

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Karakterisasi Kulit Nanas

Karakterisasi kulit nanas memiliki tekstur lunak dan berair. Kulit nanas mengandung 81,72 % air, 20,87 % serat kasar, 17,53 % karbohidrat, 4,41 % protein dan 13,65 % gula reduksi pada hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Harahap dkk., (2014). Mengingat kandungan karbohidrat dan gula yang cukup tinggi tersebut maka kulit nanas memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bahan kimia, salah satunya adalah bioetanol melalui proses fermentasi (Harimbi dkk., 2010). Hasil Analisis proksimat kulit nanas disajikan pada tabel 4.

Tabel 1. Hasil Analisis Proksimat Kulit Nanas

Analisis	Hasil Analisis
Karbohidrat (%)	3,95
Serat Kasar (%)	4,84
Gura reduksi (%)	2,64
Protein (%)	0,39
Air (%)	85,05

Sumber : Lab. Chem-Mix Pratama (2016)

Kulit nanas yang digunakan mengandung air 85,05 %. Menurut hasil penelitian yang dilakukan Harahap, (2014) uji proksimat kulit nanas mengandung kadar air 81,72 %. Tingginya kandungan air yang di uji menunjukkan bahwa kulit nanas yang digunakan masih keadaan segar atau belum terfermentasi alami, kulit nanas yang digunakan sudah mengalami proses fermentasi alami akan menurunkan kandungan kadar air juga kandungan lain di dalam kulit nanas.

Perbedaan kandungan kadar air hasil penelitian yang dilakukan oleh Harahap, (2014) terjadi karena pada saat proses pengujian proksimat, kulit nanas sudah mengalami fermentasi secara alami. Hal itu karena tekstur dari kulit nanas yang lunak dan berair. Kulit nanas yang terlalu lembab akan mudah sekali busuk atau terfermentasi alami sehingga menurunkan kuantitas dan kualitas kandungannya. Selain itu, dengan kandungan air yang lebih besar memungkinkan untuk menghasilkan etanol yang paling tinggi karena air sangat berpengaruh pada metabolisme mikrobial fermentatif yang mengkonversi glukosa menjadi etanol.

Selain bahan utama berupa kadar air pada kulit nanas, juga terdapat serat kasar, lemak, protein, kadar abu, dan kadar air. Widayatnim (2015) serat kasar terdiri atas selulosa dan hemiselulosa yang sifatnya sulit terhidrolisis, sehingga jika semakin banyak kandungan serat kasar maka mempengaruhi kadar gula yang diperoleh lebih sedikit. Serat kasar hasil uji proksimat diperoleh hasil 4,84 % dibandingkan dengan hasil uji proksimat yang dilakukan oleh Harahap (2014) sebesar 17,53 %. Perbedaan tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan teknik penanganan pada proses pengujian dan jenis kulit nanas yang digunakan, sehingga terdapat perbedaan hasil kandungan.

Menurut Slamet dkk., (1989) protein yang terhidrolisis akan melepas asam-asam amino penyusunnya. Asam amino yang sesuai bagi enzim dapat berfungsi sebagai energi enzim bekerja, diantaranya enzim amilase yang bekerja merombak pati menjadi gula. Meskipun hasil hidrolisis protein bukan berupa gula, namun dengan protein yang banyak terhidrolisis maka energi bagi enzim bekerja juga semakin banyak, sehingga enzim dapat bekerja maksimal sesuai

tugasnya. Kadar protein hasil uji proksimat 0,39%. Namun dilihat hasil uji proksimat dari kulit nanas, protein yang dihasilkan masih rendah di bawah 1 % berbeda dengan hasil uji proksimat dari Harahap, (2014) yaitu 4,41 %. Protein berperan dalam hal suplai nutrisi bagi mikroba, selain hal nya dengan karbohidrat. Namun jumlah kandungan protein dalam suplai makanan bagi mikroba tidak sebanyak karbohidrat. Sedikit atau banyaknya kebutuhan bagi mikroba, protein tetap berpengaruh dalam proses fermentasi.

B. Fermentasi Bioethanol dari Kulit Nanas

Proses fermentasi merupakan proses biokomia dimana terjadi perubahan-perubahan atau reaksi-reaksi kimia dengan pertolongan jasad renik penyebab fermentasi yang berhubungan dengan zat makanan yang sesuai dengan pertumbuhannya. Akibat terjadinya fermentasi sebagian atau seluruhnya akan berubah menjadi alkohol setelah beberapa waktu lamanya.

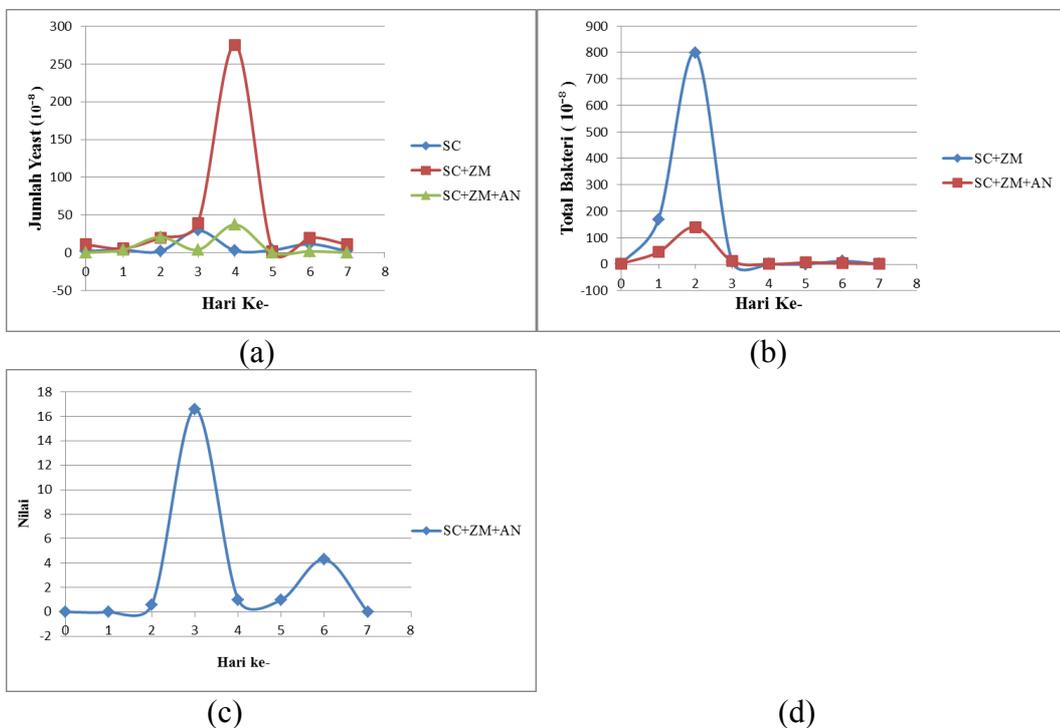
Pada proses fermentasi, untuk mengetahui dinamika perubahan kimia pada bahan, pembentukan etanol serta aktivitas mikroba maka dilakukan pengujian-pengujian kimia yang meliputi gula reduksi, total asam, pH dan uji mikrobiologi (Lia, 2012).

