

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kulit Pisang dan Potensinya Sebagai Substrat Fermentasi

Pisang termasuk famili *Musaceae* yang memiliki banyak jenis di antaranya genus *Musa* yang terdiri dari 80 – 100 varietas. Golongan pisang yang dapat dikonsumsi di antaranya pisang ambon, pisang raja, pisang emas, pisang susu, dan pisang *cavendish*, pisang raja, pisang kepok, pisang nangka, dan pisang tanduk (Sunardjono, 1985).

Astuty (1991) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kandungan pati dalam kulit pisang cukup besar. Hasil analisis kimia berbagai jenis kulit pisang dapat dilihat pada Tabel 1.

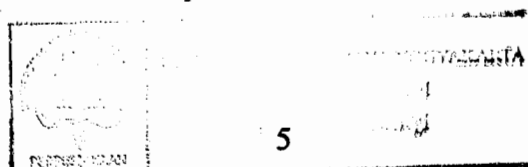
Tabel 1. Komposisi kimia 5 kulit buah pisang (%)

Komponen	Jenis kulit buah pisang				
	Ambon	Raja	Gabu	Kepok	Susu
Air*	13,57	16,75	8,95	11,70	9,26
Gula total*	7,98	6,99	6,25	5,87	6,52
Gula reduksi*	6,85	5,86	5,00	4,74	5,40
Pati*	7,83	6,98	6,86	6,16	6,10
Serat kasar*	1,82	1,91	1,84	2,12	1,64
Protein (Nx0,25)	0,80	0,96	0,78	0,79	0,80
Pektin (N-Pektat)	19,30	19,70	21,80	20,50	19,00
Protopektin	17,90	18,00	19,60	19,50	18,20
Lemak kasar	0,98	0,98	0,97	0,86	0,99
Abu	14,51	16,70	18,96	18,98	17,99
Lain-lain	8,46	6,15	8,99	8,78	14,10

Sumber : Data Statistik Dinas Pertanian DIY (1990)

* Analisis kimia di laboratorium TP UGM (Astuty, 1991)

Buah pisang ambon (*Musa paradisiacal var sapientum* Lamb.) disebut pisang eksotis karena merupakan komoditas ekspor yang paling disukai. Selain rasanya enak juga mengandung karbohidrat, protein, vitamin, dan mineral sehingga dapat



dikonsumsi bayi hingga orang dewasa karena dapat memenuhi gizi yang dibutuhkan oleh tubuh (Sunardjono, 1985).

Buah pisang ambon memiliki ciri-ciri fisik yaitu panjang 15-17 cm, diameter 3-4 cm, bentuk agak lurus dengan pangkal bulat, tebal kulit 0,3 cm, warna daging hijau kekuning-kuningan, tidak berbiji, beraroma, dan rasanya manis (Sunardjono, 1985).

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa kulit buah pisang ambon memiliki kadar gula reduksi paling tinggi di antara kulit buah pisang jenis lainnya yakni sebesar 6,85% dan telah terbukti dapat digunakan sebagai substrat pembuatan alkohol. Medium yang mengandung 4% kulit buah pisang yang difermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* mampu menghasilkan kadar alkohol sebesar 0,37% (Astuty, 1991). Alkohol yang dihasilkan merupakan substrat yang potensial untuk fermentasi asam asetat oleh *Acetobacter aceti* (Weisher *et al.*, 1971).

B. *Saccharomyces cerevisiae* dan Mekanisme Pembentukan Alkohol

Saccharomyces termasuk divisi Eumycota, sub divisi Ascomycotina, kelas Hemiascomycetes, Ordo Endomycetales, famili Saccharomycetaceae, dan genus *Saccharomyces* (Halasz & Lasztity, 1991).

Sel khamir yang termasuk jenis *Saccharomyces* berbentuk oval atau agak memanjang dengan panjang 1-5 μm , dan lebar 1-10 μm . Reproduksi dilakukan dengan cara pertunasan multipolar atau melalui pembentukan askospora. Askospora dapat terbentuk setelah terjadi konjugasi atau berasal dari sel diploid. Askospora

yang berjumlah satu sampai empat per askus, biasanya berbentuk bulat atau oval (Fardiaz, 1992).

