

## **Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* Terhadap Produksi Bioetanol Dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L)**

## **The Effect Of *Saccharomyces cerevisiae* Inoculum Concentration On Bioetanol Production From Cocoa Peel (*Theobroma cacao* L)**

**Thauhidayatul Hidayah**

Fakultas Sains dan Teknologi/Universitas Qamarul Huda Badaruddin

Corresponding Author: [indhaf13@gmail.com](mailto:indhaf13@gmail.com) , Tel: +6285339492739

**Diterima pada 26 Pebruari 2018, Direvisi pertama pada 24 Maret 2018, Direvisi kedua pada 29 Maret 2018, Disetujui pada 27 April 2018, Diterbitkan daring pada 20 Mei 2018**

**Abstract:** This study aims to determine the effect of *S. cerevisiae* inoculum concentration on the ethanol content produced in the fermentation process of cocoa pods. The study design used a completely randomized design (CRD). Parameters observed were alcohol content, reducing sugar content and pH. The research was carried out in the laboratory scale and pilot scale. The laboratory scale consists of preliminary and major research. Preliminary research aims to find the optimum concentration of  $H_2SO_4$  to produce the highest reducing sugar. The main research phase, namely hydrolysis using optimum  $H_2SO_4$  from preliminary research and fermentation using *S. cerevisiae* inoculum with variations in inoculum concentrations of 0%, 1%, 3%, 5% and 7% (v / v). The aim of The pilot scale is producing bioethanol. Fermentation was carried out for six days at a temperature of 28-300 C, observations carried out every two days. Measurement of alcohol content using the titration method, reducing sugar content by the Somogyi-Nelson method, and the pH measured by the indicator pH. Pilot scale measurements were carried out by distillation and GC-MS test. Average alcohol content, reducing sugar content, and pH were 23.73%, 90.20  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , and 4.4. From the pilot scale distillation results, 87.6 ml of distillate were obtained from 1L of cocoa pods substrate. GC-MS test results showed that in distillate ethanol contained 74.944%. The results confirmed that cocoa pods have the potential as bioethanol raw materials.

**Keywords:** Bioethanol, Somogyi-Nelson, *Saccharomyces cerevisiae*,  $H_2SO_4$

**Abstrak:** Departemen ESDM menyatakan bahwa saat ini Indonesia kekurangan cadangan minyak bumi. Bahan bakar nabati berjenis biodiesel dan bioetanol saat ini menjadi alternatif sebagai sumber pengganti minyak bumi. Salah satu sumber bioetanol adalah kulit buah kakao. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* terhadap kadar etanol yang dihasilkan pada proses fermentasi kulit buah kakao. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Parameter yang diamati yaitu kadar alkohol, kadar gula pereduksi dan pH. Penelitian dilakukan dalam tahap skala laboratorium dan skala pilot. Skala laboratorium terdiri atas penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan bertujuan untuk mencari konsentrasi  $H_2SO_4$  yang optimum menghasilkan gula pereduksi tertinggi. Tahap penelitian utama, yaitu hidrolisis menggunakan  $H_2SO_4$  yang optimum dari penelitian pendahuluan dan fermentasi menggunakan

*inokulum S. cerevisiae dengan variasi konsentrasi inokulum 0%, 1%, 3%, 5% dan 7% (v/v). Skala pilot dilakukan pada kondisi optimum dengan tujuan untuk memproduksi bioetanol. Fermentasi dilakukan selama enam hari pada suhu 28-30°C, pengamatan dilakukan setiap dua hari sekali. Pengukuran kadar alkohol menggunakan metode titrasi, kadar gula pereduksi dengan metode Somogyi-Nelson, dan pH diukur dengan pH indikator. Pengukuran skala pilot dilakukan dengan destilasi dan uji GC-MS. Rata-rata kadar alkohol, kadar gula pereduksi, dan pH berturut-turut sebesar 23,73%, 90,20 µg/ml, dan 4,4. Dari hasil destilasi skala pilot, diperoleh destilat sebanyak 87,6 ml dari 1L substrat kulit buah kakao. Hasil uji GC-MS menunjukkan bahwa dalam destilat terkandung etanol sebesar 74,944%. Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa kulit buah kakao berpotensi sebagai bahan baku bioetanol.*

**Kata kunci :** Bioetanol, Somogyi-Nelson, *Saccharomyces cerevisiae*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 1. PENDAHULUAN

