

**PENGARUH PENAMBAHAN INOKULUM *Aspergillus niger*
Saacharomyces cereviceae DAN *Zymomonas mobilis* TERHADAP
KADAR BIOETANOL LIMBAH NANAS (*Ananas comosus*)**

SKRIPSI



Oleh:

**Aditya Yudha Ramdhoni
20110210058
Program Studi Agroteknologi**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA
YOGYAKARTA
2016**

**PENGARUH PENAMBAHAN INOKULUM *Aspergillus niger*
Saccharomyces cereviceae DAN *Zymomonas mobilis* TERHADAP KADAR
BIOETANOL LIMBAH NANAS (*Ananas comosus*)**

yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Aditya Yudha Ramdhoni
20110210058

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji

Pada tanggal 22 Agustus 2016

Skripsi tersebut telah diterima sebagai syarat yang diperlukan guna memperoleh
derajat Sarjana Pertanian

Pembimbing Utama:

Anggota Penguji:

Ir. Agung Astuti, MSi.
NIK.19620923199303133017

Ir. Gatot Supangkat, M.P
NIK.196210231991031003

Pembimbing Pendamping:

Dr. Ir. Indira Prabasari, M.P
NIP.132014262

Yogyakarta, 22 Agustus 2016
Universitas Muhammadiyah Yogyakarta
Dekan Fakultas Pertanian

(Ir. Sarjiyah, MS)
NIP. 19610918.199103.2.001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan:

1. Karya tulis saya, skripsi ini, adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik, baik di Universitas Muhammadiyah Yogyakarta maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ada gagasan, rumusan dan penilaian saya setelah mendapatkan arahan dan saran dari Tim Pembimbing. Oleh karena itu, saya menyetujui pemanfaatan karya tulis ini dalam berbagai forum ilmiah, maupun pengembangannya dalam bentuk karya ilmiah lain oleh Tim Pembimbing,
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidak benaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah saya peroleh karena karya tulis ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini

Yogyakarta, Agustus 2016

Yang membuat pernyataan,

Aditya Yudha Ramdhoni
20110210058

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr.wb.

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan ridhoNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas penelitian hingga penyusunan skripsi. Berjudul ”**PENGARUH PENAMBAHAN INOKULUM *Aspergillus niger*, *Saacharomyces cereviceae* DAN *Zymomonas mobilis* TERHADAP KADAR BIOETANOL LIMBAH NANAS (*Ananas comosus*)**”. Berdasarkan penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan November 2015 sampai dengan April 2016.

Banyak bimbingan dan bantuan yang penulis peroleh dalam penelitian maupun penyusunan skripsi ini, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih yang setulusnya kepada :

1. Ir. Agung Astuti, MSi, selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberikan semangat dan saran dari awal hingga akhir skripsi.
2. Dr. Indira Prabarsari, MP selaku dosen pembimbing yang juga telah banyak meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan, memberikan semangat dan saran dari awal hingga akhir skripsi.
3. Ir. Gatot Supangkat, MP selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan saran, arahan dan motivasi kepada penulis.
4. Ir. Sarjiyah, MS selaku dekan Fakultas Pertanian yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
5. Dr. Ir. Innaka Rineksane, MP selaku kaprodi Agroteknologi yang telah memberika dukungan, motivasi dan saran kepada penulis.
6. Yang tercinta, Ibu, Bapak, Dek Bayu, Dek Bintang, Om Galih yang selalu memberikan dukungan moril dan riil, serta kepercayaan penuh. Terimakasih.

7. Sumarsih, selaku pembimbing laboratorium yang telah banyak memberikan arahan dan membantu teknis penelitian.
8. Teman-teman se-laboratorium, Jumiati, Septaristya, Heni, Bustamil, Agus A, Ghulam, Rizki, Dingga, mas Dedi, Ega, Linda, Nadia, Dita, Tifa, Fitri, Vina, Imam S yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
9. Semua teman Pertanian UMY, dan kos LS Imam, Arjun, Ferdy, Awaludin, Fail Sajid, Prasetyo, Seto, Ahmad Fathoni, Arif, Syarifudin, Fuad Annas.
10. Keluarga Besar Agroteknologi, Agribisnis dan Relesase Photography Club yang banyak memberikan dukungan dan semangat di perjalanan skripsi ini.

Pada akhirnya, penulis memohon maaf apabila ada salah dan berharap semoga skripsi ini memberikan manfaat dan inspirasi bagi para pembaca.

Yogyakarta, Agustus 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
INTISARI	xi
<i>ABSTRACT</i>	xii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Limbah Nanas	6
B. Fermentasi Bioetanol	8
C. Proses pembuatan bioetanol	10
D. Fermentasi Alkohol	11
E. Destilasi	13
F. Mikroba pada proses Fermentasi	15
G. Hipotesis	17
III. TATA CARAPENELITIAN	18
A. Tempat dan Waktu Penelitian	18
B. Bahan dan Alat Penelitian	18
C. Metode Penelitian	19

D.	Tata Laksana Penelitian.....	20
E.	Parameter yang diamati	27
F.	Analisis Data	31
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
A.	Karakterisasi Kulit Nanas.....	32
B.	Fermentasi Bioethanol dari Kulit Nanas	34
C.	Etanol.....	50
D.	Hasil Standar Mutu Bioetanol	55
V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	58
A.	Kesimpulan.....	58
	DAFTAR PUSTAKA	59
	LAMPIRAN.....	65

DAFTAR TABEL

Tabel :	Halaman
1. Kandungan Gizi Kulit Buah Nanas.....	6
2. Hasil Analisis Proksimat Kulit Buah Nanas Berdasarkan Berat Basah.....	7
3. Kandungan Gizi kulit buah nanas	8
4. Hasil Analisis Proksimat Kulit Nanas.....	32
5. Rerata Gula Reduksi fermentasi hari ke 3 dan 7.....	39
6. Rerata Total asam fermentasi hari ke 3 dan 7.....	44
7. Hasil etanol dari Fermentasi Kulit nanas	50
8. Syarat Mutu SNI dan Hasil Penelitian Etanol.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar :	Halaman
1. Pertumbuhan Mikrobiologi (a) Total Pertumbuhan <i>Yeast</i> (b) Total bakteri <i>Zymomonas mobilis</i> (c) Total Jamur <i>Aspergillus niger</i>	35
2. Grafik Persentase Gula Reduksi pada prose fermentasi.	42
3. Grafik Total Total asam	45
4. Hasil Analisis pH selama fermentasi 7 hari.	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran :	Halaman
1. <i>Lay out</i> penelitian.....	65
2. Gambar Pembuatan bioetanol	66
3. Skema pembuatan bioethanol dari kulit nanas.....	67
4. Analisis Sidik Ragam.....	68

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian khamir *Aspergillus niger* terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan dari fermentasi kulit nanas fermentasi 7 hari. Penelitian ini disusun dalam RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan rancangan percobaan Faktor Tunggal, sehingga pada perlakuan ini terdapat tiga perlakuan, yaitu *Saccaromyces cereviciae*, *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis*, serta *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*. Analisis kimia yang diuji adalah uji mikrobiologi, gula reduksi, total asam dan pH.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan khamir *Aspergillus niger* dapat menghasilkan kadar etanol terbaik pada proses fermentasi kulit nanas selama 7 hari. Perlakuan terbaik dengan kadar etanol tertinggi pada fermentasi 7 hari adalah perlakuan *Saccaromyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* dengan kadar etanol 9,3% rendemen etanol 13,6 (%^{v/v}) dengan volume etanol 41 ml.

Kata kunci: kulit nanas, *S. cereviciae*, *Z. mobilis*, *A. niger*, bioetanol

ABSTRACT

*This study aimed to determine the effect of yeast *Aspergillus niger* on levels of bioethanol produced from fermented pineapple waste fermentation 7 days. This research is compiled in the CRD (completely randomized design) with a single factor experimental design, so that the treatment, there are three treatments, namely *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces Cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* + *Aspergillus niger*. Chemical analysis is tested microbiological test, reducing sugar, total acid and pH.*

*The results showed that the addition of yeast *Aspergillus niger* can produce the highest levels of ethanol in the fermentation process pineapple waste for 7 days. The best treatment with the best ethanol content in fermentation 7 days is the treatment of *Saccharomyces Cerevisiae* + *Zymomonas mobilis* with ethanol content of 9.3% ethanol yield of 13.6 (% v / v) with a volume of 41 ml of ethanol.*

*Keywords: pineapple waste, *S. cerevisiae* , *Z. mobilis*, *A. niger*, bioethanol*

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pertambahan jumlah penduduk telah meningkatkan kebutuhan sarana transportasi dan aktivitas industri yang berakibat pada peningkatan kebutuhan dan konsumsi Bahan Bakar Minyak (BBM), untuk memenuhi kebutuhan BBM tersebut, pemerintah mengimpor sebagian BBM. Besarnya ketergantungan Indonesia terhadap BBM impor semakin memberatkan pemerintah karena harga minyak dunia yang semakin tinggi. Beberapa dari bahan bakar nabati yang sekarang ini sedang dikembangkan adalah bioetanol. Indonesia mempunyai potensi yang sangat besar untuk menghasilkan bioetanol mengingat bahan bakar nabati ini dapat memanfaatkan kondisi geografis dan sumber bahan baku minyak nabati dari berbagai tanaman yang tersedia di Indonesia (Elisabet, 2012).

Bioetanol adalah pelarut yang serbaguna, larut dalam air dan sebagai pelarut bahan organik lainnya, meliputi asam asetat, aseton, benzena, karbon tetraklorida, kloroform, dietil eter, etilena glikol, gliserol, nitrometana, piridina, dan toluena. Etanol juga larut dalam hidrokarbon alifatik yang ringan, seperti pentana dan heksana, dan juga larut dalam senyawa klorida alifatik seperti trikloroetana dan tetrakloroetilena (Wikipedia, 2013a). Bioetanol dapat juga dibuat dengan beberapa substrat seperti, ubi jalar, ubi kayu, sorgum manis (cintel), jagung, molasse (tetes tebu - hasil samping produksi gula), dan aren (nira, aren) (Edmond, 2009). Berdasarkan kandungan nutriennya, ternyata kulit buah nanas mengandung karbohidrat dan gula yang cukup tinggi. Kulit nanas mengandung 81,72% air; 20,87% serat kasar; 17,53% karbohidrat; 4,41% protein; dan 13,65%

gula reduksi (Harahap, 2014). Mengingat kandungan karbohidrat dan gula yang cukup tinggi tersebut, maka kulit nanas memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bahan kimia, salah satunya etanol melalui proses fermentasi (Harahap, 2014). Berdasarkan data produksi nanas tahun 2011, sentra produksi nanas di Indonesia terdapat di 5 (lima) provinsi yang diantaranya yaitu Lampung dengan kontribusi 32,80% terhadap produksi nanas nasional. Lampung Tengah mampu memproduksi lebih dari 500 ribu ton setiap tahunnya atau 11 ribu kontainer buah nanas per tahun sehingga dampak industri-industri pengolahan nanas ini berpotensi menghasilkan produk sampingan, yakni limbah sekitar 135 ribu ton setiap tahun atau 5000 - 7000 m³ per hari (Julius, 2009) dan akan menimbulkan masalah jika dibiarkan begitu saja.