Saccharomyces merupakan salah satu genus paling aktif dalam proses fermentasi alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* adalah spesies yang memproduksi alkohol dalam jumlah tinggi sehingga sering digunakan dalam produksi alkohol dan anggur. Transformasi gula menjadi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* secara anaerob dapat ditulis dalam suatu persamaan reaksi sebagai berikut :



Saccharomyces cerevisiae termasuk *top yeast* yang bersifat fermentatif kuat dan tumbuh dengan cepat pada suhu 20°C. *Saccharomyces cerevisiae* mampu melakukan fermentasi alkohol dari bahan dasar molase maupun pati-patian seperti ubi kayu, jagung, gandum, beras, barley, sorgum, dan kedelai (Fardiaz, 1992).

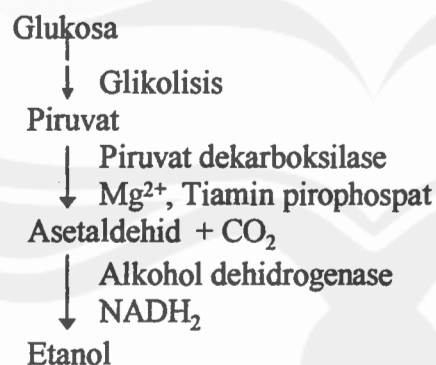
Saccharomyces cerevisiae mempunyai keunggulan antara lain mampu melakukan fermentasi pada berbagai variasi substrat dan toleran terhadap konsentrasi alkohol yang tinggi. Casida (1968) menyatakan bahwa mikroorganisme yang digunakan dalam fermentasi harus toleran terhadap konsentrasi gula yang tinggi tetapi juga mampu memproduksi alkohol dalam jumlah besar dan resisten terhadap alkohol.

Keadaan lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* ada beberapa faktor seperti kandungan nutrisi substrat, pH, suhu, tersedianya oksigen, dan ada tidaknya senyawa penghambat. Kisaran suhu optimal bagi *Saccharomyces cerevisiae* antara 25-30°C dengan batas aktivitas air terendah 0,88-0,94. *Saccharomyces cerevisiae* lebih menyukai tumbuh pada keadaan asam, yaitu pada pH 4-4,5, dan tidak dapat tumbuh dengan baik pada medium alkali.

Saccharomyces cerevisiae tumbuh baik pada kondisi aerobik, tetapi yang bersifat fermentatif dapat tumbuh secara anaerobik meskipun lambat (Fardiaz, 1992).

Kebanyakan spesies *Saccharomyces* menggunakan ion amonium sebagai sumber nitrogen untuk sintesis asam amino, sedangkan beberapa dapat menggunakan nitrat dan nitrit. Kebutuhan sulfur oleh *Saccharomyces cerevisiae* dapat dipenuhi oleh adanya sulfat di dalam medium. Mineral lain yang dibutuhkan adalah kalium, magnesium, natrium, dan kalsium (Fardiaz, 1992).

Menurut Crueger & Crueger (1990), pada kondisi anaerob pertumbuhan khamir berjalan pelan dan piruvat dari jalur glikolisis dipecah oleh piruvat dekarboksilase menjadi asetaldehid dan CO₂. Etanol kemudian dihasilkan dari asetaldehid yang direduksi oleh alkohol dehidrogenase. Secara skematis, biosintesis etanol dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Biosintesis etanol (Sumber : Crueger & Crueger, 1990).

Menurut Stanburry & Whittaker (1984), alkohol merupakan hasil dari metabolisme primer fermentasi. Sinohara dalam Gill *et al.*(1996) menambahkan bahwa alkohol akan dihasilkan dari metabolisme primer sejak awal pertumbuhan secara ekstraseluler.

Selama proses fermentasi, gula tidak seluruhnya dapat diubah menjadi etanol. Setiap gram glukosa yang dikonsumsi akan menghasilkan 0,51 gram etanol, namun sebagian glukosa digunakan untuk produksi biomassa sehingga secara teoritis etanol yang dihasilkan menjadi 90-95%. Secara keseluruhan setiap molekul glukosa yang difermentasi akan diperoleh etanol, CO₂, biomassa, dan 2 molekul ATP (Wibowo, 1989).

Fermentasi alkohol akan diakhiri setelah seluruh gula terfermentasi menjadi etanol, umumnya setelah proses berlangsung selama 48-72 jam. Pada fermentasi alkohol, khamir yang digunakan sebanyak 3-10% dari volume total media fermentasi dengan lebih dahulu dikembangkan sebagai starter (Wibowo, 1989). Alkohol yang dihasilkan dapat digunakan lebih lanjut menjadi asam asetat bila difermentasikan dengan bakteri asam asetat (Wibowo, 1988).

