

**PENGARUH PENAMBAHAN UREA DAN LAMA FERMENTASI  
KHAMIR HASIL ISOLASI DARI DAGING DAN KULIT BUAH NANAS  
(*Ananas comosus* L.) TERHADAP KADAR ETANOL**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
INDAH PUJI LESTARI  
NIM. 19620005**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

**PENGARUH PENAMBAHAN UREA DAN LAMA FERMENTASI  
KHAMIR HASIL ISOLASI DARI DAGING DAN KULIT BUAH NANAS  
(*Ananas comosus* L.) TERHADAP KADAR ETANOL**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
INDAH PUJI LESTARI  
NIM. 19620005**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2023**

**PENGARUH PENAMBAHAN UREA DAN LAMA FERMENTASI  
KHAMIR HASIL ISOLASI DARI DAGING DAN KULIT BUAH NANAS  
(*Ananas comosus* L.) TERHADAP KADAR ETANOL**

**SKRIPSI**

Oleh:

**INDAH PUJI LESTARI**

**NIM. 19620005**

**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji**

**Tanggal 23 Juni 2023**

**Pembimbing I**



**Ir. Liliek Harianie AR, M.P**

**NIP. 19620901 199803 2 001**

**Pembimbing II**



**Oky Bagas Prasetyo, M.Pd**

**NIP. 19890113 20180201 1 244**

**Mengetahui,**

**Ketua Program Studi Biologi**



**Dr. Fyika Sandi Savitri, M.P**

**NIP. 19741018 200312 2 002**

**PENGARUH PENAMBAHAN UREA DAN LAMA FERMENTASI  
KHAMIR HASIL ISOLASI DARI DAGING DAN KULIT BUAH NANAS  
(*Ananas comosus* L.) TERHADAP KADAR ETANOL**

**SKRIPSI**

Oleh:

**INDAH PUJI LESTARI**

**NIM. 19620005**

telah dipertahankan

di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal:

Ketua Penguji : Dr. Eko Budi Minarno, M.Pd  
NIP. 19630114 199903 1 001  
Anggota Penguji I : Prilya Dewi Fitriasari, M.Si  
NIP. 19900428 2016080 1 2062  
Anggota Penguji II : Ir. Liliek Harianie AR, M.P  
NIP. 19620901 199803 2 001  
Anggota Penguji III : Oky Bagas Prasetyo, M.Pd  
NIP. 19890113 20180201 1 244

()  
()  
()  
()

Mengesahkan,  
Ketua Program Studi Biologi  
  
Dr. Evlka Sandi Savitri, M.P  
NIP. 19741018 200312 2 002

## MOTTO

وَلَا تَهِنُوا وَلَا تَحْزَنُوا وَأَنْتُمْ الْأَعْلَوْنَ إِنْ كُنْتُمْ مُؤْمِنِينَ

Artinya : “Dan janganlah kamu (merasa) lemah, dan jangan (pula) bersedih hati, sebab kamu paling tinggi (derajatnya), jika kamu orang beriman.” (QS. Ali Imran [3] : 139)

## **HALAMAN PERSEMBAHAN**

**Skripsi ini kupersembahkan untuk kedua orang tua Bapak Imam Mudawami dan Ibu Siti Halimah, adik tercinta Laila Apriliani, sahabat yang selalu menguatkan Alina Chusna Yain, Roisatun Napik dan teman seperjuangan Lilis Nurhalimah, Anisa Safari Putri dan Alifia Syahira Ramadhani.**

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Indah Puji Lestari  
NIM : 19620005  
Program Studi : Biologi  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Pengaruh Penambahan Urea dan Lama Fermentasi Khamir Hasil Isolasi dari Daging dan Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) Terhadap Kadar Etanol

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang,

Yang membuat pernyataan,



Indah Puji Lestari

NIM. 19620005

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

# **Pengaruh Penambahan Urea dan Lama Fermentasi Khamir Hasil Isolasi dari Daging dan Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) Terhadap Kadar Etanol**

Indah Puji Lestari, Liliek Harianie, Oky Bagus Prasetyo

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

## **ABSTRAK**

Bioetanol merupakan produk fermentasi yang dapat berperan sebagai *biofuel* atau energi terbarukan. Penggunaan bioetanol penting karena dapat menurunkan tingkat emisi karbon dan pencemaran udara akibat penggunaan bahan bakar fosil. Bioetanol dapat diproduksi dengan fermentasi karbohidrat dari bahan nabati oleh khamir. Khamir adalah salah satu kelompok mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan dalam pembuatan bioetanol. Habitat yang disukai oleh khamir adalah jaringan tanaman, daun, bunga, buah-buahan, produk fermentasi, tanah dan air. Khamir dapat diisolasi dari buah nanas (*Ananas comosus* L.). Penambahan urea dan lama fermentasi diduga berpengaruh terhadap kadar bioetanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui genus khamir yang didapatkan dari hasil isolasi buah nanas dan untuk mengetahui pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi terhadap kadar etanol. Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksplorasi dan eksperimen. Penelitian eksplorasi dengan cara mengisolasi khamir dari daging dan kulit buah nanas yang diperoleh dari Kabupaten Blitar. Penelitian eksperimen menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan variabel bebas konsentrasi urea dan lama fermentasi dengan 3 ulangan. Konsentrasi urea yang digunakan adalah 0%, 2% dan 4%. Lama fermentasi yang digunakan adalah 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Variabel yang diamati adalah kadar etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan analisis varian *one way* ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan genus khamir yang diperoleh dari isolasi daging dan kulit buah nanas adalah *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* dan *Zygosaccharomyces*. Penambahan urea dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar etanol. Kadar etanol tertinggi yang diperoleh dari fermentasi sebesar 18,2 % dengan perlakuan urea 2% dan lama fermentasi 48 jam. Kadar etanol terendah yaitu 3,06 % pada penambahan urea 0% dan lama fermentasi 24 jam.

Kata kunci : buah nanas, etanol, fermentasi, khamir, urea

# **Effect of Urea Addition and Fermentation Time of Yeast Isolated from Pulp and Pell of Pineapple (*Ananas comosus* L.) on Ethanol Content**

Indah Puji Lestari, Liliek Harianie, Oky Bagas Prasetyo

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang

## **ABSTRACT**

Bioethanol is a fermented product that can act as biofuel or renewable energy. The use of bioethanol is important because it can reduce the level of carbon emissions and air pollution due to the use of fossil fuels. Bioethanol can be produced by fermenting carbohydrates from vegetable materials by yeast. Yeast is a group of microorganisms that can be used in the manufacture of bioethanol. Habitat preferred by yeast is plant tissue, leaves, flowers, fruits, fermented products, soil and water. Yeast can be isolated from pineapple (*Ananas comosus* L.). The addition of urea and fermentation time are thought to have an effect on bioethanol levels. The purpose of this study was to determine the genus of yeast obtained from pineapple fruit isolation and to determine the effect of adding urea and fermentation time on ethanol content. This research includes exploratory and experimental research types. Exploratory research by isolating yeast from pineapple flesh and skin obtained from Blitar Regency. Experimental study used a completely randomized design (CRD) with the independent variables of urea concentration and fermentation time with 3 replications. The concentration of urea used was 0%, 2% and 4%. The fermentation time used was 24 hours, 48 hours and 72 hours. The variable observed was the ethanol content produced from the fermentation process. The data obtained were then analyzed using one way ANOVA analysis of variance. The results showed that the yeast genera obtained from the isolation of pineapple pulp and peel were *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* and *Zygosaccharomyces*. The addition of urea and fermentation time affect the ethanol content. The highest ethanol content obtained from fermentation was 18.2% with 2% urea treatment and 48 hours of fermentation time. The lowest ethanol content was 3.06% with the addition of 0% urea and 24 hours of fermentation.

Keywords: pineapple, ethanol, fermentation, yeast, urea

## تأثير إضافة اليوريا ووقت تخمير الخميرة المعزولة من الأناناس (الأناس

### الوبري أو أناس) ضد مستويات الإيثانول

اينداه فوجي ليستاري، ليليك هرياني، اوكي باكاس فراسيتيوا  
علوم الحياة، الكلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية  
الحكومية مالانج

#### ملخص البحث

الإيثانول الحيوي هو منتج تخمير يمكن أن يكون بمثابة وقود حيوي أو طاقة متجددة. يعد استخدام الإيثانول الحيوي أمرا مهما لأنه يمكن أن يقلل من مستوى انبعاثات الكربون وتلوث الهواء بسبب استخدام الوقود الأحفوري. يمكن إنتاج الإيثانول الحيوي عن طريق تخمير الكربوهيدرات من المواد النباتية بواسطة الخميرة. الخميرة هي واحدة من مجموعات الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن استخدامها في صناعة الإيثانول الحيوي. الموائل التي تفضلها الخميرة هي الأنسجة النباتية والأوراق والزهور والفواكه ومنتجات التخمير والتربة والمياه. يمكن عزل الخميرة من فاكهة الأناناس (الأناس الوبري أو أناس) يعتقد أن إضافة اليوريا ومدة التخمير تؤثر على مستويات الإيثانول الحيوي.

يهدف من هذا البحث هو تحديد جنس الخميرة التي تم الحصول عليها من عزل فاكهة الأناناس وتحديد تأثير إضافة اليوريا ووقت التخمير على مستويات الإيثانول. ينتمي هذا البحث إلى أنواع البحوث الاستكشافية والتجريبية. بحث استكشافي عن طريق عزل الخميرة من فاكهة الأناناس التي تم الحصول عليها من بليتار ريجنسي. استخدم البحث التجريبي تصميم عشوائيا كاملا (RAL) مع متغيرات مستقلة لتركيز اليوريا ومدة التخمير مع ثلاث تكرارات. تركيزات اليوريا المستخدمة هي 0% و 2% و 4%. مدة التخمير المستخدمة هي 24 (أربع وعشرون) ساعة و 48 (ثمان وأربعون) ساعة و 72 (اثنان وسبعون) ساعة. كان المتغير الملاحظ هو محتوى الإيثانول الناتج عن عملية التخمير. ثم تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام تحليل البديل أحادي الاتجاه من ANOVA.

أظهرت النتائج أن جنس الخميرة الذي تم الحصول عليه من عزل لحم الأناناس والجلد كان سكيرى أو خميرة ومبيضة و Pichia و Zygosaccharomyces تؤثر إضافة اليوريا ومدة التخمير على مستويات الإيثانول. كان أعلى محتوى من الإيثانول تم الحصول عليه من التخمير 18.2% مع معالجة اليوريا بنسبة 2% ومدة التخمير 48 (ثمان وأربعون) ساعة. كان أقل محتوى من الإيثانول 3.06% عند إضافة 0% يوريا ووقت تخمير 24 (أربع وعشرون) ساعة.

**الكلمات الرئيسية: فاكهة الأناناس، الإيثانول، التخمير، الخميرة، اليوريا**

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr. Wb*

*Bismillahirrohmaanirrohiim*, segala puji bagi Allah Tuhan Semesta Alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Pengaruh Penambahan Urea dan Lama Fermentasi Khamir Hasil Isolasi dari Daging dan Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) Terhadap Kadar Etanol”. Tidak lupa pula shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW yang telah menegakkan agama islam hingga akhir zaman.

Berkat bimbingan dari berbagai pihak maka penulis menyampaikan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada :

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ir. Liliek Harianie AR, M.P selaku pembimbing bidang Biologi yang telah membimbing dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Oky Bagas Prasetyo, M.Pd selaku pembimbing bidang integrasi sains islam yang memberikan saran dan masukan dalam menyelesaikan skripsi.
6. Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc selaku dosen wali yang telah membimbing dan memberi masukan kepada penulis.
7. Kedua orang tua dan keluarga tercinta yang telah memberikan doa, dukungan serta motivasi kepada penulis.
8. Teman-teman seperjuangan Biologi yang telah membantu dan berjuang bersama dengan penulis.

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang,

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	Error! Bookmark not defined.
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	Error! Bookmark not defined.
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	Error! Bookmark not defined.
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
ملخص البحث .....	<b>x</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan .....	7
1.4 Hipotesis .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
1.6 Batasan Masalah .....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>9</b>
2.1 Nanas ( <i>Ananas comosus</i> ) .....	9
2.3 Khamir .....	12
2.4 Fermentasi Alkohol .....	16
2.5 Bioetanol .....	22
2.6 Hidrolisis .....	24
2.7 Distilasi .....	25
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>27</b>
3.1 Rancangan Penelitian .....	27
3.2 Waktu dan Tempat .....	27
3.3 Alat dan Bahan .....	28

3.4	Prosedur Penelitian .....	28
3.4.1	Tahap Preparasi Alat dan Bahan .....	28
3.4.2	Pembuatan Media.....	28
3.4.3	Isolasi Khamir .....	29
3.4.4	Karakterisasi Khamir hasil Isolasi .....	30
3.4.5	Uji Fermentasi Gula .....	31
3.4.6	Uji Toleransi Etanol .....	32
3.4.7	Uji Produksi Bioetanol.....	32
3.5	Analisis Data.....	34
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>35</b>
4.1	Karakterisasi Morfologi Khamir Hasil Isolasi Buah Nanas.....	35
4.2	Uji Fermentasi Karbohidrat.....	49
4.3	Uji Toleransi Etanol .....	51
4.4	Pengaruh Penambahan Urea dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol .	52
<b>BAB V PENUTUP .....</b>		<b>59</b>
5.1	Kesimpulan.....	59
5.2	Saran .....	59
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>60</b>
<b>Lampiran .....</b>		<b>66</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Tanaman nanas .....	9
Gambar 2.2. Bentuk sel khamir.....	13
Gambar 2.3 Fermentasi alkohol pada sel khamir.....	18
Gambar 2.4 Alat Distilasi.....	26
Gambar 4.21 Kurva standar glukosa.....	53
Gambar 4.22 Hasil kadar Etanol .....	55

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 3.1 Kombinasi konsentrasi urea dan waktu fermentasi .....	27
Tabel 4.1. Morfologi Makroskopis Khamir .....	35
Tabel 4.2. Morfologi Mikroskopis Khamir.....	37
Tabel 4.3 Uji Fermentasi Karbohidrat .....	49
Tabel 4.4 Uji Toleransi Etanol .....	51
Tabel. 4.5 Kadar gula bahan baku.....	53

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Allah SWT menciptakan makhluk hidup yang diberikan kemampuan mengubah suatu zat menjadi zat lain yang dapat mendatangkan kemaslahatan selama tidak disalahgunakan oleh manusia. Makhluk hidup tersebut adalah khamir. Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler yang diklasifikasikan dalam kingdom fungi. Khamir adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan dalam proses fermentasi dengan mengubah glukosa menjadi etanol. Kemampuan yang dimiliki oleh khamir tersebut merupakan bentuk kekuasaan Allah SWT. Allah SWT berfirman dalam Al Qur'an surat Al Baqarah ayat 26 sebagai berikut :

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا<sup>٢٦</sup> فَأَمَّا الَّذِينَ آمَنُوا فَيَعْلَمُونَ أَنَّهُ الْحَقُّ مِنْ رَبِّهِمْ<sup>٢٦</sup> وَأَمَّا الَّذِينَ كَفَرُوا فَيَقُولُونَ مَاذَا أَرَادَ اللَّهُ بِهَذَا مَثَلًا يُضِلُّ بِهِ كَثِيرًا وَيَهْدِي بِهِ كَثِيرًا<sup>٢٦</sup>  
وَمَا يُضِلُّ بِهِ إِلَّا الْفَاسِقِينَ<sup>٢٦</sup>

Artinya : “*Sesungguhnya Allah tidak segan membuat perumpamaan seekor nyamuk atau yang lebih kecil daripada itu. Adapun orang-orang yang beriman mengetahui bahwa itu kebenaran dari Tuhannya. Akan tetapi, orang-orang kafir berkata, “Apa maksud Allah dengan perumpamaan ini?” Dengan (perumpamaan) itu banyak orang yang disesatkan-Nya. Dengan itu pula banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Namun, tidak ada yang Dia sesatkan dengan (perumpamaan) itu, selain orang-orang fasik*”.

Menurut tafsir Al Misbah ayat tersebut menjelaskan Allah memberikan perumpamaan bahwa Allah dapat menciptakan makhluk yang lebih kecil dari nyamuk. Makhluk kecil yang dianggap lemah, seperti nyamuk, semut, lebah, laba-laba memiliki banyak manfaat yang dapat dipelajari oleh manusia. Seseorang yang tidak memahami petunjuk Allah Swt menjadi sesat karena kesalahannya. Ayat ini menjelaskan bahwa mereka yang ingkar dan tidak mau memahami Allah Swt.

menjadikan nyamuk sebagai perumpamaan. Akibatnya, mereka kehilangan arah. Orang yang melanggar aturan agama baik dengan ucapan maupun tindakan disebut fasik.

Al Quran Surah Al Baqarah ayat 26 menjelaskan bahwa Allah mampu menciptakan makhluk yang berukuran sangat kecil bahkan lebih kecil dari nyamuk. Makhluk yang sangat kecil yang Allah ciptakan adalah mikroorganisme. Mikroorganisme adalah makhluk hidup yang hanya dapat dilihat menggunakan mikroskop. Salah satu mikroorganisme adalah khamir.

Salah satu jenis mikroorganisme yang paling umum di alam adalah khamir. Populasi khamir dapat ditemukan di darat, di air, dan di udara. Khamir juga dapat ditemukan pada kotoran, serangga, jamur, dan makhluk hidup lainnya sebagai parasit, saprofit, atau endofit. Khamir lebih menyukai habitat jaringan tumbuhan, daun, bunga, buah, hasil fermentasi, tanah, dan air (Akbar dkk., 2019).

Berbagai jenis makanan dan minuman fermentasi telah dibuat menggunakan khamir sebagai starter (Steensels *et al.* 2014). Saat makanan dan minuman difermentasi, khamir berkontribusi pada degradasi substrat untuk menciptakan struktur, tekstur, dan aroma, yang semuanya dapat memberikan nilai gizi (Carrau *et al.* 2015). Salah satu hal yang perlu diperhatikan untuk meningkatkan sektor industri dan energi adalah fungsi masing-masing spesies khamir dalam proses fermentasi. Menurut Aidoo *et al.* (2006), khamir industri dari makanan fermentasi dapat digunakan sebagai penambah rasa, pembusuk busa, enzim, karotenoid, dan vitamin. Khamir diperkirakan akan digunakan di sektor energi untuk menciptakan sumber energi berkelanjutan seperti bioetanol dan biofuel (Buijs *et al.* 2013; Nielsen *et al.* 2013).

Salah satu bahan bakar alternatif yang paling banyak digunakan yang dapat mengurangi efek merusak dari konsumsi bahan bakar fosil terhadap lingkungan dan ekonomi dan mendukung ketahanan energi adalah bioetanol (Muruaga *et al.*, 2016). Menurut Anggrayeni *et al.* (2019), bioetanol adalah etanol (etil alkohol) yang proses produksinya menggunakan bahan baku alami dan memerlukan bantuan mikroorganisme seperti khamir dan dibuat melalui proses fermentasi dari substrat yang mengandung karbohidrat seperti gula, pati, atau selulosa.

