

## **NASKAH PUBLIKASI**

### **PRODUKSI BIOETANOL DARI PATI BIJI DURIAN DENGAN HIDROLISIS ENZIM AMYLASE DAN FERMENTASI MENGGUNAKAN *Zymomonas mobilis***

Disusun oleh:

Donni Wisly Pasaribu

NPM: 08 08 01067



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA  
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
YOGYAKARTA  
2016**

## **Produksi Bioetanol Dari Pati Biji Durian Dengan Hidrolisis Enzim Amylase Dan Fermentasi Menggunakan *Zymomonas mobilis***

### **Bioethanol Production From Durian Starch Seeds With Amylase Enzyme Hydrolysis and Fermentation Using *Zymomonas mobilis*.**

Donni Wisly Pasaribu<sup>1</sup>, Bernardus Boy Rahardjo Sidharta<sup>2</sup>, F. Sinung Pranata<sup>3</sup>  
<sup>1,2,3</sup>Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Jalan Babarsari  
No. 44 Yogyakarta

<sup>1</sup>e-mail: ex.trackers@yahoo@gmail.com

#### **ABSTRAK**

Negara Indonesia merupakan negara agraris yang salah satu produknya adalah buah-buahan. Sebagian besar dari buah-buahan menghasilkan limbah yang dan tidak dimanfaatkan. Biji durian adalah limbah dari buah durian yang banyak ditemukan dan belum dimanfaatkan. Biji durian merupakan bahan organik yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan bioetanol, karena memiliki kandungan karbohidrat 43,6 gram dalam 100 gram biji durian. Produksi bioetanol dari biji durian diharapkan dapat mengatasi masalah bahan bakar dan kebutuhan etanol di Indonesia. Untuk produksi etanol dilakukan fermentasi pada pati biji durian yang telah dihidrolisis menggunakan enzim amylase ( $\alpha$ -amylase dan glucoamylase) oleh *Zymomonas mobilis*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kemampuan enzim amylase dalam menghidrolisis pati biji durian dan kemampuan *zymomonas mobilis* dalam produksi etanol dari pati biji durian. Produksi etanol dilakukan secara anaerob menggunakan botol plastik kedap udara. Hidrolisis pati biji durian dilakukan dengan pelakuan pemanasan, penambahan  $\alpha$ -amylase dan penambahan glucoamylase dengan variasi konsentrasi (2, 3, 4, 5 dan 6% b/v) pati biji durian. Hidrolisis menggunakan enzim memberikan pengaruh yang berbeda pada pemanasan, penambahan  $\alpha$ -amylase dan penambahan glucoamylase dalam pemecahan pati. Semakin tinggi konsentrasi pati akan menghasilkan gula reduksi yang semakin tinggi. Fermentasi pada hidrolisat (pati terhidrolisis) menggunakan *Z. mobilis* dilakukan dengan variasi konsentrasi dan lama fermentasi dengan hasil semakin tinggi kadar etanol paling tinggi pada hari ke-4 dengan konsentrasi pati biji durian 4, 5 dan 6 % (b/v) berturut-turut sebesar 5,743%, 5,499% dan 5,975%. Hasil ini juga membuktikan bahwa *Z. mobilis* dapat digunakan untuk produksi etanol dari limbah organik yang mengandung karbohidrat tinggi seperti pada limbah biji durian.

Kata Kunci: biji durian,  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, bioetanol, *Zymomonas mobilis*

## **Pendahuluan**

Sumber hayati yang berpotensi untuk pembuatan bioetanol adalah tanaman durian (*Durio zibethinus* Murr.) dengan memanfaatkan bagian biji sebagai substrat. Biji durian berpotensi untuk substrat pembuatan bioetanol karena memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi. Menurut Brown (1997) dalam Jhonprimen, dkk. (2012) di dalam biji durian segar mengandung karbohidrat sebanyak 43,6%.

Badan Litbang Pertanian menjelaskan, total produksi durian di Indonesia pada tahun 2011 adalah 500-700 ribu ton per tahun dari lahan sekitar 60 ribu ha (Badan Litbang Pertanian, 2012). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (BPS) produksi buah durian Negara Indonesia pada tahun 2009-2014 secara berturut-turut sebanyak 797.798, 492.139, 883.969, 888.130, 759.058, dan 859.127 ton. Dalam hal ini dapat disimpulkan bahwa besarnya pertumbuhan dan produksi buah durian setiap tahun, berarti banyak pula sampah biji dan kulit durian yang dihasilkan (Suryamin, 2013 dan 2015; Heriawan, 2010).

Proses produksi bioetanol memiliki dua tahap utama yaitu, hidrolisis pati dan fermentasi. Judoamidjojo dkk. (1992), hidrolisis pati dapat dilakukan menggunakan katalis asam, kombinasi asam dan enzim, serta kombinasi enzim dan enzim. Asam akan memecah molekul pati secara acak dan gula yang dihasilkan sebagian besar adalah gula pereduksi. Crueger dan Crueger (1982) menjelaskan, proses hidrolisis pati dapat menggunakan katalisator enzim. Hidrolisis menggunakan katalisator enzim memiliki kelebihan: (1) dapat

meningkatkan produk, (2) bekerja pada pH netral dan suhu rendah, dan (3) bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat dibandingkan dengan asam.