Seiring dengan berkembangnya industri di Indonesia, terjadi penipisan sumber daya energi seperti bahan bakar minyak bumi. Menurut Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral (ESDM) (2007), saat ini Indonesia kekurangan cadangan minyak bumi, dan kemungkinan akan habis dalam beberapa tahun kemudian. Oleh karena itu, Indonesia sebagai negara yang memiliki beragam kekayaan alam sangat berpotensi menghasilkan bioenergi alternatif. Bioenergi tersebut dapat dihasilkan dari bahan bakar nabati (BBN). BBN berjenis biodiesel dan bioetanol saat ini telah menjadi pilihan untuk digunakan sebagai sumber energi pengganti minyak bumi. Berdasarkan laporan *International Energy Agency* (IEA) diprediksi bahwa pada tahun 2050 BBN dapat menurunkan kebutuhan bahan bakar minyak bumi sebanyak 20- 40% [1].

Bioetanol berpeluang besar untuk dikembangkan di Indonesia, karena bahan bioetanol mudah diperoleh yaitu dari proses fermentasi biomassa yang mengandung karbohidrat dengan bantuan mikroorganisme [2]. Kelebihan etanol sebagai sumber energi adalah sifatnya ramah lingkungan, dapat diperbarukan, dan memiliki nilai oktan yang tinggi. Etanol dikatakan ramah lingkungan karena emisi gas yang dihasilkan rendah kadar karbon monoksida, nitrogen oksida dan gas-gas rumah kaca yang menjadi polutan serta mudah terurai dan aman. Di samping itu substrat untuk produksi bioetanol cukup melimpah di Indonesia. Bahan baku untuk pembuatan bioetanol bisa berupa bahan pertanian seperti aren, ubi kayu, bonggol jagung, nipah, sagu, tebu, limbah kakao, dan sorgum [3].

Perkebunan kakao di Indonesia mengalami perkembangan pesat dalam kurun waktu 20 tahun terakhir dan pada tahun 2002 areal

perkebunan kakao Indonesia tercatat seluas 914.051 ha. Meningkatnya produksi kakao dapat memacu tingkat limbah pertanian di Indonesia. Kulit buah kakao sebagai bahan sisa dapat mencapai 2.000.000 ton/tahun, permukaan kulit luarnya yang paling banyak mengandung pigmen sekitar 16% dari berat kulit seluruhnya atau setara dengan 320.000 ton/tahun sehingga sangat potensial dimanfaatkan [4]. Kulit buah kakao juga mengandung 19% protein, 6,2% lemak, dan 16% serat kasar [5].

Komponen limbah buah kakao yang terbesar berasal dari kulit buahnya, yaitu sebesar 75% dari total buah [6]. Jika dilihat dari data produksi buah kakao yang mencapai 779,5 ribu ton/tahun, maka limbah kulit kakao yang dihasilkan sebesar 584,6 ribu ton/tahun. Limbah pertanian dari kulit kakao ini merupakan salah satu sumber daya yang potensial untuk dimanfaatkan, yaitu sebagai salah satu sumber bahan bakar nabati (BBN). Sampai saat ini kulit buah kakao belum dimanfaatkan secara optimal. Kulit buah kakao merupakan limbah lignoselulosa yang mengandung komponen utama berupa lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Ashadi (1988), mengenai pembuatan gula cair dari kulit kakao didapatkan data mengenai komposisi buah kakao dan kandungan kimiawi kulit kakao. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kulit kakao mengandung 20,11% lignin, 31,25% selulosa, dan 48,64% hemiselulosa. Kandungan selulosa pada kulit kakao cukup potensial untuk diolah lebih lanjut menjadi produk bernilai ekonomi, salah satunya yaitu etanol.

Gula hasil hidrolisis asam, dapat difermentasi menjadi senyawa tertentu oleh mikroorganisme, salah satunya adalah khamir. Ada berbagai khamir yang memiliki fungsi penting dalam fermentasi, salah satunya *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir ini

telah lama digunakan dalam industri *wine* dan bir [7]. Khamir ini bersifat nonpatogenik dan nontoksik, sehingga sejak dahulu banyak digunakan dalam berbagai proses fermentasi seperti pada pembuatan roti dan alkohol [8]. Selain itu khamir juga memiliki sifat-sifat fisiologi yang stabil, sangat aktif dalam memecah gula menjadi karbondioksida dan alkohol, terdispersi dalam air, memiliki daya tahan simpan lama, dan tumbuh dengan cepat [9].