Buah nanas dapat digunakan untuk mengisolasi khamir potensial yang dapat digunakan dalam produksi bioetanol (Chasanah *et al.*, 2020). Di daerah tropis dan subtropis, nanas merupakan buah yang banyak ditanam (Istianah, 2017). Dalam 100 gram daging buah nanas terdapat 12,63 gram karbohidrat total, 9,26 gram gula, dan 1,4 gram serat pangan (Anggraini, 2018). Menurut Nulhakim *et al.* (2019), kulit nanas memiliki kadar glukosa dan karbohidrat yang tinggi yaitu 13,65% dan 17,53%. Pertumbuhan khamir dimungkinkan karena kandungan gula yang tinggi pada daging dan kulit nanas.

Khamir potensial untuk industri produksi etanol harus mampu memfermentasi sumber karbon (Chasanah *et al.*, 2020). Industri sering menggunakan khamir. Banyak proses manufaktur produk industri, termasuk di sektor makanan dan minuman, pengolahan limbah, manufaktur kimia, dan industri lainnya memanfaatkan kemampuan khamir (Nasir *et al.*, 2017). Kemampuan khamir menentukan hasil produk industri. Isolasi khamir dengan kemampuan atau toleransi tinggi terhadap keadaan dalam proses industri menjadi penting untuk dilakukan (Akbar dkk., 2019).

Faktor genotipe (rangkaiian gen) dan faktor lingkungan, memengaruhi variasi fenotip makhluk hidup suatu organisme salah satunya adalah khamir. Faktor lingkungan memiliki pengaruh yang menentukan pada variasi morfologi, dan faktor genetik pada suatu jenis organisme, termasuk khamir, memainkan peran penting dalam adaptasi, kemampuan, dan keberadaan (habitat). Keberagaman alel gen akan memengaruhi pertumbuhan dan fisiologi organisme secara berbeda (Asril dkk., 2022).

Salah satu faktor yang memengaruhi tinggi rendahnya produksi bioetanol adalah jenis khamir. Identifikasi dan isolasi khamir diperlukan untuk mengidentifikasi isolat khamir yang dapat menghasilkan bioetanol (Anggrayeni *et al.*, 2019). Isolasi merupakan tahap penting untuk mendapatkan kultur murni dalam kajian biologi, khususnya mikrobiologi. Mikroorganisme diisolasi dari lingkungannya untuk menghasilkan isolat murni. Kultur murni yang diisolasi dikarakterisasi untuk memastikan sifat dan keunggulan mikroba dengan menggunakan karakterisasi morfologi, fisiologi, dan biokimia (Akbar *et al.*, 2019).

Industri yang memanfaatkan khamir salah satunya adalah industri produksi etanol. Bioetanol dibuat dari biomassa melalui fermentasi oleh khamir. Ada beberapa jenis biomassa yang dapat digunakan untuk membuat etanol, antara lain tebu, molase, biomassa laut dari rumput laut, jagung, dan limbah (Naito *et al.*, 2019). Kulit nanas adalah salah satu jenis limbah yang dapat digunakan untuk membuat bioetanol. Dengan produksi global sebesar 25,9 juta ton, nanas dianggap sebagai buah tropis terpenting kedua di dunia pada tahun 2017 (Altendorf, 2017). Komponen terapeutik, termasuk asam sitrat, bromelain, dan sifat anti-inflamasi pada nanas menyebabkan banyak produsen obat dan kosmetik menggunakan nanas

(Adabe *et al.*, 2016). Produksi limbah nanas meningkat akibat meningkatnya permintaan dan konsumsi nanas. Jumlah limbah dari nanas telah meningkat sebesar 0,62 juta ton secara global dalam beberapa tahun terakhir (Choonut *et al.*, 2014).

Buah nanas hanya dimakan daging buahnya, dan kulit buahnya kurang digunakan. Kulit buah nanas hanya dibuang tanpa diproses terlebih dahulu. Limbah kulit buah nanas yang dihasilkan dari satu buah nanas berkisar antara 21,73 dan 24,48%; berat nanas rata-rata adalah sekitar 600 hingga 800 gram, sehingga limbah kulit buah nanas dapat mencapai 40-50 kilogram dari 200 kilogram nanas (Marjenah *et al.*, 2017). Kulit nanas memiliki kandungan karbohidrat sebesar  $21,98 \pm 2,34\%$ , hemiselulosa sebesar  $74,96 \pm 2,55\%$ , dan lignin sebesar  $2,68 \pm 1,54\%$  (Nurhakim *dkk.*, 2019). Limbah nanas bagian kulit buah yang mengandung lignin, hemiselulosa dan selulosa dapat digunakan dalam produksi bioetanol (Salafia *et al.*, 2022).

Proses fermentasi dalam menghasilkan bioetanol dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satu faktor yang memengaruhi jumlah bioetanol yang diperoleh adalah waktu fermentasi. Jika fermentasi berlangsung terlalu lama, nutrisi di substrat akan habis, sehingga mikroba tidak dapat memfermentasi bahan (Yusmartini *et al.*, 2020). Dengan substrat molase, penelitian Naufal & Dharmadewanti (2015) menghasilkan konsentrasi bioetanol tertinggi pada jam fermentasi ke 72 sebesar 6,8%. Babu *et al.* (2019) menunjukkan bahwa produksi bioetanol tertinggi terjadi pada 48 jam waktu inkubasi. Penelitian oleh Belal & Farid (2015) dan Nasir *et al.* (2017) menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi etanol diperoleh setelah 72 jam.

Unsur nitrogen diperlukan untuk khamir selama proses pertumbuhan dan perkembangan. Nitrogen berfungsi sebagai sumber vitamin, asam nukleat, dan

asam amino tunggal yang diperlukan khamir untuk bertahan hidup. Salah satu cara untuk memenuhi kebutuhan pertumbuhan khamir selama proses fermentasi adalah dengan menambah urea. Dalam proses fermentasi, urea berfungsi sebagai nutrisi untuk pertumbuhan mikroba (Wachid & Mutia, 2019; Susmanto dkk., 2020). Selain unsur nitrogen, nutrisi seperti fosfat berfungsi sebagai sumber daya yang mendorong aktivitas biosintesis, meningkatkan massa sel, dan menghasilkan energi (Swinnen *et al.*, 2006). Studi sebelumnya menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk fermentasi nira nipah menjadi bioetanol dengan penambahan urea sebagai sumber nitrogen (Rahmah *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan Sahriani dkk. (2016) dengan penambahan nutrisi urea 1,5 % dihasilkan kadar etanol sebesar 22,439 %. Penelitian yang dilakukan Susmanto dkk., (2020) didapatkan kadar bioetanol tertinggi sebesar 57,1429% dengan penambahan urea 3%.

Di Indonesia, banyak penelitian telah dilakukan tentang kemampuan khamir untuk menghasilkan bioetanol dengan menggunakan berbagai substrat. Namun, jenis khamir yang digunakan biasanya hanya satu, yaitu *S. cerevisiae* atau konsorsium ragi yang tersedia di pasar (Sumerta & Kanti, 2017). Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Nasir *et al.*, (2017) mengungkapkan bahwa dua khamir yang diisolasi dari kulit nanas dan kulit jeruk sangat toleran terhadap etanol, termotoleran serta osmotoleran sedang dan dapat bertahan pada berbagai rentang pH. Penelitian yang dilakukan Nutaratat *et al.*, (2022) menunjukkan bahwa terdapat dua spesies khamir yang diisolasi dari daun nanas di Thailand yaitu *Savitrella phatthalungensis* dan *Goffeauzyma siamensis*. Oleh karena itu, melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah keanekaragaman terkait genus khamir dari buah

nanas yang mampu menghasilkan etanol serta pengaruh penambahan urea dan waktu fermentasi optimal terhadap kadar etanol.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apa saja genus khamir yang didapatkan dari hasil isolasi buah nanas ?
2. Apakah terdapat pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi oleh khamir terhadap kadar etanol ?

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui genus khamir yang didapatkan dari hasil isolasi buah nanas.
2. Untuk mengetahui pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi oleh khamir terhadap kadar etanol.

## **1.4 Hipotesis**

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. H<sub>0</sub> : tidak terdapat pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi terhadap kadar etanol.
2. H<sub>1</sub> : terdapat pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi terhadap kadar etanol.

## **1.5 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk memberikan informasi mengenai genus khamir hasil isolasi dari buah nanas.

2. Untuk menambah informasi mengenai pemanfaatan khamir untuk dikembangkan dalam produksi bioetanol.
3. Untuk memberikan informasi penambahan urea dan waktu fermentasi optimal dalam menghasilkan kadar etanol.

### **1.6 Batasan Masalah**

Batasan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Daging dan kulit buah nanas yang digunakan untuk isolasi khamir adalah varietas *queen* yang diperoleh dari sawah di Kabupaten Blitar.
2. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji fermentasi gula dan uji toleransi etanol.
3. Sumber gula yang digunakan untuk uji fermentasi adalah glukosa, sukrosa dan fruktosa.
4. Variabel yang diteliti adalah kadar etanol dari hasil fermentasi.
5. Kulit nanas yang digunakan sebagai substrat fermentasi adalah kulit buah nanas yang sudah matang dengan ciri berwarna kekuningan.
6. Tahap hidrolisis kulit nanas menggunakan enzim selulase.
7. Konsentrasi khamir yang digunakan adalah 2 gram.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Nanas (*Ananas comosus*)**

Nanas (*Ananas comosus*) adalah tanaman herba parenial dari *Liliopsidae* (monokotil) dengan perbungaan terminal yang menghasilkan buah ganda (*sorose*). Tanaman nanas dewasa memiliki tinggi 1–2 m. Morfologi utama dari tanaman nanas adalah batang, daun, buah majemuk, dan akar. Batang nanas berbentuk gada dengan panjang 20-50 cm dan lebar 2-5 cm di bagian pangkal serta 5-8 cm di bagian atas. Daun tanaman nanas membungkus batang dengan jumlah daun sekitar 40-80 namun bervariasi antar kultivar. Panjang daun tanaman nanas mencapai 1,6 m dengan lebar 7 cm tergantung dengan kultivar dan kondisi ekologis (Gambar 2.1). Sistem perakaran tanaman nanas dapat menyebar hingga 1-2 m secara lateral dengan kedalaman 0,85 m. Perbungaan kurang dari 50 hingga lebih dari 200 bunga individu dan ditutup oleh mahkota. Perbungaan berlangsung selama 10-15 hari (Bartholomew *et al.*, 2003).



**Gambar 2.1. Tanaman nanas** (Jannah & Salbiah, 2020)

Klasifikasi dari tanaman nanas menurut NCBI (2020) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Division : Tracheophyta  
Class : Magnoliopsida  
Order : Poales  
Family : Bromeliaceae  
Genus : Ananas  
Species : *Ananas comosus* (L.) Merr.

Nanas dengan nama ilmiah *Ananas comosus* (L.) Merr, adalah salah satu tanaman yang paling umum ditanam di Indonesia. *Smooth Cayenne*, *Queen*, dan *Spanish* adalah beberapa varietas nanas (Chasanah *et al.*, 2020). Sebagian besar orang Spanyol tinggal di Kepulauan India Barat, Puerto Rico, Mexico, dan Malaysia. *Abacaxi* adalah varietas yang sangat umum di Brazil. Varietas nanas yang paling umum di Indonesia adalah *Queen*. Secara umum, nanas *Queen* memiliki karakteristik seperti tepi daun berduri, bobotnya sekitar 0,5 hingga 1,1 kilogram, matanya menonjol, kulitnya berwarna kuning saat matang, dagingnya berwarna kuning tua, hatinya kecil, dan rasanya manis (Husniati, 2010).

Nanas sangat bermanfaat sebagai bahan pangan, pakan, dan bahan baku industri. Prospek agribisnis nanas meningkat untuk memenuhi kebutuhan buah segar dan olahan. Tanaman nanas memiliki kandungan karbohidrat (oligosakarida) dan glukosa (monosakarida) yang tinggi, sehingga buahnya merupakan bagian penting dari tanaman yang memiliki nilai ekonomi tinggi (Chasanah *et al.*, 2020). Per 100 gram nanas, ada 12,63 gram karbohidrat, 9,26 gram gula, dan 1,4 gram serat makanan (Anggraini, 2018). Gula pereduksi ditemukan lebih tinggi pada pulp nanas jika dibandingkan dengan limbah nanas. Jumlah gula pereduksi maksimal

diamati pada pulp nanas (10,5%) lebih tinggi daripada limbah (8,2%) (Hemalatha & Anbuselvi, 2013).

## **2.2 Limbah Kulit Nanas**

Kulit buah dan mahkota merupakan bagian dari limbah nanas yang mengandung lignin, hemiselulosa dan selulosa. Lignoselulosa dapat digunakan dalam produksi bioetanol generasi kedua, setelah pra-perlakuan dan hidrolisis, untuk menyediakan sumber gula yang dapat difermentasi (Salafia *et al.*, 2022). Kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) tidak banyak digunakan, dan menjadi limbah rumah tangga atau industri. Selain digunakan sebagai bahan baku industri pengolahan, kulit buah nanas yang dibuang masih mengandung karbohidrat. Kulit nanas mengandung glukosa sebesar 13,65 % dan karbohidrat sebesar 17,53 %, sedangkan selulosa sebesar  $21,98 \pm 2,34$  %, hemiselulosa sebesar  $74,96 \pm 2,55$  %, dan lignin sebesar  $2,68 \pm 1,54$  %. Bagian buahnya saja yang digunakan untuk diolah dalam industri makanan, kulitnya hanya menjadi limbah, pengolahan buah nanas secara industri dapat menyebabkan lebih banyak limbah kulit. (Fauziah dkk., 2020).

Seiring bertambahnya jumlah nanas olahan yang dihasilkan, maka limbah yang dihasilkan juga meningkat. Saat ini limbah kulit nanas kurang dimanfaatkan dengan baik. Limbah tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan etanol melalui hidrolisis, fermentasi dengan penambahan khamir, dan pemurnian melalui penyulingan untuk meningkatkan nilainya. Konsumsi nanas menghasilkan limbah kulit dalam jumlah yang signifikan, yang merupakan 34,61% dari berat buah dan mengandung sekitar 10,54% karbohidrat. Kadar glukosa sebesar 17% menurut penelitian mengenai produksi etanol dari ekstrak kulit nanas (Susanti dkk., 2011).

Pemanfaatan limbah kulit nanas sebagai bahan baku bioetanol sebagaimana firman Allah dalam QS: Asy Syuara [26]: 7 sebagai berikut :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya : “Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami telah menumbuhkan di sana segala jenis (tanaman) yang tumbuh baik.”

Dalam Tafsir Al Misbah ayat tersebut menjelaskan bahwa jika manusia mau merenungi dan mengamati ciptaan Allah maka akan mendapat petunjuk. Allah yang menciptakan beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat. Dan itu semua hanya dapat dilakukan oleh Tuhan yang Mahaesa dan Mahakuasa.

Al Qur'an Surah Asy Syu'ara ayat 7 menjelaskan bahwa Allah menumbuhkan segala jenis tanaman yang baik yaitu memiliki manfaat. Salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat adalah buah nanas (*Ananas Comosus L.*). Selain daging buah nanas yang dapat dikonsumsi, kulit buah nanas yang masih banyak mengandung gula dapat dijadikan sebagai substrat fermentasi untuk pembuatan bioetanol.

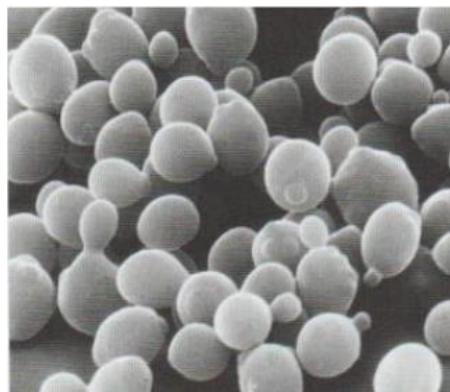
### **2.3 Khamir**

Kelompok fungi uniseluler yang dikenal sebagai khamir memiliki sel yang ukurannya berkisar antara 2-3  $\mu\text{m}$  hingga 20-50  $\mu\text{m}$  dan lebar 1-10  $\mu\text{m}$ . Flagel tidak terdapat dalam khamir (Kavanagh, 2005). Khamir berkembang biak dengan tunas secara aseksual (Gandjar *et al.*, 2006). Sel khamir terdiri dari komponen-komponen antara lain dinding sel, membran sel, lipatan membran sel, tunas, mitokondria, nukleus, vakuola, dan retikulum endoplasma (Walker, 2011).

Khamir adalah sel tunggal yang tumbuh dan bereproduksi lebih cepat daripada kapang yang menghasilkan filamen. Perbandingan luas permukaan dengan

volume yang lebih tinggi, khamir lebih efektif daripada kapang dalam memecah komponen kimia. khamir memiliki dinding sel yang sangat tipis saat masih muda, tetapi seiring bertambahnya umur, dinding sel menebal. Glukan, mannan, protein, kitin, dan lipid adalah komponen yang menyusun dinding sel khamir (Waluyo, 2005).

Koloni khamir basah berwarna putih kekuningan dan berbentuk bulat dan cembung dengan tekstur halus dan licin yang menyerupai bakteri (Padoli, 2016). Sel khamir ada dalam berbagai bentuk, ukuran, dan warna. Sel-sel khamir seringkali berbentuk silinder, setengah bola, oval, atau bundar (Gambar 2.2). Khamir dapat menghasilkan warna hitam, merah muda, merah, jingga, dan kuning (Kavanagh, 2005). Khamir memiliki kemampuan untuk menghasilkan hifa palsu, yang berkembang menjadi miselium palsu, miselium asli, atau pseudomiselium. Kemiripan dengan *Candida* spp. dan *Pichia* spp., sel induk khamir yang memanjang ini membentuk rantai dan tidak terlepas dari sel induknya (Gandjar *et al.*, 2006).



**Gambar 2.2. Bentuk sel khamir** (Alberts *et al.*, 2008)

Khamir hidup di lingkungan alami seperti tanah, air dan lingkungan. kelompok khamir ditemukan berasosiasi dengan tanaman, hewan dan serangga.

Beberapa spesies khamir juga telah diisolasi dari lingkungan ekstrem seperti potensi air rendah (misalnya kadar gula/garam tinggi), suhu rendah (misalnya khamir yang diisolasi dari Antartika), dan ketersediaan oksigen rendah (misalnya saluran usus hewan). Khamir memiliki peran penting dalam rantai makanan, siklus karbon, nitrogen, dan belerang (Satyanarayana & Kunze, 2009).