Muljadi dkk. (2009) menambahkan, hidrolisis menggunakan enzim dalam pembuatan bioetanol dapat menggunakan enzim *alpha-amylase* (proses gelatinasi) dan enzim *gluko-amylase* (proses sakarifikasi). Darwis dan Sukara (1990) dalam Iskandar (2011) menyatakan bahwa enzim *gluko-amilase* merupakan enzim yang dapat memecah polisakarida (pati dan glikogen) pada ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\beta$ -1,6 dan menghasilkan glukosa. Enzim *alfa-amilase* memotong ikatan  $\alpha$ -1,4 pada pati secara acak dan menghasilkan dekstrin dan maltosa (Waites dkk., 2001 dalam Iskandar, 2011).

Sedangkan proses fermentasi dilakukan oleh mikroorganisme diantaranya adalah ragi atau khamir (*Saccharomyces cereviceae*), namun tidak tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi yang dihasilkan. Penelitian yang sekarang difokuskan pada bakteri Gram negatif *Zymomonas mobilis*. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif dan merupakan organisme fermentatif yang memanfaatkan sukrosa, glukosa dan fruktosa dengan mengikuti jalur *Entner Doudoroff Pathway* untuk menghasilkan etanol. Menurut Triphetchul dkk. (1992) dalam Tanate dan Surya (2008), *Zymomonas mobilis* memiliki kelebihan dibandingkan *Saccharomyces cerevisiae*, diantaranya konversi yang lebih cepat, toleran terhadap suhu, pH rendah, serta tahan terhadap etanol konsentrasi tinggi.

Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan bioetanol menggunakan pati biji durian. Untuk menghasilkan glukosa dari pati biji durian akan dilakukan hidrolisis menggunakan katalisator enzim. Enzim yang

digunakan dalam hidrolisis biji durian adalah *alpha-amylase* dan *gluco-amylase*. Selanjutnya, pati yang telah dihidrolisis digunakan sebagai substrat untuk produksi bioetanol dengan cara fermentasi. Fermentasi bioetanol dari pati biji durian dilakukan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*. Bakteri ini karena memiliki keunggulan dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Metode Penelitian**

#### **1. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, talenan, baskom, *petridish*, pH meter, corong, erlenmeyer, pipet tetes, propipet, pipet ukur, *laminair air flow*, ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, timbangan elektrik, arloji, kertas label, blender, spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu pharmaspec 18000 UV-VIS*), *autoclave*, oven, neraca analitik, pemanas, panci, penyaring / pengayak 80 *mesh*, cawan Conway, alat destilasi, magnetik stirrer, alat *colony counter*, dan *shaker* inkubator, vorteks, *hot plate stirrer*, kertas saring, *handcounter*, ayakan, *aluminium foil*, tabung *Durham*, jarum enten, botol plastic 250 mL, dan selang karet diameter 0,5 cm.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji durian (*Durio zibethinus* Murr.) yang diperoleh dari kegiatan usaha terkait buah durian yang ada di kota Yogyakarta. Kultur *Zymomonas mobilis* strain FNCC-5506 diperoleh dari Pusat Studi Bioteknologi PAU UGM. Bahan lainnya adalah  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , DNS, Na-K Tartarat, NaOH (Merck),  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  fenol kristal, natrium sulfat, asam asetat, Na-asetat, larutan, *Ziehl Neelsen* (Zn) A, larutan Zn B, larutan Zn C, larutan laktofenol, larutan NaOH,

HCL, spritus, alkohol 70%, reagen Arsenomolibdat, reagen Nelson A, Nelson B, etanol (p.a), pereaksi Anthrone, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, larutan gram (A, B, C, dan D), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\alpha$ -naftalamin, asam sulfanilat, reagen *Kovac's*, glukasa monohidrat enzim amylase ( $\alpha$ -amylase dan glucoamylase) merk Suntaq, medium *Nutrient agar* (NA).

## 2. Tahapan Penelitian

- a. Preparasi biji durian Surraya dan Sukandar, 2008; De Idral, dkk., 2012; Kusumaningati, dkk., 2013 dengan modifikasi).

Biji durian dibersihkan dan ditiriskan, kemudian dipisahkan dari daging buah biji durian. Biji durian diiris tipis dan dijemur pada panas matahari hingga kering (2-3 hari). Irisan biji durian kering digiling menggunakan penggilingan tepung beras atau blender, selanjutnya diayak dengan ayakan tepung konvensional hingga diperoleh bubuk biji durian dan disimpan di tempat kering. Bubuk biji durian ditambahkan air dengan perbandingan 1:5 (b/v) sambil dilakukan peremasan, diaduk, dan kemudian dibiarkan sampai 12 jam. Lendir pada larutan tepung biji durian dicuci dengan air sebanyak 3 kali. Larutan tepung biji durian disaring dengan kain penyaring (kain panel) dan selanjutnya diendapkan selama 12-24 jam. Endapan yang terbentuk dijemur hingga kering, dihaluskan menggunakan blender dan disaring menggunakan ayakan 80 mesh hingga diperoleh tepung pati biji durian. Pati biji durian dilakukan pengukuran kadar air (AOAC, 1995), kadar pati (AOAC, 1984; Apriantono dkk., 1989).

