oleh biosensor menunjukkan konsentrasi etanol 2.79%. Pengolahan data konsentrasi yang dihasilkan kemudian diuji menggunakan metode statistik Analysis of Variance (ANOVA) untuk mengetahui signifikansi perbedaan data yang dihasilkan untuk tiap konsentrasi etanol yang diuji. Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan kesadaran dan kewaspadaan masyarakat terhadap adanya etanol dalam makanan tradisional yang berbahaya ketika dikonsumsi secara berlebihan.

Kata Kunci: ANOVA; Biosensor amperometris; Etanol; Lemang tapai; *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

[Title: Ethanol Detection in Traditional Lemang Tapai Food Using Microbial Biosensors] Consumption of ethanol has consequences for health, and the determination of ethanol is relevant to clinical toxicology tests that affect the nervous system, circulatory system, and digestive system, so it needs to be detected. The amperometric biosensor is an alternative for the detection of ethanol in food, which is observed through the output potential value obtained from dissolved oxygen remaining from the results of cell metabolism. In this research, quantitative detection of ethanol was carried out using a biosensor based on the yeast cell *Saccharomyces cerevisiae* to determine the ethanol content found in traditional lemang tapai food with a value of <5%. Standard ethanol solution with concentrations of 1.2%, 2.43%, 3.64%, and 4.86% v/v as sensor calibration, which shows a good correlation (r) of 0.9937. The measurement results of Lemang Tapai detected by the biosensor showed an ethanol concentration of 2.79%. The processing of the resulting concentration data was then tested using the Analysis of Variance (ANOVA) statistical method to determine the significance of the differences in the resulting data for each tested ethanol concentration. The results of this study are expected to increase public awareness and vigilance about the presence of ethanol in traditional foods, which is dangerous when consumed in excess.

Keywords: Amperometric biosensor; ANOVA; ethanol; lemang tapai; *Saccharomyces cerevisiae*.

Pendahuluan

Etanol (C_2H_6O) merupakan senyawa yang banyak terdapat pada berbagai produk makanan dan minuman, termasuk makanan tradisional (Destanoglu & Ates, 2019). Keberadaan dan konsentrasinya dapat sangat memengaruhi atribut sensorik, komposisi kimia, dan kualitas keseluruhan dari bahan makanan ini (Febriani, 2020). Oleh karena itu, kuantifikasi etanol yang akurat dan andal dalam makanan tradisional sangat penting untuk memastikan keamanan pangan, kepatuhan terhadap

standar peraturan, dan menjaga kepuasan konsumen. Penentuan kadar etanol dalam makanan fermentasi tradisional sangat diperlukan untuk meningkatkan kesadaran dan kewaspadaan masyarakat akan adanya etanol dalam makanan tradisional yang berbahaya bila dikonsumsi secara berlebihan (Grand, 2018).

Metode konvensional untuk kuantifikasi etanol dalam makanan seringkali melibatkan prosedur yang rumit dan memakan waktu, membutuhkan peralatan laboratorium yang canggih

dan personel yang terlatih seperti, titrasi *winkler*, *versatile* lab fermentor, spektrofotometri (Gonchar *et al.*, 2017). Perkembangan teknologi biosensor telah memberikan alternatif yang menjanjikan untuk analisis etanol yang cepat dan efisien dengan berbagai macam metode seperti, biosensor berbasis sel *Gluconobacter* (Reshetilov *et al.*, 2012) dan biosensor berbasis PANI/AOX untuk deteksi etanol pada minuman kemasan (Kuswandi *et al.*, 2014). Selain itu, Cinti (2017) juga mendeteksi etanol pada minuman bir menggunakan metode biosensor siklik voltametri dengan memanfaatkan enzim, dimana penggunaan enzim dalam penelitian memiliki kekurangan seperti *treatment* yang rumit serta biaya yang cukup mahal.