Beberapa peneliti sebelumnya telah melakukan produksi etanol dengan kulit nanas sebagai bahan baku substrat, diantaranya Setyawati dan Rahman (2010), melakukan penelitian bioetanol dari kulit nanas dengan variasi massa *Saccharomyces cereviceae* dan waktu fermentasi, menggunakan fermentasi dalam medium cair. Hasil penelitian yang diperoleh adalah kadar etanol tertinggi sebesar 3,96% pada penambahan 30 gram *Saccharomyces cerevisiae* dan waktu fermentasi 10 hari. Sedangkan Febriyanti dan Rufita, (2011) melakukan penelitian pembuatan etanol dari limbah kulit nanas (*Ananas comosus L. merr*) dengan proses enzimasi dan fermentasi. Kadar etanol tertinggi dengan proses fermentasi melalui enzimasi sebesar 49,22% dengan lama waktu fermentasi 3 hari (Oktaviani dkk., 2015). Sedangkan penelitian dengan menggunakan singkong karet di peroleh hasil bioetanol dengan proses fermentasi dengan menggunakan

Saccharomyces cerevisiae pada waktu fermentasi 168 jam di dapat hasil kadar etanol tertinggi 94% (Amalia dan Prasmashinta, 2013).

Pembuatan bioetanol dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara sintetik melalui reaksi kimia dan secara fermentasi melalui aktivitas mikroorganisme. Proses pembuatan bioetanol secara fermentasi telah dilakukan sejak ribuan tahun yang lalu dengan menggunakan bahan yang mengandung karbohidrat sebagai bahan bakunya. Sebelum fermentasi, karbohidrat dan selulosa akan di hidrolisis dari jamur, fermentasi glukosa menjadi etanol dilakukan dengan mikroorganisme yang terbagi ke dalam dua jenis, yaitu bakteri dan ragi. Namun penggunaan ragi sebagai biokatalis lebih sering dilakukan, karena ragi lebih mudah dikembangbiakan dan lebih mudah dikontrol pertumbuhannya. Kesulitan yang sering dijumpai dalam proses fermentasi etanol yaitu dalam pemisahan produk dari ragi yang digunakan.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi jumlah etanol yang dihasilkan dari fermentasi adalah mikroorganisme dan medium yang digunakan, adanya komponen medium yang dapat menghambat pertumbuhan serta kemampuan fermentasi mikroorganisme dan kondisi selama fermentasi. Selain itu hal-hal yang perlu diperhatikan selama fermentasi adalah pemilihan mikroba, medium, konsentrasi gula, keasaman, ada tidaknya oksigen dan suhu dari perasan buah.

B. Perumusan Masalah

Terdapat berbagai macam mikroorganisme yang dapat digunakan untuk proses hidrolisis dan fermentasi. Untuk itu perlu diteliti mikroorganisme mana yang tepat untuk proses Fermentasi. Dari penelitian bioetanol dari kulit nanas

sebelumnya fermentasi menggunakan yeast *Saccharomyces* dengan perbandingan (1:2) didapatkan hasil bioetanol yaitu 3,96 % terjadi ketika kadar glukosa tinggi yaitu 8,42% pada penambahan 30g *Saccaromyces cerevisiae* (Setyawati dan Rahman, 2010). Bakteri *Zymomonas mobilis* juga dapat digunakan sebagai starter pada fermentasi metode *Solid state Fermentation*(SSF). *Zymomonas mobilis* serta konsentrasi etanol yang dihasilkan dipengaruhi oleh ukuran partikel substrat. Konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan adalah 33% dari substrat kulit nanas (Oktaviani dkk., 2015). Limbah Nanas memiliki kandungan serat yang tinggi, sehingga perlu dilakukan proses hidrolisis pada fermentasinya. Menurut penelitian Lyli dan Fahruroji, (2011) Substrat yang digunakan dalam penelitian tersebut berupa Ubi Kayu dan diinokulasikan dengan menggunakan isolat *Aspergillus niger* menghasilkan kadar gula pereduksi yang tertinggi yaitu 2,3% (b/v). Dari hasil hidrolisis tersebut diproduksi bioetanol dengan kadar tertinggi, yaitu 47,1%, setelah melalui proses distilasi, yang dicapai pada 72 jam waktu fermentasi oleh *Saccharomyces cereviseae*.

Hal ini menunjukkan bahwa hidrolisis pati ubi kayu menggunakan *Aspergillus niger* lebih optimal dibandingkan kontrol (asam). Dari penelitian tersebut maka pada penelitian ini akan menggunakan *Aspergillus niger* sebagai starter yang akan mempercepat proses hidrolisis limbah kulit nanas.

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh mikroba *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cereviceae*, dan *Zymomonas mobilis*, pada bahan baku bioetanol dari limbah nanas.
2. Menentukan kadar bioetanol terbaik yang dihasilkan dari fermentasi limbah nanas.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Limbah Nanas

Masyarakat Indonesia mengkonsumsi nanas hanya 53%, dan sisanya masih dibuang sebagai limbah. Menurut Mulyohardjo (1984), bagian kulit buah nanas masih mengandung daging yang bisa dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan Bioetanol. Saat ini banyak industri yang memanfaatkan limbah untuk pembuatan produk baru yang bermanfaat bagi makhluk hidup lainnya seperti kulit buah nanas yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol, dimana dengan memanfaatkan kulit buah nanas dapat mengurangi pencemaran terhadap lingkungan (Harahap, 2014).

Pembuatan etanol diperlukan bahan baku dengan kadar gula yang cukup tinggi. Kulit buah nanas diketahui cukup banyak mengandung gula, sehingga bisa digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan bioetanol. Menurut Harahap, (2014) kandungan gizi kulit buah nanas dapat dilihat pada Tabel 1 dan hasil analisis proksimat kulit buah nanas berdasarkan berat basah dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Kandungan Gizi Kulit Buah Nanas

Kandungan gizi	Jumlah (%)
Karbohidrat	17,53
Protein	4,41
Gula reduksi	13,65
Kadar air	81,72
Serat kasar	20,87

(Sumber: Harahap, 2014)

Tabel 2. Hasil Analisis Proksimat Kulit Buah Nanas Berdasarkan Berat Basah

Komposisi	Rata-rata (%bb)
Air	86,70
Protein	0,69
Lemak	0,02
Abu	0,48
Serat basah	1,66
Karbohidrat	10,54

(Sumber: Harahap, 2014).

Berdasarkan data dari tabel 2, komponen terbesar dalam kulit nanas adalah air (86,7%) dan karbohidrat (10,54%). Karbohidrat terbagi menjadi tiga yaitu : monosakarida (glukosa dan fruktosa), disakarida (sukrosa, maltosa dan laktosa) dan polisakarida (amilum, glikogen dan selulosa). Menurut Harahap (2014) kandungan gula reduksi pada filtrat kulit nanas sebesar 11,40 %. Mengingat kandungan gula yang cukup tinggi tersebut maka kulit nanas memungkinkan untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol melalui proses fermentasi.

Kulit nanas adalah bahan organik yang mengandung karbohidrat yang dapat dijadikan alternatif bahan pembuat bioetanol. Karbohidrat ini perlu difermentasi sehingga menjadi glukosa dan ini bisa dilakukan oleh jamur atau bakteri. Pada tabel 3 kandungan gizi yang terdapat pada kulit nanas paling besar adalah kandungan vitamin A yaitu 130,00 (SI) kandungan karbohidrat 16,00 (g) dan kandungan air yang cukup tinggi yaitu 85,30 (g), Kalori 52,00 (kal), Protein 0,40 (g), Lemak 0,20 (g). Selebihnya adalah bagian yang bias dimakan yaitu daging buah 53 (%). Kandungan gizi kulit nanas disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Gizi kulit buah nanas

Kandungan Gizi	Jumlah
Kalori (kal)	52,00
Protein (g)	0,40
Lemak (g)	0,20
Karbohidrat (g)	16,00
Fosfor (mg)	11,00
Zat Besi (mg)	0,30
Vitamin A (SI)	130,00
Vitamin B1 (mg)	0,08
Vitamin C(mg)	24,00
Air (g)	85,30
Bagian dapat dimakan (%)	53,00

(Sumber: Buletin Teknopro Hortikultura Edisi 71, Juli 2014)

B. Fermentasi Bioetanol

Bioetanol adalah proses fermentasi gula dari sumber karbohidrat dengan menggunakan bantuan mikroorganisme dilanjutkan dengan proses destilasi. Sebagai bahan baku digunakan tanaman yang mengandung pati, lignoselulosa dan sukrosa. Dalam perkembangannya produksi bioetanol yang paling banyak digunakan adalah metode fermentasi dan destilasi (Harahap, 2014). Bioetanol atau etil alkohol yang dipasaran lebih dikenal sebagai alkohol merupakan senyawa organik dengan rumus kimia C_2H_5OH . Dalam kondisi kamar, etanol berwujud cairan yang tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar, mudah larut dalam air dan tembus cahaya. Etanol adalah senyawa organik golongan alkohol primer. Sifat fisik dan kimia etanol bergantung pada gugus hidroksil (Harahap, 2014).

Bioetanol dapat dibuat dari tiga jenis bahan baku, yaitu:

1. Sakarin. Sakarin adalah material yang di dalamnya terdapat karbohidrat dalam bentuk sederhana, enam dan dua belas molekul gula karbon seperti *glukosa*, *fruktosa*, dan *maltose* yang dapat langsung difermentasikan. Beberapa material

yang mengandung sakarin, seperti : tebu, bit gula (*sugar beets*), buah-buahan segar dan kering, tetes dan lain-lain.