1. Uji mikrobiologi

Uji mikrobiologi dimaksudkan untuk mengetahui dinamika populasi mikrobia dan aktivitasnya dalam proses sakarifikasi dan fermentasi. Menurut Fardiaz (1988), konsentrasi inokulum yang terlibat dalam fermentasi sangat mempengaruhi efektivitas penghasilan produk. Jumlah inokulum akan

mempengaruhi persaingan pengambilan nutrisi, sehingga sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan sel ragi dan kadar alkohol yang dihasilkan.

Metode yang dilakukan yaitu dengan menghitung jumlah total mikroba yang tumbuh pada medium PGYP untuk *yeast*, bakteri dan jamur dengan seri pengenceran 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} dengan metode *plate count* yang diinkubasi selama 2x24 jam. Adapun aktivitas mikroba dapat dilihat dengan gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan Mikrobiologi (a) Total Pertumbuhan *Yeast* (b) Total bakteri *Zymomonas mobilis* (c) Total Jamur *Aspergillus niger*.

Menurut Timotius (1982) kurva pertumbuhan bakteri pada umumnya dibagi dalam empat fase, yaitu fase permulaan (*lag*), fase logaritma (fase eksponensial), fase maksimum, dan fase kematian. Fase pertumbuhan perlakuan *Saccaromyces cereviciae* gambar 1 (a) mengalami fase pertumbuhan dengan fase permulaan – fase tetap maksimum – fase pengurangan. Pertumbuhan yang lambat

atau fase adaptasi yaitu pada hari ke 1, 2, 3 dan pada baru hari ke- 4 memasuki fase eksponensial, meskipun pada hari ke- 5, 6, 7 memasuki fase kematian. Perbedaan fase pertumbuhan antar perlakuan terjadi pada hari ke- 2, 3, 4. Perlakuan *Zymomonas mobilis* gambar 1 (b) mulai fase pertumbuhan lebih cepat pada hari ke- 2. Hal ini dikarenakan pada saat proses konversi gula reduksi yang merupakan sumber makanan pada mikroba, terjadi persaingan dalam hal bertahan hidup. Jamur *Aspergillus niger* gambar 1 (c) memulai fase pertumbuhan memasuki pada hari ke- 3 setelah itu memasuk fase tumbuh lagi pada hari ke- 6 dan memasuki fase kematian pada hari ke- 7.

Jika dikarenakan akumulasi hasil-hasil metabolisme yang menghambat pertumbuhan, maka jumlah total bakterinya akan makin bertambah banyak. Menurut Admianta (2001), semakin lama proses fermentasi, dan semakin banyak dosis ragi *Saccaromyces cereviceae* yang diberikan maka kadar bioetanol semakin meningkat. Semakin lama waktu fermentasi maka mikroba berkembang biak dan jumlahnya bertambah sehingga kemampuan untuk memecah glukosa yang ada menjadi alkohol semakin besar. Menurut Roukas (1996), penurunan bioetanol terjadi pada konsentrasi glukosa berlebih sebagai efek inhibisi substrat dan produk. Konsentrasi substrat yang terlalu tinggi mengurangi jumlah oksigen terlarut, walaupun dalam jumlah yang sedikit, oksigen tetap dibutuhkan dalam fermentasi oleh *Saccaromyces cerevisiae* untuk menjaga kehidupan dalam konsentrasi sel tinggi (Hepworth, 2005; Nowak, 2000; Tao dkk., 2005) menurut Admianta (2001), semakin lama proses fermentasi, dan semakin banyak dosis ragi *Saccaromyces cereviceae* (Harimbi dkk., 2010) yang diberikan maka kadar

alkohol semakin meningkat. Semakin lama waktu fermentasi maka jumlah mikroba semakin menurun, dan akan menuju ke fase kematian karena alkohol yang dihasilkan semakin banyak dan nutrient yang ada sebagai makanan mikroba semakin menurun (Kunaepah, 2008).

Zymomonas mobilis merupakan salah satu mikroorganisme yang memiliki laju pertumbuhan sel yang tinggi (Rogers dkk., 2007). Pada saat fase adaptasi, *Zymomonas mobilis* menghasilkan etanol dengan konsentrasi etanol yang dihasilkan masih kecil. Dilihat pada gambar 1 (b) memasuki fase stasioner konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh *Zymomonas mobilis* semakin meningkat sampai waktu 24 jam. Pada fase stasioner *Zymomonas mobilis* mengalami pertumbuhan sehingga konsentrasi etanol yang dihasilkan juga semakin meningkat. Setelah waktu 24 jam, etanol yang dihasilkan mulai menurun, hal tersebut merupakan indikasi *Zymomonas mobilis* telah memasuki *fasedeclin* (fase pertumbuhan lambat).

Pada *fase declin* mikroorganisme yang berkembang biak lebih sedikit dari pada mikroorganisme yang mati, selain itu penurunan konsentrasi nutrisi yang tersedia juga menyebabkan menurunnya konsentrasi etanol yang dihasilkan. Penurunan konsentrasi etanol terjadi sampai waktu fermentasi 36 jam.

