

## PENGARUH LAMA FERMENTASI TERHADAP KADAR ALKOHOL, pH, DAN PRODUKSI GAS PADA PROSES FERMENTASI BIOETANOL DARI WHEY DENGAN SUBSTITUSI KULIT NANAS

N. Azizah, A. N. Al-Baarri, S. Mulyani

**ABSTRAK:** Penelitian dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH, dan produksi gas pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas telah dilakukan. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan yaitu T1, T2, T3, T4, dan T5, yang masing-masing adalah lama fermentasi 12, 24, 36, 48, dan 60 jam. Ulangan dilakukan sebanyak 4 kali untuk masing-masing perlakuan. Data diolah dengan menggunakan ANOVA, apabila ada pengaruh dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan. Hasil Penelitian menunjukkan lama fermentasi berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap pH tetapi tidak menunjukkan pengaruh ( $P > 0,05$ ) terhadap kadar alkohol dan produksi gas. Kesimpulan, lama fermentasi berpengaruh menurunkan nilai pH, tetapi tidak berpengaruh meningkatkan kadar alkohol dan produksi gas.

Kata kunci: whey, bioetanol, kadar alkohol, pH, produksi gas.

### PENDAHULUAN

Kebutuhan dan konsumsi masyarakat akan Bahan Bakar Minyak (BBM) yang semakin meningkat dari tahun ke tahun berbanding terbalik dengan ketersediaannya. Di Jawa Tengah misalnya, suplai BBM dari tahun ke tahun menurun meskipun angkanya relatif tetap. Menurut Badan Pusat Statistik Jawa Tengah jumlah total penyaluran BBM pada tahun 2006 adalah 4.202.246 kL kemudian pada tahun 2008 mengalami penurunan yang tidak signifikan menjadi 4.204.353 kL dan pada tahun 2010 juga mengalami penurunan menjadi 4.010.695 kL. Menurunnya total suplai bahan bakar minyak tersebut salah satunya dikarenakan sumber penghasil BBM yaitu fosil semakin lama semakin berkurang.

Salah satu upaya untuk mengurangi konsumsi masyarakat terhadap BBM adalah dengan memanfaatkan energi alternatif terbarukan seperti yang tertuang dalam Peraturan Presiden (Perpres) Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2006 tentang Kebijakan Energi Nasional, adalah melalui pengembangan energi terbarukan berbasis nabati atau sering disebut Bahan Bakar Nabati (BBN). Tidak hanya mengeluarkan Perpres no. 5 tahun 2006, tetapi pemerintah juga menargetkan pada tahun 2016 pemanfaatan BBN bisa mencapai angka 5%. Salah satu contoh bahan bakar berbasis nabati adalah bioetanol. Saat ini sudah banyak ditemukan pemanfaatan bioetanol sebagai bahan campuran (aditif) dari bensin yang sering disebut dengan gasohol E-10. Gasohol E-10 merupakan campuran antara bensin dengan 10% bioetanol murni. Gasohol E-10 memiliki angka oktan 92 yang hampir setara dengan pertamax yang memiliki nilai oktan 92-95. Oleh karena itu sangatlah mungkin jika bioetanol dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif pensubstitusi

BBM yang ramah lingkungan karena hasil pembakarannya hanya menghasilkan  $H_2O$  dan  $CO_2$ .