Penggunaan *S. cerevisiae* dalam fermentasi etanol sudah banyak dilakukan di beberapa negara diantaranya Brazil dan Amerika. Kedua negara tersebut merupakan produsen etanol terbesar di dunia [10]. Penggunaan *S. cerevisiae* dalam produksi etanol, karena organisme ini memiliki enzim alkohol dehidrogenase yang dapat memecah asetildehid menjadi alkohol.

Penggunaan *S. cerevisiae* dalam produksi bioetanol sangat berpengaruh terhadap konsentrasi bioetanol yang dihasilkan. Selain itu, konsentrasi bioetanol yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh suhu, pH, sumber karbon, sumber nitrogen dan waktu inkubasi [11]. Dengan pertimbangan tersebut, maka dilakukan penelitian mengenai pengaruh konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L).

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr Setiabudhi No. 229 pada bulan Maret-Mei 2011.

**Pembuatan Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yang digunakan dalam hidrolisis adalah 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% (Balat *et al.*, 2008). Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5%, dibuat dengan

cara melarutkan 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dalam akuades hingga volume mencapai 1L. Langkah yang sama juga dilakukan dalam pembuatan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, 1,5%, dan 2%.

**Penentuan Konsentrasi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yang Optimum** : Bahan berupa bubuk kulit buah kakao sebanyak 200 gram dan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> masing-masing 500 ml pada konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%. Bubuk kulit buah kakao direndam dalam H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pada perbandingan 1:10 (b/v) selama 15 jam (Fanaei *et al.*, 2008). Sebanyak 50 gram sampel direndam menggunakan 500 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam gelas beaker, ditutup rapat dan dididihkan selama 120 menit menggunakan *hot plate*. Hidrolisat disaring dan dimasukkan ke dalam botol yang telah disiapkan dan diberi label. Pengujian kadar gula pereduksi dilakukan sebanyak lima kali pengulangan. Untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat, data yang diperoleh diolah dengan uji *One Way Anova* untuk melihat pengaruh signifikan dari perlakuan dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui konsentrasi yang menghasilkan gula pereduksi paling tinggi.

**Hidrolisis Kulit Buah Kakao** : Sebanyak 600 gram bubuk kulit buah kakao direndam dalam 6 L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yang optimal dari penelitian pendahuluan selama 15 jam dan dipanaskan hingga mendidih selama 120 menit. Hidrosilat disaring dan diatur pH hingga pH 5 menggunakan NaOH 1 M. Hidrolisat dimasukkan ke dalam 25 botol fermentor yang berukuran 100 ml. Sterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121<sup>o</sup> C selama 15 menit.

**Persiapan Inokulum *S. cerevisiae*** : Terdapat dua macam media yang digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara *S. cerevisiae* yaitu medium *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) dan medium kultur *Potatoes Dextrose Borth* (PDB). Subkultur *S. Cerevisiae* dilakukan dalam medium PDA, sedangkan medium aktivasi dilakukan dalam medium PDB. *S.*

*cerevisiae* yang akan digunakan dalam penelitian ditumbuhkan dalam medium agar miring. Medium agar miring yang digunakan adalah medium PDA (*Potatoes Dextrose Agar*).

**Pengukuran kadar Glukosa (Somogyi-Nelson) :** Pada pengukuran kadar glukosa, 2 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1,6 ml larutan Somogyi I dan 0,4 ml larutan Somogyi II kemudian dihomogenkan. Tabung ditutup dengan menggunakan kelereng lalu dipanaskan dalam penangas selama 10 menit. Setelah 10 menit pindahkan tabung ke dalam es, kemudian ditambahkan sebanyak 2 ml larutan Nelson dan 4 ml akuades, dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan dimasukkan dalam cuvet dan diukur kadar glukosa menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Jika larutan terlalu pekat dan tidak terbaca pada spektrofotometer, maka larutan tersebut diencerkan dengan cara mengambil 1 ml larutan kemudian ditambahkan 9 ml akuades.

**Pengukuran kadar Alkohol :** dilakukan setiap dua hari selama enam hari. Hasil fermentasi diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berukuran 100 ml. Kemudian ditambahkan 1 ml anhidrat asetat dan 2 tetes phenolftalein kemudian dititrasi dengan NaOH 1 M dengan buret sampai terlihat perubahan warna menjadi warna merah muda. Kadar alkohol yang telah digunakan pada sampel ditentukan dengan cara memasukkan jumlah NaOH yang digunakan ke dalam persamaan yang diperoleh pada kurva standar alkohol.