Pada pola ini, laju pertumbuhan spesifik mikroorganisme berbanding lurus dengan laju pembentukan produk yang dihasilkan (Ahmad, 2009). Selama proses fermentasi berlangsung, komposisi substrat berubah setiap waktunya dan produk metabolit akan terbentuk. Kondisi lingkungan pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

berada dalam keadaan unsteady state. Proses fermentasi berlangsung pada laju pertumbuhan spesifik yang konstan dan tidak bergantung pada perubahan konsentrasi nutrisi (Ahmad, 2009). Gambar 1 (b) menunjukkan nilai laju pertumbuhan spesifik *Zymomonas mobilis* yang diperoleh pada waktu fermentasi.

Pada gambar 1 (c) menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* mengalami masa pertumbuhan eksponensial sampai hari ke-3, selanjutnya memasuki masa stationer pada hari ke-4, setelah itu hari ke-5 memasuki fase eksponensial lagi sampai hari ke-6 kemudian memasuki fase mati (*death phase*) pada hari ke-7. Hal ini dapat terjadi karena lingkungan pada hari terakhir fermentasi ini tidak sesuai lagi bagi *Aspergillus niger* untuk aktif beraktivitas. Ketersediaan nutrisi, suhu, pH, dan oksigen pada hari terakhir fermentasi mulai menipis bagi pertumbuhan *Aspergillus niger*. Disamping itu juga, konsentrasi gula yang rendah dan jumlah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* dapat menghambat pertumbuhan sel jamur pada proses fermentasi, dan konsentrasi etanol yang tinggi juga dapat mematikan khamir (Alico, 1982). Adanya fase tetap maksimum disebabkan antara lain karena kekurangan nutrisi, akumulasi hasil-hasil metabolisme akhir, dan lain-lain. Jika disebabkan karena kekurangan nutrisi, maka jumlah sel-sel yang hidup dan / atau mati atau jumlah total sel (hidup dan mati) tetap. Jika dikarenakan akumulasi hasil-hasil metabolisme yang menghambat pertumbuhan, maka jumlah total bakterinya akan makin bertambah banyak. Pada perlakuan penambahan *Aspergillus niger* memiliki fase pertumbuhan diawali dengan fase logaritma – fase tetap maksimum - fase pengurangan pertumbuhan. Sementara pada perlakuan lain diawali dengan fase

permulaan – fase tetap maksimum – fase pengurangan pertumbuhan. Kurang baiknya pertumbuhan sel khamir dikarenakan karena proses pertumbuhan dari *yeast* dan bakteri, yang lebih baik pada proses perombakan gula pada fermentasi.

Mikroorganisme dalam hal ini digolongkan menjadi 4 yaitu aerobik: hanya dapat tumbuh apabila ada oksigen bebas, anaerob: hanya dapat tumbuh apabila tidak ada oksigen bebas, mikroaerofilik: dapat tumbuh baik dengan atau tanpa oksigen bebas, mikroaerofik: dapat tumbuh baik dengan oksigen jumlah kecil (Lia, 2012). Inokulum yang digunakan dalam proses fermentasi ini adalah bakteri *Zymomonas mobilis* dan *saccharomyces cerevisiae*, yang kedua mikroba ini adalah mikroba fermentatif yaitu bersifat fakultatif anaerob yaitu mikroba yang membutuhkan oksigen dalam jumlah sedikit, begitupun dengan bakteri lain yang tumbuh dalam perlakuan ini dapat tumbuh dengan keterbatasan oksigen.

2. Hasil Analisis Kimia

Pada proses fermentasi, untuk mengetahui dinamika perubahan kimia pada bahan, pembentukan etanol maka dilakukan pengujian-pengujian kimia yang meliputi, gula reduksi, total asam dan pH selama proses fermentasi berlangsung.

a. Uji Gula Reduksi

Hasil pengamatan gula reduksi dan total asam selama proses fermentasi 7 hari disajikan pada tabel 5.

Tabel 2. Rerata Gula Reduksifermentasi hari ke 3 dan 7.

Perlakuan	gula reduksi hari ke 3 (%)	gula reduksi hari ke 7 (%)
Sc	0,60 a	0,016 a

Sc+Zm	0,19 c	0,023 a
Sc+Zm+An	0,39 b	0.005 a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata pada jenjang nyata 5% berdasarkan uji sidik ragam.

Sc : *Saccaromyces cereviciae*

Sc + Zm : *Saccaromyces cereviciae*+ *Zymomonas mobilis*

Sc + Zm + An : *Saccaromyces cereviciae*+ *Zymomonas mobilis*+ *Aspergillus niger*

Pengukuran kadar gula reduksi ini ialah bertujuan untuk mengetahui kecukupan nutrisi bagi mikroba selama memproduksi etanol. Selain itu, menurut Wignyanto dkk., (2001), peningkatan jumlah sel *Sacchromyces cerevisiae* dan penurunan konsentrasi gula reduksi diikuti dengan peningkatan konsentrasi etanol. Dengan demikian, pengukuran gula reduksi pada proses fermentasi ialah untuk mengetahui seberapa banyak gula reduksi yang terkandung pada limbah kulit nanas tersebut dimanfaatkan oleh mikroba untuk melakukan metabolisme.

Hasil sidik ragam gula reduksi dengan taraf nyata 5% yang di uji pada hari ke 3 (lampiran 4a) menunjukkan bahwa tiap perlakuan memberikan pengaruh signifikan. Perlakuan *Saccaromyces cereviciae* berbeda nyata dengan penambahan *Zymomonas mobilis* dan penambahan *Aspergillus niger*. Perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae*. Rerata gula tertinggi terdapat pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* yaitu sebesar 0,60%. Perlakuan dengan rerata gula yang paling rendah yaitu pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* 0,19%. Hal ini terjadi karena proses perombakan gula terjadi lebih dulu pada hari ke-3. Pertumbuhan sel *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* yang bersamaan pada hari ke-3 menyebabkan persaingan dalam hal perebutan makanan untuk proses fermentasi.