2. Saripati. Saripati merupakan bagian yang mengandung karbohidrat yang lebih kompleks seperti pati dan inulin yang dapat dipecah menjadi enam dan dua belas molekul gula karbon dengan proses hidrolisis dengan asam atau enzim di dalam proses yang disebut *malting*. Beberapa material yang mengandung saripati, seperti : nanas, Jagung, biji Sorghum, Jawawut (*Barley*), gandum, kentang, ubi jalar, ubi kayu, dan lain-lain.

3. Selulosa, Contoh selulosa seperti kayu, limbah kayu, kertas, jerami, batang jagung, tongkol jagung, kapas dan lain-lain, yang mengandung material yang dapat dihidrolisis dengan asam, enzim atau dengan kata lain dirubah menjadi gula yang dapat difermentasikan. Penggunaan paling besar dari gula untuk fermentasi adalah molasesnya yang mengandung sekitar 35-40% berat sukrosa, 15-20% berat gula invers seperti glukosa dan fruktosa, dan 28-35% berat padatan bukan gula. Molases diencerkan untuk memperoleh 10-20% berat gula. Setelah pH dijadikan 4-5 dengan asam mineral kemudian diinokulasikan dengan *yeast* dan difermentasi pada suhu 20-32⁰C selama kira-kira 1-3 hari. Fermentasi langsung nira gula tebu, nira gula bit, molases gula bit, buah segar, sorghum, whey, susu skim digunakan untuk mendapatkan ethanol, tapi molasses adalah bahan terbaik untuk menghasilkan ethanol (Harahap, 2014).

C. Proses pembuatan bioetanol

Tahap Pengolahan

1. Persiapan bahan baku

Kulit nanas yang merupakan ampas dari nanas ditambahkan dengan aquadest untuk diambil sarinya setelah itu dilanjutkan proses Ekstraksi.

2. Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan menghancurkan kulit nanas yang telah ditambah aquadest dengan perbandingan berat kulit nanas: aquadest = 3:1 dengan cara di blender.

3. Penyaringan.

Filtrasi adalah proses pemisahan dari campuran heterogen yang mengandung cairan dan partikel-partikel padat dengan menggunakan medium filter yang hanya meloloskan cairan dan menahan partikel-partikel padat.

4. Proses pasteurisasi

Proses pasteurisasi merupakan proses pemanasan dengan suhu yang relatif cukup rendah (di bawah 100°C) dengan tujuan untuk membunuh semua mikroba patogen.

5. Pendinginan

Pendinginan dapat dianggap sebagai proses penurunan suhu bahan dari suhu awal ke suhu tertentu di atas titik beku.

6. Fermentasi

Proses fermentasi berlangsung secara *anaerob* pada pH 4-5 dengan menggunakan *yeast Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* sebagai

mikroorganisme yang akan menguraikan glukosa menjadi etanol minimal 36 jam sampai tidak muncul buihnya lagi. Konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan adalah 33% V pada variasi ukuran partikel substrat berupa *slurry* dengan laju pertumbuhan spesifik maksimum 0,43/jam (Oktaviani, 2015).

7. Distilasi

Distilasi adalah suatu metode operasi yang digunakan pada proses pemisahan suatu komponen dari campurannya berdasarkan titik didih masing-masing komponen dengan menggunakan panas sebagai tenaga pemisah.

8. Setelah proses ini berlangsung maka akan dihasilkan Bioetanol.

D. Fermentasi Alkohol

Fermentasi adalah proses pembebasan energi tanpa adanya oksigen yang bersifat anaerob. Fermentasi dilakukan dalam tangki fermentasi, pada kepekatan tetes 24° Brix dengan kadar gula total $\pm 15\%$. Apabila kadar gula substrat rendah maka dibutuhkan kondisi anaerob, sehingga sel-sel ragi dapat melakukan fermentasi yang akan mengubah tetes yang mengandung gula menjadi alkohol.

Proses fermentasi ini menyebabkannya terjadi peningkatan panas. Agar panas yang timbul dapat diserap maka diperlukan pendingin untuk menjaga suhu yang tetap pada 30°C selama proses fermentasi yang berlangsung selama 30-40 jam.

Etanol merupakan zat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan menguap, dapat bercampur dalam air dengan segala perbandingan.

E. Destilasi

Fermentasi yang berlangsung cepat dengan hasil sangat diperlukan di dalam pembuatan alkohol hasil distilasi. Adapun kecepatan fermentasi sangat tergantung pada komposisi bahan dasar, kecepatan pemindahan nutrisi ke dalam membran sel, kondisi suhu, pH dan oksigen terlarut, tingkat inokulasi, kondisi fisiologi inokulum khamir, aktivitas enzim yang penting di dalam jalur dan toleransi khamir pada kondisi ekstrem yaitu terhadap kadar gula tinggi pada awal fermentasi dan konsentrasi alkohol tinggi pada akhir fermentasi (Elisabeth, 2012).

Distilasi merupakan proses pemurnian dengan memisahkan dua atau lebih komponen berdasarkan perbedaan titik didih. Adapun jenis-jenis dari distilasi (Elisabeth, 2012) adalah:

- a. Distilasi sederhana, prinsipnya memisahkan dua lebih komponen cairan berdasarkan perbedaan titik didih yang jauh berbeda.
- b. Distilasi Fraksonasi (bertingkat), sama prinsipnya dengan distilasi sederhana, hanya distilasi bertingkat ini memiliki rangkaian alat kondensor yang lebih baik, sehingga mampu memisahkan dua komponen yang memiliki perbedaan titik didih yang berdekatan.
- c. Distilasi Azeotrop, memisahkan campuran azeotrop (campuran dua atau lebih komponen yang sulit dipisahkan), biasanya dalam prosesnya digunakan senyawa lain yang dapat memecah ikatan azeotrop tersebut, atau dengan menggunakan tekanan tinggi.

- d. Distilasi kering memanaskan material padat untuk mendapatkan fase uap dan cairannya. Biasanya digunakan untuk mengambil cairan bahan bakar dari kayu atau batu bata.
- e. Distilasi vakum: memisahkan dua komponen yang titik didihnya sangat tinggi, metode yang digunakan adalah dengan menurunkan tekanan permukaan lebih rendah dari 1 atm, sehingga titik didihnya juga menjadi rendah, dalam prosesnya suhu yang digunakan untuk mendistilasinya tidak perlu terlalu tinggi.

Proses distilasi dikembangkan sejak dahulu kala dan pertama kalinya digunakan untuk membuat minuman beralkohol seperti anggur, kosmetik, obat-obatan, dan bahan bakar bioetanol (Rahayu dan Rahayu, 1998). Pada umumnya distilasi digunakan secara *batch*, yaitu cara distilasi yang dikerjakan dengan menempatkan cairan fermentasi ke dalam *still* (*Pot still*), kemudian didistilasi tanpa dilakukan penambahan cairan fermentasi yang baru. Distilasi dinyatakan selesai apabila komponen yang mudah menguap dalam cairan fermentasi sudah habis atau tinggal sedikit sehingga tidak menguntungkan lagi untuk didistilasi lebih lanjut.

Distilasi dilakukan untuk memisahkan etanol dari beer (sebagian besar adalah air dan etanol). Titik didih etanol murni adalah 78°C sedangkan air adalah 100°C (kondisi standar). Dengan memanaskan larutan pada suhu rentang 78°C - 100°C akan mengakibatkan sebagian besar etanol menguap, dan melalui unit kondensasi akan bisa dihasilkan etanol menguap, dan melalui unit kondensasi akan bisa dihasilkan etanol dengan konsentrasi 95% volume (Rahayu dan Rahayu,

1998). Dan untuk proses pembuatan bioetanol dengan menggunakan bahan baku limbah nanas pada penelitian ini sistem pemurnian yang digunakan adalah dengan cara distilasi.

F. Mikroba pada proses Fermentasi

1. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces adalah genus dalam kerajaan jamur yang mencakup banyak jenis ragi. *Saccharomyces* adalah dari berasal dari bahasa Latin yang berarti gula jamur. *Saccharomyces* merupakan mikroorganisme bersel satu tidak berklorofil, termasuk termasuk kelompok *Eumycetes*. Tumbuh baik pada suhu 30°C dan pH 4,8. Beberapa kelebihan *Saccharomyces cerevisiae* dalam proses fermentasi yaitu mikroorganisme ini cepat berkembang biak, tahan terhadap kadar alkohol yang tinggi, tahan terhadap suhu yang tinggi, mempunyai sifat stabil dan cepat mengadakan adaptasi. Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dipengaruhi oleh adanya penambahan nutrisi yaitu unsur C sebagai sumber carbon, unsur N yang diperoleh dari penambahan urea, ZA, amonium dan pepton, mineral dan vitamin. Suhu optimum untuk fermentasi antara 28 – 30°C (Swiss, 2011). Hasil penelitian yang diperoleh adalah kadar etanol tertinggi sebesar 3,96% pada penambahan 30 gram *Saccharomyces cerevisiae* dan waktu fermentasi 10 hari (Oktaviani, 2015).

2. *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis ini memiliki karakteristik sebagai bakteri Gram negatif, anaerob tetapi toleran terhadap oksigen atau biasa disebut anaerob fakultatif, dapat memfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa menghasilkan

sejumlah etanol dan CO₂, tetapi tidak dapat memfermentasikan manitol dan laktosa, mampu menghasilkan enzim katalase, tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon serta tidak memiliki enzim triptofanase dan gelatinase (Tanate dan Putra, 2015).

Zymomonas mobilis mampu menghasilkan *yield* etanol sekurang-kurangnya 12% (w/v) dan diatas 97 % dari nilai teoritisnya. Ketika dibandingkan dengan yeast, *Zymomonas mobilis* mampu menghasilkan 5-10 *yield* yang lebih tinggi dan menghasilkan produktivitas lima kali lebih besar. *Yield* tinggi yang dihasilkan oleh bakteri ini dihubungkan dengan reduksi biomassa selama fermentasi, dan dibatasi oleh ketersediaan ATP (Wulan, 2013). Menggunakan jamur, bakteri *Zymomonas mobilis* juga dapat digunakan sebagai starter. *Zymomonas mobilis* serta konsentrasi etanol yang dihasilkan dipengaruhi oleh ukuran partikel substrat. Konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan adalah 33% (Oktaviani dkk.,2015).

3. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger merupakan fungi dari filum *Ascomycetes* yang berfilamen, mempunyai hifa berseptat, dan dapat ditemukan melimpah di alam. Fungi ini biasanya diisolasi dari tanah dan sisa tumbuhan. Koloninya berwarna putih pada *Agar Dekstrosa Kentang* (PDA) 25 °C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur (Wikipedia, 2015c).

Aspergillus niger dikenal sebagai kapang penghasil asam sitrat, Anilin, Pektinase, Selulase, β -1,4-glikan Hidrolase, Protease, α -amilase, glukoamilase, maltase, β -galaktosidase, α -glukosidase, β -glukosidase, asam glukonat, glukosa oksidase, asam oksalat, fosfodiesterase, Ribonuklease, pupulan 4-Glukanohidrolase, β -xilosidase, xilanase dan Lipase. Glukoamilase dari *Aspergillus niger* menunjukkan bobot molekul berkisar 54-112 k D dan pH optimum berkisar antara 4,0-5,0. Temperatur optimum aktivasi berkisar antara 40–65°C (Arnata, 2015). Dari hasil penelitian Nugroho dkk., (2008) menunjukkan bahwa presentase etanol yang terbentuk dari hasil fermentasi yang dilakukan adalah 2,48% diperoleh dengan penambahan 10% fungi *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae* secara mix culture pada limbah padat tapioka seberat 50 gram. Pada perlakuan itu diperoleh biomassa sebanyak 6,14E+17 koloni/gram, pada pH 4,36; dengan nilai rasio C/N 3,4.

G. Hipotesis

Diduga penambahan *Aspergillus niger*, pada fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* dari limbah kulit nanas, akan mempercepat proses fermentasi dan menghasilkan kadar bioethanol yang tinggi.

III. TATA CARAPENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan November 2015 sampai April 2016.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan. Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari :

- a. Bahan inokulasi : isolat *Zymomonas mobilis*, *Saccaromyces cereviciae* dan *Aspergillus niger*.
- b. Bahan pembiakan kultur : medium Pepton Glukosa Yeast Ekstrak Agar (PGYA), medium Pepton Glukosa Yeast Ekstrak cair (PGYC), dan medium PDA.
- c. Bahan baku bioethanol : limbah kulit nanas (nanas madu jenis queen)
- d. Bahan sterilisasi : Desinfektan, spirtus, alkohol 70%, kapas, plastik, kertas payung.
- e. Bahan analisis : NaOH 0,01 N, indikator PP, NaOH 15% ,reagen Nelson, reagen Arsenomolidat, aquades.

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi :

- a. Alat sterilisasi : lampu Bunsen, autoclaf
- b. Alat inokulasi : jarum ose, jarum driglasky, lampu Bunsen, *micropipet*, *faintips*, tabung reaksi, *petridish*, *shaker*, *vortex*.
- c. Alat hidrolisis : *Autoclafe*, boiler.

- d. Alat fermentasi : botol selai, blender, plastik.
- e. Alat pengukur : pH meter, *Alkoholmeter*, gelas ukur, pipet ukur, timbangan analitik.
- f. Alat analisis : statip, biuret, corong, tabung reaksi, *colony counter*, *Spektrofotometer*, Erlenmeyer, cawan porselen, pipet tetes, labu ukur.
- g. Mesin bioetanol : alat distilasi, kompor listrik.

C. Metode Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah:

Tahap 1. Karakterisasi kulit nanas.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu limbah kulit nanas. Limbah kulit nanas diperoleh dari penjual buah di sekitr jalan Kaliurang KM 6 Pertama hal yang dilakukan yaitu limbah kulit nanas yang telah dipersiapkan sebelumnya dicuci bersih dan ditunggu agak kering agar air bekas cucian mengering. Setelah itu, limbah kulit nanas tersebut diblender dan disaring sehingga diperoleh limbah cair kulit nanas, dan dianalisis kandungan protein, karbohidrat, kadar serat, kadar air dan gula reduksi.

Tahap 2. Fermentasi kulit nanas menjadi etanol

Limbah cair kulit nanas difermentasi dengan menambahkan starter sesuai perlakuan yang akan diuji yaitu: A). *S. Cerevicae*, B). *S. Cerevicae* + *Z. mobilis* dan C). *S. cerevicae* + *Z. mobilis* + *A. niger*

Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan metode percobaan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan rancangan percobaan faktor tunggal yaitu macam inokulum yang terdiri dari 3 perlakuan. Adapun perlakuannya adalah :

Perlakuan A. *S. Cerevicae*

Perlakuan B. *S. Cerevicae* + *Zymomonas mobilis*

Perlakuan C. *S. Cerevicae* + *Z. mobilis* + *A. niger*

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan setiap ulangan terdiri dari 3 sampel korban untuk hari ke 0 sampai hari ke 7 yang diuji mikrobiologis, kimiadan hasil etanol, sehingga total keseluruhan adalah $3 \times 3 \times 7 = 63$ unit percobaan (Lampiran 1).

D. Tata Laksana Penelitian

Tahap 1. Karakterisasi kulit nanas

Kulit nanas yang akan digunakan pada penelitian ini dikarakterisasi terlebih dahulu untuk mengetahui kandungan kulit nanas tersebut sebelum menjadi etanol.

a. Analisis Karbohidrat

Karbohidrat dalam bentuk gula dan pati dianalisis dengan metode Nelson-Samogyi secara spektrofotometri (Sudarmadji dkk., 1984). Sampel (5 ml) ditambah 143,75 mg enzim amilase kemudian digojok dan didiamkan selama 6 jam. 1 ml sampel yang ditambah amilase dan 1 ml sampel tanpa amilase masing-masing ditambah akuades sampai volume akhir 10 mL , kemudian diambil 1 mL ditambah dengan 9 mL akuades dan digojok dengan vorteks. 1 ml arutan sampel

ditambahkan 1 ml larutan Nelson (campuran larutan Nelson A dan Nelson B; 25:1 v/v), kemudian dipanaskan dengan *water bath* pada suhu 100°C selama 20 menit. Larutan sampel didinginkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian ditambahkan 1 ml larutan Arseno Molybdat. Larutan sampel digojog, kemudian ditambahkan akuades 7 ml dan digojog lagi. Larutan sampel diukur penyerapan (absorbansi) cahaya tampak (*visible*) pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi sampel - nilai absorbansi blanko kemudian dikonversi ke mg/ml gula reduksi berdasarkan persamaan regresi senyawa standar (glukosa monohidrat). Kadar gula reduksi adalah kadar gula reduksi tanpa enzim amilase.

$$\text{Kadar pati} = (\text{Kadar gula reduksi setelah diberi enzim amylase} - \text{kadar gula reduksi tanpa enzim amilase}) \times 0,9.$$

b. Analisis Kadar Protein (Sudarmadji dkk., 2007)

Kandungan protein ditentukan dengan Analisis kandungan Nitrogen (Sudarmaji dkk., 2007). Uji kandungan protein dilakukan dengan cara menguji kadar Nitrogen dalam sampel. Kemudian hasilnya dikonversi dengan mengalikan kadar Nitrogen yang didapat dengan 6,25. Hasil konversi yang didapat itu merupakan kandungan protein dalam sampel. Untuk menguji kadar Nitrogen, sampel sebanyak 2 g dimasukkan dalam labu Kjeidahl. Ditambahkan katalis N (CuSO_4 dan K_2SO_4) 0,7 g dan ditambah H_2SO_4 pekat 3 ml lalu didestruksi pada suhu 370-410°C dalam lemari asam sampai jernih kurang lebih selama 1 jam. Pada tahapan ini asam sulfat pekat mendestruksi sampel menjadi unsur-unsurnya. Elemen Karbon, Hidrogen teroksidasi menjadi CO , CO_2 , dan H_2O . Sedangkan Nitrogen-nya (N) akan berubah menjadi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Selanjutnya sampel masuk pada tahap destilasi, pada tahap ini Ammonium Sulfat dipecah menjadi ammonia (NH_3) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dan dipanaskan. Setelah melalui tahap destruksi sampel didinginkan lalu ditambahkan 15 ml H_2O , lalu dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan 15 ml NaOH 40%. Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml larutan HCl 40% yang diberi indikator PP 2-3 tetes. Destilasi diakhiri bila semua ammonia terdistilasi sempurna dengan ditandai destilat tidak bereaksi basis.

Hasil destilasi selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N. akhir titrasi ditandai dengan warna merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Selisih jumlah titrasi blangko dan sampel merupakan jumlah ekuivalen Nitrogen. Persen protein dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blangko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N. \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

c. Analisis Kadar Serat Metode Gravimetri (Sudarmadji dkk., 2003)

Sampel ditimbang sebanyak 1-2 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml, kemudian ditambahkan 50 ml H_2SO_4 1,25% panaskan dan direflux selama 30 menit, setelah itu ditambahkan 50 ml NaOH 3,25% dan direflux selama 30 menit. Sampel yang telah dipanaskan, kemudian disaring panas-panas dengan kertas saring Whatman 42 yang telah diketahui bobotnya. Setelah disaring, lalu sampel dicuci dengan 50 ml H_2SO_4 1,25% dan 50 ml alkohol 36%, kemudian endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C dan timbang sampai bobot konstan. Serat kasar dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ serat kasar} = [(a-b)/c] \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat kertas saring ditambah sampel yang telah dikeringkan (g)

b = berat kertas saring (g)

c = berat sampel (g)

Pada Analisis karbohidrat metode serat kasar menggunakan sampel berupa nanas. Nanas yang berusia satu sampai dua tahun, tingginya 50- 150 cm, mempunyai tunas yang merayap pada bagian pangkalnya. Daun berkumpul dalam roset akar, dimana bagian pangkalnya melebar menjadi pelepah. Daun berbentuk seperti pedang, tebal dan liat, dengan panjang 80-120 cm dan lebar 2-6 cm, ujungnya lancip menyerupai duri, berwarna hijau atau hijau kemerahan. Buahnya berbentuk bulat panjang, berdaging, dan berwarna hijau, jika masak warnanya menjadi kuning, rasanya asam sampai manis.