**Pengukuran pH :** menggunakan pH indikator.

**Skala Pilot :** Sebanyak 500 gram bubuk kulit buah kakao direndam dalam 5 L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> menggunakan konsentrasi yang optimum

pada penelitian pendahuluan dan penelitian utama dengan perbandingan 1:10 (b/v). Dipanaskan selama 120 menit menggunakan kompor. Hidrolisat yang diperoleh disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121°C selama 15 menit. Hidrolisat ditambahkan gula awal sebesar 5%, dihomogenkan, dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Setelah larutan dingin, inokulum *S. cerevisiae* diinokulasikan berdasarkan konsentrasi inokulum dan lama fermentasi optimum dari penelitian utama (skala laboratorium).

**Uji Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS) :** dilakukan di laboratorium Akademi Kimia Analisis (AKA) Bogor.

**Analisis Data :** Analisis data yang digunakan untuk menentukan bahwa terdapat perbedaan dari setiap perlakuan yang diberikan, dilakukan dengan menggunakan Uji Anova dua jalur (*Two way ANOVA*) jika data berdistribusi normal dan homogen. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 16.0 for windows*.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji pendahuluan, diketahui bahwa kadar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> terbaik adalah 0,5% (v/v), sehingga pada penelitian utama proses hidrolisis dilakukan menggunakan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5% (v/v). Hidrolisat yang diperoleh langsung difermentasi selama enam hari. Parameter yang diukur selama fermentasi yaitu kadar alkohol, kadar gula pereduksi, dan pH. Pengukuran parameter tersebut dilakukan setiap dua hari sekali.

Sebelum dilakukan fermentasi, hidrolisat tersebut diatur keasamannya pada pH 5 dan semua perlakuan ditambahkan gula awal 5% (v/v) dan disimpan dalam inkubator pada kisaran suhu 28-30°C. Kadar gula awal, pH, dan suhu inkubasi diatur demikian, karena sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan

*S. cerevisiae*, mikroba yang digunakan dalam penelitian ini. Keasaman ini diatur pada pH 5 karena merupakan pH yang baik pertumbuhan *S. cerevisiae* dalam fermentasi alkohol. Penambahan gula awal berfungsi sebagai sumber karbon *S. cerevisiae* untuk lebih cepat menyesuaikan diri terhadap medium kompleks, sehingga biomassa sel dapat bertambah. Suhu inkubator tidak selalu tepat dan berkisar pada suhu 28-30°C, namun hal ini tidak mempengaruhi *S. cerevisiae* karena mikroba ini dapat tumbuh optimum pada kisaran suhu tersebut [7]. Analisis hasil dari penelitian ini terdapat pada Tabel 1.1 yang meliputi hasil rata-rata kadar alkohol, kadar gula pereduksi, dan pH.

Konsentrasi Inokulum (%)	Kadar Alkohol (%)				Kadar Gula Pereduksi (µg/ml)				pH			
	Hari ke-				Hari ke-				Hari ke-			
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
0	0,00 ±0,00	7,31 ±0,98	9,47 ±0,11	10,92 ±0,99	129,39	161,92	167,13	151,46	5,00	4,60	4,00	4,00
1	0,00 ±0,00	19,22 ±1,21	18,14 ±1,48	18,50 ±1,02	129,39	180,80	148,47	99,91	5,00	4,60	4,00	4,00
3	0,00 ±0,00	17,05 ±1,27	19,58 ±0,98	23,91 ±1,87	129,39	177,51	146,91	118,33	5,00	4,00	4,20	4,20
5	0,00 ±0,00	19,94 ±1,91	21,38 ±0,98	22,29 ±1,17	129,39	167,99	135,02	84,22	5,00	4,00	4,20	4,60
7	0,00 ±0,00	18,68 ±1,17	22,47 ±1,56	23,73 ±2,85	129,39	174,82	152,78	90,20	5,00	4,20	4,60	4,40

Tabel 3.1. Rata-rata Kadar Alkohol, Kadar Gula Pereduksi dan pH dengan konsentrasi inokulum 0%, 1%, 3%, 5%, 7% (v/v), Inkubasi selama enam hari