Hasil sidik ragam gula reduksi dengan taraf nyata 5% yang di uji pada hari ke- 7 (lampiran 4c) menunjukkan bahwa tiap perlakuan tidak memberikan pengaruh signifikan. Perlakuan terbaik pada hasil analisis ini terdapat pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* 0,023%. Perlakuan dengan rerata terendah adalah perlakuan *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* sebesar 0,005%. Hal tersebut dikarenakan kadar gula reduksi pada perlakuan tersebut (gambar 2) sudah mengalami penurunan pada hari ke-4 proses fermentasi. Setelah melewati hari ke- 4 penurunan gula disebabkan oleh perombakan gula menjadi energi oleh khamir guna bertahan hidup.

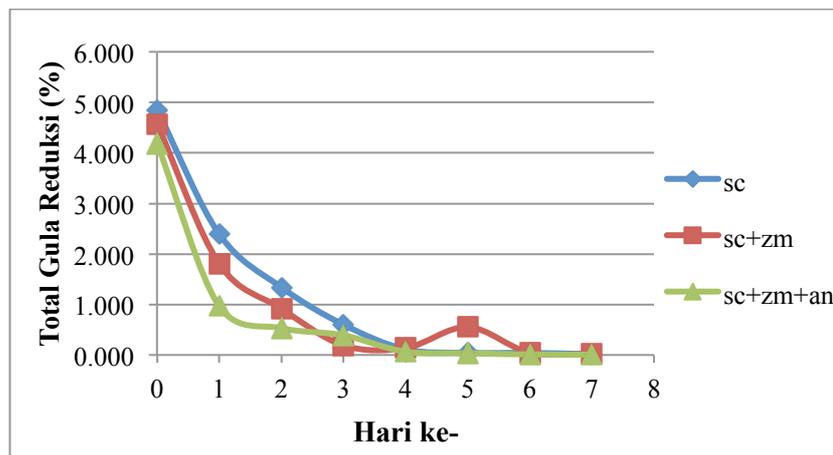
Hasil penelitian Harimbi dkk., (2010) analisis yang dilakukan terhadap hasil penelitian diperoleh hasil: kadar glukosa awal sari kulit nanas 8,53%, kadar glukosa tertinggi dari fermentasi adalah 8,42%, pada penambahan 30 g *Saccaromyces cerevisiae* dan waktu fermentasi 2 hari.

Kadar gula reduksi digunakan sebagai indikator terjadinya fermentasi. Gula akan difermentasikan oleh mikroba menghasilkan asam dan alkohol. Bila terjadi fermentasi maka kadar gula reduksi menurun dan total asam tinggi serta pH akan menjadi sangat asam. Gula reduksi adalah gula yang mempunyai kemampuan untuk mereduksi. Hal ini dikarenakan adanya gugus aldehid atau keton bebas. Senyawa-senyawa yang mengoksidasi atau bersifat reduktor adalah logam-logam oksidator seperti Cu (II) (Huzairah, 2009).

Reduksi gula atau perombakan gula merupakan proses yang tergolong dalam glikolisi yaitu pemecahan gula secara anaerob sampai asam piruvat yang dilakukan oleh kebanyakan jasad daritingkat tinggi hingga tingkat rendah. Reaksi

glikolisis terjadi dalam sitoplasma dan tidak menggunakan oksigen sebagai aseptor elektornya, melainkan zat lain. Asam piruvat mempunyai kedudukan yang penting karena merupakan titik pusat dari berbagai reaksi pemecahan maupun pembentukan. Fermentasi adalah proses metabolisme karena dalam proses fermentasi terjadi reaksi-reaksi biokimia dan reaksi tersebut tergolong dalam reaksi metabolit dengan kondisi anaerob.

Perubahan kadar gula reduksi fermentasi selama 7 hari dapat dilihat dalam gambar 2.



Gambar 2. Grafik Persentase Gula Reduksi pada prose fermentasi.

Keterangan:

sc = *Saccaromyces cereviciae*

sc+zm = *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis*

sc+zm+zn = *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*

Gambar 2 menunjukkan bahwa pada awal pengamatan atau hari ke-0, secara umum presentase gula reduksi berada pada kisaran jumlah yang relatifsama. Secara keseluruhan pada pengamatan pada hari ke 1,2,3 dan 4 terjadi penurunan kadar gula reduksi. Penurunan ini dikarenakan terjadi proses fermentasi yang dilakukan oleh mikroba yaitu dengan merombak glukosa yang terdapat pada substrat menjadi etanol sehingga kadar gula reduksi menurun.

Kadar gula reduksi substrat kulit nanas fermentasi 4 hari menunjukkan penurunan. Penurunan terjadi di hari pertama dan penurunan berlangsung hingga akhir fermentasi. Kecuali pada perlakuan *Saccharomyces cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* terjadi peningkatan pada hari ke- 5 dan mengalami penurunan sampai di akhir fermentasi penurunan terendah pada perlakuan *Saccharomyces cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*.

Gula reduksi merupakan hasil metabolisme karbohidrat yang digunakan untuk aktivitas pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder oleh mikroba. Penurunan kadar gula reduksi di akhir fermentasi menunjukkan terbentuknya metabolit sekunder. Penurunan kadar gula pereduksi selama fermentasi menunjukkan aktifnya mikroba yaitu *yeast* untuk memecah glukosa. Glukosa merupakan sumber karbon utama yang diserap melalui proses transpor aktif yang kemudian dimetabolisme untuk menghasilkan energi, mensintesis bahan pembentuk sel, serta sintesis metabolit. Pada proses fermentasi, glukosa digunakan *yeast* untuk tumbuh dan berkembang biak dan sebagian di konversi menjadi produk metabolit seperti etanol.

b. Total Asam

Titration merupakan salah satu teknik Analisis kuantitatif yang dipergunakan untuk menentukan konsentrasi suatu larutan tertentu, yang penentuannya menggunakan suatu larutan standar yang diketahui konsentrasinya secara tepat. Pengukuran volume dalam titration memegang peranan yang amat penting sehingga ada kalanya sampai saat ini banyak orang yang menyebut titration dengan nama Analisis volumetri.