Sama halnya dengan serat-serat alam lainnya yang berasal dari daun (*leaf fibres*), secara morfologi jumlah serat dalam daun nanas terdiri dari beberapa ikatan serat (*bundle of fibres*) dan masing-masing ikatan terdiri dari beberapa serat (*multi-celluler fibre*). Berdasarkan pengamatan dengan mikroskop, sel-sel dalam serat daun nanas mempunyai ukuran diameter rata-rata berkisar 10 μm dan panjang rata-rata 4,5 mm dengan rasio perbandingan antara panjang dan diameter adalah 450. Rata-rata ketebalan dinding sel dari serat daun nanas adalah 8,3 μm . Ketebalan dinding sel ini terletak antara serat sisal (12,8 μm) dan serat batang pisang (1,2 μm) (Sudarmadji, 2004).

d. Analisis Kadar Air (AOAC, 2003)

Kadar air ditentukan dengan mengeringkan sampel ke dalam oven pada suhu 80 °C dan didinginkan di dalam desikator kemudian ditimbang. Pengeringan dilakukan berulang ulang hingga beratnya konstan. Terakhir, menghitung kadar air.

Tahap 2. Fermentasi Kulit nanas

a. Persiapan Medium

Pembuatan medium dilakukan bersamaan dengan tahap karakterisasi, medium yang digunakan adalah PGYP untuk *Aspergillus niger*, *Saccaromyces cereviceae*, dan *Zymomonas mobilis*.

b. perbanyak inokulum

i) Saccharomyces cereviceae

Biakan *S.cerevisiae* yang digunakan berasal dari PAU Universitas Gajah Mada, lalu diambil satu ose sel ditumbuhkan pada 5 ml medium *Yeast Malt Extract* (YM) cair dengan komposisi pepton 0,5 g; *yeast extract* 0,3 g; *malt extract* 0,3 g; glukosa 1 g dan akuades hingga mencapai volume 100 ml. Biakan diinkubasi pada suhu 30° C selama 48 jam dengan metode *plate count*.

ii) Aspergillus niger

Tahap pertama yaitu pembiakan *Aspergillus niger* ke dalam medium PGYP (*Pepton Glucose Yeast Padat*). Persiapannya pembuatan PGYP, Pepton 0,75g, glukosa 0,2g, *yeast ekstrak* 0,45g dilarutkan dalam 100 ml aquades dan dipanaskan, setelah larut dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditutup untuk

diserilkan dalam *autoclave* dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah 15 menit, larutan dikerluarkan dan dipindah ke dalam tabung reaksi dan dinginkan. Setelah dingin keluarkan digunakan sebagai medium penanaman *Aspergillus Niger*.

iii) *Zymomonas mobilis*

Sebelum diinokulasi isolat *Zymomonas mobilis* diremajakan terlebih dahulu pada medium miring NA dengan mengambil 1 ose isolat, lalu diinkubasi selama 48 jam. Kemudian Inokulum dibuat dengan memindahkan sel *Zymomonas mobilis* dari medium agar miring ke labu 250mL yang mengandung 50 mL medium cair pH 5,5. Medium yang telah diinokulasi ini kemudian diinkubasi selama 20 jam pada suhu 30°C dan di shaker 125 rpm. Inokulum yang diperoleh ditransfer ke labu 1 liter yang mengandung 450/mL medium cair diinkubasi dan dishaker pada kecepatan 125 rpm. Setelah 17-18 jam inkubasi dihentikan sehingga diperoleh biomassa/starter biakan *Zymomonas mobilis* yang dipakai sebagai inokulat pada proses fermentasi (Arum dkk., 2015)

a. Pengolahan bahan baku

- 1) Kulit nanas dipotong diambil dagingnya yang masih tersisa kemudian ditambah aquadest untuk diblender dan diambil sarinya (lampiran5: 1a, 1b,1c)
- 2) Ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan dengan menghancurkan kulit nanas yang dengan menggunakan blender dengan perbandingan kulit nanas : aquadest 3:1.

- 3) Penyaringan. Filtrasi adalah proses pemisahan dari campuran heterogen yang mengandung cairan dan partikel-partikel padat dengan menggunakan medium yang hanya meloloskan cairan dan menahan partikel-partikel padat.
- 4) Proses pasteurisasi. Proses pasteurisasi merupakan proses pemanasan dengan suhu relatif rendah yaitu 70°C selama 15 menit dengan tujuan untuk membunuh pathogen.
- 5) Pendinginan. Pendinginan dapat dianggap sebagai proses penurunan suhu bahan dari suhu awal ke suhu tertentu sampai titik beku, kemudian larutan hasil hidrolisis diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 500 ml dan mengatur pH sampai pH 4,5. Mensterilkan larutan tersebut ($T=104^{\circ}\text{C}$, $t=15$ menit).

a. Proses fermentasi kulit nanas

Sari kulit nanas yang sudah disaring lalu diberi starter sesuai dengan perlakuan setelah diberi starter lalu masukkan dalam botol jam dan ditutup rapat. Proses fermentasi dilakukan selama 7 hari (lampiran 2a). Kandungan di uji total asam (lampiran 3a), uji pH (lampiran 3b) dan uji mikrobiologi (lampiran 3c).

b. Destilasi

Setelah didapat larutan ethanol dari hasil fermentasi kemudian larutan tersebut dipisahkan dengan menggunakan destilator dengan suhu 78°C . Untuk memisahkan antara ethanol dengan air.

c. Pengujian Kadar Etanol

Untuk mengetahui kadar etanol dari hasil fermentasi dilakukan dengan cara, sampel cairan fermentasi diambil 100 ml kemudian diukur dengan alat alkoholmeter akan diketahui kadar alkohol yang diperoleh.

E. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini ada 2 tahap yaitu: Tahap fermentasi dan tahap karakterisasi dalam waktu 198 jam.

1. Karakteristik Ekstrak Kulit Nanas

a. Karbohidrat

Kadar pati = (Kadar gula reduksi setelah diberi enzim amylase –
Kadar gula reduksi tanpa enzim amilase) X 0,9.

b. Serat

Serat kasar dihitung dengan rumus :

$$\% \text{serat kasar} = [(a-b)/c] \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat kertas saring ditambah sampel yang telah dikeringkan (g)

b = berat kertas saring (g)

c = berat sampel (g)

c. Protein

Persen protein dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% N = \frac{\text{ml NaOH (blangko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N. \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

d. Analisis Kadar Air

$$\% \text{Moisture} = (w1-w2)/w1 \times 100\%$$

Keterangan : W1 = berat pengeringan sampel pertama

W2 = berat pengeringan sampel terakhir (konstan)

2. Tahap Fermentasi

1. Uji gula reduksi (%)

Analisis kuantitatif gula reduksi

Cara kerja :

Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 mL reagen dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Penetapan kadar gula reduksi dalam sampel :

- a). Timbang sampel buah 1 g dan diekstrak dengan 20 ml air
- b). Saring dan masukkan labu ukur 100 ml, tera sampai tandabatas
- c). Pipet 1 ml larutan jernih sampel dan encerkan sampai 100 ml
- d). Siapkan 2 tabung reaksi. Masukkan 1 ml aquades (blanko) pada salah satu tabung dan tabung yang lain diisi dengan 1 ml sampel

- e). Tambahkan masing-masing tabung dengan 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan.
- f). Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskandalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berwarnamerah-coklat.
- g). Kemudian ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40 %.
- h). Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan
- i). Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.
- j). Kadar gula reduksi dihitung dengan rumus berikut :

Kadar gula reduksi

= $\frac{\text{konsentrasi glukosa sampel berdasarkan kurva standar} \times \text{fp} \times 100 \%}{\text{Konsentrasi sampel untuk analisis}}$

fp = faktor pengenceran

2. Total asam

Uji Total asam dilakukan dengan meneteskan larutan fermentasi dengan NaOH 0,1 N sampai berubah warna menjadi merah muda.

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blangko-sampel)} \times \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%}{\text{Berat sampel (g)} \times 1000}$$

3. pH

Pengecekan pH dilakukan dengan menggunakan pH meter.

4. Kadar Etanol

Pengecekan kadar etanol dilakukan pada pengamatan hari terakhir dengan menggunakan Alkoholmeter. Uji etanol dilakukan dengan cara kualitatif dan

kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan dengan meneteskan larutan campuran antara $K_2Cr_2O_7$ dan H_2SO_4 pekat serta dengan uji nyala. Uji kuantitatif dilakukan dengan metode berat jenis menggunakan piknometer, namun apabila volume etanol kurang dari 25 ml, berat jenis dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Berat Jenis} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Volume (ml)ml}} = g$$

5. Populasi Mikroba

Perhitungan populasi menggunakan metode *Plate count* pada medium PDA dan dihitung jumlah isolatnya dengan menggunakan koloni counter. Penentuan jumlah koloni dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah bakteri per ml sampel (CFU/ml)} = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Penentuan jumlah jumlah bakteri per mililiter dengan menggunakan cara *Total Plate Count* harus memenuhi syarat sebagai berikut:

- i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni
- ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
- iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya
- iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk, 2014).

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan secara periodik disajikan dalam bentuk histogram dan grafik, sedangkan hasil akhir dianalisis sidik ragam (*Analysis of variance*) menggunakan uji F pada tingkat kesalahan α 5%. Untuk perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji jarak berganda Duncan *Multiple Range Test* (DMRT).

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 4. 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 melepaskan 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 halnya 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 biokimia 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.

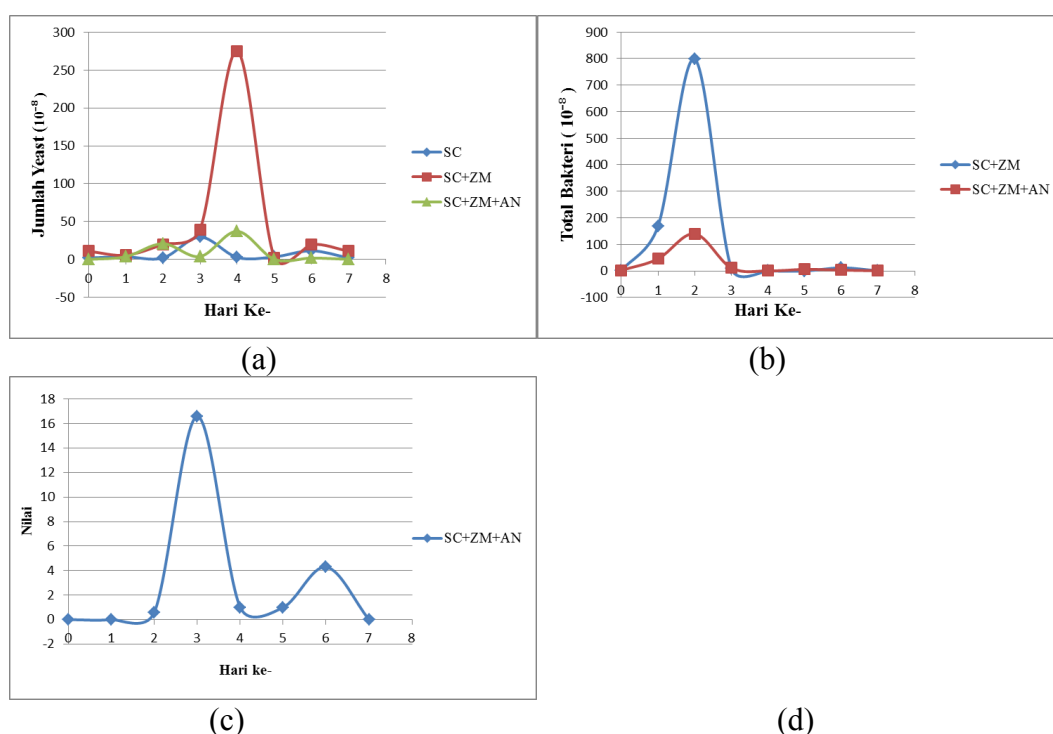
Pada proses fermentasi, untuk mengetahui dinamika perubahan kimia pada bahan, pembentukan etanol serta aktivitas mikroba maka dilakukan pengujian-pengujian kimia yang meliputi gula reduksi, total asam, pH dan uji mikrobiologi (Lia, 2012).

1. Uji mikrobiologi

Uji mikrobiologi dimasukkan untuk mengetahui dinamika populasi mikrobial 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 nutrien (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 *Saccaromyces 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 cereviciae*, 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 5. 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.

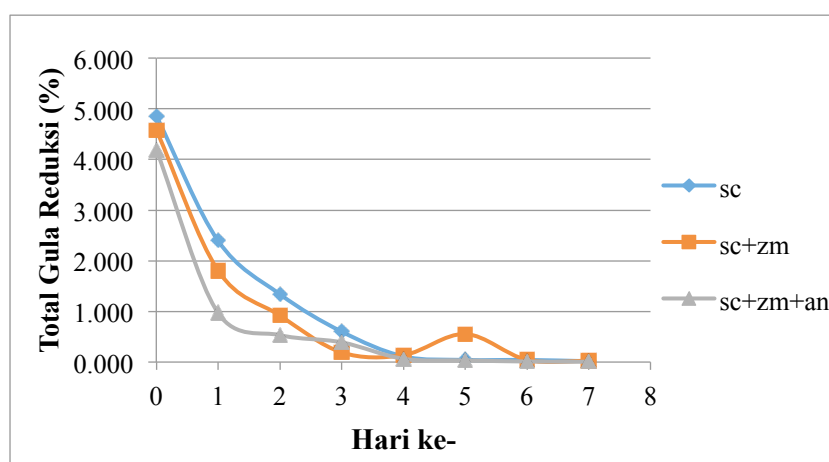
Hasil penelitian Harimbi dkk., (2010) analisis yang dilakukan terhadap hasil penelitian diperoleh hasil: kadar glukosa awal sari kulit nanas 8,53%, kadar glukosa tertinggi dari fermentasi adalah 8,42%, pada penambahan 30 g *Saccaromyces cerevisiae* dan waktu fermentasi 2 hari.

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) (Huzafah, 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 proses 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 relatif sama. 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 6. 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*

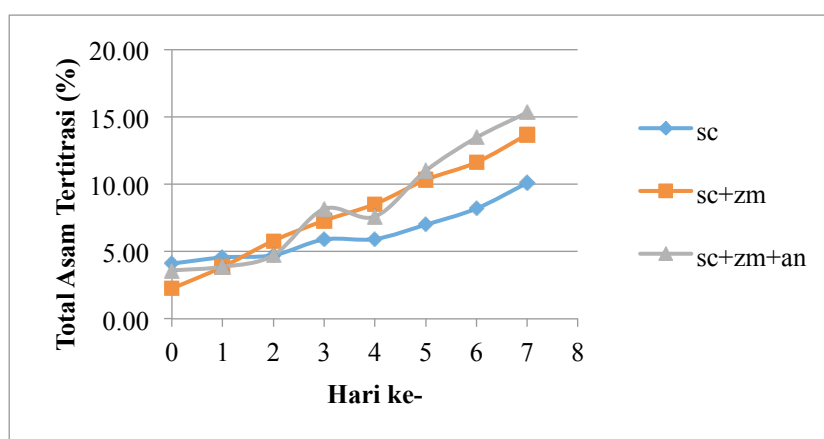
Hasil sidik ragam total asam dengan taraf nyata 5% (lampiran 4b) pada hari ke-3 menunjukkan pengaruh tidak signifikan terhadap total asam, dan tidak ada beda nyata dalam perlakuan. Hal tersebut menunjukkan bahwa fase etanol telah terlewati dan etanol perlahan-lahan berubah menjadi asam. Hasil rerata 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.

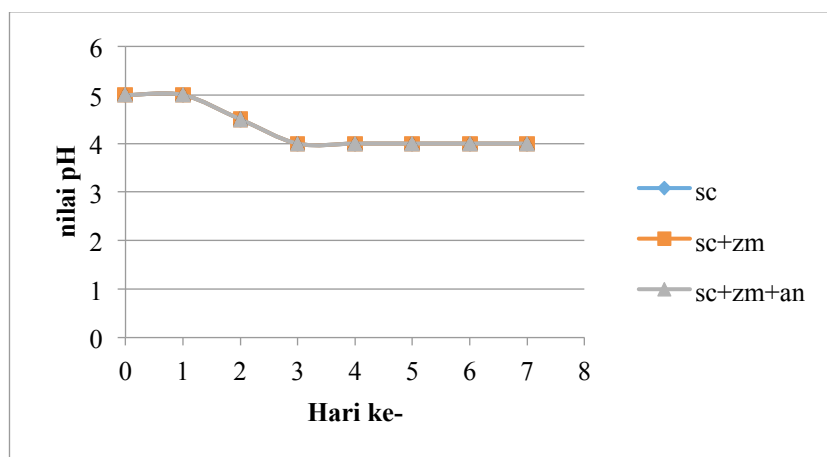
Secara keseluruhan dari grafik tersebut dapat diketahui peningkatan total asam dari hari ke hari. Hal ini menunjukkan terjadinya proses metabolisme mikroba yang menghasilkan asam asetat sebagai hasil samping dari proses metabolismenya. Kenaikan jumlah total asam ini menunjukkan bahwa fase pembentukan 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 kebasaaan 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 (CO_2), 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 7. Etanol dari Fermentasi Kulit nanas dengan satu tingkat

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

keterangan:

Sc : *Saccaromyces cereviciae*

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

Sc + Zm + An : *Saccaromyces cereviciae* + *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 cereviciae* menghasilkan volume destilat etanol 36 ml dengan satu tingkat destilasi, perlakuan *Saccharomyces cereviciae* + *Zymomonas mobilis* menghasilkan volume destilat etanol yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lain sebesar 41 ml dan perlakuan *Saccharomyces cereviciae* + *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 8. 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.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Penambahan mikroba *Aspergillus niger*, *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* berpengaruh dalam menghasilkan kadar etanol yang didapatkan dari fermentasi selama 7 hari dari limbah nanas.
2. Perlakuan terbaik didapatkan dari perlakuan *Saccaromyces cereviciae* dan *Zymomonas mobilis* dengan volume destilat 41 ml kadar etanol 9,3% dan rendemen etanol 13,6 (% v/v).

DAFTAR PUSTAKA

- Admianta, Noer Z dan Fitriani. 2001. "Pengaruh Jumlah *Yeast* Terhadap Kadar Alkohol Pada Fermentasi Kulit Nanas dengan Menggunakan Fermentor". Skripsi Mahasiswa Teknik ITN Malang.
- Agung_Astuti. Haryono dan M. H. Rachman. 2014. Pengujian Toleransi Terhadap Cekaman Kekeringan Pada Berbagai Varietas Padi Yang Diinokulasi *Rhizobakteri Indigenous* Merapi. Skripsi Mahasiswa Pertanian UMY (Tidak Dipublikasikan).
- Ahmad Tabah, Antonius Priyo U, 2010. "Pembuatan Bioetanol dari Sari Kulit Nanas". Program Studi DIII Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sebelas Maret Surakarta. pdf.
- Ahmad, A 2009. Teknologi Fermentasi, Diktat, Laboratorium Rekayasa Bioproses Teknik Kimia, Universitas Riau, Pekanbaru.
- Alico, D.H., "*Alkohol Fuels: Policies, Production and Potential*", West view press (Boulder), Colorado, 1982, 1-19;37-80
- Anna, P., Titin, S., dan P. Soemodimedjo. 2005. Dasar-Dasar Biokimia. Universitas Indonesia. Jakarta. 469 hal.
- Amalia MH, Prasmashinta A. 2013. Pembuatan Bioetanol dari Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Untuk Bahan Bakar Kompor Rumah Tangga Sebagai Upaya Mempercepat Konversi Minyak Tanah Ke Bahan Bakar Nabati. Jurnal Teknologi Kiiia dan Industri, 2 (2): 240-245.
- Andri. H., Sitinjak. R, Wira. H, Wibawa. G, dan Ali, 2009. Distilasi Terpadu Untuk Memisahkan campuran Azeotrope Sistem Etanol+Air. Prosiding SNTKI. Bandung.
- Anonim. 2011. Metode Analisis Etanol. <http://pkimorg1a.blogspot.com/2012/10/metode-Analisis-etanol.html>. Diakses tanggal 3 Agustus 2015.
- Anonim. 2015. Analisis Lemak. <https://rinaherowati.files.wordpress.com/2011/11/3-analisis-lemak.pdf>. Diakses tanggal 3 Agustus 2015.
- Anna, P., Titin, S., dan P. Soemodimedjo. 2005. Dasar-Dasar Biokimia. Universitas Indonesia. Jakarta. 469 hal.
- Armansyah. T.H, Hambali. E, Mujdalipah. S, Patriwi. W.A, dan Hendroko.R, 2007. Teknologi Bioenergi. PT Agro Medium Pustaka. Jakarta. eprints.undip.ac.id/32143/1/Rizki_Amalia_Herawati.pdf