- b. Hidrolisis pati (Modifikasi dan kombinasi Maemunah dan Ali, 2006; Purnama, dkk., 2013; Amin, dkk., 2014).

Pati biji durian sebanyak 18, 27, 36, 45 dan 54 g masing-masing dicampur dengan aquadest sebanyak 900 ml sehingga menjadi larutan pati dengan kadar 2, 3, 4, 5 dan 6% (b/v) dan dibuat tiga ulangan tiap perlakuan. Sampel dipanaskan pada waterbath pada suhu 95 °C selama 1 jam, kemudian diukur gula reduksi dan total karbohidrat sampel. Sampel didinginkan dan dilikuifikasi dengan menambahkan enzim alpha-amilase 0,005% (b/v) pada pH 6.0 suhu 60 °C selama 1 jam, kemudian diukur gula reduksi dan total karbohidrat sampel. Larutan kemudian didinginkan dan dilakukan sakarifikasi menggunakan katalis enzim Glukoamilase sebanyak 0,12% (b/v) pada pH 4.6 suhu 40 °C selama satu jam, selanjutnya diukur gula reduksi dan karbohidrat total sampel. Kadar gula reduksi diukur dengan metode Nelson somogyi dan total karbohidrat diukur menggunakan metode *Anthrone*.

- c. Pembuatan medium untuk pertumbuhan *Zymomonas mobilis*
- i. Medium nutrien agar (Jutono, dkk., 1980 dengan modifikasi)

Medium nutrien agar (NA) dapat dibuat dengan mencampurkan 1000 ml aquadest, 5 g pepton, 3 g *beef extract* dan ditambahkan 15 gram agar. Pelarutan bahan-bahan tersebut dilakukan pada suhu 100°C menggunakan *microwave* hingga didapatkan kondisi homogen, lalu didinginkan pada suhu 40 °C hingga mengeras. Pada pembuatan medium agar miring, medium yang telah dipanaskan dimasukkan ke

dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml. Tabung reaksi disimpan pada posisi miring hingga memadat. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

ii. Media sintetik untuk pertumbuhan *Zymomonas mobilis*

Media pertumbuhan *Zymomonas mobilis* dibuat dari terdiri dari glukosa 10% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v) (Ruanglek dkk., 2006). Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

d. Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* pada medium sintetik

Pengamatan sel *Zymomonas mobilis* dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 kali untuk mengetahui bentuk dan sifat motilitasnya, yaitu dengan membuat preparat basah *Zymomonas mobilis* (Cappucino dan Sherman, 2005). Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* diketahui dengan menumbuhkan 10% (v/v) kultur pada media sintetik yang terdiri dari glukosa 10% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v) (Ruanglek dkk., 2006). Pertumbuhan sel (OD) diamati dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 560 nm setiap 4 jam selama 24 jam. Nilai OD menyatakan jumlah sel yang tumbuh dalam medium sintetik.



e. Pembuatan kultur stok *Zymomonas mobilis*

Inokulum ditumbuhkan dalam 10 mL medium sintetik (Ruanglek dkk., 2006), diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Media pertumbuhan cair sebanyak 10 ml yang berisi kultur digoreskan pada media pertumbuhan agar miring (Ruanglek dkk., 2006), diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam. Stok kultur agar miring disimpan dalam lemari es suhu 2-3 °C, diregenerasi tiga minggu sekali.

f. Pembuatan *Starter* (Ernes, dkk., 2014).

Kultur starter *Zymomonas mobilis* dibuat dengan menumbuhkan 1-2 ose kultur dari agar miring pada 10 mL media pertumbuhan cair (media sintetik) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. 10 mL media pertumbuhan cair yang berisi kultur ditransfer pada 90 mL media pertumbuhan cair pada erlenmeyer 250 mL serta diinkubasi selama 16 jam pada suhu 30 °C dan goyangan 105 rpm.

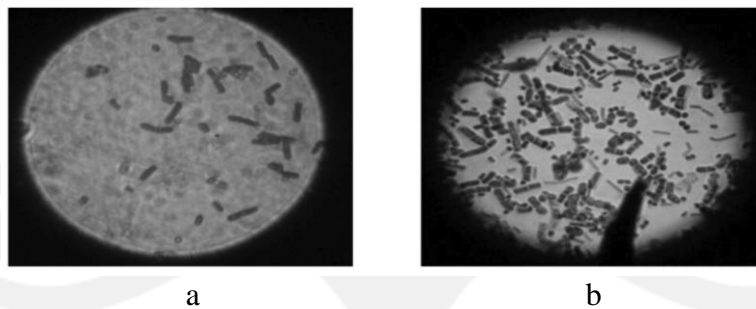
g. Fermentasi dengan *Zymomonas mobilis*.

Larutan hidrolisat (hasil hidrolisis dengan gula reduksi paling tinggi) 2, 3, 4, 5, dan 6 % (b/v) dipersiapkan untuk digunakan dalam fermentasi etanol. Pada masing-masing konsentrasi ditambahkan nutrisi tambahan yaitu gula pasir 4% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v), dan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v). Starter ditambahkan sebanyak 10% (v/v) ke dalam botol fermentor dan diinkubasi dengan lama sesuai dengan rancangan penelitian (0, 1, 2, 3, 4, dan 5 jam) pada suhu kamar. Untuk proses fermentasi 0 hari langsung melalui tahap

pasteurisasi. Setelah proses fermentasi selesai, tutup botol dilepas dan dipasteurisasi pada suhu  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit (Kusumaningati, dkk., 2013). Dilakukan pengukuran kadar gula reduksi (Metode Neelson somogyi), pH medium pertumbuhan dan kadar etanol metode *Micro Conway Diffusion* (Widiyaningrum, 2009; Kartika, dkk., 1992; Sandi dan Zubaidah, 2014).

