

# Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi Pada Produksi Etanol dari Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya

Mutiara Arum Kusumaningati<sup>1</sup>, Sri Nurhatika<sup>1</sup>, dan Anton Muhibuddin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS). Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

<sup>2</sup>Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya (UB). Jl. Veteran, Malang 65145 Indonesia.

*e-mail:* nurhatika@bio.its.ac.id

**Abstrak**—Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum bakteri *Zymomonas mobilis* dan lama fermentasi terhadap produksi etanol yang optimum. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2012 sampai Mei 2013 di Laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Penelitian ini menggunakan variasi perlakuan yaitu konsentrasi inokulum (0, 5, 10 dan 15%) dan lama fermentasi (0, 2, 4, 6, dan 8 hari). Masing-masing perlakuan diulangi sebanyak 2 kali, sehingga diperoleh 40 unit percobaan dan dianalisis menggunakan uji ANOVA. Parameter yang diamati adalah kadar etanol. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini adalah kadar etanol optimum sebesar 9,5% (v/v) dihasilkan pada interaksi konsentrasi inokulum 10% dan lama waktu fermentasi 6 hari.

**Kata Kunci**—*Zymomonas mobilis*, Sampah sayur dan buah Pasar Wonokromo Surabaya, Etanol.

## I. PENDAHULUAN

Masalah global yang terjadi di Indonesia salah satunya yaitu sampah. Sampah adalah sebagian dari sesuatu yang tidak dipakai, harus dibuang, umumnya berasal dari kegiatan yang dilakukan manusia dan bersifat padat [1]. Kurangnya usaha pemanfaatan sampah berdampak volume sampah bertambah setiap harinya. Jumlah rata-rata sampah di Surabaya per harinya adalah 8700 m<sup>3</sup>. Total sampah organik sebesar 87% terdapat di Pasar Wonokromo Surabaya didominasi oleh sampah sayur dan buah [2]. Perlu dilakukan upaya dalam memanfaatkan sampah menjadi sesuatu yang berharga yaitu bioetanol sebagai alternatif mengatasi masalah bahan bakar minyak dan gas yang semakin terbatas.

Bioetanol merupakan etanol yang berasal dari sumber hayati dan dapat dijadikan sebagai bahan alternatif karena sifatnya yang ramah lingkungan [3], mengandung emisi gas CO lebih rendah (19-25%) [4], memiliki kandungan oksigen yang tinggi (35%) sehingga terbakar lebih sempurna [5], bernilai oktan lebih tinggi (117) [6], dan dapat diproduksi terus menerus oleh mikroorganisme [7], salah satunya adalah bakteri *Zymomonas mobilis*. Adapun dasar penggunaan bakteri ini dikarenakan memiliki kelebihan yaitu tahan terhadap konsentrasi tinggi (15%) [8], lebih toleran terhadap suhu dan pH rendah (3,5-7,5)

[9], dan dapat menghasilkan etanol lebih cepat dibandingkan dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Penggunaan jalur *Entner-Doudoroff* (ED) inilah yang membuatnya lebih cepat menghasilkan etanol dibandingkan dengan mikroorganisme yang menggunakan jalur *Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP) [10].

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan [11], memanfaatkan sampah organik di Pasar Wonokromo Surabaya dengan metode hidrolisis asam dan fermentasi menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* terbukti mengandung etanol. Sedangkan penelitian [12], dihasilkan etanol optimum 11,64% selama 6 hari dari sampah buah jeruk, dan penelitian [13] dihasilkan etanol optimum 9,68% selama 6 hari dari sampah buah tomat. Melihat tidak hanya kandungan amilum yang tinggi, namun kandungan selulosanya juga besar dalam sayur dan buah, maka peneliti bermaksud menggunakannya sebagai substrat dalam pembuatan etanol. Diharapkan dengan memanfaatkan sampah sayur dan buah didapatkan hasil etanol yang lebih optimum melalui proses *pretreatment*, hidrolisis enzim menggunakan kapang *Aspergillus* sp, fermentasi etanol menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* dan destilasi.

## II. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2012 sampai Mei 2013 di Laboratorium Botani, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Laboratorium Zoologi dan Laboratorium Mikologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember; Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga; dan Laboratorium Penelitian, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya. Pengambilan sampah sayur dan buah dilakukan di Pasar Wonokromo Surabaya.

### A. Persiapan Bahan dan Perlakuan Awal (*Pretreatment*)

Sampah sayur dan buah diambil dari Pasar Wonokromo Surabaya sebanyak 2 kg. Kemudian dipilah, diambil sampah

sayur dan buah yang mengandung selulosa dan dicuci bersih. Perlakuan awal (*pretreatment*) pada sampah dilakukan secara fisik, mekanik dan kimia. *Pretreatment* secara fisik, sampah dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering ( $\pm 1-2$  hari). Kemudian dilakukan *pretreatment* secara mekanik dengan dipotong-potong berukuran  $\pm 2$  cm, dihaluskan dengan diblender, diayak dengan saringan mesh ukuran 40 dan disimpan di tempat yang kering. Sedangkan untuk *pretreatment* secara kimia, sampah direndam dengan NaOH 2% (wt), perbandingan 1:6 (b/v) pada suhu ruang selama 24 jam, kemudian diautoclave pada suhu 120°C selama 1 jam. Setelah itu dicuci dengan air kran hingga pH netral (7) dan dioven pada suhu 65°C hingga diperoleh berat konstan [14]. Penggunaan ekstrak ini untuk proses pembuatan kurva pertumbuhan, pembuatan starter, hidrolisis dan proses fermentasi.

#### B. Proses Hidrolisis Enzim Menggunakan *Aspergillus*

Tahap ini terdiri dari beberapa tahapan diantaranya tahap kultur kapang *Aspergillus* sp. isolat dari hasil eksplorasi kapang di Taman Nasional Alas Purwo Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Setelah tahap kultur kapang, dilakukan tahap produksi enzim, tahap pemanenan dan pengujian aktivitas enzim [14]. Tahap kultur kapang *Aspergillus* sp. dimulai dengan membuat media kultur *Potato Dextrose Agar* (PDA). *Aspergillus* sp. dikultur dalam tabung reaksi yang berisi media PDA steril menggunakan jarum tanam tajam dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang [15].

Tahap produksi enzim diawali dengan membuat medium Andreotti yang dituang ke dalam botol ukuran 500 ml sebanyak 150 ml, ditambahkan ekstrak sampah yang telah di-*pretreatment* sebanyak 1,5 gr (1%), ditutup menggunakan kapas lemak dan dilakukan pengaturan pH awal yaitu 5, selanjutnya ditutup dengan kapas lemak, disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit dalam autoklaf [15]. Suspensi spora yang dibuat dari *Aspergillus* sp. berumur 7 hari dipindahkan ke dalam medium fermentasi pada konsentrasi 10% (v/v) dan diaduk secara aseptis di atas *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 7 hari [14].

Tahap pemanenan dan pengujian enzim dilakukan pada akhir fermentasi yaitu hari ke-7. Enzim kasar disentrifuse dengan kecepatan 4000 rpm selama 16 menit, diambil filtrat. Kemudian disaring menggunakan kertas saring sampai larutan menjadi bening. Hasil saringan merupakan enzim kasar yang siap dianalisis. Selanjutnya hasil hidrolisis disebut hidrolisat. Dalam penelitian ini parameter yang diamati yaitu pengujian aktivitas enzim endoglukanase menggunakan substrat CMC 1%. Hasil pengukuran absorbansi filtrat enzim (dikoreksikan dengan blanko), diplotkan dalam satuan unit/ml filtrat enzim. Satu unit aktivitas enzim endoglukanase sebanding dengan satu mikromol glukosa yang dihasilkan dari perlakuan enzim terhadap substrat larutan CMC 1% selama 1 menit, atau jumlah mg/ml glukosa yang dihasilkan dikalikan dengan 0,185 unit [14].

#### C. Pembuatan Kultur Stok dan Kultur Kerja

Isolat *Zymomonas mobilis* disubkultur dalam tabung reaksi yang berisi medium NA (Nutrien Agar) miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Untuk memperkaya jumlah sel, maka medium ditambahkan 20g/L glukosa, 10 g/L *yeast extract*, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O [16].

#### D. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Aktivasi *Zymomonas mobilis* dilakukan dengan mengambil 1 ose kultur kerja yang diinokulasi ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 5 ml hidrolisat ekstrak sampah yang telah disterilisasi dan telah diatur pH menjadi 4 dengan penambahan larutan HCl 30% dan diinkubasi dalam inkubator suhu 30°C selama 24 jam (aktivasi I). Setelah 24 jam, hasil dari aktivasi I diambil sebanyak 1 ml (10%) dan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 9 ml hidrolisat ekstrak sampah yang telah disterilisasi kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam (Aktivasi II). Kemudian diambil 5 ml (10%) dari hasil aktivasi II dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 45 ml hidrolisat ekstrak limbah sayur dan limbah buah yang telah disterilisasi kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam yang disebut sebagai kultur fermentasi [17][18].

Dilakukan pengenceran dari 10<sup>-1</sup> sampai dengan 10<sup>-9</sup>. Medium kultur diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Tabung reaksi yang berisi campuran tersebut divortex dengan *vortex mixer*, dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya. Perlakuan diulangi sampai pengenceran 10<sup>-9</sup>. Pembuatan grafik kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara pengukuran absorbansi *Zymomonas mobilis* diukur pada panjang gelombang 600 nm dengan interval tiap 1 jam sekali selama 24 jam. Dibuat grafik kurva pertumbuhan dari nilai absorbansi dan waktu fermentasi [19]. Penentuan *regeneration (doubling) time (Td)* dilakukan selama fase log, dimana waktu inkubasi dengan nilai Td tertinggi dijadikan sebagai usia starter [20].

#### E. Pembuatan Starter

*Zymomonas mobilis* diambil 1 ose dan diinokulasi ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 5 ml hidrolisat ekstrak limbah sayur dan limbah buah steril yang telah diatur pH menjadi 4 dengan penambahan larutan HCl 30%. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam (Aktivasi I). Sebanyak 1 ml dari aktivasi I (10%) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer yang berisi 9 ml hidrolisat ekstrak limbah sayur dan limbah buah, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam (Aktivasi II). Sebanyak 5 ml dari aktivasi II (10%) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 45 ml hidrolisat ekstrak limbah sayur dan limbah buah, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C sampai jam dimana fase log *Zymomonas mobilis* terjadi (sesuai dengan kurva pertumbuhan) (Aktivasi III) [17][18].

#### F. Proses Fermentasi

Starter ditambahkan dengan konsentrasi sesuai dengan rancangan penelitian (0,5,10 dan 15%) ke dalam botol

fermentor 100 ml yang berisi 50 ml ekstrak limbah sayur dan limbah buah, diinkubasi dengan lama sesuai dengan rancangan penelitian (0,2,4,6 dan 8 hari) pada suhu kamar. Proses fermentasi dilakukan pada kondisi anaerob dengan menggunakan teknik Hungate, yaitu dengan mengalirkan gas nitrogen selama 2 menit ke dalam fermentor kemudian ditutup dengan penutup sumbat karet. Untuk proses fermentasi 0 hari langsung melalui tahap pasteurisasi. Setelah proses fermentasi selesai, tutup botol dilepas, ditutup dengan kapas lemak dan dipasteurisasi pada suhu  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit [21]. Tujuan dari pasteurisasi ini adalah untuk mematikan bakteri yang terkandung dalam sampel sehingga proses fermentasi dapat berhenti [13].

#### G. Pengukuran Kadar Etanol

Tabung destilasi dan labu gondok 250 ml disiapkan, selanjutnya 50 ml sampel cairan hasil fermentasi menggunakan labu ukur 50 ml dan dimasukkan ke dalam tabung destilasi. Dididihkan dengan hati-hati untuk menghindari buih yang berlebihan, destilasi campuran alkohol dan air sampai dapat dikumpulkan tepat 5 ml distilat. Sementara dilakukan destilasi, piknometer dikalibrasi. Piknometer diisi akuades destilasi dan ditutup. Piknometer dan akuades ditimbang, berat yang didapat adalah W2. Kemudian piknometer dikosongkan, akuades yang tersisa diabsorpsi dengan aseton. Tabung piknometer dikeringkan dengan oven. Piknometer yang telah kering ditimbang, berat yang didapatkan adalah W1. Berat akuades (W) dihitung dengan cara  $W2 - W1$  [22].

Distilat dipindahkan ke dalam gelas beaker kering. Distilat diaduk supaya homogen sebelum diisikan ke piknometer. Piknometer kering diisi dengan distilat, permukaan luar piknometer dikeringkan dan ditimbang. Hasil yang didapat adalah W3. Berat distilat adalah  $W3 - W1 = L$ . Berat air (L) dihitung dengan *specific gravity* atau  $spg = L/W$ . Nilai spg ditentukan dengan menggunakan Tabel AOAC (*Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*) dan selanjutnya persentase etanol dihitung [22].

#### H. Pengukuran Gula Reduksi

Gula reduksi diukur dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi [15]. Sampel 1 ml ditambah akuades sampai volume akhir 10 ml. Campuran diambil 1 ml dan ditambah 9 ml akuades. Sampel diambil 1 ml dan dicampur 1 ml larutan Nelson (campuran Nelson A&B; 25:1 v/v), kemudian dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit. Sampel didinginkan sampai mencapai suhu kamar. Sampel ditambah 1 ml larutan arsenomolybdat dan 7 ml akuades kemudian digojok menggunakan *vortex*. Campuran tersebut dimasukkan ke kuvet dan diukur penyerapan cahaya tampak (*visible*) pada panjang gelombang 510 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dikurangi nilai absorbansi blanko sehingga diperoleh nilai absorbansi sampel. Nilai absorbansi sampel dikonversi ke kadar gula reduksi (mg/ml) berdasar persamaan regresi larutan standar [23].

#### I. Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA atau *Analysis Of Variance* untuk mengetahui pengaruh interaksi faktor konsentrasi inokulum *Zymomonas mobilis* dan lama

waktu fermentasi terhadap kadar etanol yang dihasilkan dengan hipotesa: ( $H_0$ ) Tidak ada pengaruh interaksi antara konsentrasi inokulum *Zymomonas mobilis* dan lama waktu fermentasi terhadap persentase (%) etanol yang dihasilkan. ( $H_1$ ) Ada pengaruh interaksi antara konsentrasi inokulum *Zymomonas mobilis* dan lama waktu fermentasi terhadap persentase (%) etanol yang dihasilkan. Jika  $H_1$  diterima, maka dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) untuk mengetahui perbedaan nyata antara pengaruh kombinasi perlakuan konsentrasi inokulum dan lama waktu fermentasi [24].