Penggunaan ragi dalam penelitian telah banyak dilakukan karena genetiknya mudah dimanipulasi, penumbuhan kultur yang cepat serta tahan terhadap berbagai kondisi lingkungan (Żymańczyk-Duda *et al.*, 2016). Ragi adalah jenis mikroorganisme eukariotik yang sering digunakan dalam proses fermentasi, termasuk fermentasi alkohol yang mengubah gula menjadi etanol. Namun, ragi juga dapat menjadi sensitif terhadap etanol dalam konsentrasi tertentu. Ketika ragi berada dalam lingkungan yang mengandung etanol dengan konsentrasi yang tinggi, etanol dapat menembus dinding sel ragi dan merusak membran sel, mengganggu fungsi seluler dan struktur sel ragi.

Penelitian ini melakukan deteksi etanol dengan menggunakan metode biosensor amperometris berdasarkan sel ragi *Saccharomyces cerevisiae*, dimana telah mendapat perhatian karena spesifisitas dan kepekaannya yang tinggi terhadap etanol, membuatnya sangat cocok untuk aplikasi yang berhubungan dengan makanan (Martin-Yken, 2020). Biosensor amperometris, khususnya, menawarkan pendekatan yang kuat untuk deteksi etanol dengan mengukur arus listrik yang dihasilkan selama reaksi enzimatik antara etanol dan sel ragi. Untuk meningkatkan sensitivitas dan akurasi biosensor amperometris, integrasi komponen penguat trans-impedansi telah diimplementasikan. Penguat ini mengubah sinyal arus menjadi tegangan *output* proporsional, memungkinkan pengukuran konsentrasi etanol yang lebih akurat dan kuantitatif. Sel ragi mengalami asimilasi etanol selama proses respirasi, yang menyebabkan konsumsi oksigen (O_2) di sekitar membran sel. Akibatnya, terjadi perubahan sinyal *output*. Perubahan tegangan *output* ini berhubungan dengan perubahan konsentrasi oksigen yang tersisa diambil sebagai indikator untuk mengukur konsentrasi etanol dalam sampel (Rotariu *et al.*, 2004). *Analysis of variance* (ANOVA) kemudian digunakan untuk menilai signifikansi dari

data yang diperoleh, menjelaskan pengaruh konsentrasi etanol yang berbeda dari sampel makanan tradisional.

METODE

Kultivasi sel ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Strain ragi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Saccharomyces cerevisiae* FNCC-3049 dari Universitas Gadjah Mada yang terlihat pada **Gambar 1**, kemudian ditumbuhkan menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam bentuk kultur agar miring. Medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebagai medium penyedia nutrisi bagi perkembangbiakan sel ragi *S.cerevisiae* di dalam skala laboratorium, hal ini dikarenakan medium PDB kaya akan karbohidrat berkualitas tinggi yang dibutuhkan untuk perkembangan sel ragi (Rosandi *et al.*, 2021).



Gambar 1. Sel ragi *S.cerevisiae* yang terlihat melalui mikroskop (Britannica, 2023).

Proses perpindahan kultur murni sel ragi dilakukan dengan cara diinokulasikan secara aseptis ke dalam tabung reaksi yang mengandung 15 mL medium PDA dalam kondisi anaerobik mempergunakan loop inokulasi (jarum ose) sebanyak 1 ose pada suhu ruang 28°C dan pH 6. Campuran kultur murni sel ragi dalam media PDA kemudian diinkubasi dan ditutup dengan aluminium foil untuk meminimalisir kontaminasi.

Pertumbuhan sel ragi juga dihitung densitas sel menggunakan hemasitometer dan diobservasi menggunakan mikroskop. Densitas sel ragi sebanyak $26,8 \times 10^6$ sel/mL diimobilisasi ke dalam *chamber* elektroda sensor menggunakan mikropipet Eppendorf untuk diukur nilai tegangan *output* yang dihasilkan dari tingkat oksigen yang tertinggal dalam larutan setelah proses metabolisme sel ragi. Derajat keasaman (pH) ragi diketahui menggunakan kertas indikator pH Merck.