Waktu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu selama enam hari, merupakan waktu yang umum digunakan dalam fermentasi sampah organik menjadi alcohol [12]. Tabel 1.1 menunjukkan kadar alkohol, gula pereduksi, dan pH selama enam hari pengamatan dengan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 0%, 1%, 3%, 5%, dan 7% (v/v). Secara umum, selama enam hari inkubasi, rata-rata kadar etanol mengalami peningkatan dari hari ke-2 hingga hari ke-6, sedangkan kadar gula pereduksi dan pH mengalami penurunan. Pada konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 0%, yang merupakan perlakuan kontrol juga terdapat alkohol sebesar 7,31-10,92 %. Kadar alkohol pada kontrol ini dapat dikatakan cukup tinggi, seharusnya pada perlakuan kontrol tidak

terdapat alkohol, karena tidak diinokulasikan *S. cerevisiae* yang menguraikan substrat. Kadar alkohol yang terdapat pada kontrol diduga merupakan produk mikroba pengurai selain *S. cerevisiae*. Mikroba tersebut dapat berasal dari alat-alat yang digunakan pada saat pengambilan sampel hasil fermentasi, kontaminasi pada alat penelitian bisa terjadi karena di lingkungan sekitar banyak terdapat jasad-jasad renik. Menurut Pelczar dan Chan (2005), bahwa beberapa jasad renik dari lingkungan bisa masuk ke dalam substrat selama penanganan, pengolahan, dan penyimpanan. Pernyataan tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian ini, terjadi kontaminasi pada substrat fermentasi diduga karena adanya jasad renik yang terbawa melalui alat penelitian, walaupun sudah diupayakan untuk meminimalkan kontaminasi. Menurut Setyowati (2008) bahwa terdapat mikroba pengurai pada limbah organik yaitu seperti *Actinomyces*, bakteri Selulolitik, dan bakteri Proteolitik. Dugaan adanya mikroba pengurai pada kontrol juga ditandai dengan pengurangan kadar gula pereduksi dan perubahan pH. Pada perlakuan *S. cerevisiae* 1%, 3%, 5%, dan 7% benar-benar terdapat etanol, namun pada kontrol belum tentu terdapat etanol, bisa saja merupakan alkohol jenis lain selain etanol. Jenis alkohol pada kontrol tidak dapat ditentukan karena tidak diuji dengan GCMS.

Pada konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 1%, 3%, 5%, dan 7%, kadar alkohol tetap mengalami peningkatan. Produksi alkohol yang terus meningkat mengindikasikan bahwa *S. cerevisiae* dalam fase logaritmik, karena pada fase ini sel aktif melakukan metabolisme dan sintesis bahan sel sangat cepat sehingga menghasilkan metabolit berupa etanol [13].

Peningkatan kadar alkohol yang diproduksi oleh *S. cerevisiae* disebabkan karena masih tersedianya substrat yang dikonversi

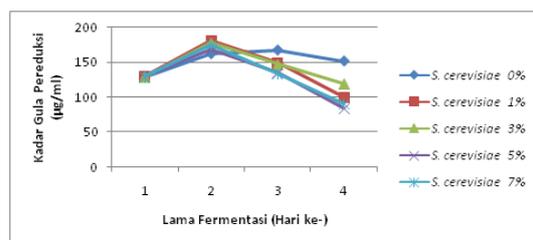
menjadi alkohol. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Pramanik (2003) bahwa untuk fermentasi alkohol, substrat harus memiliki konsentrasi kadar gula pereduksi minimal sebesar 50 µg/ml. Artinya konsentrasi gula pereduksi yang digunakan dalam penelitian ini masih sesuai dengan kondisi tumbuh *S. cerevisiae*, dapat dilihat pada tabel 4.3 kadar gula pereduksi yang tersedia paling rendah sebesar 84,22 µg/ml pada hari ke-6 fermentasi. Oleh karena itu, kadar alkohol terus mengalami peningkatan hingga hari ke-6 fermentasi.

Pada proses fermentasi alkohol, glukosa merupakan sumber karbon dan sumber energi utama bagi khamir. Dalam fermentasi alkohol satu molekul glukosa hanya dapat menghasilkan 2 molekul ATP. Secara singkat reaksi tersebut berlangsung melalui jalur glikolisis yaitu pemecahan gula ( $C_6H_{12}O_6$ ) menjadi asam piruvat, kemudian terjadi dekarboksilasi asam piruvat menjadi asetaldehid dengan bantuan enzim piruvat dekarboksilase. Tahap akhir yaitu perubahan asetaldehid menjadi alkohol (etanol) oleh enzim alkohol dehidrogenase [14].

Pada penelitian ini kadar alkohol tertinggi dihasilkan pada hari ke-6. Hal ini sesuai pernyataan Effendi dalam Budhiutami (2010), bahwa semakin lama fermentasi, kadar alkohol yang dihasilkan akan meningkat dan mencapai keadaan yang optimum sebelum mengalami penurunan. Waktu fermentasi yang optimum pada kulit buah kakao ini diperoleh pada hari ke-6 dengan kadar alkohol rata-rata sebesar 23,73%, hari ke-6 memiliki selisih terbesar bila dibandingkan dengan hari ke-0, 2, dan 4 dan perbedaannya pun signifikan, dapat dilihat dari kolom Sig. pada tabel yang bernilai 0.000 dan nilai tersebut kurang dari taraf signifikansi penelitian yaitu 5%.