### III. HASIL DAN DISKUSI

#### A. Proses Perlakuan Awal (Pretreatment)

Sampel sampah sayur dan buah yang diambil yaitu terdiri dari lima jenis sampah sayur (kangkung, kacang panjang, selada, kenikir, dan sawi hijau) dan lima jenis sampah buah (pisang raja, apel, jeruk, jambu biji, dan pepaya) yang merupakan sampah terbanyak setiap harinya dengan kandungan serat yang besar juga. Macam *pretreatment* yang dilakukan yaitu *pretreatment* fisik, mekanik dan kimiawi. Pada *pretreatment* fisik, sampah yang telah dicuci bersih, dijemur di bawah sinar matahari sampai kering ( $\pm 1-2$  hari) dengan tujuan untuk mengurangi kadar air sampah sayur dan buah yang mencapai 55,38 % [25]. Setelah itu dilakukan *pretreatment* mekanik dengan memotong sampah yang sudah kering  $\pm 2$  cm, diblender, diayak menggunakan *mesh* berukuran 40. Hal ini dilakukan dengan tujuan didapatkan ukuran yang homogen dan memperbesar luas permukaan substrat [26]. Menurut [27], ukuran bahan baku akan mempengaruhi porositas, sehingga dapat memaksimalkan kontak antara bahan baku dengan enzim. Semakin kecil ukuran substrat, maka akan mempermudah terdegradasinya lignin sehingga selulosa dan hemiselulosa akan terhidrolisis secara optimal.

Proses *pretreatment* yang terakhir yaitu *pretreatment* kimia dengan menggunakan NaOH. Proses ini biasa disebut dengan delignifikasi, yaitu suatu proses pembebasan lignin dari suatu senyawa kompleks. Delignifikasi dilakukan dengan larutan NaOH karena natrium hidroksida ini akan membentuk larutan alkali yang kuat ketika dilarutkan dalam air. Menurut [28], lignin tidak akan larut dalam larutan asam, tetapi mudah larut dalam larutan alkali encer. Sehingga larutan NaOH ini dapat menyerang dan merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf, memisahkan sebagian lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa [14]. Proses delignifikasi dengan NaOH menyebabkan ikatan silang dari struktur aromatik lignin dapat memperlambat penetrasi oleh enzim sehingga mempengaruhi proses hidrolisis. Ion  $\text{OH}^-$  dari NaOH akan memutus ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin. Sedangkan ion  $\text{Na}^+$  akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Garam fenolat ini bersifat mudah larut. Lignin yang terlarut ditandai dengan warna hitam pada larutan yang disebut lindi hitam atau *black liquor* [15].

Struktur kimia lignin akan mengalami perubahan di bawah kondisi suhu tinggi, mengakibatkan lignin terpecah menjadi partikel yang lebih kecil dan terlepas dari selulosa, maka dari itu diautoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam [29]. Setelah

diautoklaf, dibilas dengan air mengalir sampai pH 7. Proses penghilangan lignin ini dapat dikatakan lama, yaitu  $\pm 12$  jam. Semakin tinggi hemiselulosa dan lignin pada limbah, semakin banyak NaOH yang mengakses ikatan lignin dan hemiselulosa, menyebabkan banyaknya NaOH yang kontak dengan limbah, sehingga proses penghilangan NaOH semakin lama [30]. Hasil akhir proses *pretreatment* yaitu didapatkan ekstrak sampah sebesar 187 gr dari berat awal sampah sayur dan buah 2000 gr.

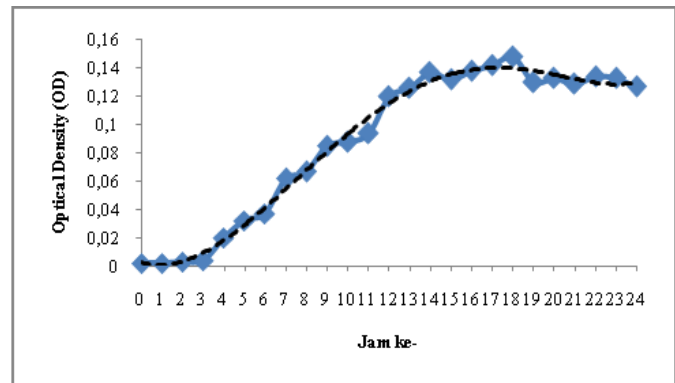
### B. Penentuan Umur Starter

Starter merupakan biakan mikroba tertentu yang ditumbuhkan di dalam substrat atau medium untuk tujuan proses tertentu. Kurva pertumbuhan memberikan gambaran mengenai faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan suatu mikroba misalnya substrat, suhu lingkungan, dan pH. Kurva pertumbuhan *Zymomonas mobilis* pada Gambar 1, diperoleh dengan menumbuhkan isolat dalam medium nutrisi Broth. Pengukuran jumlah sel dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan medium selama 24 jam dengan interval setiap 1 jam sekali dan 3 kali pengulangan. Untuk mencegah kontaminasi dalam pengambilan data, setiap pengukuran absorbansi dilakukan dengan mengambil data dari medium pada tabung yang berbeda.

Setiap mikroorganisme memiliki bentuk kurva pertumbuhan yang spesifik. Pada kurva pertumbuhan tersebut, fase lambat atau *lag phase* ini terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-3. Pada fase ini bakteri melakukan metabolisme dalam mempersiapkan dan menyesuaikan diri dengan kondisi pertumbuhan di lingkungan yang baru sehingga tidak ada penambahan jumlah sel yang signifikan. Pertambahan sel mulai terlihat dan terus menanjak pada jam ke-3 sampai jam ke-19. Fase ini juga disebut dengan fase eksponensial yaitu fase perbanyakan jumlah sel, aktivitas sel meningkat, dan merupakan fase yang penting dalam pertumbuhan *Zymomonas mobilis*.

Setelah terjadi pertambahan sel, aktivitas sel akan meningkat pula, pada umumnya akan cenderung stagnan, disebut fase stasioner yaitu pada jam ke-19 sampai ke-24. Pada fase ini nutrisi yang tersedia makin lama makin habis atau terjadi penimbunan zat racun sebagai bahan akhir metabolisme. Akibatnya kecepatan pertumbuhan menurun dan pertumbuhan akhirnya terhenti. Pertumbuhan bakteri berlangsung dengan mengonsumsi nutrisi sekaligus mengeluarkan produk-produk metabolisme yang terbentuk, maka setelah waktu tertentu laju pertumbuhannya akan menurun dan akhirnya akan berhenti sama sekali yang disebut dengan fase kematian (*death phase*). Namun, pada penelitian ini tidak ditemukan *death phase* karena pada jam ke-24 kurva tetap menunjukkan grafik yang stagnan.

Maka, dengan membuat kurva pertumbuhan ini dapat ditentukan waktu yang optimal untuk starter. Umur starter ditentukan dengan menghitung laju pertumbuhan spesifik ( $\mu$ )



Gambar 1. Kurva pertumbuhan bakteri *Zymomonas mobilis* pada medium sampah sayur dan buah.

dan waktu *doubling time* ( $t_g$ ) berdasarkan data jumlah sel dan waktu inkubasi pada kurva pertumbuhan [31]. Umur starter *Zymomonas mobilis* yang digunakan berdasarkan kurva pertumbuhan yaitu jam ke-(6-7) dimana besar laju pertumbuhannya menunjukkan angka terbesar  $\mu=0,476$  generasi/jam dengan waktu *doubling time* tercepat 80,56 menit.

### C. Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Lama Fermentasi

Gula merupakan faktor penting bagi sel bakteri sebagai sumber energi untuk metabolisme yang pada akhirnya akan berpengaruh terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan. Namun, besarnya konsentrasi etanol yang didapatkan dari proses fermentasi tidak dapat ditentukan hanya berdasarkan konsentrasi gula reduksi saja, karena ada banyak faktor yang mempengaruhi seperti konsentrasi inokulum, lama fermentasi, suhu, pH dan nutrisi.

Pada penelitian ini terdapat dua variabel bebas yaitu konsentrasi inokulum bakteri *Zymomonas mobilis* (0, 5, 10 dan 15%) dan lama waktu fermentasi (0, 2, 4, 6, dan 8 hari). Variasi konsentrasi inokulum ditetapkan atas dasar penelitian Wignyanto *et al* (2001), yang menyatakan bahwa rentang konsentrasi yang sempit (6, 8, dan 10%) tidak memberikan hasil yang berbeda nyata. Parameter yang diamati yaitu kadar etanol yang terbentuk.

Berdasarkan hasil uji Anova, F hitung lebih besar dari F tabel yang berarti  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Sehingga ada pengaruh interaksi antara konsentrasi inokulum *Zymomonas mobilis* dan lama waktu fermentasi terhadap persentase (%) etanol yang dihasilkan. Karena  $H_1$  diterima, maka dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95% untuk diketahui apakah terjadi perbedaan nyata antara interaksi konsentrasi inokulum dan lama waktu fermentasi. Berdasarkan uji Tukey, didapatkan hasil bahwa konsentrasi inokulum dan lama fermentasi sama-sama memiliki perbedaan yang nyata. Begitu juga dengan hasil interaksi keduanya menunjukkan perbedaan yang nyata, ditunjukkan dengan notasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada Gambar 2. dapat dilihat bahwa konsentrasi inokulum 0% sebagai kontrol, grafik menunjukkan posisi stagnan yang artinya tidak ada produk fermentasi yang dihasilkan karena tidak ada bakteri *Zymomonas mobilis* yang ditambahkan. Fermentasi pada hari ke-4 sampai ke-8, etanol mulai terbentuk yaitu 0,2% (v/v). Hal ini diduga pada umumnya sayur dan

buah yang masak mengandung etanol secara alami. Sesuai dengan literatur [31], menyatakan bahwa semakin masak sayur dan buah, semakin tinggi kadar etanolnya namun masih di bawah 1%. Dugaan ini diperkuat dengan data statistik yang menyatakan bahwa pada hari ke-4 sampai ke-8 dengan hari ke-0 sampai hari ke-2 termasuk dalam grup yang sama berarti tidak berbeda nyata. Seharusnya dalam kondisi tidak ada mikroba ini, konversi gula reduksi tidak lebih besar dari kondisi yang ditambahkan mikroba. Tetapi, konversi gula reduksi pada konsentrasi inokulum 0% tinggi yaitu 49,80%. Hal ini diduga karena etanol dari sampah sayur dan buah tanpa penambahan *Zymomonas mobilis* dengan pH 4 merupakan kondisi penggunaan konversi gula reduksi dan air yang mendukung terjadinya peristiwa fermentasi secara enzimatik yang dihasilkan dalam sampah sayur dan buah. Dugaan ini selaras dengan [32] yang menyatakan bahwa pada kondisi alami tanpa penambahan bakteri, gula reduksi cenderung terkonversi menjadi asetaldehid dan beberapa metabolit lain.

Peningkatan kadar etanol terjadi seiring dengan waktu fermentasi yang semakin lama. Misalnya pada konsentrasi inokulum 5%, sampai pada fermentasi hari ke-8 menunjukkan grafik yang terus meningkat. Hal ini diduga bahwa sampai pada hari ke-8, masih terdapat nutrisi yang ditambahkan pada medium fermentasi seperti *yeast extract* yang merupakan sumber nitrogen untuk pertumbuhan *Zymomonas mobilis* [33]. Sehingga sel bakteri akan tumbuh dan membelah secara eksponensial sampai jumlah yang maksimal atau masih memasuki fase logaritma. Selain itu, glukosa pada medium fermentasi sampai pada hari ke-8 masih banyak, nilai konversi gula reduksinya 44,81%.

Proses fermentasi ini dapat terus berlangsung dengan memanfaatkan glukosa sebagai sumber energi dalam siklus glikolisis yang menghasilkan piruvat. Kemudian katabolisme piruvat secara anaerob akan menghasilkan etanol dan CO<sub>2</sub>. Maka, dimungkinkan dengan konsentrasi inokulum 5%, akan didapatkan kadar etanol yang lebih besar dengan waktu fermentasi yang lebih lama, karena pada hari ke-8 hanya dihasilkan kadar etanol 6,6% (v/v). Maka dapat disimpulkan bahwa penggunaan konsentrasi inokulum 5% dalam skala produksi kurang efektif untuk produksi etanol karena membutuhkan waktu fermentasi yang lama. Hal ini diperkuat dengan data uji statistik yang menyatakan bahwa konsentrasi inokulum 5% berbeda nyata dengan konsentrasi 10 dan 15%.

Sedangkan pada konsentrasi inokulum 10% dan 15%, menunjukkan grafik peningkatan etanol di hari ke-0 sampai hari ke-6 kemudian menurun pada hari ke-8. Penurunan kadar etanol terjadi di hari ke-8 diduga selama fermentasi, gula reduksi telah habis digunakan bakteri *Zymomonas mobilis* untuk dikonversi menjadi etanol. Hal ini sesuai dengan [34] yang menyatakan bahwa semakin banyak gula reduksi yang dapat dimanfaatkan oleh sel, semakin tinggi juga kadar etanol yang dihasilkan. Data nilai konversi gula reduksi jika dibandingkan dengan inokulum 5%, jauh lebih besar yaitu pada inokulum 10% (50,27%) dan inokulum 15% (47,87%).

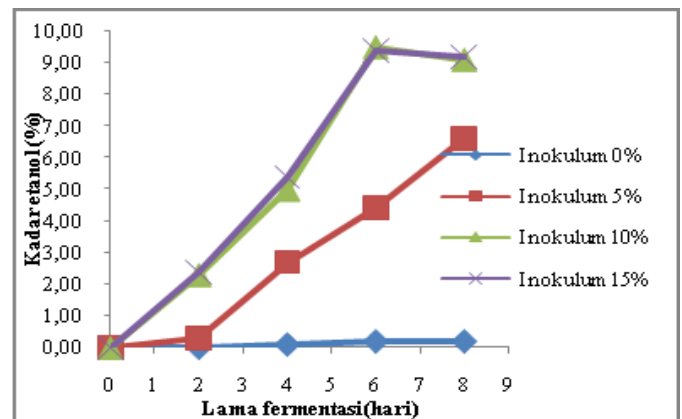
Selain itu, semakin lama waktu fermentasi, maka nutrisi dalam medium semakin berkurang dengan adanya jumlah sel yang semakin bertambah dapat mengakibatkan kompetisi dan akhirnya akan memasuki fase kematian. Akumulasi etanol

Tabel 1.

Rerata kadar etanol (%) hasil fermentasi ekstrak sampah sayur dan buah pasar wonokromo surabaya menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

Konsentrasi inokulum	Jumlah etanol yang dihasilkan (%) dalam waktu fermentasi				
	0 hari	2 hari	4 hari	6 hari	8 hari
0%	0,00 <sup>h</sup>	0,00 <sup>h</sup>	0,10 <sup>h</sup>	0,20 <sup>h</sup>	0,20 <sup>h</sup>
5%	0,00 <sup>h</sup>	0,30 <sup>h</sup>	2,70 <sup>f</sup>	4,40 <sup>e</sup>	6,60 <sup>c</sup>
10%	0,00 <sup>h</sup>	2,30 <sup>g</sup>	5,00 <sup>d</sup>	9,50 <sup>a</sup>	9,10 <sup>b</sup>
15%	0,00 <sup>h</sup>	2,40 <sup>fg</sup>	5,40 <sup>d</sup>	9,40 <sup>ab</sup>	9,20 <sup>ab</sup>

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom dan baris menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Tukey pada selang kepercayaan 95%.



Gambar 2. Grafik kadar etanol selama proses fermentasi dengan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*.

hasil metabolisme mikroorganisme menurut [35] dapat menghambat pembelahan dan aktivitas fermentasi sel, yang mengakibatkan jumlah etanol sedikit. Hal ini akan lebih kuat dugaannya bila didukung dengan adanya data perhitungan jumlah sel bakteri *Zymomonas mobilis*.