Dalam proses fermentasi alkohol, terbentuk pula asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat, dan juga dihasilkan CO₂. CO₂ tersebut akan bereaksi dengan air dalam medium fermentasi yang akan membentuk asam karbonat. Asam organik tersebut akan terakumulasi pada medium dan akan menurunkan pH medium (Lia, 2012). Uji total asam adalah jumlah asam laktat yang terbentuk selama proses fermentasi yang merupakan hasil pemecahan laktosa oleh bakteri asam laktat.

Tabel 3. Rerata Total Asam fermentasi hari ke 3 dan 7.

Perlakuan	Total asam hari ke 3 (%)	Total asam hari ke 7 (%)
Sc	5,90a	10,1b
Sc+Zm	7,30a	13,7a
Sc+Zm+An	8,16a	15,3a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata pada jenjang nyata 5% berdasarkan uji sidik ragam.

Sc : *Saccaromyces cereviciae*

Sc + Zm : *Saccaromyces cereviciae*+ *Zymomonas mobilis*

Sc + Zm + An : *Saccaromyces cereviciae*+ *Zymomonas mobilis*+ *Aspergillus niger*

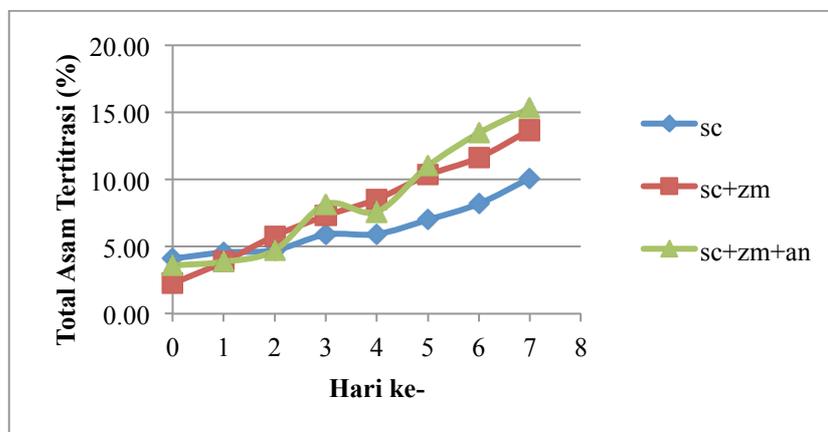
Hasil sidik ragam total asam dengan taraf nyata 5% (lampiran 4b) pada hari ke-3 menunjukkan pengaruh tidak signifikan terhadap total asam, dan tidak ada beda nyata dalam perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa fase etanol telah terlewati dan etanol perlahan-lahan berubah menjadi asam. Hasil rerata pada tabel 7 Perlakuan terbaik terdapat pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* 8,16%. Dan perlakuan dengan rerata terendah pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* 5,90%.

Penelitian yang dilakukan Lia, (2012) dari substrat kulit kakao didapatkan hasil rerata total asam tertinggi yaitu 0,014%. Berbeda dengan penelitian yang

telah dilakukan dengan substrat kulit nanas fermentasi selama 7 hari didapatkan hasil rerata titrasi tertinggi 8,17%. Perubahan keasaman medium ini merupakan salah satu indikator aktivitas metabolisme sel dimana inokulum sudah mulai memproduksi senyawa asam seperti asam laktat, asam asetat atau asam piruvat.

Hasil uji sidik ragam hari ke- 7 dengan taraf nyata 5% (lampiran 4d) menunjukkan pengaruh tidak signifikan dan berbeda nyata terhadap total total asam selama waktu fermentasi 7 hari. Di dapatkan hasil tertinggi pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* 15,3%. Dan perlakuan dengan rerata terendah adalah *Saccaromyces cereviciae* 10,1%. Kenaikan jumlah total asam ini menunjukkan bahwa fase pembentukan etanol sudah terlewati dan etanol berubah menjadi asam. Perubahan keasaman medium ini merupakan salah satu indikator aktivitas metabolisme sel dimana mikroba sudah mulai memproduksi senyawa asam piruvat.

Perubahan derajat keasaman fermentasi selama 7 hari disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Grafik Total Total asam

Keterangan :

Sc = *Saccaromyces cereviciae*

Sc+zm = *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis*

Sc+Zm+An = *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*

Berdasarkan gambar 3 dapat diketahui adanya perubahan total asam pada tiap perlakuan. Pada hari ke 0 sampai hari 2 nilai total asam relatif sama, dan perlakuan *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* mengalami peningkatan pada hari ke- 3, dan menurun pada hari ke-4, namun tidak jauh berbeda dengan perlakuan *Sacaaromyces cereviciae* yang sedikit mengalami fase stagnan pada hari ke- 3 dan ke- 4 setelah itu mengalami peningkatan total asam. Berbeda dengan perlakuan *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* yang dari hari ke- 0 sampai hari ke- 7 proses fermentasi mengalami kenaikan tanpa adanya fase stagnan ataupun penurunan. Hal tersebut didukung oleh hasil dari perubahan gula reduksi bahwa perlakuan *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* adalah perlakuan yang rendah karena memasuki hari ke- 3 gula reduksi sudah di ubah menjadi etanol hal tersebut yang membuat meningkatnya kada total asam.

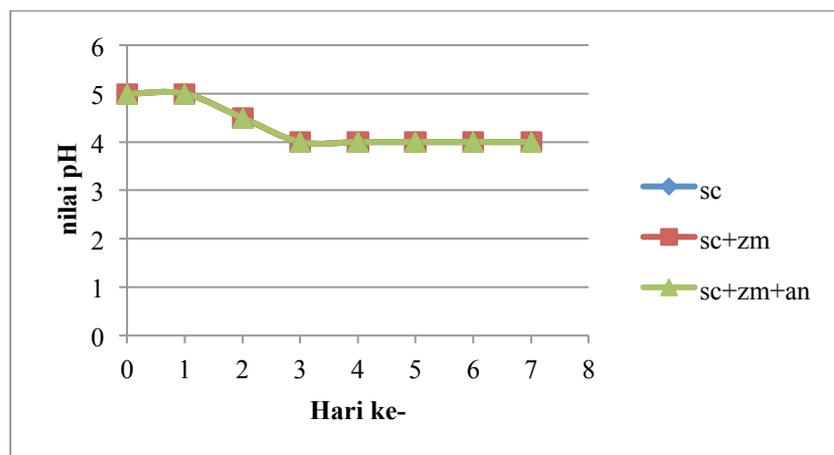
Secara keseluruhan dari grafik tersebut dapat diketahui peningkatan total asam dari hari ke hari. Hal ini menunjukkan terjadinya proses metabolisme mikroba yang menghasilkan asam asetat sebagai hasil samping dari proses metabolismenya. Kenaikan jumlah total asam ini menunjukkan bahwa fase pembentukan etanol terlewati dan etanol perlahan-lahan berubah menjadi asam. Sesuai dengan pernyataan Maiorella dkk (1981) selama fermentasi alkohol, selain