### Hasil dan Pembahasan

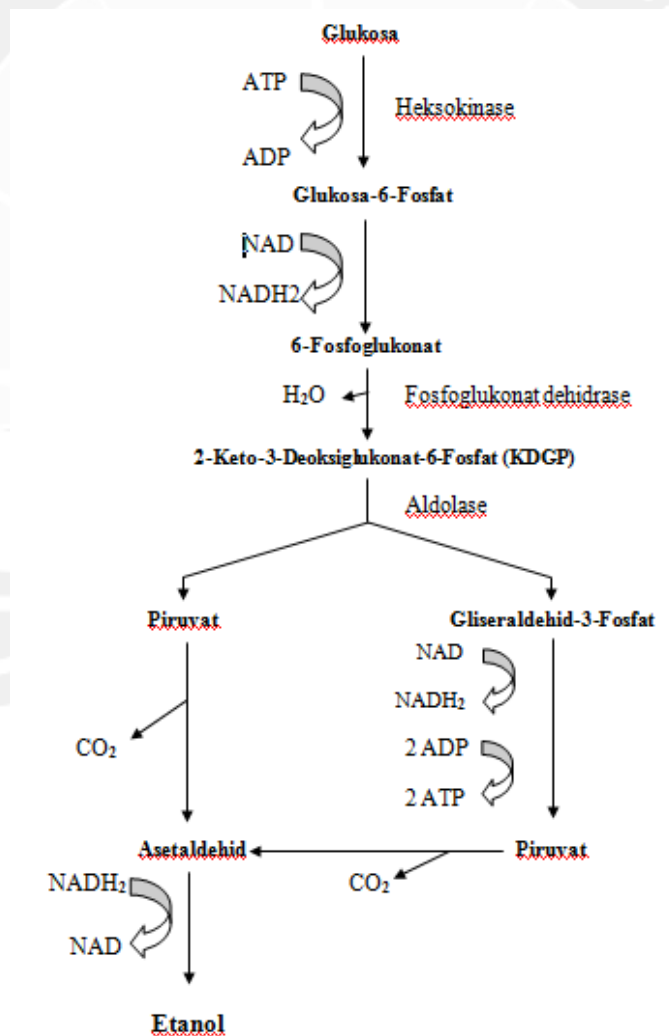
Dari hasil pengujian bakteri *Zymomonas mobilis* strain FNCC-0056 yang diperoleh dari PAU UGM memiliki karakteristik berbentuk batang (Obire, 2005), ukuran sel 2-6  $\mu\text{m}$ , diameter 1,0-1,4  $\mu\text{m}$  (Holt, dkk., 2005). Positif terhadap uji nitrat dan katalase (Thanonkeo dkk., 2011 dan Hanny, 2009), merupakan bakteri gram negatif, fakultatif anaerob (Obire, 2005).



Gambar 1. *Zymomonas mobilis* (a) Hasil pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x dan (b) Literatur dengan perbesaran 1000x (Joshi, 2010).

Bakteri *Zymomonas mobilis* juga mempunyai sifat osmotoleran sampai kadar 40%, alkohol toleran dengan kadar alkohol 2-10 %, kisaran pH optimum 5,0-7,0. Sel kadang-kadang membentuk rantai pendek (koloni), pada fermentasi

sukrosa biasanya diawali dengan fase adaptasi yang lama (Swings dan De Lay, 1997). Penggunaan *Zymomonas mobilis* dalam fermentasi etanol banyak mengalami keberhasilan. Bakteri ini menunjukkan produktifitas etanol lebih tinggi 3-5 kali lipat dari *yeast* (Rogers dkk., 1982) dengan hasil etanol dari glukosa mencapai nilai maksimum 95-98 % secara teori. Jalur glikolisis yang digunakan *Zymomonas mobilis* adalah lintasan *Entner-Doudoroff* (ED), seperti pada Gambar 2.



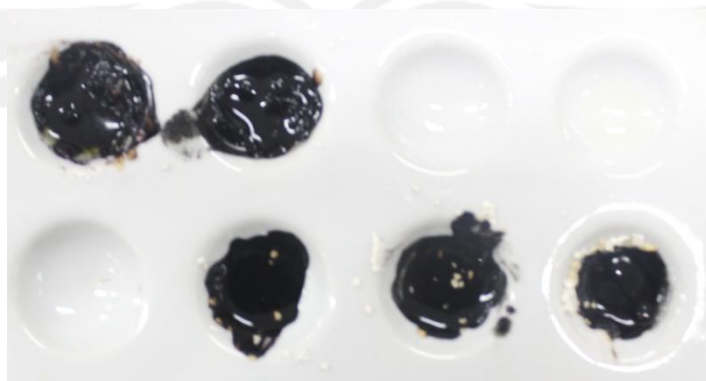
Gambar 2. Skema Jalur 2-keto-3-deosiglukonat-6-fosfat pada fermentasi etanol oleh bakteri *Zymomonas mobilis* (Sumber: Timotius, 1992).