Untuk mengetahui jumlah konsentrasi inokulum dan lama waktu fermentasi yang tepat agar didapatkan produksi etanol yang optimum dapat ditentukan dengan melihat kadar etanol tertinggi pada Tabel 1. Kadar etanol tertinggi pada konsentrasi inokulum 10% dengan lama fermentasi 6 hari sebesar 9,50% (v/v). Berdasarkan uji statistik dapat dilihat bahwa konsentrasi inokulum 10% dan 15% tidak berbeda nyata (notasi a). Namun, untuk skala produksi menggunakan konsentrasi inokulum 15% kurang efektif, karena hasil etanol yang dihasilkan pada hari ke-6 (9,40%) dan ke-8 (9,20%) tidak berbeda nyata sekali dengan etanol tertinggi 9,50% di hari ke-6 dengan konsentrasi inokulum 10%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa jika dengan konsentrasi inokulum 10% saja sudah dihasilkan etanol tertinggi, maka tidak perlu lagi digunakan inokulum 15% yang membuat semakin tidak efisien. Bahkan menurut [36], penggunaan konsentrasi inokulum yang terlalu tinggi dapat menyebabkan pengurangan viabilitas sel.

Bakteri *Zymomonas mobilis* dapat menghasilkan etanol karena mampu menguraikan glukosa, fruktosa atau sukrosa sebagai sumber karbon melalui jalur metabolik *Entner-Doudoroff*. Jalur metabolisme ini hanya menghasilkan 1 mol ATP tiap mol glukosa atau fruktosa, sehingga *Zymomonas mobilis* menguraikan glukosa dengan kecepatan tinggi supaya

menghasilkan cukup energi untuk pertumbuhannya. Oleh karena hanya menghasilkan satu molekul ATP, maka *Zymomonas mobilis* harus menguraikan glukosa dengan cepat untuk memenuhi kebutuhan ATP. Hasil bersih dari jalur *Entner-Doudoroff* ini adalah etanol dan CO<sub>2</sub> [33].