### Kadar Gula Pereduksi

Pengukuran kadar gula peduksi dilakukan dengan metode Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952). Rata-rata kadar gula pereduksi dengan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 0%, 1%, 3%, 5%, dan 7% (v/v) setelah pengamatan selama enam hari dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rata-rata Kadar Gula Pereduksi Selama Enam hari Pengamatan

Pengukuran ini dilakukan untuk melihat kecenderungan pengurangan glukosa yang dikonversi menjadi alkohol oleh *S. cerevisiae*. Pada Tabel 1.1 dan Gambar 1.1 menunjukkan bahwa semakin lama fermentasi mengakibatkan nilai rata-rata gula pereduksi yang diukur menggunakan metode Somogyi-Nelson mengalami penurunan. Penurunan kadar gula pereduksi pada substrat selama fermentasi mengindikasikan adanya penggunaan glukosa oleh *S. cerevisiae*. Glukosa merupakan sumber karbon utama dan adanya penyerapan glukosa ini menyebabkan penurunan kadar glukosa turun selama fermentasi. Gula pereduksi mengalami peningkatan pada hari ke-2. Peningkatan kadar gula ini terjadi akibat masih adanya peristiwa hidrolisis pada substrat, hal ini diketahui bahwa substrat awal masih memiliki pH yang rendah yaitu pH 1, pH yang demikian menunjukkan bahwa pada substrat masih ada kandungan  $H_2SO_4$ . Kondisi ini sesuai dengan pernyataan Taherzadeh dan Karimi (2007), bahwa hidrolisis asam akan menghasilkan hidrolisat yang cukup asam dan bisa meningkatkan kadar gula peduksi karena aktivitas asam terus memecah ikatan glikosidik pada selulosa dan hemiselulosa.

Gula pereduksi pada hari ke-2 hingga hari ke-6 mengalami penurunan diikuti dengan meningkatnya kadar alkohol yang dihasilkan, hal ini mengindikasikan bahwa gula tersebut diubah menjadi alkohol oleh *S. cerevisiae*, seperti yang dinyatakan oleh Pelczar dan Chan (2006) bahwa penurunan kadar gula ini disebabkan karena digunakan untuk pertumbuhan dan membentuk metabolit primer berupa alkohol. Penurunan kadar gula pereduksi ini terjadi pada semua konsentrasi inokulum yakni 1%, 3%, 5% dan 7% (v/v).

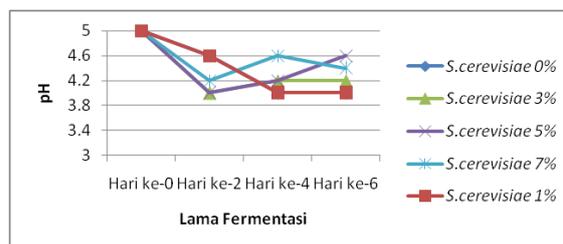
Indikasi penggunaan gula pereduksi menjadi alkohol oleh *S. cerevisiae* didukung oleh hasil uji korelasi. Nilai korelasi antara kadar alkohol dan kadar gula adalah sebesar -0.394. Tanda negatif menunjukkan terdapatnya hubungan yang berbanding terbalik antara kadar alkohol dan kadar gula. Angka korelasi tersebut adalah signifikan, dapat dilihat dari nilai sig. pada tabel yaitu 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi penelitian ini yaitu 5%.

### pH Medium

Derajat keasaman (pH) larutan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi proses fermentasi. 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 *S. cerevisiae* yaitu karbondioksida, dan disebabkan oleh asam-asam yang merupakan produk samping fermentasi etanol seperti asam asetat dan asam piruvat. Adanya asam tersebut karena sebagian *S. cerevisiae* tidak mengkonversi asam piruvat menjadi etanol, sehingga asam akan terakumulasi dan menambah keasaman larutan (Rhem dan Reed dalam Didu, 2010).