Khamir menggunakan sumber karbon di lingkungan alami seperti alkohol, asam organik dan asam amino yang dapat mendukung pertumbuhan khamir untuk metabolisme gula. Metabolisme sumber karbon diantaranya adalah gula seperti heksosa (glukosa, fruktosa, galaktosa atau manosa) dan disakarida (maltosa atau sukrosa) serta senyawa dengan dua karbon (etanol atau asetat). Metabolisme yang digunakan untuk metabolisme heksosa dan disakarida memiliki kesamaan jalur (sebagian besar metabolik berasal dari perantara glikolisis, siklus asam trikarboksilat (TCA), dan jalur pentosa fosfat) dan berbeda hanya pada langkah dasar awal metabolisme. Namun, perubahan signifikan dapat diamati ketika metabolisme gula dibandingkan dengan metabolisme senyawa dua karbon (Rodrigues, 2006).

### **2.3.1 Kelas Basidiomycetes**

Basidiospora, atau spora seksual, diproduksi oleh basidiomycetes. Anggota filum Basidiomycota, khamir *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, dan *Trichosporon* memiliki bentuk koloni lembut, biasanya lembut atau mucoid (Boekhout *et al.* 2011). Sebagian besar khamir Basidiomycetes memiliki siklus hidup dimorfik. Khamir basidiomycetes dapat bereproduksi aseksual dengan tunas enteroblastik atau melalui balistoconidia (Fell *et al.*, 2001). Khamir pada kelas Basidiomycetes menghasilkan basidiospora. Kelas Basidiomycetes terdiri dari 3 subkelas yaitu

Uredinomycetes, Hymenomycetes, dan Ustilagenomycetes (Satyanaraya dan kunze, 2009).

### **2.3.1.1 Ustilagenomycetes**

Khamir *ustilagenomycetes* memiliki karakteristik septa seperti mikropori dengan margin timbul. Septa mikropori tidak memiliki dinding sel dan tidak memiliki pori yang sebenarnya. Kandungan glukosa tinggi selain itu terdapat kandungan galaktosa dan manosa tetapi tidak terdapat xilosa (Satyanaraya dan kunze, 2009).

### **2.3.1.2 Hymenomycetes**

Khamir *hymenomycetes* memiliki septum dolipore dan dinding sel mengandung glukosa, manosa dan xilosa. Khamir yang termasuk kedalam *hymenomycetes* adalah genus *Cryptococcus*. Subkelas *hymenomycetes* terdiri dari *Tremellales*, *Trichosporonales*, *Filobasidiales*, and *Cystofilobasidiales*. *Tremellales* : *Bullera*, *Bulleromyces*, *Fellomyces*, *Filobasidiella*, *Kockovaella* dan *Tsuchiyaea*. *Trichosporonales* terdiri dari semua spesies dari *Trichosporon* kecuali *Trichosporon pullulans* karena termasuk *cystofilobasidiales*, *Filobasidiales* terdiri dari *Filobasidium* dan *Cystofilobasidiales* terdiri dari *Cystofilobasidium*, *Mrakia*, *Phaffia*, *Urediniomyces* dan *Xanthophyllomyces* (Satyanaraya dan kunze, 2009).

### **2.3.1.3 Uredinomycetes**

Uredinomycetes terdiri dari *Microbotryum*, *Sporidiobolus*, *Agaricostilbum* dan *Erythrobasidium*. *Microbotryum* terdiri dari *Leucosporidium*, *Sporidiobolus* terdiri dari *Rhodosporidium* dan *Sporidiobolus*, *Agaricostilbum* terdiri dari *Kondoa*, *Kurtzmanomyces* dan *Sterigmatomyces*, *Erythrobasidium* terdiri dari *Erythrobasidium*, *Sakaguchia* dan *Occultifur* (Kurtzman dan Fell, 1998).

### 2.3.2 Kelas Ascomycetes

Kelas Ascomycetes terdiri dari Subkelas *Hemiascomycetes* dan *Eucomycetes*. Subkelas *Hemiascomycetes* memiliki askus tidak tertutup askokarp sedangkan sub kelas *Eucomycetes* membentuk askus di dalam askokarp (Kurtzman dan Fell, 1998).

*Taphrinomycotina* (misalnya, *Schizosaccharomyces pombe*), *Saccharomycotina* (termasuk clades *Candida* dan *Saccharomyces*), dan *Pezizomycotina* (subfilum terbesar, yang meliputi *Eurotiomycetes*, *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, dan *Leotiomycetes*). Kebanyakan *Saccharomycotina* tumbuh sebagai tunas khamir atau dimorfik (dapat tumbuh sebagai khamir atau filamen), sedangkan sebagian besar *Pezizomycotina* sebagian besar berfilamen, meskipun beberapa juga dimorfik (Bennet and Tugeon, 2016).

### 2.4 Fermentasi Alkohol

Fermentasi adalah proses penguraian gula menjadi etanol dan karbondioksida dengan menggunakan mikroorganisme. Proses fermentasi terjadi pada substrat organik melalui aktivitas enzim mikroorganisme. Jika mikroorganisme hidup pada substrat yang sesuai dengan pertumbuhannya, mereka dapat mengubah gula menjadi etanol (Osvaldo dkk., 2012). Menurut Hermiati *et al.* (2020), penguraian satu molekul glukosa menghasilkan dua molekul etanol dan dua molekul karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Penguraian molekul xilosa menghasilkan lima molekul etanol dan lima molekul CO<sub>2</sub>.

Allah berfirman dalam QS: An Nahl [16]: 67 sebagai berikut :

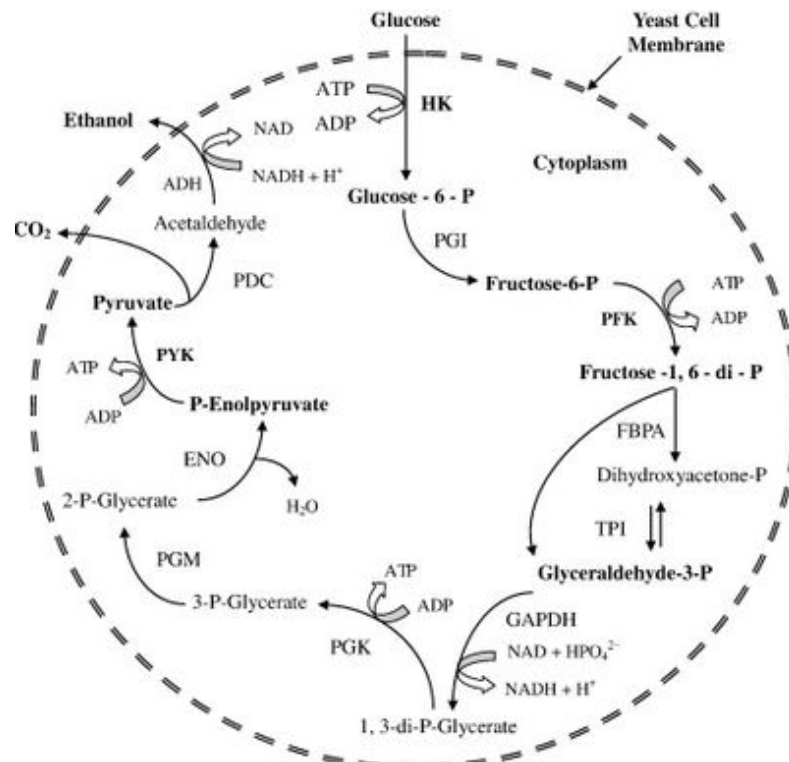
وَمِنْ ثَمَرَاتِ النَّخِيلِ وَالْأَعْنَابِ تَتَّخِذُونَ مِنْهُ سَكَرًا وَرِزْقًا حَسَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya : “*Dari buah kurma dan anggur, kamu membuat minuman yang memabukkan dan rezeki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengerti.*”

Tafsir Al Misbah menyatakan bahwa buah-buahan tidak hanya dapat dimakan tetapi juga dapat dibuat minuman. Mungkin saja minuman ini menjadi sesuatu yang buruk karena memabukkan. Sebaliknya, ayat ini menunjukkan bahwa kurma dan anggur dapat menghasilkan dua hal yang berbeda: minuman yang memabukkan dan rezeki yang baik yang tidak memabukkan, seperti perasan anggur, kurma segar, cuka, dan selai, karena wujudnya minuman tersebut membutuhkan upaya manusia untuk dapat membuat sesuatu dari hasil perasannya.

Buah-buahan yang disebutkan pada QS. An Nahl ayat 67 yaitu kurma dan anggur merupakan buah yang mengandung gula yang dapat dibuat menjadi minuman yang memabukkan. Minuman yang menyebabkan mabuk disebabkan oleh adanya etanol akibat proses fermentasi oleh mikroorganisme. Etanol dapat dimanfaatkan dalam kehidupan salah satunya sebagai bahan pengganti BBM. Etanol yang dihasilkan oleh proses fermentasi dan digunakan sebagai bahan bakar memiliki karakteristik *biodegradable* sehingga ramah lingkungan dan tidak merusak lingkungan.

Piruvat diproduksi melalui jalur *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP) selama fermentasi alkohol. Enzim piruvat dekarboksilase kemudian mengkatalisis konversi piruvat menjadi asetaldehida. Fermentasi alkohol, menurut Huang *et al.* (2015), dimulai ketika khamir memecah glukosa untuk menghasilkan dua molekul asam piruvat. Kemudian, kedua molekul asam piruvat ini dipecah menjadi dua molekul etanol dan dua molekul karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) (Gambar 2.3).



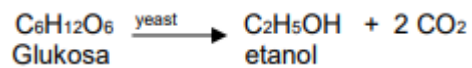
**Gambar 2.3 Fermentasi alkohol pada sel khamir** (Bai *et al.*, 2008)

Setelah memasuki sel, glukosa dimetabolisme dengan dua cara yaitu dengan difosforilasi oleh enzim kinase menjadi glukosa-6-fosfat dan dengan isomerisasi oleh enzim fosfoglukosa isomerase menjadi fruktosa-6-fosfat. Kemudian, fruktosa-6-fosfat diubah menjadi fruktosa-1,6-bifosfat dengan bantuan enzim fosfoglukosa isomerase. Proses glikolisis dimulai pada langkah ini, yang membutuhkan ATP untuk energi. Aldolase, triosefosfat isomerase, gliseraldehida-3-fosfat dehidrogenase, fosfogliserat kinase, fosfogliserat mutase, enolase, dan piruvat kinase adalah enzim yang terlibat dalam proses selanjutnya. Proses glikolisis berakhir dengan produksi piruvat. Jalur glikolisis diperlukan untuk setiap jenis khamir (Kustyawati, 2018).

Kondisi anaerob piruvat menghasilkan asetaldehida, yang kemudian melepaskan karbon dioksida dan menghasilkan etanol. Dalam fermentasi alkohol,

NAD<sup>+</sup>, akseptor elektron, direduksi menjadi NADH. Pertukaran elektron ini memengaruhi produksi ATP (Malakar *et al.*, 2020).

Fermentasi oleh khamir misalnya *Sacharomyces cereviseae* dapat menghasilkan etil alkohol (etanol) dan CO<sub>2</sub> melalui reaksi sebagai berikut (Susanti, 2013) (Susanti dkk., 2013):



Pada proses ini, glukosa difermentasikan dengan enzim *zimase/invertase* oleh khamir seperti *Sacharomyces cereviseae*. Enzim zimase mengubah polisakarida (pati) yang masih ada dalam proses hidrolisis menjadi monosakarida (glukosa), dan kemudian, melalui proses fermentasi, monosakarida diubah menjadi alkohol (Susanti *et al.*, 2013).

Pemecahan glukosa terjadi selama proses fermentasi, yang melibatkan perombakan karbohidrat. Jenis mikroba yang melakukan perombakan glukosa dan produk yang dihasilkannya menentukan seberapa banyak glukosa dapat difermentasi menjadi berbagai produk. Dalam proses fermentasi atau respirasi anaerob, glukosa diubah menjadi etanol sebagai produk utama dan tidak menghasilkan energi. Proses ini terjadi di dalam sel khamir. Perombakan gula oleh khamir selama fermentasi juga menghasilkan produk metabolit sekunder berupa komponen rasa yang mempengaruhi rasa dan aroma suatu produk. Produk metabolit sekunder ini termasuk golongan alkohol (etanol dan alkohol tinggi), golongan ester (ester asetat, ester asam lemak rantai menengah), dan komponen karbonil (asetaldehid) (Boekhout and Robert, 2003).

Terdapat beberapa faktor penting yang mempengaruhi proses fermentasi gula menjadi alkohol, yaitu jenis dan konsentrasi mikroba, pH, suhu, lama fermentasi dan nutrisi.

a. Jenis Mikroba

Jenis mikroba memengaruhi lama fermentasi dan jumlah alkohol yang dihasilkan. Khamir adalah mikroba yang paling umum digunakan untuk fermentasi alkohol karena dapat mengkonversi gula menjadi alkohol. Selama proses fermentasi, khamir membutuhkan unsur-unsur nitrogen, fosfor, karbon, hidrogen, zat besi, dan magnesium. Lama proses fermentasi memengaruhi jumlah alkohol atau etanol yang dihasilkan. Kemampuan *S. cerevisiae* untuk mengubah gula atau glukosa menjadi alkohol meningkat dengan waktu fermentasi (Arif dkk., 2016)

b. Konsentrasi Khamir

Substrat yang akan difermentasi dengan baik, konsentrasi ragi harus sekitar 2-4 persen dari volume substrat (Dyah, 2011). Jika konsentrasi ragi kurang dari jumlah yang disarankan, kecepatan fermentasi akan menurun karena jumlah massa yang lebih sedikit untuk menguraikan glukosa menjadi etanol. Akibatnya, substrat menjadi lebih banyak diperlukan (Bahri dkk., 2018).

c. pH

pH digunakan selama proses fermentasi untuk menciptakan kondisi lingkungan yang memungkinkan *Saccharomyces cerevisiae* berkembang dengan mengubah glukosa menjadi etanol. Pertumbuhan khamir dapat terganggu jika pH tidak sesuai dengan lingkungan fermentasi (Rosdee *et al.*, 2020). pH yang rendah dapat memperlambat proses fermentasi, sedangkan pH yang tinggi akan meningkatkan aktivitas fermentasi tetapi dapat menghasilkan produk samping

seperti gliserin (Kurniati et al., 2021). Ketika nilai pH yang ideal digunakan untuk berbagai mikroorganisme dan substrat selama proses fermentasi, aktivitas enzim dari hasil metabolit mikroorganisme dapat bekerja dengan baik untuk menghasilkan jumlah bioetanol yang tinggi (Pangaribuan et al., 2021). Fermentasi yang optimal, derajat keasaman (pH) harus antara 4 dan 5. Proses fermentasi akan berkurang pada pH di bawah 3 (Edward dan Dewa, 2015).

d. Suhu

Suhu memengaruhi proses fermentasi dalam dua cara yaitu memengaruhi aktivitas enzim pada khamir dan secara langsung memengaruhi hasil alkohol. Akibat penguapan, seperti proses biologis (enzimatik) lainnya, kecepatan fermentasi akan meningkat pada suhu ideal, yang berkisar antara 27 dan 32 °C (Bahri dkk., 2018).

Tingkat fermentasi yang tinggi dapat mempercepat proses hidrolisis pati menjadi gula, yang akan digunakan sebagai bahan fermentasi. Namun, hal ini juga bergantung pada bagaimana enzim yang berpartisipasi dalam proses fermentasi berfungsi. Jika suhu fermentasi berada di bawah suhu ideal, aktivitas katalitik enzim akan menurun. Di sisi lain, jika suhu fermentasi berada di atas suhu ideal, enzim akan terdenaturasi, yang menghambat proses fermentasi (Pangaribuan dkk., 2021).

e. Lama Fermentasi

Lamanya waktu fermentasi juga memengaruhi jumlah etanol yang dihasilkan. Semakin lama proses fermentasi berlangsung, semakin banyak bioetanol yang dihasilkan. Selama waktu fermentasi yang optimal, konsentrasi etanol yang dihasilkan akan menurun setelah mencapai waktu yang optimal. Hal ini karena mikroba telah mencapai tahap kematian (Kurniati dkk., 2021).

Pertumbuhan mikroorganisme berpengaruh dengan lama fermentasi, maka proses fermentasi membutuhkan waktu. Konsentrasi bioetanol yang dihasilkan akan turun jika fermentasi berlangsung terlalu cepat karena mikroba masih dalam tahap adaptasi dan belum sepenuhnya mengubah komponen glukosa yang tersedia di dalam media. Konsentrasi bioetanol meningkat ketika memasuki fase eksponensial. Mikroorganisme yang digunakan tumbuh sangat cepat selama fase eksponensial. Jumlah sel terbesar dan konsentrasi bioetanol tertinggi dihasilkan menjelang akhir fase eksponensial atau pada awal fase stasioner. Selama fase ini, gula dan nutrisi lainnya dikonsumsi untuk memenuhi kebutuhan perkembangan mikroorganisme. Setelah waktu fermentasi yang optimal, nutrisi pada media fermentasi akan berkurang, sehingga konsentrasi bioetanol akan menurun. Hal tersebut juga disebabkan karena terjadinya inhibisi dalam proses fermentasi yaitu akumulasi bioetanol yang tinggi akan bersifat racun bagi mikroorganisme yang digunakan sehingga secara perlahan menghentikan pertumbuhannya (Pangaribuan dkk., 2021).

#### f. Nutrisi

Nutrisi harus ditambahkan agar khamir dapat berkembang dan bereproduksi selama proses fermentasi. Unsur karbon (C) pada karbohidrat, nitrogen (N) dari penambahan pupuk antara lain nitrogen, ZA, dan urea, serta fosfor (P) dari penambahan pupuk fosfat seperti NPK, TSP, DSP, dan seterusnya (Bahri dkk., 2018).

### **2.5 Bioetanol**

Etanol, dengan rumus  $C_2H_5OH$ , adalah senyawa organik yang terdiri dari karbon, hidrogen, dan oksigen (Susanti dkk., 2013). Etanol sintetis dan etanol

biomassa adalah dua jenis etanol. Etanol sintetik, juga disebut metanol, dihasilkan dari etilen, kayu, minyak bumi, atau batu bara, sedangkan etanol biomassa dihasilkan dari berbagai bahan baku yang mengandung gula atau bahan yang dapat dikonversi menjadi gula seperti pati atau selulosa (Rama, 2008).

Ciri yang tidak berwarna dan larut dalam air merupakan ciri etanol. Bioetanol adalah nama produk etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi karbohidrat menggunakan mikroorganisme. Bioetanol dibuat dengan fermentasi bahan yang mengandung gula, yang kemudian diproses melalui proses destilasi untuk mendapatkan alkohol murni. Menurut Prihadana (2007), etanol, yang memiliki banyak sifat fisik dan kimia, dapat digunakan sebagai bahan baku industri, desinfektan, pelarut, dan bioenergi. Kadar bioetanol berbeda-beda tergantung pada cara digunakan. Bioetanol dapat digunakan dalam industri dengan kadar 6,5 hingga 90%, dalam campuran alkohol dan bahan farmasi dengan kadar 96,5 hingga 99,5%. Untuk meningkatkan nilai oktan bahan bakar, bioetanol dapat digunakan sebagai pengganti fungsi aditif yang sering ditambahkan (Chasanah *et al.*, 2020). Bahan-bahan yang dapat diproses untuk menghasilkan bioetanol adalah bahan-bahan yang banyak mengandung glukosa, seperti nira aren, tetes tebu, sari buah-buahan, nira kelapa, dan sebagainya; bahan-bahan yang mengandung pati, seperti umbi-umbian; dan bahan-bahan yang mengandung selulosa, seperti serat pisang, tandan kosong kelapa sawit, dan lainnya (Sari *et al.*, 2020).