Bioetanol dapat dibuat dari bahan yang mengandung gula sederhana, pati, maupun bahan berserat melalui proses fermentasi. Masing-masing bahan berbeda cara pengolahannya untuk bisa dijadikan bioetanol. Menurut Retno dan Nuri (2011), produksi bioetanol dengan menggunakan bahan berpati harus diawali dengan proses pemecahan pati menjadi gula sederhana atau glukosa melalui metode hidrolisis asam atau enzimatis. Whey merupakan hasil samping dari proses pengolahan keju. Di Indonesia whey umumnya tidak dimanfaatkan sehingga menjadi limbah yang dapat merusak lingkungan. Padahal, whey masih mengandung komponen-komponen yang penting diantaranya adalah laktosa. Laktosa merupakan gula sederhana sehingga dalam proses produksi bioetanol dari whey tidak membutuhkan proses hidrolisis. Untuk mengkonversi laktosa whey menjadi bioetanol dibutuhkan mikroorganisme. Mikroorganisme yang umumnya digunakan dalam proses produksi bioetanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan mikroorganisme lain yang dapat memproduksi bioetanol. Kelebihan tersebut antara lain lebih mudah beradaptasi dengan lingkungan, lebih tahan terhadap kadar alkohol tinggi, dan lebih mudah didapat.

Whey dapat dikonversi menjadi bioetanol, tetapi kadar etanol yang dihasilkan rendah. Ini disebabkan karena kandungan laktosa di dalam whey hanya sekitar 4 - 5%. Oleh karena itu perlu adanya bahan substitusi whey agar kandungan gula dalam substrat cukup untuk dapat dikonversi menjadi bioetanol. Kulit nanas yang merupakan limbah buah nanas ataupun limbah industry nanas berpotensi untuk dijadikan bahan substitusi whey karena kandungan gula didalamnya cukup tinggi yaitu sekitar 12%.

Lama fermentasi pada proses produksi bioetanol sangat mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi kadar

---

*Dikirim 30/6/2012, diterima 29/8/2012. Penulis N. Azizah adalah dari Magister Ilmu Ternak, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Penulis A. N. Al-Baarri dan S. Mulyani adalah dari Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Kontak langsung pada penulis: N. Azizah (zizay@student.undip.ac.id)*

---

bioetanol yang dihasilkan. Jika bioetanol yang terkandung di dalam substrat tinggi maka hal ini justru akan berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Karena pada kadar alkohol 2,5% pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* akan terhambat. Hanya *Saccharomyces cerevisiae* strain tertentu saja yang dapat bertahan pada kadar alkohol 2,5-5%. Oleh karena itu dibutuhkan lama fermentasi yang tepat untuk proses fermentasi bioetanol agar didapatkan kadar etanol dalam jumlah yang tinggi, nilai pH rendah, dan produksi gas yang tinggi tetapi tidak mengganggu pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH dan produksi gas selama proses fermentasi bioetanol dengan substrat whey yang disubstitusi dengan kulit nenas. Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah dapat diperoleh lama fermentasi yang paling optimal dalam fermentasi bioetanol dengan substrat whey yang disubstitusi dengan kulit nenas.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan November-Desember 2011 di Laboratorium Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang.

### Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah whey jenis *acid whey* yang didapat dari perusahaan keju "Baros" cabang Salatiga, kulit nenas, ragi roti komersil dengan merk Fermipan, gula, aquades, aluminium foil, alkohol 70%. Peralatan yang digunakan adalah *filtering flask* 1500 ml, gelas ukur, beker gelas, klip, *magnetic stirrer*, inkubator, *autoclave*, timbangan analitik, piknometer, pH meter, dan bunsen.

### Metode

Penelitian yang telah dilaksanakan menggunakan perlakuan monofaktor yaitu lama fermentasi dengan lingkungan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan respon yang diamati adalah kadar alkohol, pH, dan produksi gas. Perlakuan yang diberikan dibagi dalam 5 taraf dengan ulangan sebanyak 4 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA dan jika terdapat perbedaan maka dilakukan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan. Adapun taraf perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut:

- T1 = lama fermentasi 12 jam
- T2 = lama fermentasi 24 jam
- T3 = lama fermentasi 36 jam
- T4 = lama fermentasi 48 jam
- T5 = lama fermentasi 60 jam

**Persiapan substrat.** Substrat adalah media pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*, berbentuk cair yang di dalamnya mengandung nutrisi untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, maka

substrat yang digunakan dalam penelitian utama adalah whey yang disubstitusi dengan kulit nenas dengan perbandingan 1:1. Substrat yang terdiri dari 500 ml whey dan 500 gram kulit nenas disiapkan di dalam *filtering flask* 1500 ml. Sebelum dimasukkan dalam *filtering flask*, substrat dipasteurisasi pada suhu 70°C selama 30 menit. Setelah itu, whey dan kulit nenas dicampur sampai homogen (Tipteerasi *et al.*, 2009 termodifikasi).