C. Sifat Fisik dan Kegunaan Asam Asetat

Asam asetat adalah senyawa berbentuk cairan, tidak berwarna, mempunyai bau menyengat dan memiliki rasa asam yang tajam sekali. Titik didihnya pada tekanan atmosfer adalah 118,1°C. Bahan ini larut dalam air, alkohol, gliserol, dan eter tetapi tidak dapat larut dalam karbon disulfida (Puturau, 1982). Menurut Higgins (1985), cuka merupakan produk yang mengandung tidak kurang dari 4% (b/v) asam asetat. *Food Standards Committee* dalam organisasi FAO/WHO menyatakan bahwa cuka adalah cairan yang layak dikonsumsi oleh manusia, dihasilkan dari bahan dasar alami yang mengandung pati dan gula, dan diproduksi secara fermentasi ganda, yaitu

fermentasi alkohol dan asam asetat, dan mengandung asam asetat dalam jumlah tertentu (Wood, 1985).

Asam asetat banyak digunakan dalam industri pengolahan pangan, industri farmasi, dan industri kimia. Pada industri makanan, asam asetat terutama digunakan sebagai bahan pembangkit *flavor* asam dan bahan pengawet. Asam asetat yang digunakan berkaitan dengan makanan di antaranya digunakan secara langsung sebagai penambah rasa atau dimanfaatkan dalam skala besar dalam campuran *mayonnaise*, *mustard*, saus tomat, asinan sayur, dan acar. Pada industri farmasi, asam asetat dapat digunakan sebagai antiseptik (Weisher *et al.*, 1971).

Produk asam asetat fermentasi dapat dibedakan dari asam asetat sintetis. Perbedaan tersebut terutama pada bahan dasarnya. Bahan dasar untuk pembuatan asam asetat sintetis bukan hasil pertanian segar, tetapi melalui penyulingan kering dari kayu atau berasal dari etanol teknis dan bahan residu lainnya yang mengandung etanol. Prosesnya merupakan sintesis kimia murni dan tidak melibatkan mikroorganisme (Weisher *et al.*, 1971). Proses pembuatan asam asetat sintetis relatif tidak aseptis dibandingkan dengan pembuatan secara fermentasi. Selain itu dalam produk fermentasi asam asetat selalu terdapat asetaldehid sedangkan secara sintetis tidak pernah ditemukan (Wood, 1985).

D. *Acetobacter aceti* dan mekanisme pembentukan asam asetat

Acetobacter aceti mempunyai bentuk sel batang pendek atau elips dengan ukuran 0,6-0,8 μm x 1,0-4,0 μm , dalam keadaan tunggal, berpasangan, atau membentuk rantai, bersifat gram negatif, motil dengan flagela peritrik namun dapat

pula non motil, tidak membentuk endospora, dan bersifat aerob obligat (De Ley, 1984).

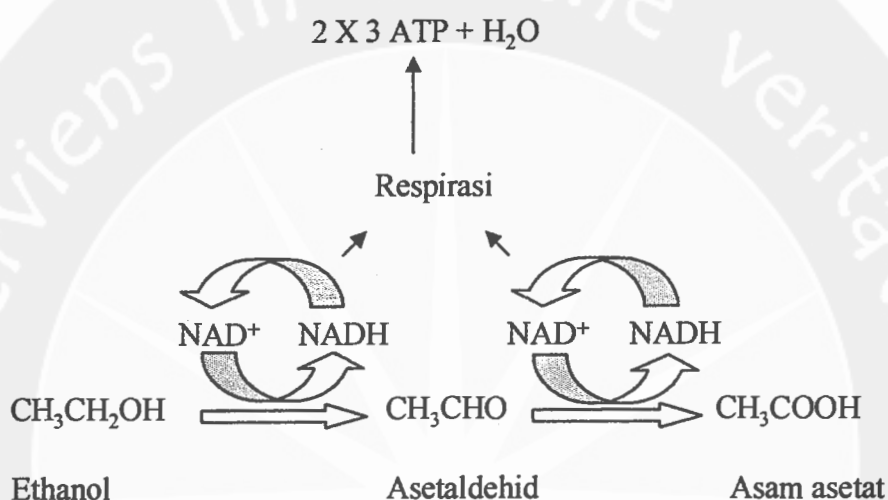
Acetobacter aceti tumbuh pada suhu optimum 25-30°C dengan pH sebesar 5,4-6,3, tidak mampu menghidrolisis laktosa maupun pati, berkembang di permukaan medium cair membentuk film atau pelikel, dan bersifat katalase positif. Pengujian oksidase, produksi H₂S, pembentukan indol, dan reduksi nitrat oleh genus *Acetobacter* selalu mendapat hasil yang negatif (De Ley, 1984).

Klasifikasi menurut *Bergey's Manual* menyebutkan bahwa genus *Acetobacter* terbagi menjadi dua, yaitu kelompok yang dapat mengoksidasi asam asetat dan kelompok yang tidak dapat mengoksidasi asam asetat. Spesies yang mampu mengoksidasi asam asetat terbagi lagi menjadi dua, tergantung pada kemampuannya dalam menggunakan garam ammonium sebagai sumber nitrogen. *Acetobacter aceti* adalah salah satu spesies yang mampu menggunakan garam ammonium (Weisher *et al.*, 1971).

Faktor pertumbuhan yang dibutuhkan *Acetobacter aceti* tergantung pada persediaan sumber karbon. Sumber karbon terbaik bagi *Acetobacter aceti* adalah etanol dan Na-D,L-laktat. Dalam medium manosa dan etanol akan menunjukkan pH akhir kurang dari 4,9 (De Ley, 1984).

Proses pembentukan asam asetat oleh bakteri asam asetat pada dasarnya merupakan proses oksidasi tidak sempurna dari fermentasi yang sebenarnya karena dalam proses ini daya pereduksi yang dihasilkan dipindahkan ke molekul oksigen. Pada tahap pertama etanol akan diubah menjadi asetaldehid dan air dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase. Asetaldehid dan air akan membentuk keseimbangan

reaksi dengan senyawa asetaldehid terhidrasi. Tahap kedua asetaldehid terhidrasi selanjutnya diubah menjadi asam asetat dengan bantuan enzim asetaldehid dehidrogenase (Prescott & Dunn, 1959). Secara skematis, oksidasi asam asetat dapat dilihat pada Gambar 2.



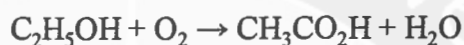
Gambar 2. Oksidasi asam asetat (Sumber : Crueger & Crueger, 1990).

Acetobacter memiliki enzim yang berada pada sisi luar sitoplasma dan mengkatalisis oksidasi etanol, gliserol, atau glukosa menjadi asam. Pada proses ini elektron disisipkan ke dalam rantai transpor elektron dan protonnya dilepaskan ke luar, ke dalam ruangan periplasma (Crueger & Crueger, 1985).

Secara biokimia, fermentasi diartikan sebagai pembentukan energi melalui senyawa organik, sedangkan aplikasinya dalam dunia industri fermentasi diartikan sebagai suatu proses untuk mengubah bahan dasar menjadi suatu produk oleh massa sel mikrobia. Pengertian ini termasuk juga proses anabolisme pembentukan komponen sel secara aerob (Wibowo, 1989).

Fermentasi asam asetat adalah fermentasi aerobik atau respiratif oksidatif, yaitu respirasi dengan oksidasi berlangsung tidak sempurna dan menghasilkan produk-produk akhir berupa senyawa asam asetat (Schlegel & Schmidt, 1994).

Proses asetifikasi merupakan proses fermentasi etanol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat. Proses asetifikasi tersebut dapat dituliskan dalam suatu persamaan sebagai berikut :



Secara stokiometri, 1 mol etanol (BM 46) setelah dioksidasi akan menghasilkan 1 mol asam asetat (BM 60), sehingga dapat diperhitungkan bahwa 1,0 gr etanol akan menghasilkan 1,3 gr asam asetat (Wibowo, 1989).

Menurut Pirt (1978), oksidasi etanol menjadi asam asetat adalah reaksi eksotermis yang menghasilkan energi sebesar 0,84 mega Joule untuk setiap 100 ml etanol yang dioksidasi. Energi yang dihasilkan dari proses oksidasi etanol sebagian dipergunakan untuk produksi biomassa yaitu sebesar 0,023 mega Joule/gr sel kering.

E. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Asam Asetat

Dalam produksi asam asetat ada beberapa hal yang perlu diperhatikan, antara lain seleksi mikroorganisme, bahan dasar, konsentrasi etanol yang digunakan, kadar oksigen, suhu, nutrien yang terkandung dalam medium, dan penambahan asam asetat pada awal fermentasi (Weisher *et al.*, 1971).