Produksi bioetanol menggunakan *Zymomonas mobilis* membutuhkan substrat glukosa atau sukrosa (gula sederhana). Biji durian dapat digunakan sebagai sumber karbohidrat oleh *Z. mobilis*. Pati biji durian yang telah halus dengan rendemen 26,6% dilakukan pengukuran kadar air dan pati sebagai berikut bila dibandingkan dengan tepung biji durian:

Tabel 1. Hasil pengukuran kadar air dan pati

No.	Bahan	Kadar air	Kadar pati
1	Tepung biji durian	15,12 %	12,77 %
2	Pati biji durian	68,37 %	81,38 %

Berdasarkan hasil pengukuran kadar pati yang kedua bahan ini, maka dapat dikatakan jumlah pati yang diperoleh dari tepung biji durian sangat kecil, yaitu 26,6 % dengan kadar pati pada tepung 68,37% dan setelah menjadi pati didapatkan 81,38%. Pati yang didapatkan juga telah dilakukan uji iod dengan hasil uji positif (warna biru tua) seperti pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji iod pati biji durian

Sumber pati biji durian ini dihidrolisis menggunakan enzim amilase dengan perlakuan pemanasan, penambahan  $\alpha$ -amilase, dan penambahan glucoamilase. Hasil pengukuran kadar glukosa pada pati biji durian yang dihidrolisis adalah sebagai berikut (Tabel 2):

Tabel 2. Hasil pengukuran gula reduksi dari hidrolisis menggunakan enzim amilase pada pati biji durian

No.	Kosentrasi pati	Gula Reduksi (mg/mL)		
		Pemanasan	Penambahan $\alpha$ -amilase	Penambahan gluco-amilase
1	2 %	0,245	2,217	16,58
2	3%	0,339	2,874	19,7
3	4%	0,457	4,269	23,97
4	5%	0,519	4,565	32,68
5	6%	0,604	5,107	37,77

Pada Table 2. Dapat dilihat perubahan kosentrasi pati biji durian akan meningkatkan memberikan pengaruh terhadap jumlah karbohidat yang tersedia untuk dihidrolisis. Pengukuran gula reduksi pada tahap pemanasan, penambahan  $\alpha$ -amilase, penambahan glucoamilase secara berurutan menunjukkan adanya perubahan nilai gula reduksi yang meningkat dari tahap ke tahap perlakuan. Penambahan  $\alpha$ -amilase memberikan pengaruh perubahan gula reksi yang lebih dari pada pemanasan, sedangkan penambahan glucoamilase memberikan perubahan gula reduksi lebih tinggi dari pada tahap pemanasan dan penambahan  $\alpha$ -amilase. Perubahan nilai gula reduksi menunjukkan ke-tiga tahap hidrolisis ini memberikan pengaruh terhadap banyaknya gula sederhana yang terbentuk sebagai hasil dari hidrolisis pati biji durian.

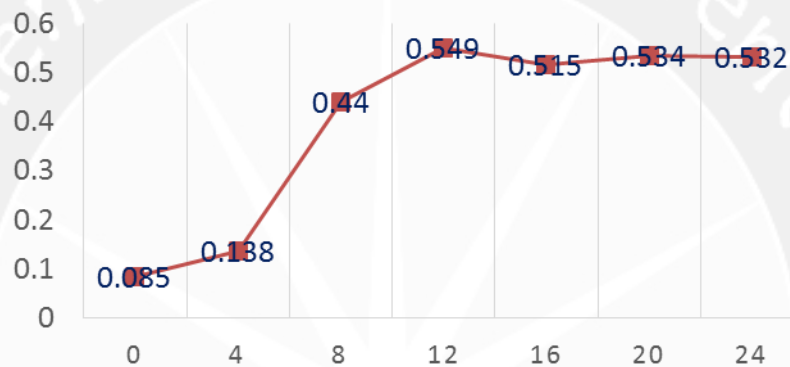
Tabel 3. Hasil pengukuran kadar pati dari hidrolisis menggunakan enzim amilase pada pati biji durian

No.	Kosentrasi pati	Total Karbohidrat mg/mL		
		Pemanasan	Penambahan $\alpha$ -amylase	Penambahan <i>gluco</i> -amylase
1	2 %	16,71	12,43	9,36
2	3%	31,67	20,45	13,77
3	4%	37,54	28,59	19,65
4	5%	44,09	32,87	23,39
5	6%	45,96	40,61	28,06
5	6%	45,96	40,61	28,06

Pengamatan hidrolisis selain dilakukan pengukuran kadar gula reduksi juga dilakukan pengukuran kadar total karbohidrat (pati). Dari hasil pengukuran total pati (Tabel 10) ini akan menunjukkan hasil berbanding terbalik dengan pengukuran kadar gula reduksi. Perubahan nilai kadar pati total mengalami penurunan menunjukkan adanya komponen pati yang telah terpecah menjadi gula sederhana (terhidrolisis) yang mengakibatkan meningkatnya kadar gula reduksi. Jadi, kadar karbohidat total (pati) ini menunjukkan banyaknya pati yang terhidrolisis. Semakin banyak dan lama waktu hidrolisis akan semakin menurunkan nilai karbohidat total pada sampel yang diujikan.