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi inokulum bakteri *Zymomonas mobilis* dan lama fermentasi. Kadar etanol optimum sebesar 9,5% (v/v) dihasilkan pada konsentrasi inokulum 10% dan lama fermentasi 6 hari.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis M.A. mengucapkan terima kasih kepada Kepala PD. Pasar Surya yang telah memberikan izin melakukan penelitian di Pasar Wonokromo Surabaya dalam pengambilan sampel sampah sayur dan buah.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] L. Sulistyorini, "Pengelolaan Sampah dengan Cara Menjadikannya Kompos". *Jurnal Kesehatan Lingkungan* Vol.2 (2005) 77-84.
- [2] T. Winanti, "Studi Kemungkinan Pengelolaan Sampah Organik Menjadi Kompos di Darmo Trade Center Pasar Wonokromo Surabaya". *Jurnal Teknologi Kejuruan* Vol. 29 No.1 (2006).
- [3] E. I. Riyanti, "Beberapa Gen Pada Bakteri yang Bertanggung Jawab Terhadap Produksi Bioetanol". *Jurnal Litbang Pertanian* Vol. 30 No. 2 (2010).
- [4] Hening and Zeddies, "Bioengineering and Agriculture". Promises and Challenges International Food Policy Research Institute (2006).
- [5] A. S. Kusnadi and Y. H. Adisendjaja, "Pemanfaatan Sampah Organik Sebagai Bahan Baku Produksi Bioetanol Sebagai Energi Alternatif". Laporan Penelitian Strategis Nasional Universitas Pendidikan Indonesia (2009).
- [6] M. Lee, A. M. Fikri, N. Muna, L.R. Septiana and N. Efrat, "Komersialisasi Bioetanol Sebagai Produk Suplemen Bensis Ramah Lingkungan". Program Kreativitas Mahasiswa IPB, Bogor (2008).
- [7] Sardjoko, "Bioteknologi-Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya". PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta (1991).
- [8] R. M. Busche, Scott, Davison and Lynd, "Etanol, The Ultimate Feedstock. A Technoeconomic Evaluation of Ethanol Manufacture in Fluidized Bed Bioreactors Operating With Immobilized Cells". *Journal Application of Biochemistry and Biotechnology* Vol. 34/35 (1992) 395-415.
- [9] J. Nowak, "Ethanol Yield and Productivity of *Zymomonas mobilis* In Various Fermentation Methods". *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* Vol. 3 No. 2 (2000).
- [10] A. Chrisnawati and Rosa, "Produksi Etanol Menggunakan Mutan *Zymomonas mobilis* yang Dimutasi dengan Hydroxylamine". Laporan Thesis (S2) Jurusan Kimia FMIPA-ITS, Surabaya (2009).
- [11] A.K. Prasetyo and Hadi, "Pembuatan Etanol dari Sampah Pasar Melalui Proses Hidrolisis Asam dan Fermentasi Bakteri *Zymomonas mobilis*". Laporan Tugas Akhir (S1) Jurusan Teknik Lingkungan FTSP-ITS, Surabaya (2010).
- [12] S. Mushlihah, "Pengaruh pH dan Konsentrasi *Zymomonas mobilis* untuk Produksi Etanol dari Sampah Buah Jeruk". Laporan Tugas Akhir (S1) Jurusan Teknik Lingkungan FTSP-ITS, Surabaya (2011).
- [13] N. Faizah, "Pengaruh Penggunaan Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Ragi Tape untuk Fermentasi dalam Pembuatan Bioetanol dari Sampah Buah Tomat". Laporan Tugas Akhir (S1) Jurusan Teknik Lingkungan FTSP-ITS, Surabaya (2012).
- [14] I. B. Gunam, K. Buda and I. M. Y. S. Guna, "Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH dan Konsentrasi Substrat Jerami Padi Terhadap Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* Nrrl A-Ii 246". *Jurnal Biologi XIV (1)* (2010) 55-61.
- [15] S. Selviza, N. Idiawati and T.A. Zaharah, "Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* Dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa". *JKK* Vol.2 (2013).
- [16] T. Struch, Neuss, B. Mayer and Sahn, "Osmotic Adjustment of *Zymomonas mobilis* to Concentrated Glucose Solutions". *Journal Application of Microbiology and Biotechnology* Vol. 34 (1991) 518-523.
- [17] M.L. Cazetta, Celligoi, Buzato and Scamino, "Fermentation of Molasses by *Zymomonas mobilis*: Effect of Temperature and Sugar Concentration on Etanol Production". *Journal Bioresource and Technology* Vol. 98 (2007) 2824-2828.
- [18] K. Zhang and Feng, "Fermentation Potentials of *Zymomonas mobilis* and Its Application In Ethanol Production From Low-cost Raw Sweet Potato". *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (37) (2010) 6122-6128.
- [19] O. Obire, "Activity of *Zymomonas mobilis* in Palm Sapobtained From Three Areas in Edo State, Nigeria". *Journal of Applied Science and Environmental Management* Vol. 9 (1) (2005) 25-30.
- [20] S. Hogg, "Essential Microbiology". John Wiley & Sons Ltd, England (2005).
- [21] E. M. Puspita, Silviana and Ismail, "Fermentasi Etanol dari Molasses dengan *Zymomonas mobilis* A3 yang Diamobilisasi Pada Karaginan". *Seminar rekayasa Kimia dan Proses 210 issn* (2010) 1411-4216.
- [22] Purwanto, "Aktivasi Fermentasi Alkoholik Cairan buah". *Jurnal Universitas Widya Mandala Madiun* No. 1 (2004) 0854-1981.
- [23] C. Dewi, T. Purwoko and A. Pangastuti, "Produksi Gula Reduksi Oleh *Rhizopus oryzae* Dari Substrat Bekatul". *Bioteknologi* Vol. 2 No. 1 (2005).
- [24] R. E. Walpole, "Ilmu Peluang dan Statistika Untuk Insinyur dan Ilmuwan". Institut Teknologi Bandung, Bandung (1992).
- [25] Y. D. Yenni and S. M. Sari, "Uji Pembentukan Biogas Dari Substrat Sampah Sayur dan Buah Dengan Ko-Substrat Limbah Isi Rumen Sapi". *Jurnal Teknik Lingkungan UNAND* Vol. 9 No. 1 (2012).
- [26] Z. Sa'adah, N. Ika and Abdullah, "Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat". Laporan Tugas Akhir (S1) Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik UNDIP, Semarang (2008).
- [27] Y. Sun and Cheng, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production". *A Review Bioresource Technology* Vol. 83 (2002).
- [28] E. K. Artati, A. Effendi, and T. Haryanto, "Pengaruh Konsentrasi Larutan Pemasak Pada Proses Delignifikasi Eceng Gondok Dengan Proses Organosolv". *Ekuilibrium* Vol. 8 No. 1 (2009).
- [29] I. G. Wiratmaja, I. G. B. W. Kusuma and I. N. S. Winaya, "Pembuatan Etanol Generasi Kedua Dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Eucheuma cottonii* Sebagai Bahan Baku". *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin* Vol. 5 No. 1 (2011).
- [30] S. I. Musaato and J. A. Teixeira, "Lignocellulose As Raw Material In Fermentation Process". *Current Research Technology and Education Topics In Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (2010).
- [31] E. Indrawati, N. D. Kuswytasari and E. Zulaika, "Pengaruh Konsentrasi Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* dan Lama Waktu Fermentasi Pada Produksi Etanol dari Limbah Kulit Nanas (*Ananas comosus* L. Merr)". Laporan Tugas Akhir (S1) Jurusan Biologi FMIPA-ITS, Surabaya (2009).
- [32] M. S. A. Wecker and Zall, "production of Acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*". *Journal Applied And Environmental Microbiology* Vol. 53 No. 12 (1987).
- [33] M. G. Garrity, "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Department of Microbiology and Molecular Genetics, Machigan State University, USA (2005).
- [34] M. Yudoamijoyo, A. A. Darwis, and E. G. Sa'id, "Teknologi Fermentasi". Rajawali Press, Jakarta (1992).
- [35] S. Wignyanto and Novita, "Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* Pada Fermentasi Etanol". *Jurnal Teknologi Pertanian* Vo. 2 (2001).
- [36] W. R. Gibbson and C. A. Westby, "Effect of Inoculum Size on Solid-Phase Fermentation of Fodder Beets for Fuel Ethanol Production". *Journal Applied and Environmental Microbiology* Vol. 52 (1986) 960-962.