**Penyiapan starter.** Starter yang digunakan adalah ragi roti dengan merk Fermipan yang ditumbuhkan dalam substrat pertumbuhan. substrat pertumbuhan terdiri dari 1000 ml aquades yang ditambahkan dengan 100 gram gula pasir (konsentrasi gula 10%) yang disiapkan di dalam gelas beker (Elevri dan Putra 2006 termodifikasi). Setelah semua bahan dimasukkan, kemudian dihomogenkan terlebih dahulu dengan *magnetic stirrer* kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Substrat ditunggu hingga dingin. Setelah dingin, sampai kira-kira mencapai suhu 30-33°C, 50 gram Fermipan dimasukkan ke dalam substrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 8 jam (Tipteerasi *et al.*, 2009 termodifikasi).

**Inokulasi starter.** Setelah *starter* diinkubasi selama 8 jam, maka *starter* tersebut siap untuk diinokulasikan di dalam substrat fermentasi. Inokulasi *starter* baik dilakukan setelah *starter* diinkubasi selama 8 jam. Hal ini didasarkan pada asumsi bahwa setelah 8 jam, *Saccharomyces cerevisiae* telah mengakhiri fase logaritmik. Akhir fase logaritmik ditandai dengan adanya perlambatan pertumbuhan dan peningkatan kemampuan metabolisme (Held, 2010). *Starter* dimasukkan dalam medium fermentasi pada kondisi yang aseptis. Jumlah *starter* yang dimasukkan adalah sebanyak 10% (Tipteerasi *et al.*, 2009).

**Proses fermentasi.** Setelah sejumlah 10% *starter* diinokulasikan ke dalam substrat fermentasi dalam keadaan yang aseptis maka proses selanjutnya adalah melakukan fermentasi substrat yang telah diinokulasi dengan *starter*. Proses fermentasi dilakukan di dalam ruangan khusus yang suhunya diatur agar tetap memenuhi persyaratan optimal pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae*. Proses fermentasi dilaksanakan selama 60 jam dan setiap 12 jam sekali dilakukan pengujian terhadap kadar alkohol, pH dan produksi gas (Richana, 2011 termodifikasi). Pengujian kadar alkohol diawali dengan proses destilasi.

**Variabel penelitian.** Variabel yang diamati dalam penelitian adalah kadar alkohol, pH, dan produksi gas. Prosedur penetapan variabel-variabel tersebut dijelaskan lebih lanjut seperti di bawah ini.

**Prosedur pengujian kadar alkohol.** Prosedur pengujian kadar alkohol dilakukan dengan metode piknometer sesuai dengan petunjuk Putri dan Sukandar (2008), pertama-tama sampel sebanyak 100 ml dimasukkan ke dalam labu destilasi Kjeldahl kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak

100 ml. Selanjutnya didestilasi pada suhu 80°C. Destilat ditampung di dalam *erlenmeyer* hingga volume 50 ml. Destilat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam piknometer yang telah ditimbang sebelumnya. Destilat dimasukkan hingga memenuhi piknometer. Kelebihan destilat pada puncak pipa kapiler dibersihkan. Piknometer yang berisi destilat ditimbang dan beratnya dicatat. Prosedur yang sama dilakukan pada aquades sebagai pembanding. Berat jenis alkohol dihitung dari (berat piknometer + destilat) dikurangi berat piknometer kosong kemudian dibagi (berat piknometer + aquades) dikurangi berat piknometer kosong. Hasil penghitungan berat jenis alkohol kemudian dikonversikan dengan menggunakan tabel konversi BJ alkohol.

**Prosedur pengujian pH.** Prosedur pengujian pH dilakukan dengan mengukur suhu sampel terlebih dahulu kemudian mengatur suhu pH meter pada suhu terukur. pH meter dihidupkan dan dibiarkan agar stabil selama 15-30 menit. Elektroda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu. Kemudian elektroda dicelupkan pada sampel sampai diperoleh pembacaan skala yang stabil (Richana, 2011).

**Prosedur pengukuran produksi gas.** Prosedur pengukuran produksi gas dilakukan dengan cara menghitung penurunan air yang ada di dalam gelas ukur 250 ml. Alat untuk mengukur volume gas yang keluar selama proses pembuatan bioetanol ini adalah suatu rangkaian yang terdiri dari *filtering flask* 1500 ml yang dihubungkan dengan gelas ukur 500 ml yang posisinya terbalik melalui selang. Gelas ukur tersebut diisi dengan air (volume awal). Kemudian karena adanya produksi gas maka air yang ada di dalam gelas ukur akan mengalami penurunan. Volume air pada saat pengukuran produksi gas merupakan volume akhir. Besarnya produksi gas dapat diukur dengan menghitung selisih volume awal dan volume akhir. Produksi gas dinyatakan dalam satuan ml (Datar *et al.*, 2004 termodifikasi).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian, data rerata nilai Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas setiap perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata Nilai Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas

Perlakuan	Kadar Alkohol (%) <sup>ns</sup>	pH	Produksi Gas (L) <sup>ns</sup>
T1	1,25	3,70 <sup>b</sup>	0,16
T2	2,04	3,72 <sup>b</sup>	0,26
T3	2,25	3,86 <sup>a</sup>	0,29
T4	1,71	3,60 <sup>b</sup>	0,44
T5	1,21	3,50 <sup>c</sup>	0,51

Keterangan: ns= tidak signifikan; Superskrip huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan adanya perbedaan ( $P < 0,05$ ).

### Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Alkohol

Berdasarkan perhitungan sidik ragam diketahui bahwa perlakuan lama fermentasi (12, 24, 36, 48, 60 jam)

tidak berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol whey dengan substitusi kulit nanas. Data rerata Kadar Alkohol dari bioetanol whey dengan substitusi kulit nanas pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Pada penelitian ini, didapatkan hasil bahwa lama fermentasi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar alkohol. Fermentasi selama 60 jam menghasilkan kadar alkohol yang berkisar antara 1,21-2,25%. Penelitian mengenai bioetanol telah banyak dilakukan sebelumnya dan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Sebagai contoh penelitian yang dilakukan oleh Kumalasari (2011), dengan menggunakan substrat kulit nanas kemudian difermentasi dengan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) selama 4 hari pada suhu 24-33°C menghasilkan kadar alkohol yang berkisar antara 4,18-5,49%. Hal ini menunjukkan bahwa, lama fermentasi pada penelitian ini, belum mencapai waktu yang optimal. Di sisi lain Sari *et al.* (2008), menyatakan bahwa lama fermentasi yang paling optimal untuk proses pembuatan bioetanol adalah 3 hari. Jika fermentasi dilakukan lebih dari 3 hari, justru kadar alkoholnya dapat berkurang. Berkurangnya kadar alkohol disebabkan karena alkohol telah dikonversi menjadi senyawa lain, misalnya ester.

Lama fermentasi dipengaruhi oleh faktor-faktor yang secara langsung maupun tidak langsung berpengaruh terhadap proses fermentasi. Menurut Kunaepah (2008), ada banyak faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain substrat, suhu, pH, oksigen, dan mikroba yang digunakan.

Substrat merupakan bahan baku fermentasi yang mengandung nutrient-nutrien yang dibutuhkan oleh mikroba untuk tumbuh maupun menghasilkan produk fermentasi. Nutrient yang paling dibutuhkan oleh mikroba baik untuk tumbuh maupun untuk menghasilkan produk fermentasi adalah karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai penghasil energi bagi mikroba, sedangkan nutrient lain seperti protein dibutuhkan dalam jumlah lebih sedikit daripada karbohidrat. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah whey yang disubstitusi dengan kulit nanas. Whey mengandung karbohidrat dari jenis laktosa, sedangkan kulit nanas mengandung karbohidrat jenis fruktosa, dan sukrosa. Dari hasil uji total gula, kandungan gula pada whey dan kulit nanas masing-masing adalah 4,21% dan 12,13%. Gula-gula tersebut kemudian akan dikonversi menjadi bioetanol dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengkonversi gula menjadi etanol karena adanya enzim invertase dan zimase. Dengan adanya enzim-enzim ini *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan untuk mengkonversi baik gula dari kelompok monosakarida maupun dari kelompok disakarida. Jika gula yang tersedia dalam substrat merupakan gula disakarida maka enzim invertase akan bekerja menghidrolisis disakarida menjadi monosakarida. Setelah itu, enzim zymase akan mengubah monosakarida tersebut menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub>. Hal ini sesuai dengan pernyataan Judoamidjojo *et al.* (1992), yang menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan etanol yang berasal dari fermentasi gula. Gula akan diubah menjadi bentuk yang paling sederhana oleh

enzim invertase baru kemudian gula sederhana tersebut akan dikonversi menjadi etanol dengan adanya enzim zymase. Kedua enzim tersebut dihasilkan oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Meskipun *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengubah gula sederhana menjadi etanol, Namun sejumlah penelitian menyebutkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* tidak mampu mengkonversi galaktosa menjadi etanol. Sehingga dalam proses fermentasi bioetanol dari sumber laktosa, hanya glukosa saja yang diubah menjadi etanol. Hal ini diungkapkan oleh O'leary *et al.* (2004), yang menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* menghidrolisis laktosa whey menjadi glukosa dan galaktosa. Kemudian glukosa akan dikonversi menjadi etanol sedangkan galaktosa tidak mampu diubah menjadi etanol. Hal yang sama juga diungkapkan oleh Rubio dan Texeira (2005), yang menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* lebih mampu beradaptasi dalam substrat yang mengandung glukosa daripada galaktosa.

Suhu fermentasi mempengaruhi lama fermentasi karena pertumbuhan mikroba dipengaruhi suhu lingkungan fermentasi. Mikroba memiliki kriteria pertumbuhan yang berbeda-beda. Menurut Fardiaz (1992), *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kisaran suhu pertumbuhan antara 20-30°C. Tetapi Kumalasari (2011), menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* akan tumbuh optimal dalam kisaran suhu 30-35°C dan puncak produksi alkohol dicapai pada suhu 33°C. Jika suhu terlalu rendah, maka fermentasi akan berlangsung secara lambat dan sebaliknya jika suhu terlalu tinggi maka *Saccharomyces cerevisiae* akan mati sehingga proses fermentasi tidak akan berlangsung.

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu faktor penting yang perlu untuk diperhatikan pada saat proses fermentasi. pH mempengaruhi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Oleh karena itu, pada awal pelaksanaan penelitian, substrat yang akan dipakai terlebih dahulu diuji pH nya. Berdasarkan hasil uji pH, pH whey dan kulit nanas masing-masing adalah 4,50 dan 4,20. 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. Ditambahkan oleh Elevri dan Putra (2006), bahwa produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* paling maksimal dapat dicapai pada pH 4,5.

Oksigen secara tidak langsung mempengaruhi lama fermentasi yang dilakukan oleh *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik pada kondisi aerob, tetapi untuk melakukan proses fermentasi alkohol, dibutuhkan kondisi anaerob. Proses fermentasi dilakukan di dalam *filing flask* 1000 ml yang ditutup rapat. Sehingga hal ini memberikan kondisi anaerob. Menurut Kunaepah (2008), *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh dengan baik pada kondisi aerob. Pada kondisi aerob *Saccharomyces cerevisiae* menghidrolisis gula menjadi air dan CO<sub>2</sub>, tetapi dalam keadaan anaerob gula akan diubah oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub>. Ditambahkan oleh Richana (2011), jika tujuan penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* adalah untuk menghasilkan

alkohol maka dibutuhkan kondisi anaerob, tetapi untuk pembuatan starter (biakan awal) diperlukan kondisi aerob.

Mikroba sebagai pelaku fermentasi tentu sangat berpengaruh terhadap lama fermentasi. Dalam fermentasi alkohol umumnya digunakan khamir karena khamir dapat mengkonversi gula menjadi alkohol dengan adanya enzim zimase. Dalam penelitian ini, mikroba yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut O'leary *et al.* (2004), *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir yang biasa digunakan dalam fermentasi alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan mikroba lain yang juga dapat membentuk alkohol. *Kluyveromyces fragilis* juga merupakan khamir yang dapat memproduksi alkohol. tetapi, *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengkonversi gula lebih cepat daripada *Kluyveromyces fragilis*. Dalam 72 jam *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan alkohol hingga 2% sedangkan *Kluyveromyces fragilis* membutuhkan waktu hingga 1 minggu untuk dapat memproduksi etanol hingga 2%. Namun, *Saccharomyces cerevisiae* tidak dapat memanfaatkan galaktosa. Hal tersebut juga diungkapkan oleh Rubio dan Texeira (2005), *Saccharomyces cerevisiae* akan menggunakan glukosa sebagai sumber karbonnya daripada galaktosa.

Lama fermentasi juga berkaitan dengan pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae*. Seperti mikroorganisme yang lain, pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae* dapat digambarkan dengan kurva pertumbuhan yang menunjukkan masing-masing fase pertumbuhan. Ada 4 fase pertumbuhan yang meliputi fase adaptasi, fase tumbuh cepat, fase stasioner, dan fase kematian. Fase adaptasi digambarkan dengan garis kurva dari keadaan nol kemudian sedikit ada kenaikan. Di dalam fase ini *Saccharomyces cerevisiae* mengalami masa adaptasi dengan lingkungan dan belum ada pertumbuhan. Fase tumbuh cepat yang digambarkan dengan garis kurva yang mulai menunjukkan adanya peningkatan yang tajam. Pada fase ini *Saccharomyces cerevisiae* mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Di dalam fase ini terjadi pemecahan gula secara besar-besaran guna memenuhi kebutuhan pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil pemecahan gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* dalam keadaan anaerob menghasilkan alkohol. Kemungkinan dihasilkan alkohol paling tinggi pada fase ini. Fase stasioner digambarkan dengan garis kurva mendatar yang menunjukkan jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang hidup sebanding dengan jumlah yang mati. Fase kematian digambarkan dengan penurunan garis kurva. Pada fase ini jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang mati jumlahnya lebih banyak sampai akhirnya semua *Saccharomyces cerevisiae* mati.

#### Pengaruh Lama Fermentasi terhadap pH Bioetanol

Berdasarkan perhitungan sidik ragam diketahui bahwa perlakuan lama fermentasi (12, 24, 36, 48, 60 jam) berpengaruh nyata terhadap nilai pH bioetanol whey dengan substitusi kulit nanas. Perlakuan lama fermentasi 36

jam mempunyai nilai pH paling rendah. Data rerata pH bioetanol pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Nilai pH dipengaruhi oleh produk yang dihasilkan selama proses fermentasi. Dalam penelitian ini, produk fermentasi yang dihasilkan adalah alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* bersifat homofermentatif, sehingga produk fermentasi yang dihasilkan hanya alkohol. Alkohol bersifat asam. Sehingga ketika waktu fermentasi ditambah maka akan semakin banyak alkohol yang terbentuk. Kondisi ini menyebabkan pH substrat semakin rendah. Substrat yang terdiri dari whey yang disubstitusi dengan kulit nanas masing-masing memiliki pH 4,50 dan 4,20. Menurut Irfandi (2005), pH awal substrat perlu diketahui agar fermentasi dapat berlangsung secara optimal. Elevri dan Putra (2006), menambahkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* dapat melakukan fermentasi secara optimal pada pH 4,5.

Proses fermentasi bioetanol tidak hanya menghasilkan etanol tetapi juga hasil samping (*by product*) yang berupa gas CO<sub>2</sub>. Seiring meningkatnya lama fermentasi, produksi gas CO<sub>2</sub> juga semakin bertambah meskipun hasilnya tidak signifikan. Peningkatan produksi gas ternyata juga diikuti dengan penurunan nilai pH. Hal ini dapat dilihat pada akhir fermentasi yaitu pada jam ke-60, nilai pH nya paling rendah. Ini membuktikan bahwa produksi gas juga berkontribusi terhadap nilai pH. Sesuai dengan pendapat Kartohardjono *et al.* (2007), bahwa gas CO<sub>2</sub> sering disebut gas asam (*acid whey*) karena gas CO<sub>2</sub> memiliki sifat asam. Oleh karena itu gas CO<sub>2</sub> juga berkontribusi terhadap nilai pH.

#### Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Produksi Gas

Berdasarkan perhitungan sidik ragam diketahui bahwa perlakuan lama fermentasi (12, 24, 36, 48, 60 jam) tidak berpengaruh nyata terhadap total gas whey dengan substitusi kulit nanas. Data rerata Produksi gas bioetanol whey dengan substitusi kulit nanas pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa produksi gas sedikit mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya lama fermentasi meskipun pertambahannya tidak signifikan. Hal ini menunjukkan adanya adanya kestabilan produk gas dari awal hingga akhir fermentasi. Fermentasi alkohol pada prinsipnya menghasilkan alkohol dan gas CO<sub>2</sub>. Menurut Hambali *et al* (2008), 1 molekul glukosa tersedia maka akan dipecah oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi 2 molekul alkohol dan 2 molekul gas CO<sub>2</sub>. Gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan memiliki perbandingan stoikiometri yang sama dengan etanol yang dihasilkan yaitu 1 : 1. Ditambahkan oleh Richana (2011), meskipun secara teori perbandingan antara produksi gas dan produksi alkohol adalah 1:1, namun pada kenyataannya hanya 70-80% gas yang dapat diukur.

Peningkatan produksi gas CO<sub>2</sub> seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi menunjukkan hasil yang berbanding terbalik dengan kadar alkohol. Gas yang dihasilkan pada proses fermentasi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghambat aktivitas dari *Saccharomyces cerevisiae* itu sendiri sehingga kadar

alkoholnya menurun. Semakin lama proses fermentasi maka gas CO<sub>2</sub> yang terbentuk juga akan semakin banyak. Kondisi ini tidak baik untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dan juga untuk proses fermentasi bioetanol. Menurut Datar *et al.* (2004), dengan adanya produksi gas selama proses fermentasi maka pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* akan berhenti meskipun *Saccharomyces cerevisiae* masih dalam keadaan hidup. Kemudian akan mulai menghasilkan alkohol kembali jika gas CO<sub>2</sub> dihilangkan.

*Starter* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ragi roti komersil dengan merk Fermipan. Ragi roti merupakan khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* tipe tertentu yang umumnya cepat tumbuh di dalam adonan roti. Di dalam adonan roti *Saccharomyces cerevisiae* memetabolisme sumber gula dan salah satu hasil metabolisemenya adalah gas CO<sub>2</sub> yang dapat mengembangkan adonan roti. Proses ini terjadi pada kondisi aerob. Di dalam kondisi anaerob ragi roti tetap menghasilkan gas CO<sub>2</sub>, meskipun tidak secepat dalam kondisi aerob. Hal ini sesuai dengan pendapat Pelczar dan Chan (1988), yang menyatakan bahwa ragi roti merupakan khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diseleksi sebelumnya untuk tujuan komersil. *Saccharomyces cerevisiae* yang dipilih adalah *Saccharomyces cerevisiae* yang memiliki kemampuan memfermentasi gula dengan baik di dalam adonan dan dapat tumbuh dengan cepat. Karbondioksida yang dihasilkan dari proses fermentasi inilah yang membuat adonan roti mengembang. Oleh karena itu, ragi roti umumnya terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae* terpilih yang cepat dalam menghasilkan karbondioksida untuk tujuan pengembangan roti.

#### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa lama fermentasi 60 jam pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas dengan penambahan *Saccharomyces cerevisiae* berpengaruh dalam menurunkan nilai pH, tetapi tidak menunjukkan adanya pengaruh dalam meningkatkan kadar alkohol dan produksi gas.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Datar, R. P., R. M. Shenkman, B. G. Cateni, R. L. Huhnke, R. S. Lewis. 2004. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 86 (5):587–594.
- Elevri, P. A. dan S. R. Putra. 2006. Produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang diamobilisasi dengan agar batang. *Akta Kamindo 1* (2): 105-114.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Hambali, E., S. Mujdalipah, A. H. Tambunan, A. W. Pattiwiri dan R. Hendroko, 2008. *Teknologi Bioenergi*. Agro Media, Jakarta.

- Irfandi. 2005. Karakteristik Morfologi Lima Populasi Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Skripsi. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Judoamidjojo, M., A. A. Darwis, dan E. G. Sa'id. 1992. Teknologi Fermentasi. Edisi 1. Rajawali Press, Jakarta.
- Kartohardjono, S., Anggara, Subihi, dan Yuliusman. 2007. Absorpsi CO<sub>2</sub> dari campurannya dengan CH<sub>4</sub> atau N<sub>2</sub> melalui kontaktor membran serat berongga menggunakan pelarut air. *Jurnal Teknologi* 11 (2): 97-102.
- Kumalasari, I. J. 2011. Pengaruh Variasi Suhu Inkubasi terhadap Kadar Etanol Hasil Fermentasi Kulit dan Bonggol Nanas (*Ananas sativus*). Skripsi. Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang.
- Kunaepah, U. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah. Tesis. Universitas Diponegoro, Semarang.
- O'Leary V. S., R. Green, B. C. Sullivan, V. H. Holsinger. 2004. Alcohol production by selected yeast strains in lactase-hydrolyzed acid whey. *Biotechnol Bioeng* 19 (10): 19–35.
- Pelczar, M. dan Chan. 1988. Dasar- Dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Retno, D.T dan Nuri, W. 2011. Pembuatan Bioetanol Dari Kulit Pisang. Jurusan Teknik Kimia FTI UPN Veteran. Yogyakarta.
- Richana, N. 2011. Bioetanol: Bahan Baku, Teknologi, Produksi dan Pengendalian Mutu. Penerbit Nuansa, Bandung.
- Roukas T. (1994), Continuous ethanol productions from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed bed reactor. *J Chem Technol Biotechnol.*, 59: 387-393.
- Rubio dan M. A. Texeira. 2005. Comparative analysis of the gal genetic switch between Not-So-Distant Cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 5: 1115-1128.
- Samson, J. A. 1980. Tropical Fruits, Tropical Agriculture Series. Longmarch, London.
- Sari, I. M., Noverita dan Yulneriwarni. 2008. Pemanfaatan jerami padi dan alang-alang dalam fermentasi etanol menggunakan kapang *Trichoderma viride* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. *Vis Vitalis.* 5 (2): 55-62.
- Tipteerasri, T., W. Hanmoungjai dan P. Hanmoungjai. 2009. Ethanol Production from Crude Whey by *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5695. Chiang Mai University, Thailand.