Pembakaran etanol menghasilkan emisi yang relatif rendah dari senyawa organik yang mudah menguap. Emisi dan toksisitas etanol lebih rendah dibandingkan dengan bahan bakar fosil seperti minyak bumi, solar dan lain-lain (Nasir *et al.*, 2017). Produksi etanol dipengaruhi oleh konsentrasi glukosa (hasil

alkohol sekitar 0,5 g etanol per g glukosa), tetapi penambahan nutrisi juga merupakan parameter penting, karena jumlah nutrisi spesifik yang memadai, seperti vitamin dan nitrogen, dapat secara signifikan meningkatkan viabilitas dan ketahanan khamir terhadap medium serta memacu kinerja dalam produksi etanol (Salafia *et al.*, 2022). Konversi lignoselulosa menjadi selulosa menghasilkan bioetanol dari tanaman yang mengandung selulosa. Konversi dapat dicapai melalui hidrolisis fisik, kimia, atau biologi (Khairani, 2007).

## 2.6 Hidrolisis

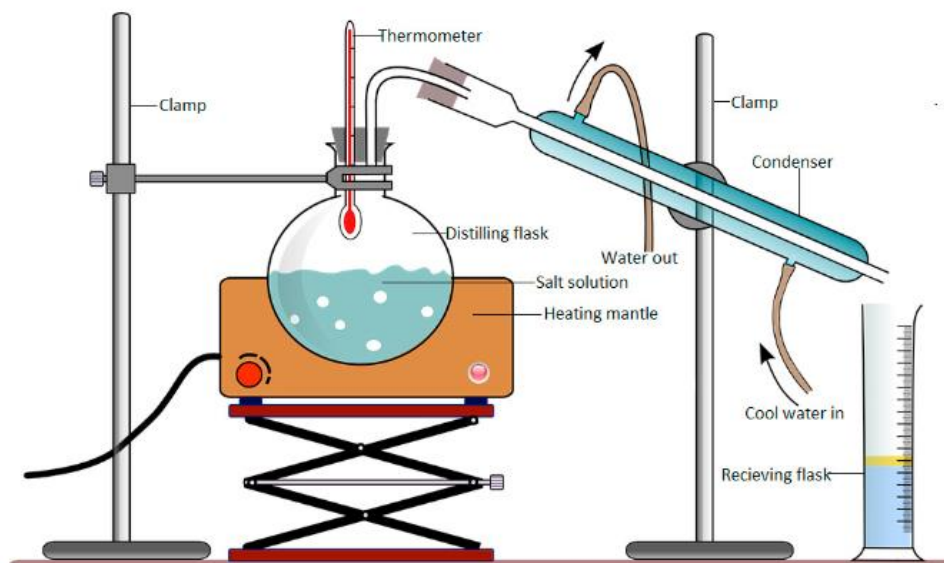
Hidrolisis terjadi antara reaktan dan air. Bioetanol diproduksi melalui fermentasi berdasarkan jumlah glukosa yang dihasilkan selama proses hidrolisis. Hidrolisis pati adalah pemecahan rantai polimer pati menjadi unit glukosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) atau dekstrosa. Katalis ditambahkan pada proses hidrolisis air murni untuk mempercepat reaksi dan meningkatkan selektivitas karena berlangsung lambat dan menghasilkan hasil yang lebih rendah. Katalis dapat berupa asam atau enzim. Katalis asam yang paling populer digunakan dalam industri adalah asam klorida (HCl), asam nitrat, dan asam sulfat (Bahri dkk., 2018).

Air berfungsi sebagai reaktan dalam hidrolisis murni. Bahan kimia hidrolisis ini memiliki beberapa kelemahan, termasuk prosedur yang lambat, dan hasil di bawah standar. Biasanya, industri termasuk katalis. Untuk menghidrolisis air, bahan kimia yang sangat reaktif dimasukkan. Selain itu, pada suhu tinggi, uap air dapat membantu mempercepat proses. Asam, yang dapat dipekatkan atau diencerkan, sering bekerja sebagai katalis dengan mengaktifkan air dari kandungan asam encer untuk menghidrolisis larutan asam. Pada sebagian besar keadaan, laju reaksi berbanding terbalik dengan laju ion  $H^+$ , namun hal ini tidak selalu terjadi pada konsentrasi yang besar.  $H_2SO_4$  dan HCl digunakan dalam bisnis asam. Dalam

larutan basa, basa pekat atau encer dapat menghidrolisis secara katalitik. Jenis basa yang digunakan adalah basa encer, basa pekat, dan basa padat. Reaksi bentuk padat dan cair sama. Hanya reaksi yang lebih sempurna atau lebih reaktif digunakan untuk tujuan tertentu, seperti untuk membentuk phenol dari benzene. Dengan katalis enzim, hidrolisa terjadi dengan zat yang dibuat oleh mikroorganisme. Industri dapat menggunakannya untuk membuat alkohol dari tetes tebu oleh enzim (Susanti dkk, 2013).

## **2.7 Distilasi**

Distilasi adalah pemisahan pada proses suatu campuran yang berdasarkan titik didih. Pada kolom distilasi terjadinya tempat untuk memisahkan campuran bahan-bahan menjadi fraksi yang lebih murni berdasarkan tingkat volatilitas fraksi-fraksi penyusunnya. Pemisahan komponen dari campuran liquid tergantung pada titik didih masing-masing komponen serta tekanan uap campuran liquid. Tekanan uap adalah tekanan keseimbangan yang dikeluarkan oleh molekul yang masuk dan keluar pada permukaan liquid. Peralatan yang digunakan pada proses distilasi yaitu kondensor, reboiler, menara stripping dan menara fraksionas (Gambar 2.4) (Komariah dkk., 2009).



**Gambar 2.4** Alat Distilasi (Bohulu *et al.*, 2019)

Setelah larutan dipanaskan, fase uap akan terbentuk selama proses distilasi. Dengan kontak uap dan cairan, semua bahan dalam larutan akan terdistribusi dalam fase dalam waktu yang cukup lama untuk membentuk distilat. Sebagian besar bahan dengan tekanan uap murni rendah atau titik didih tinggi ditemukan dalam residu setelah distilat (Susanti dkk, 2013).

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksplorasi dan eksperimen. Penelitian eksplorasi dalam penelitian ini adalah dengan cara mengisolasi khamir pada buah nanas yang diperoleh dari Kabupaten Blitar. Penelitian eksperimen menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) *one way* ANOVA dengan variabel bebas adalah konsentrasi urea dan waktu fermentasi. Variabel terikat adalah kadar etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi. Percobaan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Kombinasi konsentrasi urea dan waktu fermentasi dirangkum pada tabel 3.1.

**Tabel 3.1 Kombinasi konsentrasi urea dan waktu fermentasi**

Konsentrasi urea	Waktu Fermentasi		
	24 jam (W1)	48 jam (W2)	72 jam (W3)
0 % (A1)	A1W1	A1W2	A1W3
2 % (A2)	A2W1	A2W2	A2W3
4 % (A3)	A3W1	A3W2	A3W3

### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2022 sampai Juni 2023 di laboratorium mikrobiologi Program Studi Biologi dan Laboratorium Kimia Organik Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

### 3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, blender, botol fermentasi, Erlenmeyer (1000 ml, 250 ml, 100 ml), tabung reaksi, tabung durham, cawan petri, plastik wrap, kantong plastik tahan panas, corong, kertas saring, *aluminium foil*, kertas label, tisu, kapas, kasa, jarum ose, rak tabung, bunsen, korek api, gelas objek, gelas ukur, inkubator, shaker, timbangan analitik, *Laminar Air Flow* (LAF), *hotplate*, autoklaf, vortex, alat destilasi, mikropipet, piknometer dan mikroskop.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media YMA, media YMB, media YPGB, *Sodium DL Lactate*, buah nanas, limbah kulit nanas, urea, akuades, alkohol 70%, spirtus, dan *methylene blue*.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Cawan petri dibungkus kertas dan dimasukkan ke plastik tahan panas. Alat-alat gelas lain dibungkus *aluminium foil* dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Selanjutnya alat-alat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 3.4.2 Pembuatan Media

##### 3.4.2.1 Media YMEA

Media YMEA dibuat dengan menimbang 5 gram pepton, 10 gram glukosa, 3 gram *yeast extract*, 3 gram *malt extract*, dan 20 mikroba agar yang dilarutkan ke dalam 1000 ml akuades kemudian media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Jika suhu media kurang lebih 50 °C, maka ditambahkan *Sodium*

*DL-Lactate* yang bermanfaat sebagai antibakteri sebanyak 120  $\mu$ l (Perlatti *et al.*, 2021).

#### **3.4.2.2 Media YMB**

Media YMB dibuat dengan menimbang 5 gram pepton, 10 gram glukosa, 3 gram *yeast extract*, dan 3 gram *malt extract* yang dilarutkan ke dalam 1000 ml akuades kemudian media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Jika suhu media kurang lebih 50 °C, maka ditambahkan *Sodium DL-Lactate* yang bermanfaat sebagai antibakteri sebanyak 120  $\mu$ l (Perlatti *et al.*, 2021).

#### **3.4.2.3 Media Yeast Extract Peptone Glucose Broth (YPGB)**

Media YPGB dibuat dengan 5 g *yeast extract*, 5 g pepton, dan 10 g glukosa. Semua bahan dicampur dengan akuades sebanyak 500 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan disterilisasi dalam autoklaf (Thais, 2006).

#### **3.4.2.4 Media Fermentasi Karbohidrat**

Media yang digunakan untuk membuat 1000 ml media adalah 50 ml larutan karbohidrat, 10 g pepton, 5 g NaCl, 10 ml *Andrade's indicator*. Media larutan karbohidrat dibuat dengan mencampurkan 10 gram gula dengan 100 ml aquades. 100 ml *Andrade's indicator* dibutuhkan NAOH 16 ml dan *acid fuchsin* 0,1 gram (Atlas, 2005).

#### **3.4.3 Isolasi Khamir**

Kulit nanas dibersihkan menggunakan alkohol 70% kemudian dikeringkan. Buah nanas dicuci bersih kemudian dipisahkan dari kulitnya. Daging buah dan kulit nanas dipotong 3x3 cm menggunakan pisau steril. Khamir yang berasosiasi dengan daging buah dan kulit nanas diisolasi dengan cara direndam dalam media YMB

dengan penambahan *Sodium DL-Lactate* sebagai antibakteri. Perendaman dilakukan dalam tabung Ependorf 50 ml. Inkubasi dilakukan selama 3 hari pada suhu kamar atau sampai terbentuk gelembung berisi udara. Adanya gelembung menandakan telah terjadi fermentasi pada media akibat pertumbuhan dan perkembangan khamir (Watanabe *et al.*, 2016).

#### **3.4.4 Purifikasi Khamir**

Khamir yang sudah tumbuh pada media YMB kemudian dilakukan pengeceran. Inokulasi dilakukan pada hasil pengenceran  $10^{-3}$  dengan cara ditebar pada media YMEA. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama 48 jam (Suryaningsih dkk., 2018). Koloni yang terlihat berbeda dengan koloni lain dari karakter morfologi dan media, diinokulasikan pada media YMB sebanyak 3 ml dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 7 x 24 jam dalam inkubator shaker hingga terlihat keruh. Hasil pertumbuhan media YMB ditebar ke cawan petri yang sudah berisi media YMEA. Subkultur khamir kedua dan ketiga dilakukan dengan *streak plate* pada media YMEA hingga diperoleh isolat murni (Kusmiyati *et al.*, 2021).

#### **3.4.4 Karakterisasi Khamir hasil Isolasi**

##### **3.4.4.1 Pengamatan Makroskopis Morfologi koloni Khamir**

Khamir yang telah dimurnikan diamati karakter makroskopisnya pada cawan petri berisi media YMEA. Koloni isolat khamir yang tumbuh pada inkubasi 48 jam dilakukan pengamatan koloni secara makroskopis. Karakter makroskopik yang diamati meliputi permukaan, tepi atau margin, tekstur, warna dan elevasi koloni. Pengamatan secara mikroskopis berupa ukuran, bentuk dan cara reproduksi vegetatif seperti ada tidaknya pembentukan tunas (*budding*) pada sel khamir.

Karakteristik morfologi makroskopis menggunakan buku *Yeast : Taxonomic Study* Kurtman & Fell (Albus, 2014; Zunainda dan Alami, 2014).

#### **3.4.4.2 Pengamatan Mikroskopis Morfologi Sel Khamir**

Pengamatan morfologi sel secara mikroskopis berupa ukuran, bentuk dan cara reproduksi vegetatif seperti ada tidaknya pembentukan tunas (*budding*) pada sel khamir (Zunainda dan Alami, 2014). Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan menggunakan *methylene blue* dengan cara diambil 1 ose biakan dari masing-masing khamir, kemudian ditetaskan pada kaca preparat yang telah ditetesi akuades. Preparat ditetesi dengan *methylene blue*, preparat diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 1000x (Kusmiati, 2007). Pengamatan secara mikroskopis berupa ukuran, bentuk dan cara reproduksi vegetatif seperti ada tidaknya pembentukan tunas (*budding*) pada sel khamir (Zunainda dan Alami, 2014).

#### **3.4.5 Uji Fermentasi Gula**

Uji fermentasi karbohidrat dilakukan dengan menambahkan 100 µl khamir yang berumur 48 jam ke dalam 9 ml media uji fermentasi (glukosa, sukrosa dan fruktosa). Kemudian diinkubasi pada suhu 27 °C selama 7 hari. Media fermentasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung Durham (Karki *et al.*, 2017). Reaksi positif fermentasi ditunjukkan dengan perubahan media dari merah menjadi merah muda diikuti dengan terbentuknya gelembung pada tabung Durham. Reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung pada tabung Durham dan tidak terjadi perubahan warna pada media (Suryaningsih dkk., 2018).

### **3.4.6 Uji Toleransi Etanol**

Uji toleransi etanol dilakukan dengan isolat khamir dalam media YPGB yang mengandung konsentrasi etanol yang berbeda yaitu 10%, 13% dan 15%. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 72 jam. Kepadatan sel khamir dihitung sebelum dan setelah proses inkubasi berlangsung menggunakan Spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 660 nm (Karki *et al.*, 2017).

### **3.4.7 Uji Produksi Bioetanol**

#### **3.4.7.1 Preparasi Inokulum**

Satu ose penuh koloni khamir diinokulasi dari cawan petri ke dalam Erlenmeyer yang berisi 20 mL media YPGB steril. Inokulum khamiri diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 200 rpm selama 48 jam. Setelah 48 jam, sel khamir disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ragi dicuci dengan akuades steril sebanyak dua kali dan disuspensikan kembali dalam media YPG baru untuk digunakan sebagai inokulum (Abdulla *et al.*, 2019).

#### **3.4.7.2 Hidrolisis**

Kulit nanas yang dikumpulkan selanjutnya dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil. Selanjutnya kulit nanas dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 2 hari. Kulit nanas yang sudah kering kemudian diblender sampai didapatkan serbuk kulit nanas. Serbuk kulit nanas seberat 10 gram dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dengan penambahan enzim selulase 35 mg selama 24 jam. Larutan hasil hidrolisa disterilisasi menggunakan autoklaf kemudian didinginkan dan disaring untuk dilanjutkan pada proses fermentasi (Nulhakim dkk., 2019).

### 3.4.7.3 Pengukuran Kadar Gula dengan Metode DNS

Larutan 100 mililiter dibuat dari 1 gram bubuk DNS, 20 mililiter NaOH 2M, dan 30 mililiter Ka-Na tartrat disiapkan. Wadah tersebut kemudian disimpan di lemari es. Untuk memulai kurva standar, larutkan 250 mg glukosa dalam 50 ml air murni. Menurut Julaeha *et al.*, 2016).dibuat larutan stok glukosa dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Sebelum dan sesudah inkubasi, 1 mL sampel hasil hidrolisis enzimatis dipipet dalam keadaan bening ke dalam tabung reaksi bersih untuk deteksi kadar glukosa. Selanjutnya ditambahkan 3 mL reagen DNS

Untuk melakukan analisis kadar glukosa, sampel hasil hidrolisis enzimatik sebelum dan sesudah inkubasi dalam keadaan jernih dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang bersih dan kemudian ditambahkan 3 mL reagen DNS. Tabung reaksi dipanaskan pada air mendidih selama lima menit untuk menghasilkan reaksi antara glukosa dalam sampel dengan DNS. Tabung didinginkan hingga mencapai suhu ruang, selanjutnya absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer UV-Vis (Oktavia dkk., 2014).

### 3.4.7.3 Fermentasi

Isolat strain yang diketahui memiliki kemampuan fermentasi gula dan toleransi terbaik terhadap etanol digunakan untuk produksi bioetanol. Strain khamir kemudian diinokulasikan sebanyak 2 gram kedalam botol fermentasi yang berisi 100 ml ekstrak kulit nanas. Penambahan urea sebanyak 0%, 2% dan 4% kemudian diinkubasi dengan variasi lama fermentasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Sampel hasil fermentasi disaring menggunakan kertas saring. Hasil saringan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat destilasi. Proses destilasi dilakukan pada suhu 100°C,

karena titik didih alkohol 78-80°C dan titik didih air 100°C. Pengembunan uap hasil destilasi tersebut ditampung ke dalam gelas penampung (erlenmeyer) sampai uap tidak menetes lagi yang ditutup dengan plastik dan diikat karet (Batutah, 2017).