Pati biji durian yang dihidrolisis digunakan sebagai media pertumbuhan *Z. mobilis* untuk produksi etanol. *Z. mobilis* sebelum digunakan telah dibuat kurva pertumbuhan sebagai berikut (Gambar 4). Bakteri *Z. mobilis* mengalami fase adaptasi pada 0-4 jam, dengan nilai pertumbuhan sel (OD) berkisar 0,085-0,138. Fase logaritmik (eksponensial) pada jam ke-4 sampai dengan jam ke-12. Pada fase ini pertumbuhan *Z. mobilis* berlangsung paling cepat karena terjadi katabolisme substrat dalam jumlah besar yang digunakan untuk pertumbuhan, sintesis enzim dan sintesis senyawa lainnya. Fase stasioner terjadi pada jam ke-

12 sampai dengan jam ke-24. Berdasarkan hasil ini usia starter yang baik dapat ditentukan fase pertumbuhan *Z. mobilis* yaitu jam ke-12 sampai jam ke-16. Usia starter yang digunakan sesuai dengan penelitian terlebih dahulu, seperti yang telah dilakukan oleh Ernes, dkk. (2014<sup>a</sup> dan 2014<sup>b</sup>), Kusumaningati, dkk. (2013), dan Pinata dan Nawfa (2011).



Gambar 4. Kurva pertumbuhan *Z. mobilis* selama 24 jam.

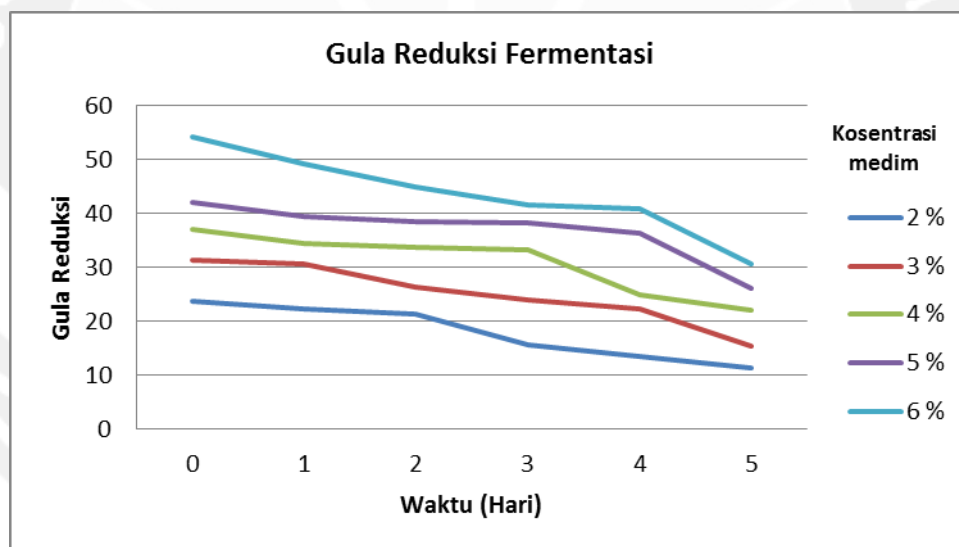
Medium produksi etanol menggunakan *Z. mobilis* menggunakan substrat pati yang terhidrolisis dengan konsentrasi pati biji durian 2, 3, 4, 5, dan 6 %. Pada medium ditambahkan glukosa (gula pasir) 4% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v). Penambahan nutrisi tambahan ini bertujuan untuk memberikan kondisi pertumbuhan yang optimal untuk *Z. mobilis* mengikuti medium sintetik yang digunakan Ruanglek dkk. (2006).

Hasil pengukuran gula reduksi selama 5 hari pengamatan produksi etanol (fermentasi etanol) adalah sebagai berikut pada Tabel 4.

Tabel 4. Gula reduksi selama fermentasi etanol (5 hari)

No.	Kosentrasi Pati	Gula Reduksi (Hari ke-1 s/d 5)					
		0	1	2	3	4	5
1	2%	23,81	22,33	21,35	15,59	13,47	11,49
2	3%	31,36	30,54	26,27	23,97	22,33	15,43
3	4%	36,94	34,48	33,82	33,33	24,95	22,00
4	5%	42,04	39,41	38,59	38,26	36,29	26,11
5	6%	54,19	49,26	44,83	41,54	40,89	30,54

Berdasar nilai pengukuran gula reduksi pada medium fermentasi pada Tabel 4, fermentasi oleh *Z. mobilis* mengakibatkan adanya perubahan nilai gula reduksi pada medium fermentasi. Perubagah Kadar gula reduksi pada medium fermentasi dapat dilihat pada Gambar 5 dimana terjadi penurunan kadar gula reduksi dari hari ke-0 hingga hari ke-5 untuk semua kosentrasi pati (2, 3, 4, 5, dan 6%).