Rata-rata pH larutan dengan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 0%, 1%, 3%, 5%, dan

7% (v/v) setelah pengamatan selama enam hari hari terdapat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Rata-rata pH Selama Enam hari Pengamatan

Gambar 3.2 menunjukkan bahwa selama proses fermentasi berlangsung keasamaan larutan semakin bertambah ditandai dengan penurunan nilai 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. Perubahan pH ini disebabkan oleh pembentukan produk yaitu karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ), yang merupakan produk fermentasi selain alkohol. Dalam larutan uji,  $\text{CO}_2$  yang dihasilkan akan bereaksi dengan air membentuk asam karbonat ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Semakin banyak  $\text{CO}_2$  yang dihasilkan, maka  $\text{H}_2\text{CO}_3$  yang terbentuk juga semakin tinggi.  $\text{H}_2\text{CO}_3$  bisa membentuk asam bikarbonat dan melepaskan ion  $\text{H}^+$ , tingginya ion  $\text{H}^+$  yang dihasilkan dapat mempengaruhi keasaman larutan uji ditandai dengan penurunan pH [15].

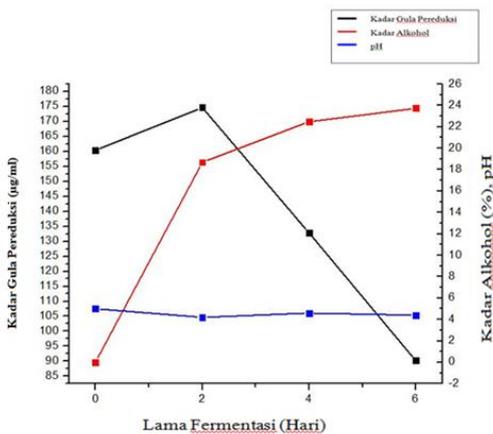
Penurunan pH pada semua perlakuan didukung oleh kadar alkohol yang dihasilkan. Pada proses fermentasi, mol alkohol yang dihasilkan berjumlah sama dengan mol  $\text{CO}_2$ , apabila alkohol yang dihasilkan dalam kadar yang banyak, maka  $\text{CO}_2$  yang dihasilkan akan meningkat, gas ini akan mempengaruhi penurunan pH. Tabel 1.1 menunjukkan bahwa rata-rata kadar alkohol tertinggi dihasilkan pada konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 7% dengan rata-rata pH 4,4. Penurunan pH ini tidak sebanding dengan rata-rata pH 4 pada

larutan kontrol, karena pada kontrol tidak diinkubasikan *S. cerevisiae* dan seharusnya pH larutan tidak mengalami perubahan. Perbedaan hasil ini diduga karena adanya mikroba pengurai yang berasal dari lingkungan sekitar.

Hasil ini menerangkan bahwa pH berbanding terbalik dengan kadar alkohol yaitu ditunjukkan oleh hasil uji korelasi. Nilai korelasi antara kadar alkohol dan pH adalah sebesar -0,545. Tanda negatif menunjukkan terdapatnya hubungan yang berbanding terbalik antara kadar alkohol dan pH. Angka korelasi tersebut adalah signifikan, dapat dilihat dari nilai sig. pada tabel yaitu 0,000 lebih kecil dari taraf signifikansi penelitian ini yaitu 5%.

**Hubungan antara Kadar Gula Pereduksi, pH, dan Kadar Alkohol**

Berdasarkan kondisi optimum fermentasi yaitu pada konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 7% dengan lama fermentasi enam hari, dibuat grafik hubungan antara kadar gula pereduksi, pH, dan kadar alkohol seperti pada Gambar 3.3 berikut :



Gambar 3.3 Hubungan antara Kadar Gula Pereduksi, pH, dan Kadar Alkohol

Pada umumnya proses fermentasi alkohol berlangsung melalui jalur glikolisis yaitu penggunaan gula ( $C_6H_{12}O_6$ ) untuk membentuk etanol dan karbondioksida. Pembentukan kedua senyawa ini dipengaruhi oleh kadar gula pereduksi yang digunakan oleh khamir. Gambar 3.3, menunjukkan bahwa kadar gula pereduksi berbanding terbalik dengan kadar alkohol, penurunan kadar gula pereduksi diikuti oleh peningkatan kadar alkohol. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa gula pereduksi digunakan oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk membentuk metabolit primer, dalam hal ini etanol. Hubungan berbanding terbalik didukung oleh nilai korelasi antara kadar gula pereduksi dan kadar alkohol sebesar -0,394.