#### 3.4.7.4 Pengukuran kadar etanol

Analisis kadar etanol hasil destilasi dilakukan dengan menggunakan piknometer. Selama 10 menit, piknometer dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C. Setelah itu, piknometer didinginkan kembali ke suhu kamar. Kemudian neraca analitik digunakan untuk menimbang piknometer. Setelah itu, distilat dimasukkan ke dalam piknometer yang sebelumnya telah ditimbang. Setelah jumlah piknometer cukup, distilat dimasukkan. Kelebihan distilat dibersihkan di puncak pipa kapiler. Timbangan piknometer yang mengandung distilat dilakukan, dan beratnya dicatat. Tabel *International Organization of Legal Metrology (OIML)* Bhavan & Marg digunakan untuk menentukan kadar etanol (Akbar dkk., 2019).

$$\text{Berat jenis} = \frac{x_2 - x_1}{x_3 - x_1}$$

Keterangan :

$x_1$  : berat kosong piknometer

$x_2$  : berat piknometer berisi destilat

$x_3$  : berat piknometer + akuades

### 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa kadar etanol dianalisis menggunakan *one way* ANOVA. Jika hasil menunjukkan perbedaan yang nyata kemudian dilanjut uji lanjut DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Karakterisasi Morfologi Khamir Hasil Isolasi Buah Nanas

Hasil isolasi khamir dari daging dan kulit buah nanas diperoleh 7 isolat dari daging dan 7 isolat dari kulit buah. Isolat-isolat yang telah dimurnikan diperoleh 5 isolat dari daging buah nanas dan 5 isolat dari kulit buah nanas yang memenuhi kriteria khamir secara makroskopis. Khamir secara makroskopis memiliki ciri-ciri koloni berwarna putih susu atau putih kekuningan dan tidak berlendir. Selain dari bentuk dan warna, khamir dapat diamati juga dengan bau yang dihasilkan isolat tersebut yaitu bau tape atau alkohol (Simbolon dkk., 2018). Isolat-isolat yang sudah diperoleh kemudian diberi kode isolat D1, D2, D3, D4, dan D5 untuk isolat yang berasal dari daging buah nanas dan kode isolat KI, K2, K3, K4 dan K5 untuk isolat yang berasal dari kulit buah nanas. Karakterisasi yang dilakukan meliputi karakterisasi makroskopis dan mikroskopis. Hasil karakterisasi morfologi secara makroskopis menggunakan buku “*The Yeast : A Taxonomy Study*” ditunjukkan pada tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Morfologi Makroskopis Khamir**

Kode isolat	Morfologi Koloni						
	Bentuk	Tekstur	Warna	Permukaan	Elevasi	Tepi	Dugaan Genus
<b>D1</b>	Bulat tepi serabut	Kental mentega	putih krem	Tidak halus dan kusam	Timbul	bergaris	<i>Candida</i>
<b>D2</b>	Bulat tepi timbul	Kental mentega	Putih	Halus dan kilau	Timbul	Rata	<i>Saccharomyces</i>
<b>D3</b>	Bulat tepi timbul	Kental mentega	Putih krem	halus dan kusam	Timbul	rata	<i>Zygosaccharomyces</i>
<b>D4</b>	Bulat tepi serabut	Kental mentega	putih	Tidak halus dan kusam	Timbul	bergaris	<i>Saccharomyces</i>
<b>D5</b>	Tidak Beraturan	Kental mentega	Putih krem	Tidak halus dan kusam	Timbul	Bergerigi	<i>Pichia</i>
<b>K1</b>	Bulat tepi timbul	Kental mentega	krem	Halus dan kusam	Timbul	rata	<i>Zygosaccharomyces</i>

Kode isolat	Morfologi Koloni						
	Bentuk	Tekstur	Warna	Permukaan	Elevasi	Tepi	Dugaan Genus
<b>K2</b>	Bulat tepi timbul	Kental mentega	Putih krem	Halus dan kilau	Timbul	Rata	<i>Zygosaccharomyces</i>
<b>K3</b>	Bulat tepi serabut	Kental mentega	Putih krem	Tidak halus dan kusam	Timbul	bergaris	<i>Pichia</i>
<b>K4</b>	Bulat tepi timbul	Kental mentega	Putih krem	Halus dan kusam	Timbul	Tidak rata	<i>Candida</i>
<b>K5</b>	Bulat tepi serabut	Kental mentega	Putih krem	Tidak halus dan kusam	Timbul	Bergaris	<i>Pichia</i>

Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis meliputi bentuk, tekstur, warna, permukaan, elevasi dan tepi. Isolat khamir yang diperoleh memiliki bentuk bulat tepi serabut pada isolat D1, D4, K3, K5, bentuk bulat tepi timbul pada isolat D2, D3, K1, K2, K4 dan bentuk tidak beraturan pada isolat D5. Semua isolat memiliki tekstur kental mentega. Isolat khamir berwarna putih krem pada D1, D2, D3, D5, K2, K3, K4, K5, berwarna krem pada isolat K1 sedangkan isolat D2 dan D4 berwarna putih. Isolat memiliki permukaan tidak halus dan kusam pada isolat D1, D4, D5, K3, K5, permukaan halus dan kusam pada isolat D3, K1, K4 sedangkan permukaan halus dan kilau pada isolat D2, K2. Semua isolat khamir memiliki elevasi timbul. Isolat khamir memiliki tepi rata pada isolat D2, D3, K1, K2, tepi tidak rata pada isolat K4, tepi bergaris pada isolat D1, D4, K3, K5 dan tepi bergerigi pada isolat D5.

Karakterisasi morfologi khamir secara mikroskopis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Karakteristik mikroskopis yang diamati meliputi bentuk sel, reproduksi vegetatif dan ukuran sel. Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopis ditunjukkan oleh tabel 4.2.

**Tabel 4.2. Morfologi Mikroskopis Khamir**

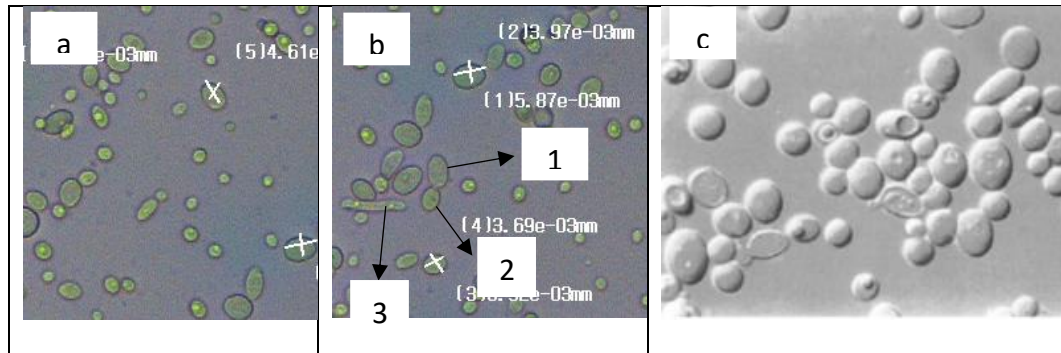
Kode Isolat	Bentuk Sel	Morfologi Sel	
		Reproduksi Vegetatif	Ukuran Sel ( $\mu\text{m}$ )
D1	oval	monopolar	(3,11-3,97) x (3,69-5,87)
D2	bulat	Multilateral	(3,97-4,87) x (4,11-7,58)
D3	oval	Multilateral	(4,24-6,20) x (3,54-5,75)
D4	Oval- memanjang	Multilateral	(6,07-6,49) x (3,93-4,78)
D5	oval	monopolar	(4,87-4,92)x (6,4-7,91)
K1	oval	monopolar	(5,28-5,70) x (3,11-4,49)
K2	oval	multilateral	(4,27-5,74) x (4,70-6,34)
K3	oval	monopolar	(4,78-4,92) x (6,40-7,91)
K4	oval	Multilateral	(4,78-5,62) x (5,40-7,61)
K5	oval	Multilateral	(3,64-4,62) x (5,8-6,2)

Hasil pengamatan secara mikroskopis sel khamir memiliki bentuk oval pada isolat D1, D3, D5, K1, K2, K3, K5, bentuk bulat pada isolat D2, bentuk oval memanjang pada isolat D4 dan bentuk isolat oval pada isolat K4. Reproduksi vegetatif khamir melalui pertunasan (*budding*) yang berbeda-beda. Pertunasan monopolar pada isolat D1, D2, D5, K1, K3, pertunasan multilateral pada isolat D3, D4, K2, K4, dan K5. Semua isolat memiliki ukuran yang bervariasi antara (3,11-6,49) x (3,11-7,91) $\mu\text{m}$ . Hal ini sesuai dengan Kavanagh (2005), bahwa sel khamir tidak berflagel dan bervariasi dalam ukuran dari 2-3  $\mu\text{m}$  hingga 20-50  $\mu\text{m}$  dan lebar 1-10  $\mu\text{m}$ . Sel-sel khamir biasanya berbentuk bulat, semi bulat, oval, elips, atau silindris (Hogg, 2005). Khamir dapat membentuk hifa palsu yang tumbuh menjadi miselium palsu, atau *pseudomycelium*, atau miselium sejati. Sel tunas khamir yang memanjang tidak dapat melepaskan diri dari sel induknya dan membentuk rantai, seperti *Candida* spp. dan *Pichia* spp. (Gandjar et al., 2006).

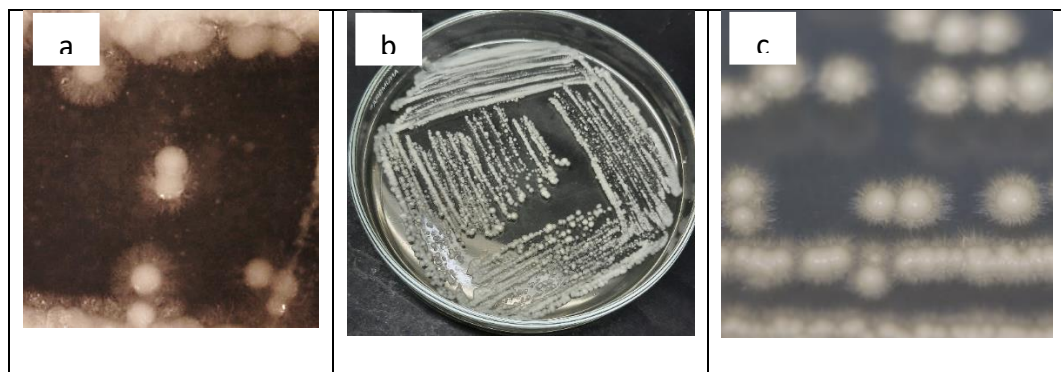
#### 4.1.1 Isolat Khamir Kode D1

Hasil pengamatan morfologi sel khamir D1 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* monopolar, dapat

membentuk pseudohifa dan memiliki ukuran  $(3,11-3,97) \times (3,69-5,87) \mu\text{m}$  (Gambar 4.1). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir D1 memiliki bentuk koloni bulat tepi serabut, tekstur kental mentega, berwarna putih krem, memiliki permukaan tidak halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi bergaris (Gambar 4.2).



Gambar 4.1 a. sel isolat D1 perbesaran 400x, b. 1. sel induk, 2. sel anak, 3. pseudohifa c. *Candida maltose* (Kurtzman dan Fell, 1998)

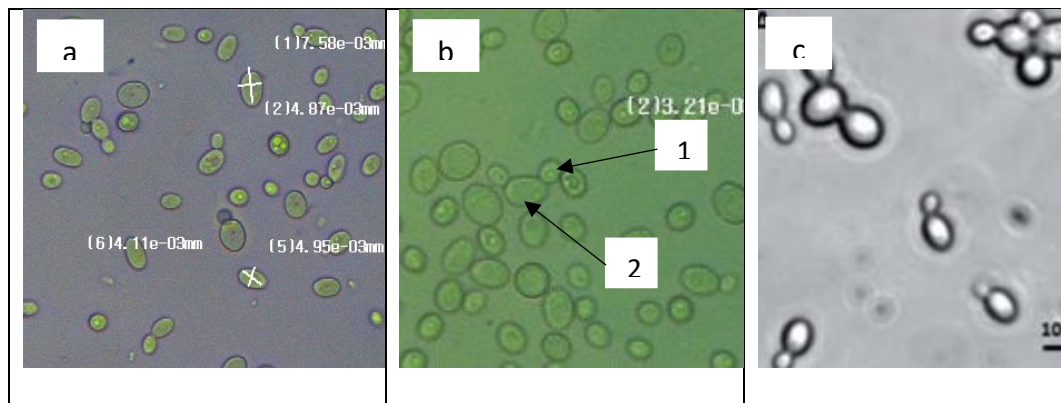


Gambar 4.2 a. koloni isolat D1 perbesaran 11x, b. koloni isolat D1, c. isolat *Candida maltose*

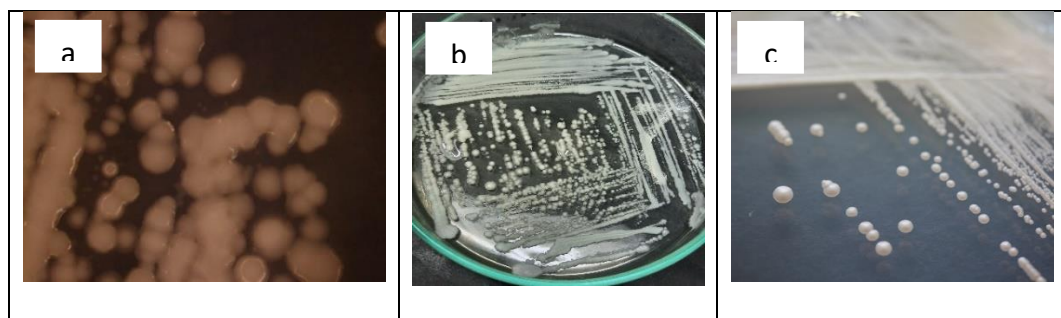
Isolat D2 diduga merupakan genus *Candida*. Menurut Kurtzman dan Fell (1998) Genus *Candida* memiliki sel berbentuk subglobos sampai ovoid, berukuran  $(3,0-5,0) \times (4,0-7,0) \mu\text{m}$ , membentuk kelompok kecil, berpasangan atau tunggal, terdapat pseudohifa yang terdiri dari sel-sel silinder. Pertumbuhan secara aerob, koloni berwarna putih, krem dan tekstur halus.

#### 4.1.2 Isolat Khamir D2

Hasil pengamatan morfologi sel khamir D2 secara mikroskopis memiliki bentuk bulat, reproduksi vegetatif membentuk *budding* multilateral dan memiliki ukuran  $(3,97-4,87) \times (4,11-7,58) \mu\text{m}$  (Gambar 4.3). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir D2 memiliki bentuk koloni bulat tepi timbul, tekstur kental mentega, berwarna putih, memiliki permukaan halus dan kilau, elevasi timbul dan tepi rata (Gambar 4.4).



Gambar 4.3 a. sel isolat D2 perbesaran 400x, b. 1. sel induk 2. sel anak, c. *Saccharomyces cerevisiae* (Wahyono *et al.*, 2015)



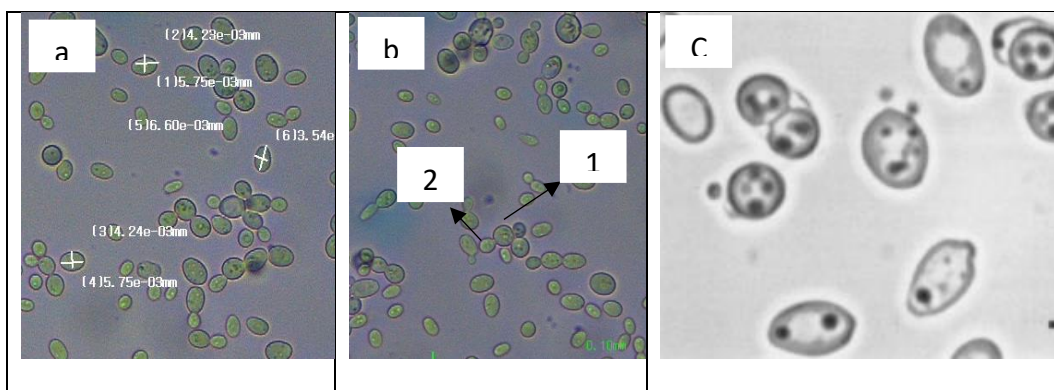
Gambar 4.4 a. koloni isolat D2 perbesaran 11x, b. koloni isolat D2, c. koloni *Saccharomyces*

Isolat D2 diduga termasuk genus *Saccharomyces*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998), bahwa Genus *Saccharomyces* memiliki sel berbentuk globose (bulat), ovoid (oval) atau elongate (memanjang) berukuran  $(3.0-8.0) \times (5.0-$

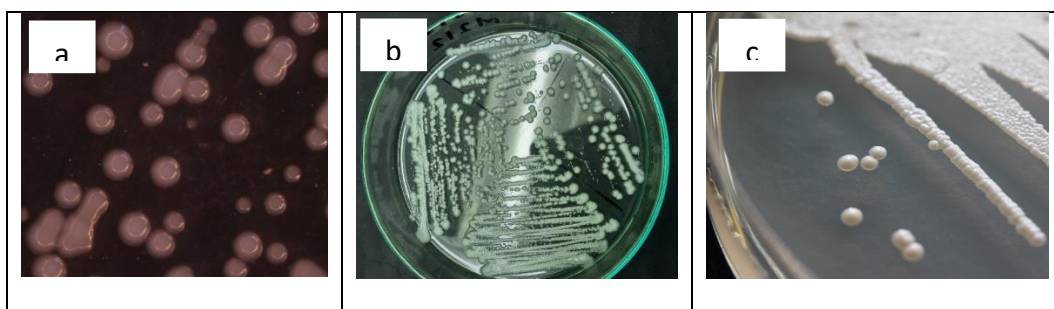
10.0)  $\mu\text{m}$ , *butyrous* (kental), berwarna krem, permukaan halus, biasanya rata (*flat*), *raised* dan *opaque*. Pratiwi dan Akhdiya (2020) menambahkan bahwa Genus *Saccharomyces* memiliki karakteristik sel berbentuk bulat, elips atau silindris, reproduksi aseksual dengan pertunasan multilateral dan secara seksual dengan askospora (1–4 atau lebih per askus).

#### 4.1.3 Isolat Khamir D3

Hasil pengamatan morfologi sel khamir D3 secara mikroskopis memiliki bentuk bulat, reproduksi vegetatif membentuk *budding* monopolar dan memiliki ukuran ( 4,24-6,20) x (3,54-5,75)  $\mu\text{m}$  (Gambar 4.5). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir D3 memiliki bentuk koloni bulat tepi timbul, tekstur kental mentega, berwarna putih, memiliki permukaan halus dan kilau, elevasi timbul dan tepi rata (Gambar 4.6).