dihasilkan alkohol dan CO₂ dihasilkan pula asam asetat, asam butirat, asam laktat dan lain-lain (Lia, 2012). Proses fermentasi alkohol kemudian dilanjutkan dengan fermentasi asam asetat dari bahan yang mengandung gula, dimana produk akhir mengandung asam asetat (Muluk dan Ghuzarina, 2010). Tingginya asam asetat tersebut dikarenakan nilai gula reduksi pada perlakuan ini memiliki nilai paling tinggi.

c. Tingkat Keasaman (pH)

Anna dkk., (2015) *Power of Hydrogen* (pH) adalah derajat keasaman yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan. Pengukuran pH digunakan untuk mengukur tingkat keasaman pada suatu larutan yang bergantung pada konsentrasi sifat asam yang diikat oleh ion H⁺.

Berdasarkan hasil Analisis pH selama proses fermentasi kulit nanas selama 7 hari terdapat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil Analisis pH selama fermentasi 7 hari.

Menurut Hidayat *et al.*, (2006), pH yang baik untuk fermentasi alkohol yaitu berlangsung pada pH 4-5. Perubahan pH selama proses fermentasi disebabkan oleh adanya asam-asam tertentu. Keasaman larutan disebabkan karena pengaruh pembentukan produk oleh *Saccaromyces cerevisiae* yaitu karbondioksida, dan disebabkan oleh asam-asam yang merupakan produk samping fermentasi etanol seperti asam asetat dan asam piruvat (Anonim, 2016).

Pengukuran derajat keasamaan (pH) menunjukkan hasil yang sama tiap perlakuan. Pada gambar 4 dapat dilihat bahwa selama proses fermentasi berlangsung, pH substrat berada pada kisaran pH 4, dari awal fermentasi pH 5. Dan sampai akhir fermentasi pH optimal pada kisaran 4. Perubahan keasaman medium ini merupakan salah satu indikator aktivitas metabolisme sel dimana inokulum awal sudah dimulai memproduksi senyawa asam seperti asam laktat, asam asetat atau asam piruvat. Secara keseluruhan dapat dilihat bahwa *Saccaromyces cereviciae* mampu tumbuh pada semua medium dan mampu merobak gula reduksi pada medium fermentasi gambar 1(a) sebagai hasil samping dalam metabolismenya. Hasil penelitian dari fermentasi sustrat kulit kakao dihasilkan uji pH Pada hari ke-0, pH larutan dikondisikan sama yaitu pada pH 5, namun sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi pH larutan menurun pada kisaran 4,6-4,0 (Anonim, 2016). Perubahan pH ini disebabkan oleh pembentukan produk yaitu karbondiosida (CO₂), yang merupakan produk fermentasi selain alkohol.

Zymomonas mobilis terlebih dahulu tumbuh dan berkembang di bandingkan dengan perlakuan *Saccaromyces cereviciae* gambar 1 (b) bakteri ini

tumbuh pada medium fermentasi pada hari 2, akan tetapi kurang mampu dalam memproduksi etanol meskipun pada gambar 1 bakteri ini mampu merombak gula reduksi akan tetapi gula reduksi dirombak untuk kebutuhan tumbuh dan berkembangnya.

Aspergillus niger kurang mampu untuk tumbuh dan berkembang pada medium fermentasi yang dapat dilihat pada gambar 1 (c) bahwa jamur beradaptasi cukup lama yaitu sampai hari ke 3 jamur ini baru bisa tumbuh dan mengalami peningkatan. Begitupun dalam memproduksi etanol dilihat pada gambar 1 (c). Hal ini dikarenakan dalam proses fermentasi proses perombakan gula reduksi menjadi etanol kalah dengan perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis*.

Nilai pH dipengaruhi oleh produk yang dihasilkan selama proses fermentasi. Dalam penelitian ini, produk fermentasi yang dihasilkan adalah alkohol. Alkohol bersifat asam, ketika waktu fermentasi ditambah maka akan semakin banyak alkohol yang terbentuk.

C. Etanol

Etanol dipisahkan dari medium fermentasi melalui proses destilasi. Proses destilasi merupakan proses pemisahan larutan berdasarkan pada perbedaan titik didihnya. Hasil dari proses destilasi dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 4. Etanol dari Fermentasi Kulit nanas dengan satu tingkat

Perlakuan	Volume destilat		Kadar etanol (%)
	(ml/300ml)	(% v/v)	
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	36	12,0	9,1
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> + <i>Zymomonas mobilis</i>	41	13,6	9,3
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> + <i>Zymomonas mobilis</i> + <i>Aspergillus niger</i>	30	10,10	9,9

keterangan:

Sc : *Saccaromyces cerevisiae*

Sc + zm : *Saccaromyces cerevisiae* + *Zymomonas mobilis*

Sc + Zm + An : *Saccaromyces cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*

Berdasarkan tabel 7, kadar etanol menunjukkan persentase etanol yang terkandung dalam volume destilasi tersebut. Waktu fermentasi berpengaruh terhadap hasil karena semakin lama waktu fermentasi akan meningkatkan kadar bioetanol. Namun bila fermentasi terlalu lama nutrisi dalam substrat akan habis dan *Saccaromyces cerevisiae* tidak lagi dapat memfermentasi bahan. Perlakuan *Saccaromyces cerevisiae* menghasilkan volume destilat etanol 36 ml dengan satu tingkat destilasi, perlakuan *Saccharomyces cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* menghasilkan volume destilat etanol yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain sebesar 41 ml dan perlakuan *Saccharomyces cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* menghasilkan volume etanol yang paling sedikit namun memiliki kadar etanol tertinggi dibandingkan dengan perlakuan

yang lain. Hal ini disebabkan karena volume etanol yang dihasilkan masih bercampur dengan air meskipun dengan jumlah kandungan air yang sedikit namun tetap mempengaruhi kadar etanol yang dihasilkan.