Produksi etanol oleh *S. cerevisiae* dapat mempengaruhi keasamaan substrat fermentasi. Berdasarkan Gambar 3.3, bahwa semakin tinggi kadar alkohol menyebabkan pH menurun, hal tersebut menunjukkan adanya hubungan berbanding terbalik didukung oleh nilai korelasi sebesar -0,545. Hubungan antara kadar gula pereduksi dan pH menunjukkan hubungan berbanding lurus dengan nilai korelasi 0,073. Penurunan kadar gula pereduksi diikuti dengan penurunan pH. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Pramanik (2003), bahwa penurunan kadar gula pereduksi diikuti oleh penambahan keasamaan substrat atau nilai pH semakin menurun.

**4. KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian mengenai pengaruh konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* terhadap produksi bioetanol dari kulit buah kakao, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi inokulum berpengaruh terhadap produksi etanol dari kulit buah kakao. Kondisi optimum untuk proses fermentasi alkohol pada penelitian ini yaitu pada konsentrasi

inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 7% (v/v) dengan lama fermentasi selama enam hari dengan rata-rata kadar alkohol yang dihasilkan sebesar 23,73 %. Dari hasil destilasi skala pilot, diperoleh destilat sebanyak 87,6 ml dari 1 liter substrat. Hasil uji GC-MS menunjukkan bahwa dalam destilat terkandung etanol sebesar 74,944%. Dari hasil penelitian ini, dapat dikatakan bahwa kulit buah kakao berpotensi sebagai salah satu bahan baku bioetanol.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Azahari, Delima Hasri. (2008). *Pengembangan Industri Biofuel (Tantangan Baru Sektor Pertanian)*. Seminar Pusat Penelitian Ekonomi dan Analisa Kebijakan Pertanian, 11 April 2008. Bogor. [Online] Tersedia : [http://pse.litbang.deptan.go.id/ind/pdffiles/S\\_MNR\\_Delima\\_11-04-08.pdf](http://pse.litbang.deptan.go.id/ind/pdffiles/S_MNR_Delima_11-04-08.pdf). [4 Desember 2010]
- [2] Yetti. (2007). *Bioteknologi Industri Etanol dari Biomassa*. Biotrends Majalah populer Bioteknologi: Vol.2 no.1 Tahun 2007
- [3] Haryanto, B. (1992). *Potensi dan Pemanfaatan Sagu*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- [4]Wulan, S.N. (2001). "Kemungkinan Pemanfaatan Limbah Kulit Buah kakao (Theobroma cacao) Sebagai Sumber Zat pewarna Alam". Jurnal teknologi Pertanian. Vol. 2, Agustus 2001
- [5] Setyowati, E. (2008). Uji Mikrobiologis Kompos Organik dari Sampah Organik dengan Penambahan Limbah Tomat dan EM-4. Skripsi FKIP : Universitas Muhammadiyah Surakarta
- [6] Ashadi, R.W. (1988). Pembuatan Gula cair dari Pod Coklat dengan Menggunakan Asam Sulfat, Enzim, serta Kombinasi Kedua. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor
- [7] Hidayat, S., Padaga, M.C., dan Suhartini, S. (2006). *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- [8] Taherzadeh, M. J., dan Karimi, K. (2007). Acid-Based Hydrolysis Processes For Ethanol From Lignocellulosic Materials : A Review. Departement of chemical engineering, Isfahan University of Technology.
- [9] Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan* 1. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama.
- [10] Schure, E.G., Maerzel, T.F., Johannes, P.D., Jack, T.R., dan Theo, F. (1998). Pyruvat Decarboxylase Catalyzes Decarboxylation of Branched Chain 2 Oxo Acid but is not Essential for Fusel Alcohol Production by *Saccharomyce recevisiae*. [Online] Tersedia : <http://aem.asm.org/cgi/reprint/64/4/1303.pdf> [13 Juli 2011]
- [11] Lin, Y, and S. Tanaka. (2006). "Ethanol fermentation from biomass reseources : current state and prospects". Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.
- [12] Kusnadi., Syulasm, A., dan Adisendjaja, Y.H. (2009). Pemanfaatan Sampah Organik Sebagai Bahan Baku Produksi Bioetanol Sebagai Energi Alternatif. Laporan Penelitian Strategis Nasional. Bandung : FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia
- [13] Pelczar, M. J. dan Chan, E.C.S. (2006). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta : Universitas Indonesia (UI-Press)
- [14] Zhang, M., C. Eddy, K. Deanda, M. Finkelstein, and S. Picataggio. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. American Association For The Advancement Science. [Online] Tersedia : <http://www.google.co.id/url?sa=t&source=web.Pdf>.[4 Juli 2011]
- [15] Poedjiadi, A dan Supriyanti, F.M.T. (2006). *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta : Universitas Indonesia (UI-Press)