Preparasi sampel analit

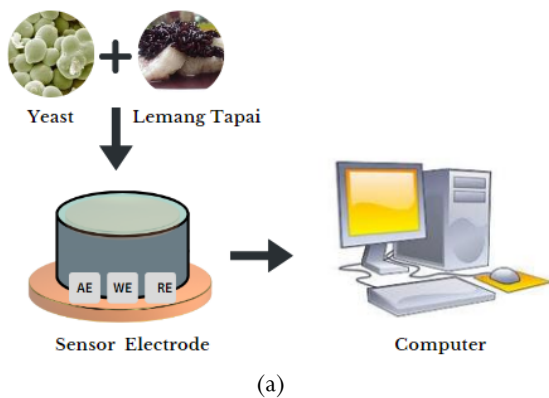
Sampel uji penelitian ini adalah lemang tapai (terlihat pada **Gambar 2**) yang didistilasi terlebih dahulu untuk mendapat larutan etanol yang dikandungnya, dimana distilasi dilakukan selama 8

jam dengan volume larutan sebanyak 300 mL pada suhu penguapan dipertahankan tidak lebih dari 80°C.

Hasil distilasi lemak tapai dimasukkan kedalam labu takar 20 mL dan ditambahkan dengan akuades hingga volume larutan mencapai batas 20 mL pada labu takar.



Gambar 2. Makanan tradisional lemak tapai.



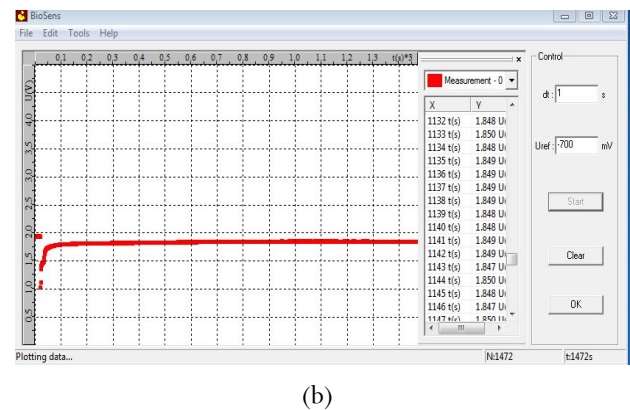
Gambar 3. (a) Set up pengukuran biosensor dan (b) Antarmuka software Biosensor

Biosensor amperometris

Biosensor amperometris dengan berdasarkan prinsip potensiostat yang terintegrasi sirkuit *trans-impedance amplifier* (TIA), dimana dalam sirkuit ini terdapat hambatan *feedback* yang dipasang dalam konfigurasi *inverting* sehingga mengubah arus masukan menjadi tegangan *output*, dimana arus masukan berbanding terbalik dengan tegangan *output*. Potensiostat bekerja dengan menggunakan tiga elektroda, yaitu elektroda kerja (*working electrode/WE*), elektroda referensi (*reference electrode/RE*) dan elektroda pendamping (*auxiliary electrode/AE*).

Elektroda sensor didesain dengan menggunakan elektroda platina (Pt) sebagai elektroda kerja dan elektroda Ag/AgCl sebagai elektroda referensi dan elektroda pendamping (Umar *et al.*, 2017). Elektroda sensor terhubung dengan modul elektronik biosensor untuk mendapatkan data hasil pengukuran dalam bentuk grafik tegangan *output* terhadap waktu yang ditampilkan oleh perangkat lunak komputer.

Larutan etanol yang digunakan yaitu etanol 96% Merck 100971 Emprove. Kalibrasi sensor dilakukan untuk mendeteksi etanol, digunakan larutan etanol standar dengan variasi konsentrasi 0,2 M; 0,4 M; 0,6 M dan 0,8 M memiliki nilai yang setara dengan 1,2%; 2,43%; 3,64% dan 4,86% v/v, didapat menggunakan metode pengenceran larutan etanol murni (96%). Pengukuran nilai tegangan *output* biosensor dengan konsentrasi etanol terkecil dan terbesar dari kalibrasi sensor juga digunakan sebagai perbandingan terhadap hasil pengukuran dari sampel uji lemak tapai.



Set up eksperimen

Pengukuran nilai tegangan *output* stasioner menggunakan biosensor dengan skema pengukuran seperti pada **Gambar 3(a)**. Sel ragi dan sampel uji (larutan etanol standar / lemak tapai) diimobilisasi dengan volume 150 μ L ke dalam *chamber* elektroda sensor menggunakan mikropipet Eppendorf untuk setiap pengukuran biosensor. Pengulangan pengukuran dilakukan sebanyak 5 kali ($n=5$) dengan perlakuan yang sama. Data hasil pengukuran ditampilkan *real-time* seperti pada **Gambar 3(b)**, yang menunjukkan hasil tegangan *output* terhadap waktu.

Analysis of Variance (ANOVA)

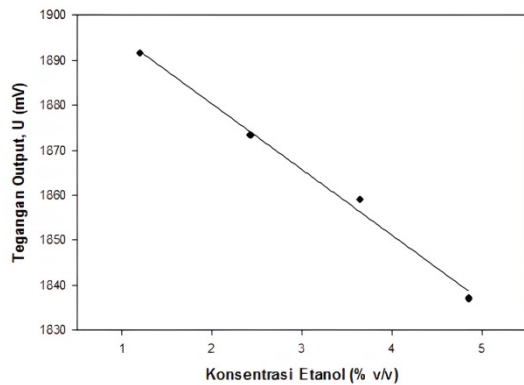
Analysis of Variance (ANOVA) adalah teknik statistik yang biasa digunakan untuk menguji kesetaraan antara beberapa rata-rata dengan membandingkan varian antar kelompok relatif terhadap varian dalam kelompok (*random error*). ANOVA sangat efisien untuk analisis data eksperimen yang memiliki beberapa variasi yang

disesuaikan dengan konteks eksperimental tertentu. Semakin besar F-statistik maka perbedaan antar kelompok analit juga semakin besar. Nilai-p merupakan perbandingan F-statistik dengan derajat kebebasan, jika nilai-p <0,001 maka data dapat disimpulkan terbedakan secara signifikan (Connelly, 2021)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kalibrasi sensor

Kurva respon pengukuran etanol dalam rentang konsentrasi 1,2 – 4,86 % v/v digunakan sebab mempertimbangkan konsentrasi etanol yang terdapat dalam sampel uji lemang tapai yang fermentasi setelah 2 hari menghasilkan etanol <5% (Marniza, 2020). Respon pengukuran telah dicatat dan grafik tegangan *output* stasioner terhadap konsentrasi etanol pada suhu 28°C terlihat pada Gambar 4. Masing-masing titik merepresentasikan rata-rata dari lima kali pengukuran biosensor dan diperoleh plot kalibrasi regresi linear. Kurva standar kalibrasi sensor menghasilkan persamaan regresi linear seperti dalam Persamaan (1).



Gambar 4. Kurva standar kalibrasi sensor

$$U(\text{mV}) = 1909,45 - 14,59(\% \text{etanol}) \quad (1)$$

Persamaan ini menunjukkan bahwa nilai sensitivitas biosensor sebesar 14,59 mV/% etanol dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9937. Hasil ini mengindikasikan bahwa biosensor memiliki sensitivitas yang baik untuk mendeteksi etanol dalam sampel uji. Persamaan (1) digunakan untuk menghitung kadar etanol dalam sampel uji lemang tapai setelah diperoleh nilai pengukuran tegangan *output* stasioner.

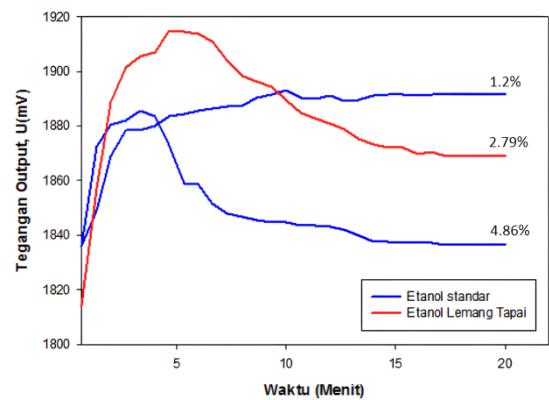
Deteksi etanol dalam sampel Lemang Tapai