Gambar 4.5 a. sel isolat D3 perbesaran 400x b. 1. sel induk, 2. sel anak, c. *Zygosaccharomyces bisporus* (Kurtzman dan Fell, 1998)

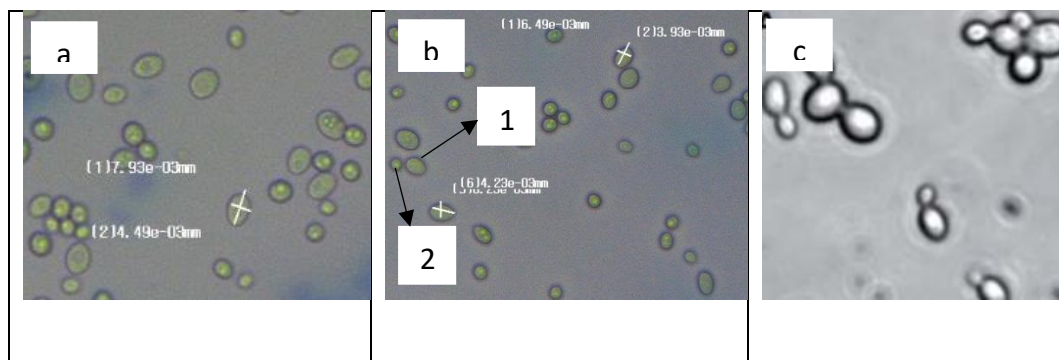


Gambar 4.6 a. koloni isolat D3 perbesaran 11x, b. koloni isolat D3, c. *Zygosaccharomyces bisporus*

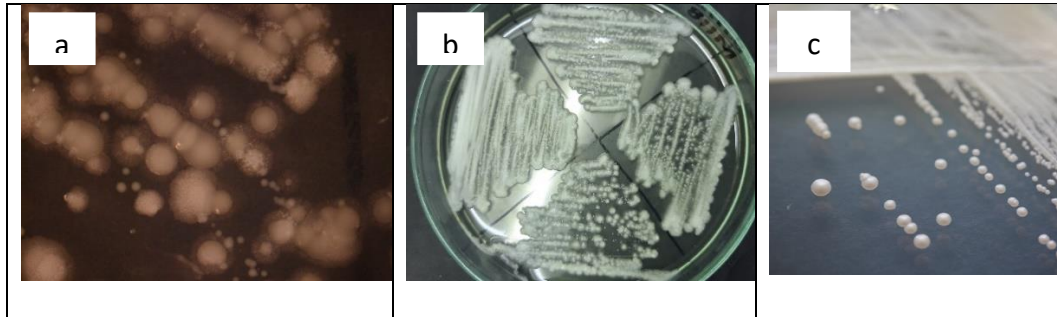
Isolat D3 diduga termasuk genus *Zygosaccharomyces*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998), bahwa genus *Zygosaccharomyces* memiliki sel berbentuk bulat hingga ellipsoidal, berukuran  $(2,3-5,2) \times (2,4-10,1) \mu\text{m}$ , tunggal atau berpasangan. Pertumbuhannya *butyrous* (kental) dan berwarna putih. Tidak terdapat pseudohifa, permukaan berkilau, dan memiliki tekstur halus.

#### 4.1.4 Isolat Khamir D4

Hasil pengamatan morfologi sel khamir D4 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* multilateral dan memiliki ukuran  $(6,07-6,49) \times (3,93-4,78) \mu\text{m}$  (Gambar 4.7). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir D4 memiliki bentuk koloni bulat tepi serabut, tekstur kental mentega, berwarna putih, memiliki permukaan tidak halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi bergaris (Gambar 4.8).



Gambar 4.7 a. sel isolat D4 perbesaran 400x, b. 1.sel induk, 2.sel anak, c. *Saccharomyces* (Wahyono *et al.*, 2015)

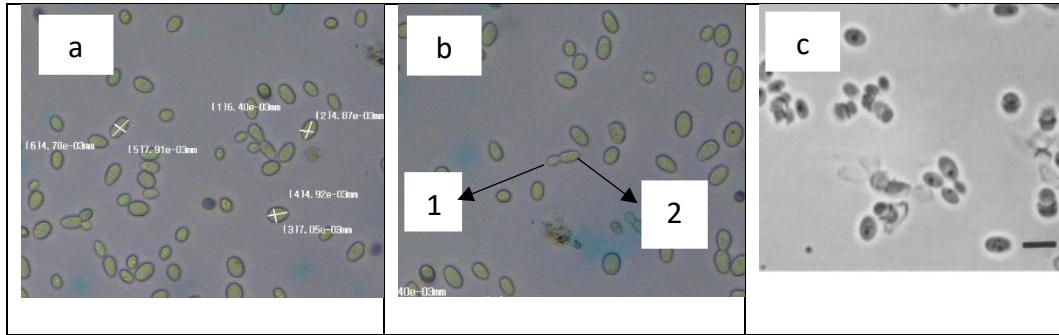


Gambar 4.8 koloni isolat D4 perbesaran 11x, b. koloni isolat D4, c. koloni *Saccharomyces*

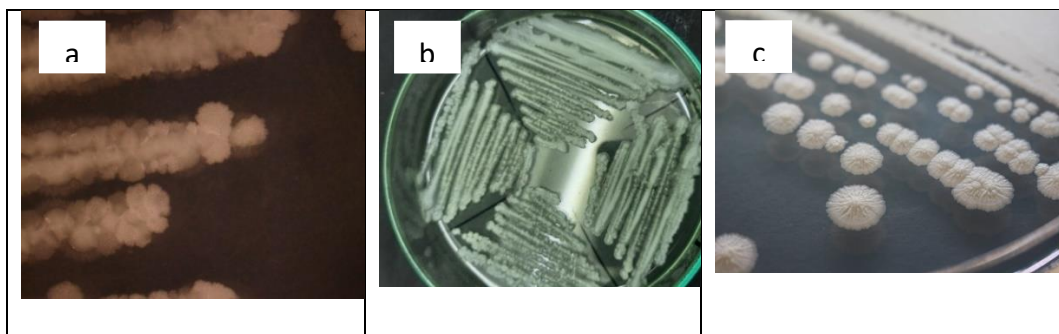
Isolat D4 diduga termasuk genus *Saccharomyces*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998), bahwa Genus *Saccharomyces* memiliki sel berbentuk globose (bulat), ovoid (oval) atau elongate (memanjang) berukuran  $(3.0-8.0) \times (5.0-10.0) \mu\text{m}$ , *butyrous* (kental), berwarna krem, permukaan halus, biasanya rata (*flat*), *raised* dan *opaque*. Pratiwi dan Akhdiya (2020) menambahkan bahwa Genus *Saccharomyces* memiliki karakteristik sel berbentuk bulat, elips atau silindris, reproduksi aseksual dengan pertunasan multilateral dan secara seksual dengan askospora (1–4 atau lebih per askus).

#### 4.1.5 Isolat Khamir D5

Hasil pengamatan morfologi sel khamir D5 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* monopolar dan memiliki ukuran  $(4,87-4,92) \times (6,4-7,91) \mu\text{m}$  (Gambar 4.9). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir D5 memiliki bentuk koloni bergerigi, tekstur kental mentega, berwarna putih krem, memiliki permukaan tidak halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi bergerigi (Gambar 4.10).



Gambar 4.9 a. sel isolat D5 perbesaran 400x, b. 1. sel induk, 2. sel anak, c. *Pichia kluyveri* (Kurtzman dan Fell, 1998)

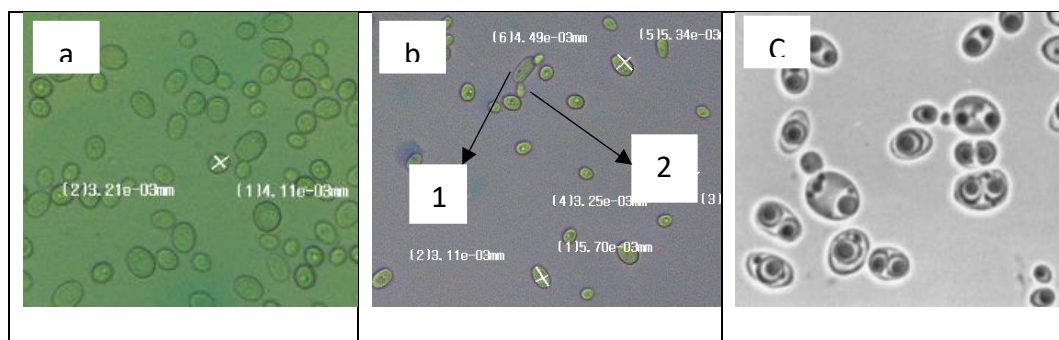


Gambar 4.10 koloni isolat D5 perbesaran 11x, b. koloni isolat D1, c. *Pichia kluyveri*

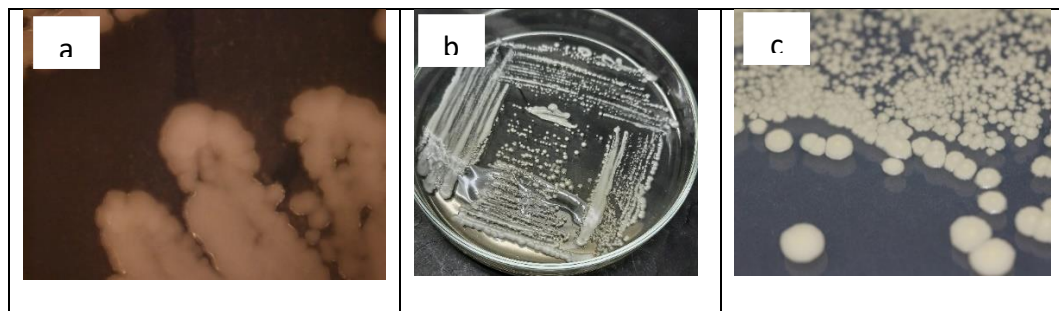
Isolat D5 diduga termasuk Genus *Pichia*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Kurtzman dan Fell (1998) bahwa Genus *Pichia* memiliki sel berbentuk bulat telur memanjang, berukuran  $(2.0-5.5) \times (4.0-11.0) \mu\text{m}$ , tunggal, berpasangan, atau berantai pendek. Pertumbuhan koloni kusam dengan kerutan halus, memiliki pseudohifa bercabang, tetapi menghasilkan beberapa blastokonidia. Hifa sejati tidak terbentuk. Koloni berwarna putih hampir seperti tepung, dan dengan garis halus dari pusat ke koloni tepian. Margin seluruhnya bergerigi halus. Pembentukan askospora dua sampai empat. Spora diproduksi di setiap askus, dan dilepaskan segera setelah pembentukan.

#### 4.1.6 Isolat Khamir K1

Hasil pengamatan morfologi sel khamir K1 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* monopolar dan memiliki ukuran (5,28-5,70 ) x (3,11-4,49)  $\mu\text{m}$  (Gambar 4.11). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir K1 memiliki bentuk koloni bulat tepi timbul, tekstur kental mentega, berwarna krem, memiliki permukaan halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi rata (Gambar 4.12)



Gambar 4.11 a. sel isolat K1 perbesaran 400x, b. 1. sel induk, 2. sel anak, c. *Pichia fluxuum* (Kurtzman dan Fell, 1998)

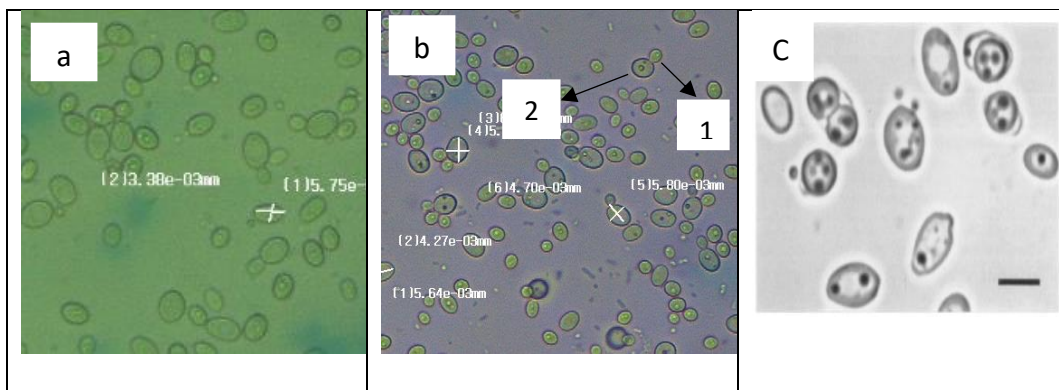


Gambar 4.12 a. koloni isolat K1 perbesaran 11x, b. koloni isolat K1, c. Koloni *Pichia fluxuum*

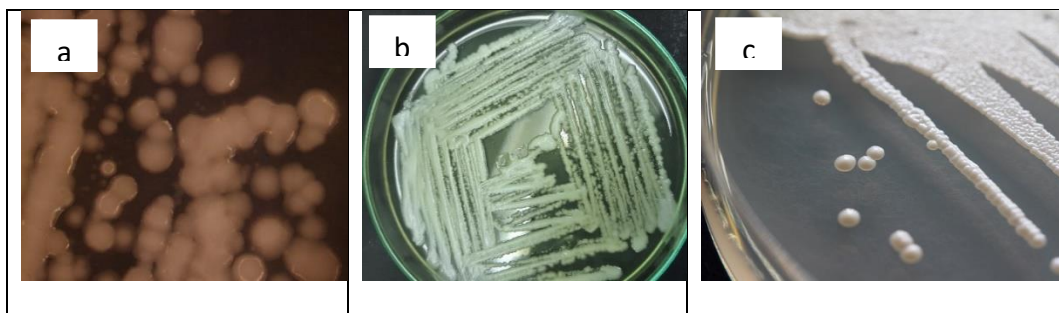
Isolat K1 diduga termasuk genus *Pichia*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998) bahwa genus *Pichia* memiliki sel berbentuk bulat telur (ovoid) atau memanjang (elongate), berukuran (2.0-6.1)x(3.5- 10.5)  $\mu\text{m}$ , tunggal atau berpasangan dan berwarna putih kekuningan.

#### 4.1.7 Isolat Khamir K2

Hasil pengamatan morfologi sel khamir K2 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* multilateral dan memiliki ukuran  $(4,27-5,74) \times (4,70-6,34)\mu\text{m}$  (Gambar 4.13). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir K2 memiliki bentuk koloni bulat tepi timbul, tekstur kental mentega, berwarna putih krem, memiliki permukaan halus dan kilau, elevasi timbul dan tepi rata (Gambar 4.14).



Gambar 4.13 a. sel isolat K2 perbesaran 400x, b. 1. sel induk, 2. sel anak, c. *Zygosaccharomyces bisporus* (Kurtzman dan Fell, 1998)



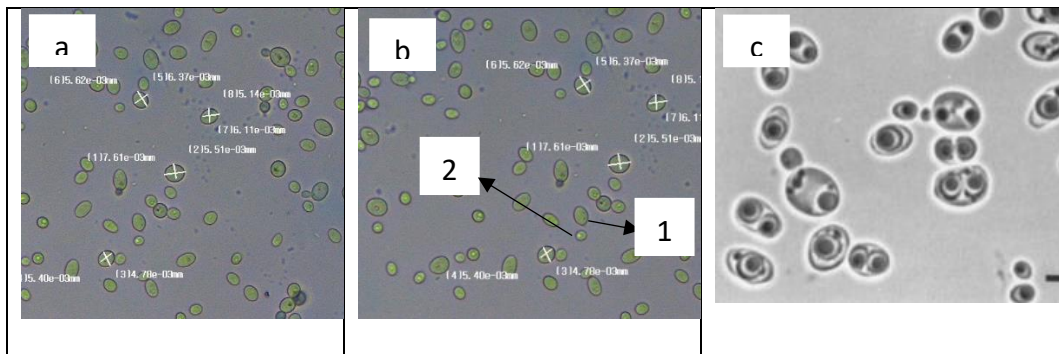
Gambar 4.14 Koloni isolat K2 perbesaran 11x, b. koloni isolat K2, c. Koloni *Zygosaccharomyces*

Isolat K2 diduga termasuk genus *Zygosaccharomyces*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998) bahwa genus *Zygosaccharomyces* memiliki sel berbentuk bulat hingga ellipsoidal, berukuran  $(2,3-5,2) \times (2,4-10,1)\mu\text{m}$ , tunggal atau

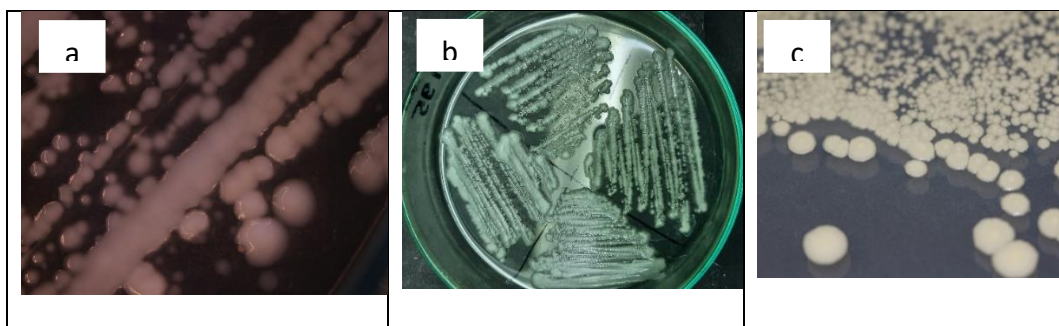
berpasangan. Pertumbuhannya *butyrous* (kental) dan berwarna putih. Tidak terdapat pseudohifa, permukaan berkilau, dan memiliki tekstur halus.

#### 4.1.8 Isolat Khamir K3

Hasil pengamatan morfologi sel khamir K3 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* monopolar dan memiliki ukuran  $(4,78-4,92) \times (6,40-7,91)\mu\text{m}$  (Gambar 4.15). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir K3 memiliki bentuk koloni bulat tepi serabut, tekstur kental mentega, berwarna putih krem, memiliki permukaan tidak halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi bergaris (Gambar 4.16).



Gambar 4.15 a. sel isolat K3 perbesaran 400x, b. 1. sel induk 2. sel anak, c. *Pichia fluxuum* (Kurtzman dan Fell, 1998)



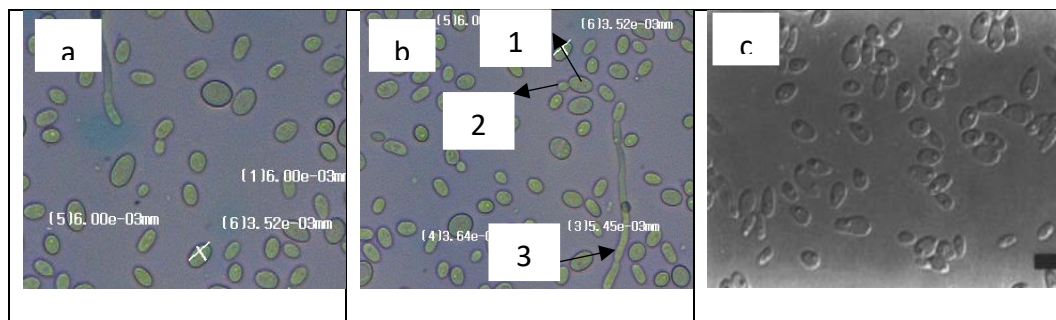
Gambar 4.16 a. koloni isolat K3 perbesaran 11x, b. koloni isolat K3, c. *Pichia*

Isolat K3 diduga termasuk genus *Pichia*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998) bahwa genus *Pichia* memiliki sel berbentuk lonjong hingga

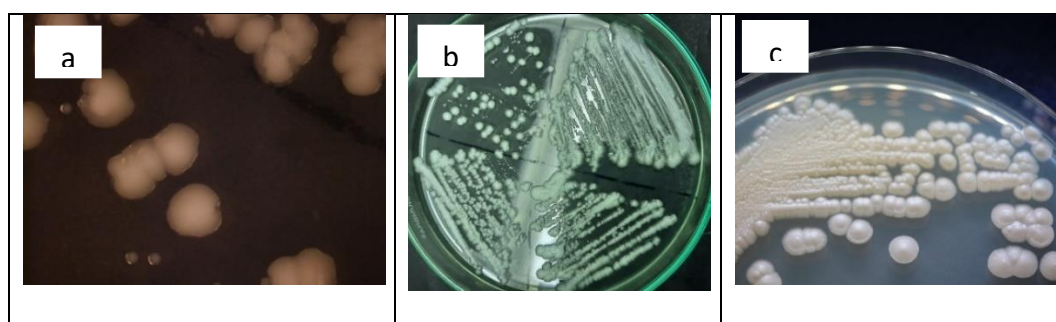
memanjang, berukuran  $(2.0-6.1) \times (3.5-10.5) \mu\text{m}$ , tunggal atau berpasangan. Koloni berwarna putih kekuningan.