- Arnata., I.W. 2009. Pengembangan Alternatif Teknologi Bioproses Pembuatan Bioetanol Dari Ubi Kayu Menggunakan *Trichoderma Viride*, *Aspergillus Niger* Dan *Saccharomyces Cerevisiae*. [http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31109050/2009iwa.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1429806254&Signature=QDgnex7U%2BvK7YekOwoVxKIWByBQ%3D&response-content disposition=inline](http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31109050/2009iwa.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1429806254&Signature=QDgnex7U%2BvK7YekOwoVxKIWByBQ%3D&response-content%20disposition=inline). Diakses tanggal 23 April 2015.
- Arum M.K, Nurhatika S, Muhibuddin A. 2015. Potensi Kapang *Aspergillus* sp. Dalam Proses Hidrolisis Untuk Produksi Etanol Dari Sampah Sayur Dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya. Jurnal. Pdf.
- Astuty ED. 1991. Fermentasi Etanol Kulit Buah Pisang. UGM, Yogyakarta. Diakses dari makalah Misgiyarta, 2012. Fermentasi Nata Dengan Substrat Limbah Buah Nanas Dan Air Kelapa. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Bogor. Hal 155-156.
- Elisabeth, S. 2012. bioethanol dari kulit nanas. <http://siskaelisabets.blogspot.com/2012/06/bioetanol-dari-kulit-buah-nanas.html>. Diakses tanggal 23 April 2015.
- Fardiaz, D. 1988. Pengenalan Proses Hulud Milk dalam Fermentasi Pangan Industrial. Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi, IPB.
- Febriyanti, L dan E. Rufita. 2011. Pembuatan Bioetanol Dari Limbah Kulit Nanas (*Ananas Comosus* L. Merr) Dengan Proses Enzimasi Dan Fermentasi, Skripsi, Institut teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Harahap, E. 2014. Makalah Pemanfaatan Kulit Nanas Jadi Bioetanol. <http://emmakhairaniharahap.blogspot.com/2014/06/makalah-pemanfaatan-kulit-nanas-jadi.html>. Diakses tanggal Desember 2014.
- Harimbi. S. dan Nanik. A.R. 2010. Bioetanol Dari Kulit Nanas Dengan Variasi Massa *Saccharomyces Cereviceae* Dan Waktu Fermentasi. Institut Teknologi Nasional, Malang.
- Mangasih, I. Tristiarti, W. Murningsih, M.H. Nasoetion, E.S. Jayanti dan Y. Astuti. 2004. Kecernaan Nutrien EcengGondok Yang Di Fermentasi Dengan *Aspergilus niger* Pada Ayam Broiler. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang
- Judoamidjojo M, Abdul AD, Endang GS. 1992. "Teknologi Fermentasi". Jakarta: Rajawali-Press. Hal 99.

- Julius S. 2009. Komposisi Bioremiator Bakteri Indigen Pereduksi Polutan Organik Limbah Cair Nanas (LCN). (Julius@ggpc.co.id). 21 Pebruari 2009. e-mail kepada Agus Sutanto(sutanto11@gmail.com). https://www.academia.edu/5368380/Deskripsi_KOMPOSISI_BIOREMEDIUMTOR_BAKTERI_INDIGEN_PEREDUKSI_POLUTAN_ORGANIK_LIMBAH_CAIR_NANAS_LCN_. Diakses tanggal 22 Oktober 2015.
- Kurniawan R. 2014. Analisa Karbohidrat Secara Kualitatif dan Kuantitatif. <http://ricky-kurniawan-20-12-1993.blogspot.com/2014/04/analisis-protein-secara-kualitatif-dan.html>. Diakses tanggal 3 Agustus 2015.
- Kumalasari, I. J. 2011. Pengaruh Variasi Suhu Inkubasi terhadap Kadar Etanol Hasil Fermentasi Kulit dan Bonggol Nanas (*Ananas sativus*). Skripsi. Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang. (Diperoleh dari jurnal N. Azizah, A. N. Al-Baarri, S. Mulyani. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, Dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. Vol 1. N0-2. 74 hal).
- Lia. 2012. Pembuatan Bioetanol dari Limbah Kulit Kakao melalui Proses Fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dan *Zimomonas mobilis*. Yogyakarta. 64 hal.
- Lily Surayya EP dan Fachruraji. 2011. Optimasi Produksi Bioetanol Dari Ubi Kayu (*Manihot utilissima* POHL) Menggunakan *Aspergillus niger* Dan *Rhizopus oryzae*. Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus: 4C (87–90).
- Lehninger, Albert. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga: Jakarta. 369 hal.
- Maiorella, B., Ch. R. Wilke, dan H.W. Blanch, “*Alkohol Production and Recovery*”, Biotech. Bioeng., 1981, p 44-48.
- Mahar. J.M. 2014. Analisis Karbohidrat. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang. Pdf.
- Mohammad I. Y, Ishak I, Hendri I. 2016. Pembuatan Bioetanol Berbasis Sampah Organik Batang Jagung. Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Matematika dan IPA. Universitas Negeri Gorontalo. pdf
- Muluk, Mizanul dan Ghuzrina Prihandini. 2010. Pemanfaatan Molasses menjadi Vinegar dengan Proses Fermentasi Menggunakan *Zymomonas mobilis* dan *Acetobacter aceti*. <http://digilib.its.ac.id/public/ITS-NonDegree-13709-2307030052-Presentation1.pdf>. Diakses tanggal 11 Maret 2016.
- Muljohardjo, M. 1984. Nanas dan Teknologi Pengolahannya. Liberty. Yogyakarta. Hal 120-121.

- Munir, M. Pemanfaatan limbah kulit buah nanas. 2013. <http://www.situsmesin.net/situsmesin/item/55569pemanfaatan-limbah-kulit-buah-nanas>. Diakses tanggal 23 April 2015
- Nugroho A. Efendi E. Wongso L. 2008. Produksi Etanol Dari Limbah Padat Tapioka Dengan *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae*. <http://ced.petra.ac.id/index.php/jtl/article/view/17556>. Diakses pada tanggal 27 Juli 2015
- Oktaviani, R., Chairul., Amraini.,S.Z., 2015. Produksi Etanol Dari Limbah Kulit Nanas Dengan Metode Solid State Fermentation (Ssf) Terhadap Variasi Waktu Dan Variasi Ukuran Partikel Substrat. https://www.academia.edu/7574796/produksi_etanol_dari_limbah_kulit_nanas_dengan_metode_solid_state_fermentation_ssf_terhadap_variasi_waktu_dan_variasi_ukuran_partikel_substrat. Diakses tanggal 23 April 2015
- Prahesti H. 2014. Analisis Kadar Abu. file:///G:/Coretanku%20_%20Analisis%20Kadar%20Abu.html. Diakses tanggal 3 Agustus 2015.
- Rahayu dan Rahayu, 1998. Distilasi. Agroindustrialtechnologydotcom.wordpress.com/2013/05/18/pemanfaatan-limbah-kulit-nanas. Diakses tanggal 20 Mei 2013.
- Rizani KZ. 2000. “Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi dan Inokulum (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Proses Fermentasi Sari Kulit Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) untuk Produksi Etanol”. Skripsi, Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. (Diperoleh dari Penelitian Harimbi. S. dan Nanik. A.R. 2010. Bioetanol Dari Kulit Nanas Dengan Variasi Massa *Saccharomyces Cereviceae* Dan Waktu Fermentasi. Institut Teknologi Nasional, Malang).
- Roukas T. 1996. “Continuous Bioetanol Production from Nonsterilized Carob Pod Extract by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on Mineral Kissiris Using A Two- reactor System”, Journal Applied Biochemistry and Biotechnology, 59 (3):
- Rogers, P.L., Jeon, Y.J., Lee, dan K.J., Lawford, H.G., 2007, *Zymomonas Mobilis* For Fuel Ethanol and Higher Value Products. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.
- Kunaepah, Uun. (2008). “Pengaruh Lama Konsentrasi dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah”. Tersedia pada:http://pdfsearchpro.com/pengaruh_lama_fermentasi_dan_konsentrasi_glukosa_terhadap_pdf.html (Penelitian Harimbi dkk, 2010)

- Sebayang, F. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/15407/1/tkp-jul2006-%20%282%29.pdf>. Diakses tanggal 23 April 2015
- Setyawati, H dan N.A Rahman. 2010. Bioetanol Dari Kulit Nanas Dengan Variasi Massa *Saccharomyces Cereviceae* Dan Waktu Fermentasi, Skripsi, Institut Teknologi Nasional, Malang.
- Setyo G., Nur A., dan Lina I. K.. 2012. Pembuatan MOCAF (*Modified Cassava Flour*) Dengan Proses Fermantasi Menggunakan *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cereviseae*, dan *Rhizopus oryzae*. Surabaya: Teknik Kimia, ITS. Hal 6.
- Sudjata. 1997. Proses destilasi."Ethanol". Encyclopedia of chemical technology 9. 1991. p. 813.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhandi. 2004. Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Edisi II. Bandung: Penerbit Alumni. file:///G:/Chorie's%20Blog_%20analisis%20serat%20kasar.html. Diakses tanggal 3 Agustus 2015
- Sudarmadji S., Bambang H., dan Suhardi. 2007. Analisis Bahan Makanan dan Pertanian. Yogyakarta. Liberty Yogyakarta hal 142-145.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi.1996. *Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty dan PAU Pangan dan Gizi UGM. [file:///G:/Coretanku%20_\)_%20Analisis%20Kadar%20Abu.html](file:///G:/Coretanku%20_)_%20Analisis%20Kadar%20Abu.html). Diakses tanggal 3 Agustus 2015.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi.1984. *Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Edisi ketiga. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Slamet, Sudarmadji, Bambang,H., dan Suhardi. 2003. Analisis Bahan Makanan dan Pertanian.172 hal.
- Swiss. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* dalam Industri Bioetanol <http://swiss8910.blogspot.com/2011/03/saccharomyces-cerevisiae-dalam-industri.html>. Diakses tanggal 23 April 2015