Meskipun banyak bakteri yang mampu menghasilkan asam asetat dari berbagai substrat, hanya beberapa bakteri yang mampu menghasilkan asam asetat sesuai dengan karakteristik yang diinginkan dalam skala industri, di antaranya

Acetobacter aceti, *Acetobacter pasteurinus*, dan *Acetobacter acetigenum* (Weisher *et al.*, 1971).

Bahan dasar utama fermentasi asam asetat dapat berasal dari berbagai bahan yang mampu difermentasi menjadi alkohol. Buah-buahan seperti apel, anggur, *peach*, *berry*, sirup gula, bir, atau *wine* dapat menjadi bahan dasar utama (Rehm & Reed, 1983). Weisher *et al.* (1971) menjelaskan bahwa kualitas asam asetat yang dihasilkan tergantung pada kualitas bahan dasar yang digunakan. Buah harus dalam keadaan sudah matang dan bersih, dan alkohol harus bersih dan bebas dari bahan pengawet.

Acetobacter aceti mampu hidup pada konsentrasi alkohol hingga 7,5% sedangkan pada konsentrasi alkohol 10% tidak ada pertumbuhan (Soedarini, 1998). Konsentrasi alkohol 14% atau lebih dapat menyebabkan sulitnya pembentukan *zoogloea* dan alkohol tidak dapat dioksidasi dengan sempurna menjadi asam asetat. Konsentrasi alkohol yang terlalu rendah yaitu kurang dari 1% atau 2% dapat menghilangkan asam asetat karena asam asetat teroksidasi sehingga aroma dan *flavor* akan hilang (Weisher *et al.*, 1971).

Konversi etanol menjadi asam asetat merupakan proses oksidasi atau proses dehidrogenasi dengan oksigen yang berperan sebagai aseptor hidrogen, sehingga kesuksesan fermentasi tergantung pada ketidakterersediaan oksigen. Dalam industri *vinegar*, kecepatan aliran udara untuk proses asetifikasi umumnya diatur sekitar 0,8-0,9 m³ per jam untuk setiap meter kubik luasan fermentor, sedangkan suhu diatur 28-30°C, yaitu suhu optimum untuk pertumbuhan *Acetobacter* (Adam, 1985).

Kecukupan oksigen sangat diperlukan untuk mengoptimalkan produksi asam asetat. Jika kecukupan oksigen tidak tercukupi dan konsentrasi asam asetat dan etanol tinggi maka sel bakteri akan mati. Crueger & Crueger (1990) menyebutkan bahwa pada konsentrasi asam asetat 5% dan dengan adanya etanol, 34% bakteri akan mati setelah 2 menit aerasi dihentikan.

Suhu merupakan faktor utama yang menentukan keberhasilan fermentasi asam asetat. Kelompok bakteri asam asetat tumbuh dengan baik pada suhu antara 15° sampai 34°C. Pada suhu tersebut bakteri asam asetat akan berkembang dengan optimal dan pada permukaan media akan membentuk *zoogloea* (Weisher *et al.*, 1971).

Menurut Prescott & Dunn (1959), bakteri asam asetat penghasil asam asetat biasanya membentuk selaput tipis pada permukaan larutan yang mengalami fermentasi asam yang biasa disebut *zoogloea* dan diberi istilah “induk dari *vinegar*”. *Zoogloea* saat muncul pertama kali akan terlihat transparan pada permukaan cairan. *Zoogloea* terbentuk pada permukaan untuk melindungi cairan di bawahnya. Pertumbuhannya akan menjadi seperti kulit tetapi saat disentuh akan terasa seperti lumpur yang licin namun merupakan massa yang kuat dan elastis.

Penambahan asam asetat pada permulaan proses asidifikasi sangat penting untuk menghindari adanya mikrobia kontaminan dan mendorong tumbuhnya bakteri asam asetat (Weisher *et al.*, 1971). *Acetobacter aceti* mampu membentuk *zoogloea* pada konsentrasi asam asetat mencapai 5% dan menunjukkan pertumbuhan pada medium Glukosa Yeast Pepton (GYP) agar, sedangkan pada konsentrasi 7,5%

mampu membentuk *zoogloea* namun tidak menunjukkan pertumbuhan pada media GYP agar (Soedarini, 1998).

Waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan prosentase asam asetat yang diinginkan membutuhkan waktu 8 sampai 12 hari (Rehm & Reed, 1983). Asam asetat dapat jernih tidak berwarna atau berwarna sesuai dengan bahan dasarnya (Ebner, 1982).