Pengujian deteksi etanol pada sampel uji lemang tapai dilakukan selama kurun waktu 20 menit dan dihentikan ketika kurva tegangan *output* mencapai keadaan stasioner. Pengukuran nilai

tegangan *output* menuju stasioner dengan waktu respon tersebut diakibatkan oleh penyesuaian elektroda sensor terhadap kondisi lingkungan elektroda. Hasil pengukuran nilai tegangan *output* pada sampel uji lemang tapai untuk mengetahui perbedaan kadar etanol yang dikandungnya, terlihat pada **Gambar 5** dan dalam **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil pengukuran tegangan *output* stasioner, kadar etanol dan nilai pH

Sampel uji	Tegangan (mV)	Kadar Etanol (% v/v)	pH
Lemang Tapai	1869 0,005	2,79	5
Kalibrasi minimum	1891,5±0,002	1,2	6
Kalibrasi maksimum	1836,5±0,002	4,86	5



Gambar 5. Hasil pengukuran kadar etanol pada sampel uji lemang tapai

Pada **Tabel 1** menunjukkan terjadi perubahan nilai tegangan *output* dari sampel uji lemang tapai yang dibandingkan dengan nilai tegangan *output* dari larutan etanol standar, terlihat pada **Gambar 5**. Pada konsentrasi larutan etanol standar 1,2% v/v kurva pada grafik terus meningkat hingga stasioner yang menunjukkan bahwa penambahan etanol pada konsentrasi ini pada sel ragi dapat berfungsi untuk membantu meningkatkan laju pertumbuhan ragi. Kemudian pada konsentrasi yang lebih tinggi seperti, 2,79% v/v hingga 4,86% v/v terjadi penurunan tegangan *output* pada tahap akhir pengukuran ketika mencapai kondisi stasioner yang menunjukkan laju pertumbuhan sel ragi menurun secara linear seiring dengan peningkatan konsentrasi etanol yang ditambahkan, dimana sel ragi tidak mampu bertahan hidup dalam konsentrasi etanol yang lebih tinggi dari 2% (Nguyen *et al.*, 2017).

Hal ini dikarenakan ketika ragi berada dalam lingkungan yang mengandung etanol dengan konsentrasi tinggi, etanol dapat menembus dinding sel ragi dan merusak membran sel, mengganggu fungsi seluler dan struktur sel ragi yang

mengakibatkan kematian sel dan mempengaruhi kemampuan sel ragi untuk mengonsumsi O_2 dalam melakukan aktivitas metabolisme, sehingga kadar O_2 tersisa yang dideteksi oleh elektroda biosensor semakin besar dan tegangan *output* yang terbaca semakin kecil akibat adanya struktur dalam sirkuit TIA modul elektronik biosensor. Nilai tegangan *output* juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti, nilai pH yang dihasilkan saat konsentrasi etanol ditambahkan. Saat konsentrasi etanol meningkat, tingkat produksi CO_2 juga meningkat, yang menyebabkan larutan menjadi lebih asam. Kondisi asam ini dapat menghambat pertumbuhan sel ragi. Oleh karena itu, nilai pH adalah salah satu faktor penting yang mempengaruhi kecepatan proses fermentasi ragi.

Hasil data ini mengindikasikan bahwa metode biosensor amperometris berbasis sel ragi *Saccharomyces cerevisiae* dapat mendeteksi kadar etanol dalam makanan tradisional yang difermentasi. Hasil data pengukuran setiap variasi kadar etanol dalam sampel uji kemudian diujikan menggunakan *one-way* ANOVA, menunjukkan nilai f-statistik sebesar 11121,78 dan nilai-p sebesar $<0,001$, mengindikasikan bahwa setiap variasi sampel uji terbedakan secara signifikan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Biosensor amperometris yang mempergunakan sel ragi *S.cerevisiae* memiliki kemampuan untuk mendeteksi etanol dalam rentang konsentrasi etanol yang kecil dan dapat diaplikasikan untuk mengukur kadar etanol pada makanan tradisional. Didapatkan kadar etanol dalam sampel uji lemang tapai sebesar 2,79% v/v, dimana dari hasil pengukuran kalibrasi sensor diketahui bahwa semakin besar konsentrasi etanol maka tegangan *output* akan semakin menurun. Hasil analisis data menggunakan ANOVA juga menunjukkan bahwa hasil data dapat diterima dan setiap variasi sampel uji memiliki perbedaan yang signifikan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak penyelenggara PIU-AKSI ADB Universitas Riau. 12810.29/UN19/KM.05.01/2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Britannica. 2013, 22 Juli. *Saccharomyces*. Diakses dari <https://www.britannica.com/science/Saccharomyces>.
- Cinti, S., Basso, M., Moscone, D., & Arduini, F. 2017. A paper-based nanomodified electrochemical biosensor for ethanol detection in beers. *Analytica Chimica Acta*, 960 : 123–130.
- Connelly, L. M. 2021. Introduction to analysis of variance (ANOVA). *Medsurg Nursing*, 30(3): 218.
- Destanoglu, O. & Ates, I. 2019. Determination and evaluation of methanol, ethanol and higher alcohols in legally and illegally produced alcoholic beverages. *Journal of the Turkish Chemical Society Chemistry: A*. 6(1):21–28.
- Febriani, & Ihsan, E. A. 2020. Determination of Ethanol in a Distillate Sample of Arenga pinnata by UV-Visible Spectrophotometry. *Journal of Physics: Conference Series*, 1539(1): 012002.
- Gonchar, M., Smutok, O., Karkovska, M., Stasyuk, N., & Gayda, G. 2017. Biotechnology of yeasts and filamentous fungi. *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi*. 1–412.
- Grand, V. R. 2018. Halal Food And Beverage Market Size Report By Product (Meat & Alternatives, Milk & Milk Products, Fruits & Vegetables, Grain Products), By Region, And Segment Forecasts. Diakses dari <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/halal-food-market>.
- Kuswandi, B., Irmawati, T., Hidayat, M., Jayus, & Ahmad, M. 2014. A Simple Visual Ethanol Biosensor Based on Alcohol Oxidase Immobilized onto Polyaniline Film for Halal Verification of Fermented Beverage Samples. *Sensors*. 14(2): 2135–2149.
- Marniza. 2020. Characterization of Tapai Ketan Hitam with Various Cooking Methods. *Teknologi Agro-Industri*. 7(2): 112-120.
- Martin-Yken, H. 2020. Yeast-Based Biosensors: Current Applications and New Developments. *Biosensors*, 10(51): 1–19.
- Nguyen, T. Y., Cai, C. M., Kumar, R., & Wyman, C. E. 2017. Overcoming factors limiting high-solids fermentation of lignocellulosic biomass to ethanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(44): 11673–11678.
- Reshetilov, A. N., Kitova, A. E., Arkhipova, A.V., Kratasyuk, V.A., Rai, M.K. 2012. Determination of ethanol in acetic acid

- containing samples by a biosensor based on immobilized *Gluconobacter* cells. *Nusantara Bioscience*. 4: 97-100
- Rosandi, V. A., Linda, T. M., Agustirandi, B., & Umar, L. 2021. Simple Amperometric Biosensor for Sucrose Concentration Measurement Based on Principal Component Analysis. *Journal of physics:conference series*. 2049: 012-048.
- Rotariu, L., Bala, C., & Magearu, V. 2004. New potentiometric microbial 10 biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*. 513(1): 119–123.
- Umar, L., Setiadi, R. N., Hamzah, Y., & Linda, T. M. 2017. Biosensor based on biochip-G for dissolved oxygen detection from photosynthesis process of green algae *Chlorella vulgaris*. *ICONSONICS 2017*. 131–134.
- Varelas, V., Sotiropoulou, E., Karambini, X., Liouni, M. & Id, E.T.N. 2017. Impact of Glucose Concentration and NaCl Osmotic Stress on Yeast Cell Wall β - D -Glucan Formation during Anaerobic Fermentation Process. *Fermentation MDPI*. 3 : 44.
- Żymańczyk-Duda, E., Brzezińska-Rodak, M., Klimek-Ochab, M., Duda, M., & Zerka, A. 2017. Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. *Yeast - Industrial Applications*. InTech, 8 Nov 2017.