#### 4.1.9 Isolat Khamir K4

Hasil pengamatan morfologi sel khamir K4 secara mikroskopis memiliki bentuk bulat elips, reproduksi vegetatif membentuk *budding* multilateral dan memiliki ukuran  $(4,78-5,62) \times (5,40-7,61) \mu\text{m}$  (Gambar 4.17). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir K4 memiliki bentuk koloni bulat tepi timbul, tekstur kental mentega, berwarna putih krem, memiliki permukaan halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi tidak rata (Gambar 4.18).



Gambar 4.17 a. sel isolat K4 perbesaran 400x, b. 1. sel induk, 2. sel anak, 3. Pseudohifa, c. *Candida rhagii*



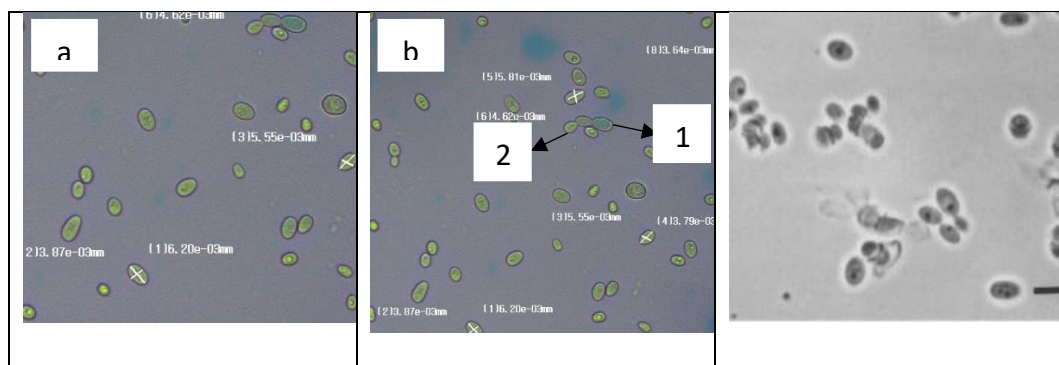
Gambar 4.18 a. koloni isolat K4 perbesaran 11x, b. koloni isolat K4, c. *Candida rhagii*

Isolat K4 diduga termasuk genus *Candida*. Hal ini sesuai dengan Kurtzman dan Fell (1998) bahwa sel berbentuk bulat telur (ovoidal), berukuran  $(2.0-5.0) \times (4.0-6.0) \mu\text{m}$ , tunggal atau berpasangan. Terdapat pseudohifa yang terdiri dari

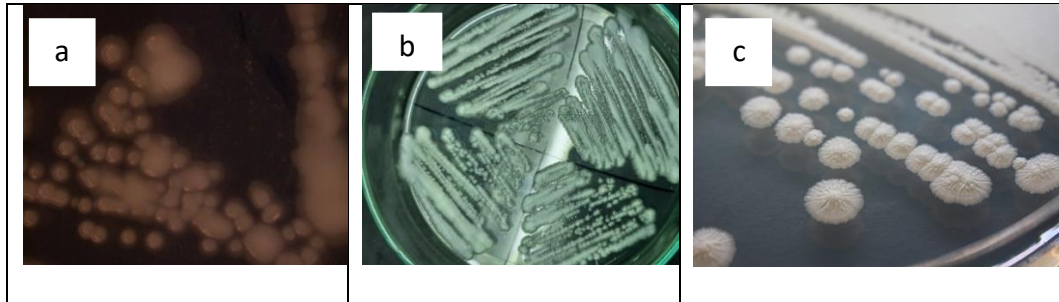
rantai bercabang dengan sel berbentuk silinder. Koloni berwarna putih dan margin berkerut. Kreger-van Rij (1987) menambahkan bahwa Genus *Candida* memiliki bentuk sel bervariasi dari bulat, oval, silindris hingga memanjang, jarang apikulat, triangular, atau bentuk botol dengan atau tanpa pseudohifa. Reproduksi aseksual dengan pertunasan multilateral. Genus *Candida* berwarna putih hingga krem.

#### 4.1.10 Isolat Khamir K5

Hasil pengamatan morfologi sel khamir K5 secara mikroskopis memiliki bentuk oval, reproduksi vegetatif membentuk *budding* multilateral dan memiliki ukuran (Gambar 4.19). Hasil pengamatan morfologi secara makroskopis isolat khamir K5 memiliki bentuk koloni bulat tepi serabut, tekstur kental mentega, berwarna putih krem, memiliki permukaan tidak halus dan kusam, elevasi timbul dan tepi bergaris (Gambar 4.20).



Gambar 4.19 a. sel isolat K5 perbesaran 400x, b. 1. sel induk, 2.sel anak, c. *Pichia Kluyveri* (Kurtzman dan Fell, 1998)



Gambar 4.20 a. Koloni isolat K5 perbesaran 11x, b.koloni isolat K5, c. *Pichia kluyveri*

Isolat K5 diduga termasuk genus *Pichia*. Hal ini sesuai dengan Berlowka *et al.* (2016) bahwa Genus *Pichia* memiliki bentuk sel bulat, elips atau memanjang, membentuk pseudohifa namun sangat jarang membentuk hifa sejati. Reproduksi aseksual dengan pertunasan multilateral dan secara seksual dengan askospora (1–4 per askus). Pada beberapa spesies mungkin membentuk artrospora.

#### 4.2 Uji Fermentasi Karbohidrat

Isolat yang didapatkan selanjutnya dilakukan uji fermentasi karbohidrat menggunakan beberapa sumber gula diantaranya glukosa, sukrosa dan fruktosa. Hasil uji fermentasi karbohidrat yang diamati meliputi produksi gelembung pada tabung durham, perubahan warna media dan perubahan pH. Hasil produksi gelembung dari uji fermentasi karbohidrat ditunjukkan pada tabel 4.3.

**Tabel 4.3 Uji Fermentasi Karbohidrat**

No.	Kode Isolat	Uji Fermentasi Karbohidrat		
		Glukosa	Sukrosa	Fruktosa
1.	<b>D1</b>	+	++	+
2.	<b>D2</b>	++	+	+
3.	<b>D3</b>	++	+	+
4.	<b>D4</b>	+++	+	++
5.	<b>D5</b>	+	+++	++
6.	<b>K1</b>	+	+	+
7.	<b>K2</b>	++	+++	++
8.	<b>K3</b>	+	+	+
9.	<b>K4</b>	+	++	+
10.	<b>K5</b>	+	++	++

Keterangan :

- + : terdapat gelembung gas pada tabung durham dalam jumlah sedikit
  - ++ : terdapat gelembung gas pada tabung durham dalam jumlah cukup
  - +++ : terdapat gelembung gas pada tabung durham dalam jumlah banyak
- (Kurtzman dan Fell, 2011)

Hasil pengamatan uji karbohidrat pada tabel 4.3 menunjukkan bahwa semua isolat mampu memfermentasi ketiga jenis gula yaitu glukosa, sukrosa dan fruktosa. Gelembung yang dihasilkan dalam tabung durham menunjukkan bahwa proses fermentasi menghasilkan karbon dioksida. Isolat D4 merupakan isolat paling baik dalam fermentasi glukosa karena menghasilkan gelembung paling banyak dari isolat yang lain. Isolat D2, D3 dan K2 menghasilkan gelembung dalam jumlah cukup. Isolat D5 dan K2 merupakan isolat paling baik dalam fermentasi sukrosa karena menghasilkan gelembung paling banyak kemudian D1, K4 dan K5 menghasilkan gelembung dalam jumlah cukup. D4, D5 K2 dan K5 menghasilkan gelembung dalam jumlah cukup pada fermentasi fruktosa.

Menurut Talaro (2012) proses fermentasi gula menjadi etanol dan CO<sub>2</sub> menyebabkan munculnya gas dalam tabung durham. Bhowmik (2011) menyatakan bahwa gelembung muncul di tabung durham jika khamir dapat difermentasi karbohidrat tertentu, seperti glukosa dan sukrosa. Karbohidrat tidak dapat menghasilkan gas jika tidak terfermentasi. Sementara produksi asam hanya dianggap sebagai kemampuan untuk menyerap karbohidrat. Menurut Giri *et al.* (2015), produksi gas dalam tabung dianggap sebagai hasil yang menguntungkan

dalam memfementasi gula. Jika gas dihasilkan pada tabung durham selama 7 hari, reaksi tersebut dianggap sangat positif (Kurtzman dan Fell, 2011).

### 4.3 Uji Toleransi Etanol

Hasil uji toleransi etanol dengan konsentrasi 10%, 13% dan 15% adalah kerapatan sel khamir dan kekeruhan pada media YPGB. Kerapatan sel khamir diukur menggunakan spektrofotometer Uv-vis dengan panjang gelombang 600 nm sebelum dan sesudah inkubasi untuk mengetahui kenaikan atau turunnya nilai kerapatan sel. Hasil kerapatan sel dari uji toleransi etanol ditunjukkan pada tabel 4.4.

**Tabel 4.4 Uji Toleransi Etanol**

Nama Isolat	10%	13%	15%
	Sesudah 72 jam	Sebelum 72 jam	Sesudah 72 jam
<b>D1</b>	0.414	0.404	0.515
<b>D2</b>	0.587	0.8	-0.628
<b>D3</b>	0.587	-0.018	-0.072
<b>D4</b>	0.307	0.56	0.001
<b>D5</b>	0.461	-0.013	-0.026
<b>K1</b>	0.265	0.007	-0.44
<b>K2</b>	1.205	0.708	0.347
<b>K3</b>	0.574	0.712	0.724
<b>K4</b>	0.834	0.439	0.719
<b>K5</b>	0.116	0.005	0.012

Hasil pengukuran kerapatan sel menggunakan spektrofotometri UV Vis dengan panjang gelombang 600 nm menunjukkan bahwa semua isolat toleran terhadap etanol dengan kadar 10% ditunjukkan dengan naiknya nilai absorbansi antara sebelum 24 jam dan sesudah inkubasi 72 jam. Semua isolat toleransi terhadap konsentrasi etanol 13% kecuali isolat D3 dan D5 yang mengalami penurunan nilai absorbansi. Isolat D3, D5, K1 tidak toleran terhadap konsentrasi etanol 15%.

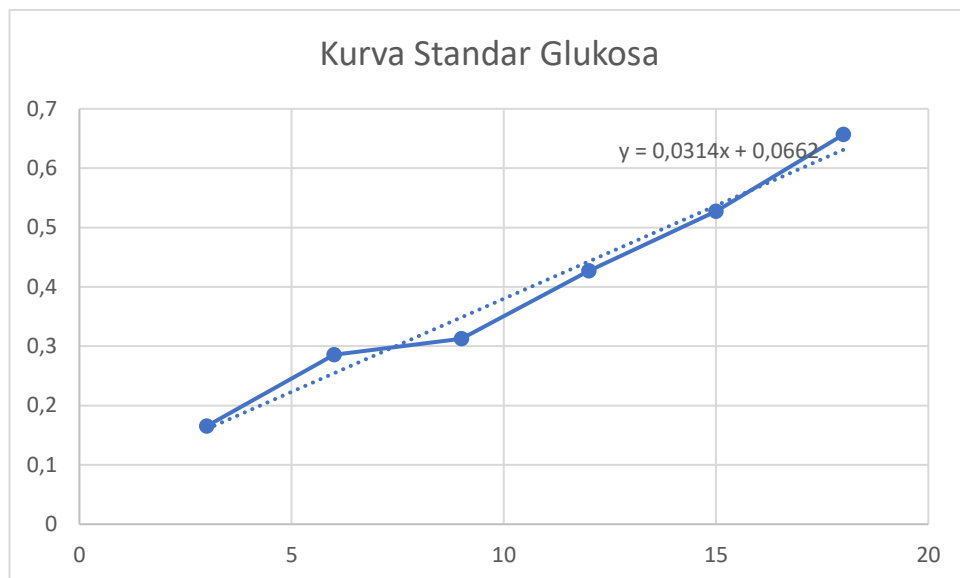
Menurut Gomar-Alba *et al.* (2015) spesies khamir mampu tumbuh dalam konsentrasi etanol yang berbeda karena kemampuan dinding selnya untuk menahan osmotik stres (plasmolisis). Toleransi terhadap etanol adalah karakteristik yang penting dari mikroorganisme yang berperan dalam produksi etanol karena proses fermentasi akan terhambat jika mikroorganisme tidak dapat mentolerir etanol (Thmmasttirong *et al.*, 2013).

#### **4.4 Pengaruh Penambahan Urea dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Etanol**

Khamir hasil isolasi selanjutnya dilakukan seleksi untuk pemilihan menjadi starter dalam proses Fermentasi. Isolat yang dipilih untuk fermentasi adalah isolat K2 karena memiliki kemampuan fermentasi glukosa, sukrosa dan fruktosa dengan ditandai adanya gelembung pada tabung durham serta kemampuan toleran terhadap etanol dengan konsentrasi 10%, 13% dan 15%. Konsentrasi khamir yang digunakan sebanyak 2 gram dari hasil sentrifugasi.

Bahan baku yang dijadikan sebagai substart pembuatan bioetanol adalah kulit buah nanas. Kulit buah nanas dilakukan *pretreatment* secara fisik dengan cara pengeringan dan penggilingan menjadi serbuk. Serbuk kulit buah nanas selanjutnya dilakukan hidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim selulase komersial. Hidrolisis dilakukan karena kandungan selulosa pada kulit buah nanas perlu dipecah menjadi glukosa untuk difermentasi oleh khamir.

Hasil hidrolisis diukur kadar gula dengan mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV Vis. Hasil absorbansi dihitung menggunakan kurva standar glukosa pada gambar 4.21 untuk mendapatkan kadar gula.



**Gambar 4.21 Kurva standar glukosa**

Rata-rata hasil gula reduksi dari kulit nanas setelah dilakukan hidrolisis menggunakan enzim selulase sebesar 30,28% (Tabel 4.5). Hasil hidrolisis selanjutnya digunakan sebagai substrat pembuatan bioetanol dengan menggunakan inokulum yang sudah dibuat. Proses fermentasi secara anaerob menghasilkan etanol dan CO<sub>2</sub>.

**Tabel. 4.5 Kadar gula bahan baku**

Perlakuan	ulangan			Rata-rata
	1	2	3	
Bahan baku	30,4585	29,229	31,16	30,2825

Pengukuran kadar gula dilakukan untuk mengetahui kadar gula yang digunakan oleh khamir selama proses fermentasi. Kemampuan khamir dalam menggunakan kadar gula yang terdapat dalam bahan baku mempengaruhi hasil dari etanol yang didapatkan. Proses hidrolisis dengan menggunakan enzim selulase membantu meningkatkan kadar gula dalam bahan baku.

Enzim selulase terdiri dari tiga enzim yaitu  $\beta$ -glukosidase, endo-1,4- $\beta$ -D-glukanase (endoglukanase) dan exo-1,4-  $\beta$ -D-glukanase (eksoglukanase). Ketiga

enzim ini terlibat dalam hidrolisis selulosa dengan aksi sinergis untuk hidrolisis selulosa secara efektif (Patel *et al.*, 2019).

Enzim selulase menghidrolisis biomassa menjadi gula sederhana, baik pentosa maupun heksosa, yang kemudian difermentasi menjadi bahan bakar salah satunya adalah bioetanol. Enzim selulase berperan dalam biokonversi biomassa lignoselulosa terbarukan. Degradasi biomassa tersebut terdiri dari 3 langkah antara lain *pretreatment* biomassa, sakarifikasi yang melibatkan enzim, dan fermentasi (Menendez *et al.*, 2015).

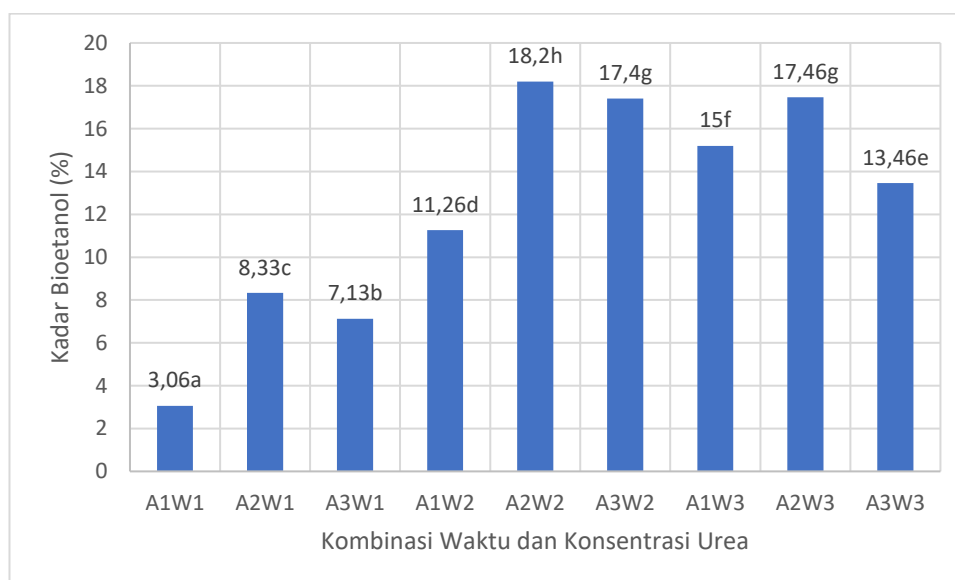
Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya penambahan nutrisi dan lama fermentasi. Nutrisi yang ditambahkan dalam proses fermentasi dalam penelitian ini adalah urea. Menurut Fitria & Lindasari (2020) urea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) mengandung 46% nitrogen. Urea akan terhidrolisis dalam air menjadi ammonium dan karbondioksida lalu ammonium diambil unsur nitrogennya oleh khamir untuk pertumbuhan dan meningkatkan aktifitas khamir. Nitrogen menjadi salah satu sumber nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme dalam pembentukan asam nukleat dan asam amino (Rahmah, 2015).

Selain penambahan nutrisi, durasi fermentasi memengaruhi jumlah etanol yang dihasilkan. Waktu fermentasi memengaruhi hasil bioetanol yang optimal. Semakin lama waktu yang dibutuhkan untuk fermentasi, semakin banyak bioetanol yang dihasilkan. Konsentrasi etanol yang dihasilkan akan turun setelah mencapai waktu yang optimal (Kurniati dkk., 2021).