Gambar 5. Grafik perubahan nilai gula reduksi hari ke-0 sampai dengan hari ke-5

Pada proses fermentasi gula reduksi awal akan mengalami penurunan gula reduksi secara bertahap dalam bertambahnya waktu fermentasi (hari). Contohnya, fermentasi menggunakan hidrolisat pati 6% (Tabel 4) dengan nilai gula reduksi awal 54,18 mengalami penurunan gula reduksi pada hari ke-1 menjadi 49,26 gr/mL. Pada hari ke-2 sampai hari ke-5 mengalami penurunan secara berturut-turut yaitu 44,82, 41,54, 40,88 dan 30,54 gr/mL. Adanya



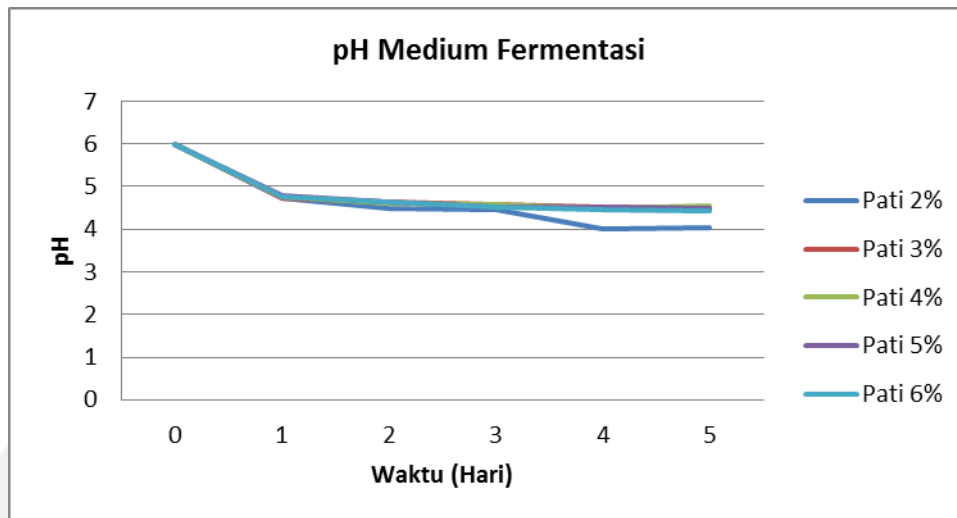
penurunan kadar gula reduksi dengan bertambahnya waktu fermentasi menunjukkan selama fermentasi terjadi penggunaan karbohidrat sederhana oleh biomasa *Z. mobilis* untuk pertumbuhan hingga pembentukan produk.

Penurunan kadar gula reduksi pada medium fermentasi dalam produksi etanol akan diikuti dengan penurunan pH medium fermentasi. Penurunan pH dapat dilihat pada Tabel 5, seperti pada penggunaan konsentrasi pati 2%. pH awal medium fermentasi adalah 6.0 mengalami penurunan nilai pH pada hari ke-1 menjadi 4,74, pada hari ke-2 mengalami penurunan menjadi 4,5, pada hari ke-3 mengalami penurunan menjadi 4,45, pada hari ke-4 turun menjadi 4,02 dan hari ke-5 menjadi 4,03. Penurunan nilai pH juga terjadi pada konsentrasi pati 3, 4, 5, dan 6% (Gambar 6).

Tabel 5. pH medium kultur selama 5 (lima) hari fermentasi pati (produksi bioetanol)

No.	Kosentrasi Pati	pH Media Fermentasi Dalam 5 Hari				
		1	2	3	4	5
1	2%	4,74	4,50	4,45	4,02	4,03
2	3%	4,73	4,65	4,57	4,53	4,48
3	4%	4,76	4,61	4,57	4,50	4,54
4	5%	4,79	4,64	4,53	4,51	4,49
5	6%	4,76	4,64	4,51	4,47	4,42

Jadi, semakin lama waktu dalam fermentasi etanol meyebabkan nilai pH medium semakin kecil (menjadi asam). Penurunan pH pada medium fermentasi menunjukkan adanya aktifitas bakteri *Z. mobilis* dalam produksi etanol. Medium menjadi semakin asam dengan bertambahnya waktu karena *Z. mobilis* menghasilkan produk samping berupa CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> terlarut yang terakumulasi pada medium akan menurunkan nilai pH kearah asam. pH medium fermentasi yang semakin ajam juga menunjukkan semakin tinggi etanol yang dihasilkan.



Gambar 20. Grafik perubahan pH medium fermentasi selama produksi etanol

Produksi etanol dari pati biji durian yang telah dihidrolisis menggunakan enzim dengan konsentrasi pati 2, 3, 4, 5, dan 6% dapat dilihat pada Tabel 13 atau Lampiran pengukuran kadar etanol. Hasil fermentasi pati biji durian yang telah terhidrolisis dikur kadar etanol dari hari ke-1 sampai dengan hari ke-5. Kadar etanol paling tinggi pada percobaan ini terjadi pada hari ke-4. Kadar etanol pati biji durian secara berturut-turut dari konsentrasi pati terkecil 2 sampai dengan 6 % adalah 5,126, 5,333, 5,743, 5,496, 5,975, dan 5,440 (mg/mL).

## DAFTAR PUSTAKA

- Amin, J.M. dan Empayus. 2014. Faktor Ragi Roti dan Waktu Fermentasi Tepung Umbi Talas (*Colocasia Esculenta [L] Schoot*) Menjadi Bioetanol. *Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal 2014*, Palembang 26-27 September 2014 ISBN.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Aoac*. AOAC International. Gaithersburg, United States.
- AOAC. 1989. *Official Methodes of Analysis of the Association of Analytical Chemist*. 14<sup>th</sup> ed. AOAC Inc. Arlington. Virginia.
- Brown. M. J. 1997. *Durio-A Bibliographic Review* hal. 37-40.