- Tanate. T. S., Putra., S.R. 2015. Pembuatan Etanol Menggunakan *Zymomonas Mobilis* Pada Kondisi Steril Dan Nonsteril Dengan Memanfaatkan Limbah Padat Pabrik Rokok Kretek Sebagai Substrat., <http://digilib.its.ac.id/public/ITS-Master-10944-Paper.pdf>. Diakses tanggal 23 April 2013.
- Timotius. 1982. Mikrobiologi Dasar. Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga. 205 hal.
- Widayatnim. 2015. Bioetanol. Digilib.itb.ac.id. Diakses tanggal 23 Juni 2016.
- Wignyanto dkk. 2001. Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum *Saccharomyces Cerevisiae* pada Fermentasi Etanol. Jurnal Teknologi Pertanian 2 (1).
- Wikipedia. 2013a. Bioethanol. [Id.wikipedia.org/wiki/Bioethanol](http://id.wikipedia.org/wiki/Bioethanol). Diakses tanggal 20 Mei 2013.
- Wikipedia. 2013b. Nanas. [Id.wikipedia.org/wiki/Nanas](http://id.wikipedia.org/wiki/Nanas). Diakses pada tanggal 20 Mei 2013.
- Wikipedia. 2013c. Etanol. <http://id.wikipedia.org/wiki/Etanol>. Diakses tanggal 20 Mei 2013.
- Windholz, Martha. 1976. The Merck index: an encyclopedia of chemicals and drugs (9th ed.). Rahway, N.J., U.S.A: Merck. ISBN 0-911910-26-3.
- Wulan. 2013. Peran *Zymomonas Mobilis* Dalam Pemanasan Global. <http://wulanhm.blogspot.com/2013/12/peran-zymomonas-mobilis-dalam-pemanasan.html>. Diakses tanggal 23 April 2015.

LAMPIRAN

Lampiran 1. *Lay out* penelitian

i. *Layout* peneltian

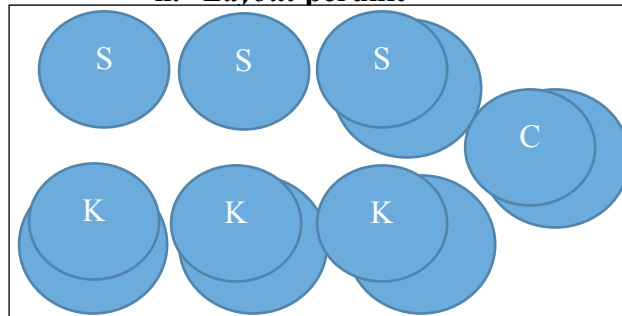
A 1	A3	B3
B2	C1	B1
C3	A2	C2

Ket: A: *S. Cerevicae* + kulit nanas

B : *S. Cerevicae* + *Zymomonas m* + kulit nanas

C : *S. Cerevicae* + *Zymomonas m*+ *Aspergillus n* + kulit nanas

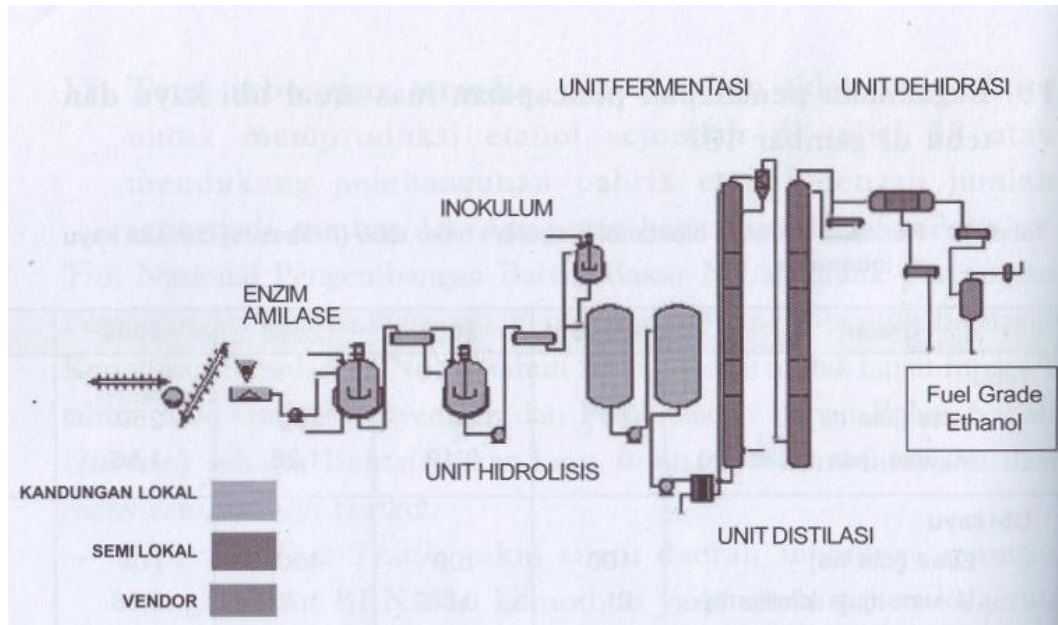
ii. *Layout* perunit

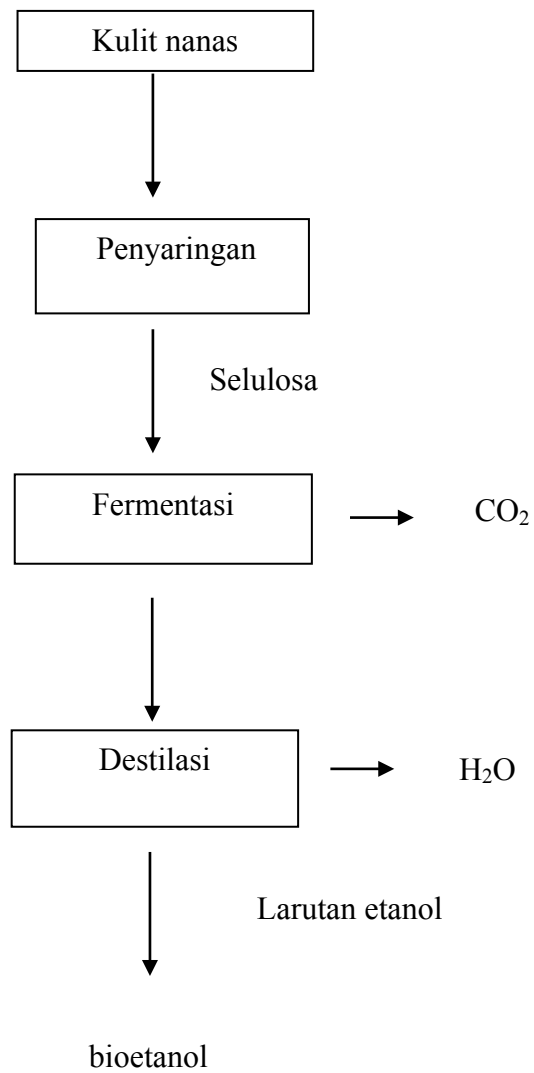


Keterangan : S = Sampel

K = Korban

C = Cadangan

Lampiran 2. Gambar Pembuatan bioetanol

Lampiran 3. Skema pembuatan bioethanol dari kulit nanas

Gambar diagram alir proses pemuatan bioetanol

Lampiran 4. Analisis Sidik Ragam

a. Analisis Sidik Ragam Gula Reduksi Hari ke-3

Sumber	DF	JK	KT	F Hitung	Prob>F
Model	2	0,16803121	0,08401560	7636,63	<,0001 s
Galat	3	0,00003301	0,00001100		
Total	5	0,16806421			

Ns: perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil gula reduksi pada taraf nyata 5%

S : perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil gula reduksi dan terdapat beda nyata antar perlakuan pada taraf nyata 5%

b. Analisis Sidik Ragam Total Asam Hari ke-3

Sumber	DF	JK	KT	F Hitung	Prob>F
Model	2	7,84888889	3,92444444	2,61	0,1530 ns
Galat	6	9,02666667	1,50444444		
Total	8	16,87555556			

Ns: perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil total asam pada taraf nyata 5%

S : perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil total asam dan terdapat beda nyata antar perlakuan pada taraf nyata 5%

c. Analisis Sidik Ragam Gula Reduksi Hari ke-7

Sumber	DF	JK	KT	F Hitung	Prob>F
Model	2	0,00031765	0,00015883	7,64	0,0665ns
Galat	3	0,00006237	0,00002079		
Total	5	0,00038002			

Ns: perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil gula reduksi pada taraf nyata 5%

S : perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil gula reduksi dan terdapat beda nyata antar perlakuan pada taraf nyata 5%

d. Analisis Sidik Ragam Total Asam Hari ke-7

Sumber	DF	JK	KT	F Hitung	Prob>F
Model	2	43,01555556	21,50777778	9,82	0,0128s
Galat	6	13,14666667	2,91111111		
Total	8	56,16222222			

Ns: perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil total asam pada taraf nyata 5%

S : perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap hasil total asam dan terdapat beda nyata antar perlakuan pada taraf nyata 5%

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

1. Persiapan penelitian



a. Kulit nanas

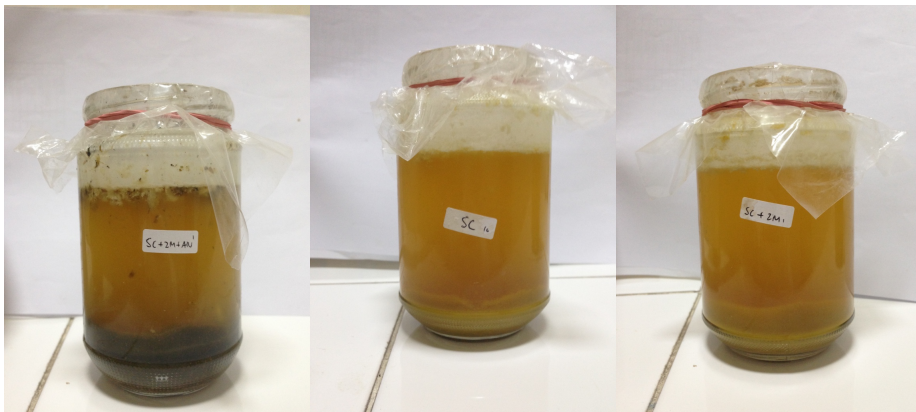


b. Proses pemilahan kulit nanas



c. sari kulit nanas

2. Proses fermentasi



a. Fermentasi Kulit nanas selama 7 hari

3. Uji parameter



a. total asam



b. uji pH



c. Uji mikrobiologi