Berdasarkan tabel 7 didapatkan hasil etanol perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dengan volume destilat 36ml sebesar 9,1% dan hasil etanol 12,0(%^{v/v}), perlakuan *Saccaromyces cereviciae*+ *Zymomonas mobilis* volume destilat 41ml didapatkan hasil 9,3% hasil etanol 13,6 (%^{v/v}), dan perlakuan *Saccaromyces cereviciae*+ *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* dengan volume destilat 30ml sebesar 9,9 % dengan hasil etanol 10,10 (%^{v/v}). Hasil ini didapatkan selama proses fermentasi, pertumbuhan mikroba yang spesifik (gambar 1a, b, c) kondisi lingkungan dan suhu juga berpengaruh dalam hasil etanol yang didapatkan, karena mikroba memiliki kriteria pertumbuhan yang berbeda-beda. Oksigen secara tidak langsung berpengaruh dalam proses fermentasi berlangsung, kondisi anaerob adalah kondisi yang baik pada pertumbuhan mikroba fermentasi, untuk merombak gula menjadi etanol. Hasil penelitian dari Kumalasari, (2011) dengan menggunakan substrat kulit nanas kemudian difermentasi dengan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) kadar alkohol yang berkisar antara 4,18- 5,49%.

Substrat yang disiapkan sebelum dilakukan proses fermentasi diukur kadar glukosanya. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa kadar glukosa yang ada pada sari kulit nanas sebesar 2,64% (tabel 4). Glukosa yang ada ini kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi untuk menghasilkan bioetanol. Kadar glukosa setelah proses fermentasi mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi (gambar 1). Hal ini karena glukosa sudah diubah

menjadi bioetanol. Perubahan glukosa menjadi bioetanol sangat dipengaruhi oleh enzim invertasi dari *Saccaromyces cerevisiae*. Pada perlakuan *Saccaromyces cerevisiae* didapatkan kadar glukosa terbanyak 0,60% (tabel 5) pada hari ke- 3 proses fermentasi, dan kadar glukosanya semakin menurun 0,0016% pada hari ke- 7 fermentasi (tabel 5). Berubahnya glukosa menjadi bioetanol terjadi karena kinerja enzim invertase dari *Saccaromyces cerevisiae*, dimana kinerja dari enzim ini akan mengalami penurunan apabila terdapat jumlah glukosa yang sedikit.

Perubahan total asam menunjukkan adanya perubahan keasaman medium yang merupakan salah satu indikator aktivitas metabolisme sel dimana inokulum *Saccaromyces cerevisiae* sudah mulai memproduksi senyawa asam seperti asam laktat, asam asetat, atau asam piruvat. Naiknya total asam mulai hari ke- 3 sampai hari ke- 7 fermentasi (gambar 3) dan mulai menurunnya gula reduksi (gambar 2) menandakan sudah terlewatinnya proses perombakan gula menjadi asam.

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang perlu untuk diperhatikan pada saat proses fermentasi. pH mempengaruhi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* dan *Aspegillus niger*. Berdasarkan hasil uji pH, pH kulit nanas pada saat proses fermentas masing-masing adalah 5,0 dan menurun 4,0 sampai akhir fermentasi (gambar 3) . Hal ini sesuai dengan pendapat Roukas (1994), bahwa kisaran pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah pada pH 3,5-6,5. Pada kondisi basa, *Saccharomyces cerevisiae* tidak dapat tumbuh.

Pada penelitian ini, proses destilasi dilakukan sebanyak 1 tingkat selama 6 jam. Tabel 7 menunjukkan kadar kadar etanol tertinggi didapatkan dari perlakuan *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger* yaitu sebesar 9,9%. Kadar etanol dari perlakuan *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* sebesar 9,3%. Sedangkan kadar etanol terendah adalah pada perlakuan *Saccaromyces cereviciae* yaitu sebesar 9,1%.

Perlakuan *Saccharomyces cereviciae* memiliki nilai etanol terendah yaitu 9,1 % dibandingkan dengan perlakuan lain pada proses fermentasi berlangsung, meskipun memiliki rerata gula reduksi tertinggi pada hari ke-3 dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Meningkatnya pertumbuhan *Saccharomyces cereviciae* pada hari ke-3 menuju hari ke-4 menunjukkan *Saccharomyces cereviciae* aktif bekerja merombak gula menjadi etanol dengan grafik pH yang stabil (gambar 4). Tingginya perombakan gula terjadi pada hari ke-4 menuju hari ke-5, dan meningkatnya kadar total asam pada hari- 4 menuju hari ke-7 (gambar 3), mempengaruhi hasil etanol selama proses fermentasi, karena gula reduksi telah banyak dirombak menjadi etanol, selebihnya adalah menjadi asam.

Perlakuan *Saccharomyces cereviciae* dengan penambahan *Zymomonas mobilis* memiliki kadar etanol sebesar 9,3% lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan *Saccharomyces cereviciae* hal itu terdapat kemungkinan pada saat merombak gula reduksi kedua mikrobia aktif dan optimal. *Zymomonas mobilis* merupakan salah satu mikroorganisme yang memiliki laju pertumbuhan sel yang tinggi (Rogers dkk., 2007). Pertumbuhan sel *Zymomonas mobilis* pada gambar 1 (b) pada hari ke-2 diikuti juga perkembangan *Saccharomyces cereviciae* (gambar

1b) meskipun jumlah pertumbuhan tidak banyak, namun hal tersebut tetap berpengaruh dalam proses perombakan gula pada saat fermentasi, penurunan gula reduksi pada hari ke-2 (gambar 2) pada saat fermentasi juga berpengaruh terhadap rendahnya kadar etanol pada perlakuan ini, meskipun nilai pH stabil (gambar 4) pada hari ke-3. Kenaikan total asam (gambar 3) pada hari ke-3 yang stabil sampai hari ke- 7 proses fermentasi mempengaruhi hasil etanol yang didapatkan pada perlakuan ini.