- Cappucino, J.G. dan Sherman, N. 2005. *Microbiology: a Laboratory Manual*, Seventh Edition. Pearson Education, Inc. San Fransisco.
- De Idral, D., Marniati S., dan Elida M. 2012. Pembuatan Bioetanol dari Ampas Sagu Dengan Proses Hidrolisis Asam dan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Kimia UNAND*; Vol. 1, No. 1, Hal 34-39.
- Ernes, A., Lia R., Agustin K.W., dan Joni K. 2014. Optimasi Fermentasi Bagas Tebu Oleh *Zymomonas mobilis* CP4 (NRRLB-14023) Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Agritech*; Vol. 34, No. 3, Hal. 247-256.
- Ernes, A. Krisna, dan Wardani. 2014. Pembuatan Bioetanol Dari Biji Nangka Oleh *Zymomonas mobilis* CP4 (Kajian Tentang Kosentrasi Inokulum dan Amonium Sulfat). *Jurnal Agrina*: Vol. 01, No. 01, Hal. 5-13 Tahun 2014.
- Heriawan, R. 2011. *Statistik Tanaman Buah-Buahan dan Sayuran Tahunan Indonesia 2012*. Badan Pusat Statistik; ISSN : 2088 – 8406. Jakarta, Indonesia.
- Hanny, S.H. 2009. Penentuan pH Optimum dalam Produksi Bioetanol dengan Menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 19088. *Skripsi*. Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, H.A.P., Staley, J.T. dan Williams, S.T. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Iskandar, A.P. (2011). Produksi Bioetanol Oleh *Saccharomyces cerevisiae* Dari Biji Durian (*Durio zibethinus* Murr.) dengan Variasi Jenis Jamur dan Kadar Pati. *Skripsi S1*. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Jhonprimen, H.S., Andreas T., dan M.H. Dahlan. 2012. Pengaruh Massa Ragi, Jenis Ragi, dan Waktu Fermentasi pada Bioetanol Dari Biji Durian. *Jurnal Teknik Kimia (JTM)*; Vol. 18, No. 2, hal 43-51.
- Judoamidjojo, R.M., A.A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Jutono, J. S., Hartadi, S., Kabirun, Susanto, Judoro dan Sunadi, D. 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Kartika, B., Guritno, A.D., dan Ismoyowati. 1997. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Kusumaningati, M.A., Sri N., dan Anton M. 2013. Pengaruh Kosentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi Pada Produksi Etanol dan Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya. *Jurnal SAINS dan Seni POMITS*; Vol. 2, No. 2, Hal. 218-223.

- Maemunah, S. dan A. Ali S. 2006. Produksi Kultur Rendam Jamur *Aspergillus Niger* dan *Aspergillus Oryzae* ITBCCL Sebagai Enzim Untuk Produksi Bioetanol Dari Singkong. *Jurnal Penelitian ITB*; 350-356.
- Muljadi, E., M. Billah, dan Novel K. 2009. Proses Produksi Bioetanol Berbasis Singkong. *Seminar Nasional: 25 November 2009*. Fakultas Teknik Industri dan LPPM UPN “Veteran” Surabaya, Jawa Timur.
- Obire, O. (2005). Activity of *Zymomonas* species in palm-sap obtained from three areas in edo state, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 9(1): 25-30.
- Purnama, H.P., Gusti N.F., dan Awaluddin N. 2013. *Prosiding Seminar Nasional 2013: Menuju Masyarakat Madani dan Lestari*, ISBN: 978-979-98438-8-3.
- Rogers, P.L., K.J. Lee, M.L. Skotnicki, dan D.E. Tribe. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng.* 23: 37–84.
- Ruanglek, V., Maneewatthana, D. dan Tripechkul, S. 2006. Evaluation of Thai Agroindustrial Waste For Bioethanol Production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* 41: 1423-1437.
- Sandi dan Zubaidah, 2014. Kajian Pengaruh Starter *Saccharomyces cereviceae* Pembuatan Sake Berbasis Umbi Kayu (*Manihot eculanta* Crantz). *Skripsi S1*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
- Surraya, L.E.P. dan D. Sukandar. 2008. Konversi Pati Ganyong (*Canna edulis* Ker.) Melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi. *Biodiversitas*; Vol. 9, No. 2, Hal 112-116.
- Suryamin. 2013. *Statistik Tanaman Buah-Buahan dan Sayuran Tahunan Indonesia 2013*. Badan Pusat Statistik; ISSN : 2088 – 8406. Jakarta, Indonesia.
- Suryamin. 2015. *Statistik Tanaman Buah-Buahan dan Sayuran Tahunan Indonesia 2015*. Badan Pusat Statistik; ISSN : 2088 – 8406. Jakarta, Indonesia.
- Tanate, T.S. dan Surya R.P. 2008. Pembuatan Etanol menggunakan *Zymomonas mobilis* Pada Kondisi Steril dan Nonsteril dengan Memanfaatkan Limbah Padat Pabrik Rokok Kretek Sebagai Substrat. *Skripsi S2*. FMIPA Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya.
- Timotius, H., 1992. *Mikrobiologi Dasar*. Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga.