

**Fermentasi Fermentasi Asam Asetat dari Nira Nipah menggunakan
Acetobacter pasteurianus dengan Variasi Waktu dan pH Awal Fermentasi**
Tantri Wilinda Julia¹⁾, Chairul²⁾, Sri Rezeki Muria²⁾

¹⁾Mahasiswa Program Studi Sarjana Teknik Kimia ²⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia
Laboratorium Teknologi Bioproses
Program Studi Teknik Kimia S1, Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Bina Widya Jl. HR Subrantas Km 12,5 Simpang Baru, Panam,
Pekanbaru 28293
Email : Tantri.wilinda@student.unri.ac.id

ABSTRACT

*Indonesia has 23% of world's mangrove ecosystems, add up to 3.489.140,68 hectares with nipah plants (Nypa Fruticans) as one of the largest. Nipah sap is one of the products obtained from young fruit bunches with high sugar content that providing an opportunity as an alternative raw material for the production of acetic acid. Acetic acid can be produced from sugary materials through a fermentation process using microorganisms. This study was taken up to evaluate the role of some paramaters like initial pH and incubation period on acetic acid production from nipah sap by two simultaneous stages of fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter pasteurianus*. Nipah sap after acid hydrolysis using 3 g/L oxalid acid were used as substrate for bio-ethanol production. Sugar contents of 417,71 g/L, temperature of 30°C, initial pH 4,5 and incubation period of 24 hours, inoculum of *S.cerevisiae* 10% (v/v) produced 10% (v/v) bio-ethanol. This medium were used as substrate to produced acetic acid using *A.pasteurianus*. Initial pH variation of 5, 5,5 and 6 and incubation period of 1,3 5, 7 and 9 days. The highest concentration of acetic acid obtained is 31,046 g/L and 30,56 %yield on the 5th day of acetic acid fermentation at the initial pH fermentation 5,5.*

Keywords: *acetic acid, Acetobacter pasterian, fermentation, initial pH, nypa sap.*

1. PENDAHULUAN

Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) adalah tanaman dari suku *Palmae* yang tumbuh disepanjang sungai dan terpengaruh pasang surut air laut. Tumbuhan ini dikelompokkan pula dalam ekosistem hutan *mangrove*. Nipah memiliki buah yang membulat seperti buah pandan dengan panjang bonggol hingga 45 cm. Sebaran jenis tanaman ini umumnya didaerah Equator, melebar dari Sri Langka ke Asia Tenggara hingga Australia Utara. Berdasarkan data Kementrian Lingkungan Hidup dan Kehutanan pada tahun 2015, Indonesia memiliki 23% dari ekosistem *mangrove* dunia yakni sebesar 3.489.140,68 hektar.

Nipah sebagai salah satu tanaman penyusun *mangrove* telah dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar sebagai sumber pangan. Hal ini dikarenakan nipah mengandung karbohidrat dan protein yang terdapat dalam buah maupun nira nipah. Pemanfaatan nipah sebagai sumber pangan salah satunya adalah pembuatan gula nipah melalui proses pengolahan nira (cairan manis yang diperoleh dari tandan bunga sebelum mekar) dan tepung nipah rendah kalori yang cocok untuk makanan diet (Subiandono dkk, 2011).

Kandungan karbohidrat didalam nira nipah dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi terbarukan berbasis tanaman yaitu mengkonversi nira menjadi asam asetat melalui proses fermentasi. Pada sektor

industri, asam asetat digunakan dalam preparasi dari *metal acetates* seperti *vinyl acetate* yang digunakan pada proses *printing* dalam industri plastik, *cellulose acetate* yang digunakan dalam pembuatan film fotografi dan tekstil serta *volatile organic ester* (etil dan butil asetat) yang sering digunakan sebagai pelarut cat dan *lacquers*. Pada sektor biologis, asam asetat merupakan intermediat metabolis penting dan secara alami terdapat dalam cairan tubuh serta sari buah (Brown, 2018).

Produksi asam asetat menggunakan bahan baku nira nipah dapat dilakukan menggunakan proses fermentasi dengan bantuan mikroorganisme. Proses fermentasi dari bahan bergula umumnya melewati dua tahap fermentasi yaitu fermentasi bioetanol dan fermentasi asam asetat. Akan tetapi kandungan gula dalam nira nipah masih berupa sukrosa sementara substrat yang digunakan dalam pembentukan bioetanol adalah gula pereduksi (glukosa dan fruktosa), oleh karena itu perlu dilakukan hidrolisis sukrosa terlebih dahulu. Peningkatan kadar gula pereduksi akan meningkatkan jumlah produk yang dihasilkan oleh karena itu perlu untuk mengetahui pengaruh waktu fermentasi terhadap produk untuk memperoleh waktu fermentasi yang sesuai untuk jumlah substrat yang tersedia dalam medium fermentasi.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah nira nipah, *S. cerevisiae* Y-613, dan *A. pasteurianus* B-376, *Glucose-Yeast Extract Peptone* (GYP), PDA, reagen Benedict, reagen Nelson-Somogyi, HCl, NaOH, indikator PP, *aquadest*, urea, NPK, KH_2PO_4 dan $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

2.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah reaktor 2 liter, erlenmeyer 600 mL, pH meter, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, gelas ukur, pipet tetes, *stirer*, inkubator, alat titrasi.

2.3 Variabel

Variabel berubah pada penelitian ini adalah waktu fermentasi asam asetat 1,3,5,7 dan 9 hari. Selain itu variabel lain yang digunakan adalah pH awal fermentasi asam asetat 5, 5,5 dan 6.

2.4 Prosedur Penelitian

a. Persiapan Bahan Baku dan Alat

Persiapan bahan baku meliputi proses hidrolisis nira nipah menggunakan asam oksalat 3 g/L kedalam nira nipah kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave*. Nira nipah didinginkan hingga mencapai suhu ruang lalu dinetralisasi dengan larutan NaOH 2 N untuk mengatur pH hingga mencapai pH fermentasi. Nira nipah yang digunakan adalah sebanyak 2 liter. Alat yang akan digunakan selama proses fermentasi disterilisasi menggunakan *autoclave*.

b. Fermentasi Bioetanol

Tahap fermentasi bioetanol diawali dengan proses peremajaan *S. cerevisiae* menggunakan medium PDA yang dilanjutkan dengan PDB selama masing-masing 24 jam. Pembuatan inokulum dilakukan dengan menambahkan 0,4 g/L urea dan 0,5 g/L NPK kedalam 200 mL (10% v/v) nira nipah didalam erlenmeyer, lalu ditambahkan kultur *S.cerevisiae* yang dikembangkan dalam medium PDB. Inokulum diinkubasi dengan disertai pengadukan 200 rpm selama 24 jam atau hingga OD mencapai 0,5 pada suhu ruang dan pH awal fermentasi 4,5. Inokulum ditambahkan kedalam medium fermentasi (1800 mL) yang telah ditambahkan urea dan NPK kemudian difermentasi pada kondisi fermentasi yang sama selama 1 hari.

c. Fermentasi Asam Asetat

Tahap fermentasi asam asetat diawali dengan proses peremajaan *A.pasteurianus* menggunakan medium GYP dan GYP *broth* selama masing-masing 24 jam. Pembuatan inokulum dilakukan dengan menambahkan 1,1 g/L K_2HPO_2 dan 3,3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kedalam 60 mL (10% v/v) substrat hasil

fermentasi bioetanol, lalu ditambahkan kultur *A.pasteurianus* yang dikembangkan dalam medium *GYP broth*. Inokulum diinkubasi dengan disertai pengadukan 200 rpm selama 24 jam atau hingga OD mencapai 0,5 pada suhu ruang dan variasi pH awal fermentasi (5, 5,5 dan 6). Inokulum ditambahkan ke dalam medium fermentasi (600 mL) yang telah ditambahkan urea dan NPK kemudian difermentasi pada kondisi fermentasi yang sama dengan variasi waktu fermentasi 1,3,5,7 dan 9 hari.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Hidrolisis terhadap Kadar Gula Pereduksi Nira Nipah Segar

Hidrolisis nira nipah segar dilakukan dengan tujuan untuk mengkonversi sukrosa menjadi gula pereduksi sehingga diharapkan perolehan bioetanol pada akhir fermentasi lebih tinggi. Pada penelitian ini, proses hidrolisis dilakukan dengan penambahan asam oksalat pada proses sterilisasi. Perbedaan warna nira nipah terjadi setelah proses hidrolisis, hal ini dapat dilihat pada Gambar 1. Perubahan warna setelah proses hidrolisis terjadi karena adanya reaksi non enzimatis yang terjadi antara gula pereduksi dan gugus amin dalam protein membentuk Reaksi Millard atau reaksi pencoklatan. Reaksi pencoklatan ini merupakan reaksi yang sering terjadi pada bahan alami seperti buah, cairan getah atau daging.



Gambar 1 Nira Nipah Sebelum dan Sesudah Hidrolisis

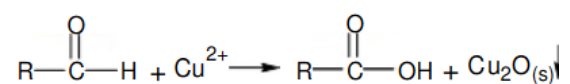
Pengujian kadar gula pereduksi dalam sampel juga dilakukan dengan

analisis Reagen Benedict. Analisis ini merupakan analisis kualitatif dimana reagen yang berwarna biru bening akan berubah warna membentuk kupro oksida jika berwarna merah bata bergantung pada kandungan gula pereduksi didalam sampel.



Gambar 2. Hasil Analisis Benedict

Perubahan ini dapat dilihat pada Gambar 2 dimana nira nipah sebelum hidrolisis membentuk warna kehijauan yang keruh sedangkan nira nipah setelah hidrolisis membentuk warna oren keruh. Warna kehijauan dalam sampel uji menunjukkan kandungan gula pereduksi yang lebih sedikit karena kupro oksida yang terbentuk berjumlah sedikit. Sementara pada sampel lainnya membentuk warna oren yang lebih mendekati warna kupro oksida sehingga dapat disimpulkan bahwa kandungan gula pereduksi lebih banyak didalam sampel nira nipah setelah hidrolisis. Perubahan warna ini mengikuti persamaan reaksi:



Gula reagen endapan

Konsentrasi gula pereduksi dalam nira nipah diketahui dengan analisis reagen Nelson-Somogyi yang diuji menggunakan alat spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 540 nm. Hasil pengujian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Konsentrasi Gula Pereduksi

Sampel	Konsentrasi (g/L)
Sebelum Hidrolisis	9,0925
Setelah Hidrolisis	417,7134

Berdasarkan analisis ini diketahui bahwa konsentrasi gula pereduksi dalam nira nipah bertambah setelah proses hidrolisis. Penambahan ini disebabkan oleh proses perombakan sukrosa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nguyen dkk (2016), hidrolisis nira nipah menggunakan asam oksalat 3 g/L sebagai katalis akan menghasilkan konversi sukrosa menjadi gula pereduksi sebesar 98%. Konversi 98% menunjukkan bahwa 98% sukrosa yang terdapat dalam sampel akan dirombak menjadi gula pereduksi.

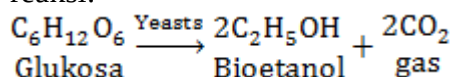
3.2 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Konsentrasi Bioetanol

Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira nipah. Nira nipah diketahui mengandung gula yang dapat dikonversi menjadi asam asetat. Menurut Nurjannah dkk (2017), selama proses fermentasi, sumber karbon akan dikonversi oleh mikroorganisme menjadi biomassa sel dan produk yang ditandai dengan menurunnya konsentrasi sumber karbon dalam media.

Tabel 2 Hasil Analisa Konsentrasi Sampel Bioetanol

Sampel	Konsentrasi (g/L)
Gula Awal	421,532
Gula Sisa	203,865
Bioetanol	78,930

Berdasarkan Tabel 1, konsentrasi gula menurun selama proses fermentasi yang ditunjukkan dengan selisih antara gula awal dan gula sisa. Hal ini disebabkan oleh pemecahan glukosa membentuk bioetanol selama proses fermentasi dengan reaksi:

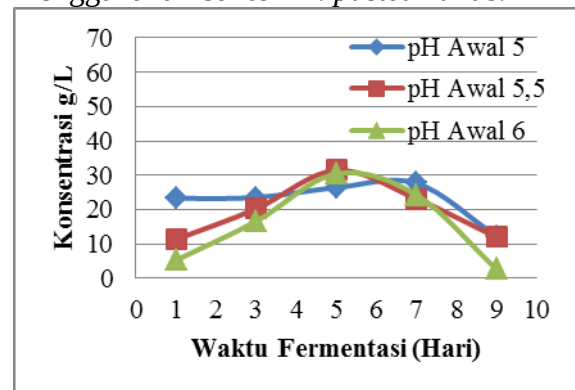


Pembentukan produk sudah dimulai dari hari ke-1 dikarenakan proses pemecahan sukrosa yang harusnya dilakukan oleh enzim invertase telah dilakukan pada proses hidrolisis. Sehingga pembentukan bioetanol dapat langsung dilakukan pada hari pertama. Jika dibandingkan pada penelitian yang

dilakukan Irawan dkk (2016) menggunakan nira nipah tanpa hidrolisis, jumlah bioetanol yang terbentuk adalah 5,77% (w/v) pada hari ke-6, pembentukan bioetanol dari penelitian ini lebih banyak yaitu 10% v/v pada hari ke-1. Hal ini disebabkan oleh jumlah substrat gula pereduksi yang lebih banyak akibat adanya proses hidrolisis.

3.3 Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Konsentrasi Asam Asetat

Bioetanol dari proses fermentasi sebelumnya digunakan sebagai substrat dalam proses fermentasi asam asetat menggunakan bakteri *A. pasteurianus*.



Gambar 3 Hasil Analisis Konsentrasi Asam Asetat.

Hasil penelitian menggunakan substrat fermentasi bioetanol mengalami peningkatan produksi asam asetat seiring bertambahnya waktu hingga mencapai hari ke-5 dan hari ke-7. Peningkatan yang terjadi dikarenakan adanya aktivitas enzim yang dilakukan oleh bakteri *A. pasteurianus* membentuk asam asetat. Penurunan kadar asam asetat disebabkan oleh semakin bertambahnya waktu fermentasi, maka substrat bioetanol didalam medium fermentasi akan semakin berkurang pula dikarenakan terpakai selama proses. Jika substrat sebagai sumber energi bakteri untuk beraktivitas berkurang, maka proses pertumbuhan bakteri akan mengalami fasa kematian. menurut De Ley dkk (1994), bakteri dari genus *Acetobacter* memiliki kecenderungan untuk mengoksidasi asam asetat membentuk CO_2 dan H_2O . Hal ini

menyebabkan pada saat jumlah bioetanol sedikit, bakteri akan mencari alternatif substrat lain yang terdapat didalam medium sebagai sumber energi, yaitu asam asetat untuk terus beraktivitas.

3.4 Pengaruh pH Awal Fermentasi terhadap Konsentrasi Asam Asetat

Fermentasi pembentukan asam asetat memerlukan kondisi tertentu untuk mendapatkan hasil asam asetat yang maksimal. Salah satu kondisi yang harus diperhatikan adalah kondisi pH medium. Derajat keasaman (pH) digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan.

Perbedaan pH awal fermentasi berpengaruh pada aktivitas enzim ADH. Menurut Manzo dkk (2008), pH fermentasi mempengaruhi respon katalitik enzim bergantung pada jenis mikroorganisme yang digunakan. Enzim yang berpengaruh dalam proses pembentukan asam asetat adalah enzim ADH. Enzim ADH merupakan enzim yang berperan dalam pemecahan bioetanol menjadi asetaldehid dan air.

Hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar 3 dimana pada pH awal 5 proses pembentukan asam asetat pada hari ke-1 berlangsung lebih cepat akan tetapi laju pembentukan menurun seiring dengan pertambahan waktu yang ditandai dengan selisih jumlah asam asetat yang terbentuk hingga terjadi penurunan pada hari ke-7.

Pada pH awal 5,5, produksi asam asetat pada hari pertama lebih rendah dibandingkan pada pH awal fermentasi 5. Akan tetapi semakin meningkat hingga mencapai konsentrasi maksimum pada hari ke-5 dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan pada pH 5.

Hasil penelitian menggunakan variasi pH awal fermentasi 6 menunjukkan produksi asam asetat pada hari pertama lebih rendah dibandingkan dua variasi sebelumnya. Akan tetapi produksi asam asetat terus meningkat dengan selisih konsentrasi yang besar hingga mencapai konsentrasi maksimum pada hari ke-5.

Konsentrasi gula didalam medium berpengaruh terhadap hasil fermentasi yang diperoleh dikarenakan pada proses fermentasi asam asetat. Menurut Kanchanarach (2014), kandungan gula yang terdapat dalam medium *A. pasteurianus* akan meningkatkan ketahanan bakteri terhadap kadar asam asetat yang tinggi, hal ini dikarenakan akan terbentuk lapisan *Pellicle Polysaccharide* yang menghalangi asam asetat untuk terdifusi didalam sel. Akan tetapi, jika kandungan gula terlalu tinggi, lapisan yang terbentuk akan terlalu tebal dan menyebabkan proses pembentukan asam asetat menjadi terhambat karena alkohol tidak bisa menembus lapisan sel.

Kandungan gula yang tersisa dalam medium memiliki jumlah yang besar sehingga pembentukan *Pellicle Polysaccharide* oleh bakteri *A. pasteurianus* berlebihan, sehingga pada kondisi pH yang tidak sesuai dan menghambat aktivitas enzim, maka asam asetat yang akan terbentuk akan lebih sedikit. Hal ini disebabkan karena enzim akan bekerja lebih banyak untuk menembus lapisan pellicle polysaccharide pada medium yang memiliki kandungan gula tinggi.

4. KESIMPULAN

Hidrolisis pada nira nipah menggunakan asam oksalat 3 g/L menyebabkan peningkatan konsentrasi gula pereduksi dari konsentrasi awal gula pereduksi 9,09 g/L mencapai 417,71 g/L setelah hidrolisis. Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi konsentrasi produk yang dihasilkan selama jumlah substrat masih mencukupi. Asam asetat tertinggi diperoleh pada hari ke-5, pH awal 5,5 yaitu 31,460 g/L. Perubahan pH awal fermentasi mempengaruhi laju aktivitas enzim ADH dan dapat diamati pada hari pertama, jika pH awal fermentasi tidak sesuai aktivitas enzim menjadi terhambat. pH awal terbaik dari fermentasi asam asetat diperoleh pada pH awal 5,5.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, W.H., 2018, Acetic acid, Encyclopedia Britannica, Encyclopedia Britannica, inc. <https://www.britannica.com/science/acetic-acid>. Tanggal akses 23 Juli 2018.
- Luwihana, S., Kuswanto, K.R., Rahayu, S. E., Sudarmadji, S., 2010, Fermentasi Asam asetat dengan sel amobil acetobacter pasteurianus INT-1 dengan variasi pH awal dan kadar etanol, *Agritech*, 30(2) , 123-132.
- Nguyen, D, V., Sethapokin, P, Rabemanolontsoa, H, Minami, E, Kawamoto, H, dan Saka, S, 2016, Efficient Production of Acetic Acid from Nipa (*Nypa fruticans*) Sap by *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*), *International Journal of Green Technology*, 2,1-12.
- Saputra, R., Irawan, H., Idris, F., 2016. *Pemanfaatan Nipah (Nypa frutican) menjadi Bioetanol Menggunakan Ragi Saccharomyces cerevisiae Dengan Lama Waktu Fermentasi yang Berbeda*. Skripsi. Universitas Maritim Raja Ali Haji.
- Subiandono, E., Heriyanto, N.M., Karlina, E., 2011, Potensi Nipah (*Nypa fruticans* (thunb.)Wurmb.) Sebagai Sumber Pangan dari Hutan Mangrove. *Buletin plasma nutfah*, 17 (1), 54-60.