Penambahan *Aspergillus niger* berpengaruh pada hasil kadar etanol yang dihasilkan, rerata gula lebih banyak dibandingkan perlakuan *Zymomonas mobilis* dan *Saccaromyces cereviciae* sebesar 9,3%. Hal itu terjadi karena dalam proses perombakan gula yang maksimal, pertumbuhan *Aspergillus niger* terjadi pada hari ke- 3 gambar (1c), diikuti juga dengan pertumbuhan dari sel *Zymomonas mobilis* dan pertumbuhan *Saccaromyces cereviciae* gambar (1b dan 1a). Perombakan gula sudah terjadi pada hari ke-3 (gambar 2) hal itu dilihat dari naiknya total asam hari ke-3 (gambar 3) meskipun memasuki hari ke-4 menurun tapi meningkat lagi sampai hari ke-7. pH yang stabil dari hari ke- 3 proses fermentasi sampai hari ke- 7 hal ini yang menyebabkan kada etanol pada perlakuan ini tinggi, karena gula telah dulu dirombak menjadi etanol pada hari ke-3 dan hari ke-4 selebihnya menjadi asam. Hasil etanol yang didapatkan dari perlakuan ini sebesar 9,9% tertinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Penelitian dari Harimbi dkk., (2010) diperoleh hasil: kadar glukosa awal sari kulit nanas 8,53%, kadar glukosa tertinggi dari fermentasi adalah 8,42%, pada penambahan 30g *Saccaromyces cerevisiae* dan diperoleh kadar bioetanol tertinggi

3,96%. Berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan dengan hasil gula reduksi awal 2,64% didapatkan hasil bioethanol tertinggi 9,9% dari penambahan 10% mikroba fermentasi. Pada saat proses fermentasi berlangsung perombakan gula reduksi menjadi etanol sangat maksimal dan dihasilkan bioetanol yang cukup tinggi, hal itu ditandai dengan siklus hidup mikroba pada saat fermentasi berlangsung (gambar 1a, b, dan c).

D. Hasil Standar Mutu Bioetanol

Hasil Bioetanol dilakukan perbandingan sifat fisik dan kimia hasilnya belum sesuai dengan referensi yang ada yaitu menurut SNI.

Hasil perbandingan sifat fisik etanol yang dihasilkan ditunjukkan pada Tabel 8.

Tabel 5. Syarat Mutu SNI dan Hasil Penelitian Etanol

No	Parameter Uji	Satuan Min/Maks	SNI	Perlakuan		
				SC	SC+ZM	SC+ZM+AN
1	Kadar Etanol	%-v,min	99,5 (setelah di denaturasi dengan denatorium benzoate) 94,0 (setelah didenaturasi dengan hidrokarbon)	9,1	9,3	9,9
2	Tampakan	Kualitatif	Jernih dan terang tidak ada endapan	Jernih (-)	Jernih (-)	Jernih (-)

Keterangan :

sc = *Saccaromyces cereviciae*

sc+zm = *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis*

sc+zm+zn = *Sacaaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*

Hasil etanol yang diperoleh dipengaruhi oleh kandungan substrat kulit nanas, yaitu karbohidrat, kadar air, glukosa, serat kasar dan protein (tabel 4). Dari hasil uji proksimat tersebut didapatkan etanol yang berbeda pada tiap perlakuan.

Selain dari kandungan kulit nanas, hasil analisis kimia seperti gula reduksi, total asam dan pH berpengaruh hasil etanol yang didapatkan.

Beberapa faktor penting yang mempengaruhi hasil etanol dan efisiensinya, yaitu (1) kondisi fisiologis inokulum mikroba yang ditambahkan ke dalam medium, (2) kondisi lingkungan selama proses fermentasi berlangsung, dan (3) kualitas bahan medium. Kondisi fisiologis (*seed*) tergantung pada kondisi pertumbuhan optimal yang spesifik bagi mikroba yang di gunakan. Faktor lingkungan yang palig penting, yaitu ph dan suhu sedangkan factor lain (1) *buffer capacity*, (2) tingkat kontaminasi di awal pertumbuhan, (3) kepekatan gula, (4) konsentrasi alkohol, (5) pemilihan strain khamir, (6) kebutuhan nutrisi bagi pertumbuhan khamir (7) jumlah oksigen yang tersedia (Alico, 1982).

Dari hasil tabel 8 menunjukan hasil fermentasi 7 hari kulit nanas diperoleh perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dengan didapatkan hasil etanol sebesar 9,1%. Perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* dihasilkan etanol sebesar 9,3% dan perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* ditambah dengan *Aspergillus niger* yaitu 9,9%. Meskipun pada penelitian ini belum didapatkan hasil yang sesuai dengan syarat dan mutu dari SNI. Namun, penelitian ini menunjukan hasil yang berbeda dengan yang didapatkan dari penelitian dari Harimbi dkk., (2010) menunjukan hasil penelitian diperoleh: kadar glukosa awal sari kulit nanas 8,53%, kadar glukosa tertinggi dari fermentasi adalah 8,42%, pada penambahan 30 g *Saccaromyces cerevisiae* dan waktu

fermentasi 2 hari. Kadar bioetanol tertinggi yang diperoleh 3,9% pada penambahan 30 g *Saccaromyces cerevisiae* dan waktu fermentasi 10 hari.

Tampakan bioetanol bebas dari endapan dan zat terlarut apabila dilihat dari pencahayaan ruang, sehingga terlihat jernih. Tidak ada endapan dan terlihat jernih menandakan bioetanol yang didapatkan hasil dari destilasi sangat baik. Hasil dari penelitian kejernihan dan endapan dari bioethanol cukup baik, apabila dilihat dari pencahayaan ruang dan suhu ruang, sesuai dengan standart hasil tampakan dari SNI.