Kadar etanol dari hasil fermentasi ditentukan berdasarkan massa jenis etanol dengan menggunakan piknometer. Etanol hasil fermentasi di distilasi sebelum di ukur kadarnya. Etanol hasil destilasi ditimbang menggunakan piknometer pada

suhu ruang (27°C). Hasil penimbangan etanol selanjutnya dihitung menggunakan rumus berat jenis. Penetapan kadar etanol berdasarkan tabel konversi berat jenis dan kadar etanol *International Organization of Legal Metrology* (OIML) Bhavan & Marg.

Hasil analisis varian one way Anova menunjukkan nilai signifikansi (0.00) yang menunjukkan adanya pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi terhadap kadar etanol. Hasil Anova selanjutnya dilanjutkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) didapatkan hasil pada gambar 4.22.



**Gambar 4.22 Hasil kadar Etanol**

Rata-rata kadar etanol tertinggi yang didapatkan adalah penambahan urea 2% dengan lama fermentasi selama 48 jam yaitu sebesar 18,2 %. Kadar etanol terendah yaitu 3,06 % pada penambahan urea 0% dan lama fermentasi 24 jam. Penelitian yang serupa Putri (2018) mendapatkan kadar etanol antara 15 -47%. Hal ini dapat disebabkan oleh fakta bahwa proses pemurnian bioetanol dalam penelitian ini masih menggunakan satu tahap distilasi sederhana. Selain itu, untuk

mendapatkan etanol murni dengan kadar lebih dari 95%, diperlukan dua tahap, yaitu destilasi dan dehidrasi etanol. Campuran air dan etanol membentuk campuran azerotrop (Erawati, 2008).

Penambahan urea selama proses fermentasi meningkatkan kadar etanol yang diperoleh. Kadar etanol yang diperoleh pada 72 jam mengalami penurunan. Hal ini dapat disebabkan karena kemampuan sel khamir yang menurun dan akumulasi konsentrasi urea yang tinggi dalam substrat menyebabkan toksik bagi khamir. Menurut Gafiera dkk., (2019) penambahan urea yang berlebih dapat menyebabkan denaturasi protein sel khamir atau terpecahnya ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, ikatan garam dan terbukanya lipatan molekul protein. Penggunaan urea yang berlebih akan membentuk  $\text{NH}_3\text{-N}$  yang bersifat racun dan dapat menghambat pertumbuhan khamir sehingga konsentrasi etanol yang dihasilkan juga semakin menurun. Wardani dan Agustini (2017) menambahkan bahwa unsur nitrogen berperan penting dalam penyusunan asam nukleat, asam amino dan enzim.

Semakin lama waktu fermentasi, kadar etanol semakin meningkat. Namun, pada waktu fermentasi 72 jam, kadar etanol turun. Menurut Arif *et al.* (2018), konsumsi gula yang tinggi, pertumbuhan khamir, dan lama fermentasi berkontribusi pada kadar bioetanol yang rendah. Produksi bioetanol meningkat dengan waktu fermentasi, tetapi produksi cenderung menurun ketika kondisi ideal tercapai. Kurniati *et al.* (2021) menyatakan bahwa lamanya proses fermentasi menghasilkan lebih banyak bioetanol. Dalam proses fermentasi memiliki waktu optimum, sehingga setelah mencapai waktu optimum konsentrasi etanol yang dihasilkan akan mengalami penurunan karena mikroba menuju pada fase kematian.

Alkohol dengan kadar di bawah 25% dapat digunakan untuk kompres (menurunkan suhu badan), 50% dapat mencegah biang keringat (dalam *lotion astringent*), dan 70% dapat digunakan sebagai desinfektan, dioleskan pada kulit sebelum diinjeksi untuk mencegah infeksi (Zuhri dan Dona, 2021). Dalam dunia medis, alkohol memiliki manfaat. Alkohol dapat merangsang keaktifan otak, menurunkan kadar gula darah secara konsisten, dan terbukti sebagai antiseptik yang kuat dalam membunuh bakteri. Etanol adalah salah satu jenis alkohol yang digunakan dalam bidang medis untuk membuat desinfektan dan antiseptik (Lukmanudin, 2015).

Allah berfirman dalam QS. An Nahl [16] : 97 sebagai berikut :

مَنْ عَمِلَ صَالِحًا مِّنْ ذَكَرٍ أَوْ أُنْثَىٰ وَهُوَ مُؤْمِنٌ فَلَنُحْيِيَنَّهٗ حَيٰوةً طَيِّبَةً وَلَنَجْزِيَنَّهُمْ أَجْرَهُمْ بِأَحْسَنِ  
مَا كَانُوا يَعْمَلُونَ ٩٧

Artinya : “*Siapa yang mengerjakan kebajikan, baik laki-laki maupun perempuan, sedangkan dia seorang mukmin, sungguh, Kami pasti akan berikan kepadanya kehidupan yang baik. dan akan Kami beri balasan dengan pahala yang lebih baik daripada apa yang selalu mereka kerjakan.*”

Menurut Tafsir Al-Misbah ayat tersebut menjelaskan Barang siapa yang mengerjakan amal saleh, apapun jenis kelaminnya, baik laki-laki maupun perempuan, sedang dia adalah mukmin yakni amal yang dilakukannya lahir atas dorongan keimanan yang shahih, maka sesungguhnya pasti akan kami berikan kepadanya masing-masing kehidupan yang baik di dunia ini dan sesungguhnya akan kami berikan balasan kepada mereka semua di dunia dan di akherat dengan pahala yang lebih baik dan berlipat ganda dari apa yang telah mereka kerjakan.

Surah An Nahl ayat 97 menjelaskan bahwa balasan atau imbalan bagi orang yang beramal saleh adalah imbalan dunia dan imbalan akherat. Penelitian yang telah dilakukan mengenai pemanfaatan limbah kulit buah menjadi etanol yang memiliki banyak manfaat dapat menjadi amal saleh. Ilmu yang dipelajari dan diaplikasikan dalam kehidupan sehingga dapat bermanfaat bagi banyak orang dapat menjadi amal yang pahalanya akan selalu mengalir baik di dunia maupun di akhirat.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Genus khamir yang didapatkan dari hasil isolasi buah nanas adalah *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Zygosaccharomyces* sp., dan *Pichia* sp.
2. Terdapat pengaruh penambahan urea dan lama fermentasi terhadap kadar etanol. Kadar etanol tertinggi yang didapatkan adalah dengan penambahan urea 2% dan lama fermentasi selama 48 jam. Kadar etanol terendah yang didapatkan adalah penambahan urea 0% dan lama fermentasi 24 jam.

#### **5.2 Saran**

Saran dari penelitian ini adalah perlu ada peningkatan konsentrasi urea yang ditambahkan dan lama waktu fermentasi perlu ditingkatkan. Selain itu, konsentrasi khamir yang digunakan perlu ditingkatkan agar kadar bioetanol yang dihasilkan lebih optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdulla R, N H Ahmad, M K Sabullah and J A Gansau. 2022. Characterization of wild type yeast isolated from Sabah soil for environmental friendly biofuel production. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 1-9.
- Adabe KE, Hind S, Maïga A. 2016. Production and processing of pineapple. PRO-AGRO Collection.
- Akbar, Galih Pertiwi, Endang Kusdiyantini & Wijanarka. 2019. Isolasi dan Karakterisasi secara Morfologi dan Biokimia Khamir dari Limbah Kulit Nanas Madu (*Ananas comosus* L.) Untuk Produksi Bioetanol. *Berkala Bioteknologi*. 2 (2):1-11.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Walter P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Fifth ed. New York: Garland Science.
- Ali, M. N. & Khan, M. M., 2014. Screening, Identification and Characterization of Alcohol Tolerant Potential Bioethanol Producing Yeast. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. 2(1):316-324.
- Altendorf S. 2017. Global prospects for major tropical fruits: shortterm outlook, challenges and opportunities in a vibrant global marketplace.
- Anggraini, Dian Puspita. 2018. Pengaruh varietas nanas dan variasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* pada fermentasi alkohol. *Prosiding Seminar Nasional IV*. Universitas Muhammadiyah Malang.
- Anggrayeni, Yesti Tri, Wijanarka & Endang Kusdiyantini. 2019. Isolasi dan identifikasi morfologi serta biokimia khamir hasil isolasi dari buah tomat (*Lycopersicon esculentum*) yang berpotensi menghasilkan bioetanol. *Bioma*. 21 (1):16-24.
- Arif, A., Budiyanto, A., Diyono, W. & Richana, N. 2018. Optimasi Waktu Fermentasi Produksi Bioetanol dari Dedak Sorghum Manis (*Sorghum Bicolor* L) melalui Proses Enzimatis. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*. 14(2):67-78.
- Arif, Abdullah Bin, Wahyu Diyono, Agus Budiyanto & Nur Richana. 2016. Analisis rancangan faktorial tiga faktor untuk optimalisasi produksi bioetanol dari molases tebu. *Informatika Pertanian*. 25 (1):145 – 154.
- Asril, Muhammad, Marulam MT Simarmata, Silvia Permata Sari, Indarwati, Ryan Budi Setiawan Arsi, Afriansyah, Junairiah. 2022. *Keanekaragaman Hayati*. Medan : Yayasan Kita Menulis.
- Babu, P. Ramesh, M. Mastan, K. Charan & Virendra Vaishnav. 2019. Optimization of Ethanol Production from Pineapple Peel by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*. 4 (5):355-358.
- Bahri, Syamsul, Amri Aji, & Fadlina Yani. 2018. Pembuatan Bioetanol dari Kulit Pisang Kepok dengan Cara Fermentasi menggunakan Ragi Roti. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal* 7 (2):85-100.
- Bai, F.W., W.A. Anderson, M. Moo-Young. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*. 26 (1):89-105.
- Barnett, J.A., R.W. Payne & D. Yarrow, 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge

- Bartholomew D.P, R.E. Paull & K.G. Rohrbach. 2003. *The pineapple : botany, production, and uses*. New York : CAB International.
- Batutah, M. Arif. 2017. Distilasi Bertingkat Bioetanol dari Buah Maja (*Aegle marmelos* L.). *Jurnal IPTEK*. 21 (2):
- Bennett, Richard J. and B. Gillian Turgeon. 2016. *Fungal Sex: The Ascomycota. Eukaryotes: Fungi and Parasitology*. 4 (5).
- Bhowmik, G. 2011. *Ana Techniqs in Biotechnology*. Tata McGraw Hill Education Private Limited, New Delhi : 92 – 93.
- Boekhout T, Fonseca A, Sampaio JP, Bandoni RJ, Fell JW, Kwon-Chung KJ. 2011 Discussion of teleomorphic and anamorphic basidiomycetous yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW– *The yeasts: ataxonomic study* 5th ed. Elsevier, B. V. London, p. 1340.
- Boekhout, T. & V. Robert. 2003. *Yeasts in Food*. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing Limited.
- Bohulu, Eunice, Nothando Ntombela, Michelle Low, David Ming, Kevin Harding. 2019. Drinking seawater: Investigations into desalination. *Procedia Manufacturing*. 35:743–748.
- Chasanah N, A Meryandini & T C Sunarti. 2020. Selection and characterization yeast potential from pineapple for bioetanol production using some sugar sources. *Series: Earth and Environmental Science*. 457:1-11.
- Choonut A, Saejong M, Sangkharak K. 2014. The production of ethanol and hydrogen from pineapple peel by *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterobacter aerogenes*. *Energy Procedia*. 52:242– 249.
- Delly, J., Zenius, A. & Hasbi, M. 2016. Analisa Bioetanol Dari Nira Aren Menggunakan Destilasi Fraksinasi Ganda Sebagai Bahan Bakar, *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Teknik Mesin*. 2(2):1–7.
- Dyah. 2011. Pembuatan Bioetanol dari Kulit Pisang. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”, Jurusan Teknik Kimia, FTI UPN”Veteran”*. Yogyakarta.
- Edward J. Dompeipen dan Riardi P. Dewa. 2015. Pengaruh Waktu dan Ph Fermentasi dalam Produksi Bioetanol dari Rumput Laut *Eucheuma cotTonii* Menggunakan Asosiasi Mikroba (*Sacchromyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* dan *Zymomonas mobilis*).
- Fauziah, Nada, Amir Musadad, & Diar Herawati Effendi. 2020. Perbandingan Metode Produksi Bioetanol dari Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Prosiding Farmasi*. 6 (2):608-615.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A & Sampaio JP. 2001. Basidiomycetous yeasts. *The Mycota VII, Part B. Systematics and Evolution* (McLaughlin DJ, McLaughlin EG & Lemke PA, eds), pp. 1–36. Springer-Verlag, Berlin.
- Gandjar, Indrawati & Wellyzar Sjamsuridzal. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Giri, S., Kindo, M. J. 2015. Evaluation Of Five Phenotypic Tests In The Identification Of Candida Species. *National Journal Of Laboratory Medicine* 4(4): 13-18.
- Gomar-Alba, M.A., Angeles-Morcillo, P., Mercecelli ,D.O.(2015) Response of cells to high glucose involves molecular and physiological difference when compared to other osmostress conditions *FEMS Yeast Res* 15(5):fov039.

- Hemalatha, R. & S. Anbuselvi. 2013. Physicochemical constituents of pineapple pulp and waste. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5(2):240-242.
- Hermiati, Euis, Maulida Oktaviani, Riksfardini Annisa Ermawar, Raden Permana Budi Laksana, Lutfi Nia Kholida, Ahmad Thontowi, Siti Mardiana, & Takashi Watanabe. 2020. Optimization of Xylose Production from Sugarcane Trash by Microwave-Maleic Acid Hydrolysis. *Reaktor*. 20(2):81-88.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: x.
- Husniati, K. 2010. Pengaruh Media Tanam Dan Konsentrasi Auksin Terhadap Pertumbuhan Stek Basal Daun Mahkota Tanaman Nenas (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Queen. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Istianah, Nur. 2017. Evaporasi multi-tahap menggunakan falling film evaporator (ffe) untuk meningkatkan efisiensi produk konsentrat nanas madu. *Seminar Nasional & Teknologi Fakultas Teknik Universitas Muhammadiyah Jakarta*. 8:1-5.
- Julaeha, Eha, Sarina Rustiyaty, Novi Nurmaliyah Fajri, Fadhilah Ramdlani, Reres Tantra. 2016. Pemanfaatan Tepung Gadung (*Dioscorea Hispida* Dennst.) Pada Produksi Amilase Menggunakan *Bacillus* Sp. *Fortech*. 1 (1) : 45-52.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi, biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xi.
- Khairani, R., 2007. *Tanaman Jagung Sebagai bahan Bio fuel*. Program Studi Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Indonesia.
- Komariah, Leily Nurul, A. F. Ramdja, & Nicky Leonard. 2009. Tinjauan teoritis perancangan kolom distilasi untuk pra-rencana pabrik skala industri. *Jurnal Teknik Kimia*. 4 (16):19-27.
- Kurniati, Yuni, Iis Elfy Khasanah, & Kurniawati Firdaus. 2021. Kajian Pembuatan Bioetanol dari Limbah Kulit Nanas (*Ananas comosus*. L). *Jurnal Teknik Kimia USU*. 10 (2):95-101.
- Kurtzman, C.P., and Fell. 2011. *The Yeast A Taxonomy Study*. Biodiversity and Ecophysiology of Yeast. Springer-verlag, Berlin.
- Kustiyawati, Maria Erna. 2018. *Saccharomyces cerevisiae : Metabolit dan Agensia Modifikasi Pangan*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Malakar, Santanu, Sanjib Kr Paul, & K.R. Jolvis Pou. 2020. Biotechnological interventions in beverage production. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. 1-37.
- Marjenah\*, Wawan Kustiawan, Ida Nurhifitiani, Keren Hapukh Morina Sembiring dan Retno Precillya Ediyono. 2017. Pemanfaatan Limbah Kulit Buah-Buahan Sebagai Bahan Baku Pembuatan Pupuk Organik Cair. *Jurnal Hutan Tropis*. 1(2): 120-127.
- Menendez, E.; Paula, G.; Rivas, R. Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioeng*. 2015, 2, 163–182.
- Naito, Yuka, Masahiko Okai, Masami Ishida, Masachika Takashio, Naoto Urano. 2019. Bioethanol Production from Molasses by Yeasts with Stress-Tolerance Isolated from Aquatic Environments in Japan. *Advances in Microbiology*. 9 : 1000-1011.
- Nasir, Armanul, Shafkat Shamim Rahman, Md. Mahboob Hossain, & Naiyyum Choudhury. 2017. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* from pineapple


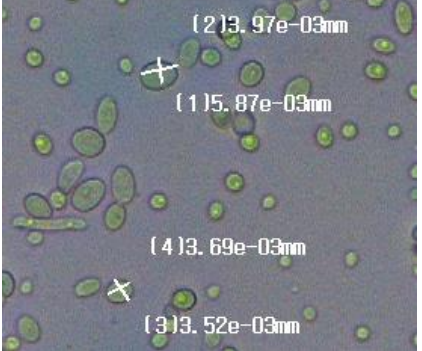
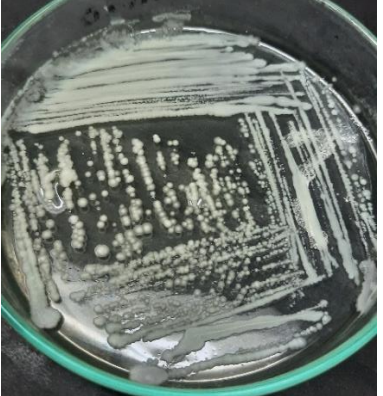
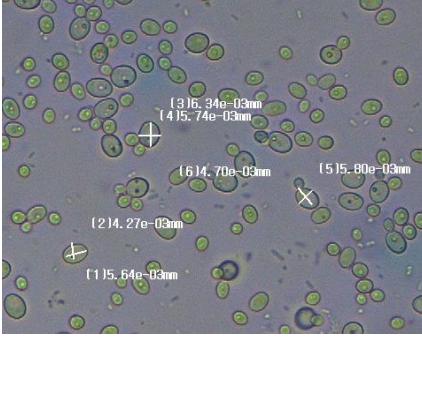

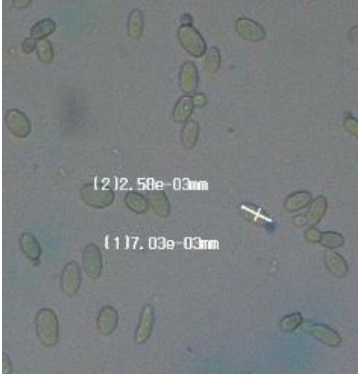
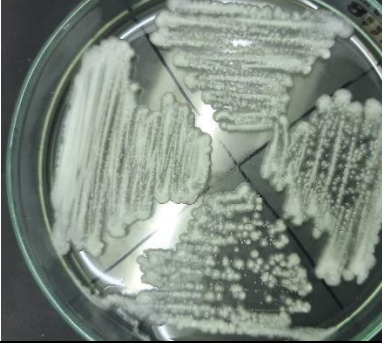
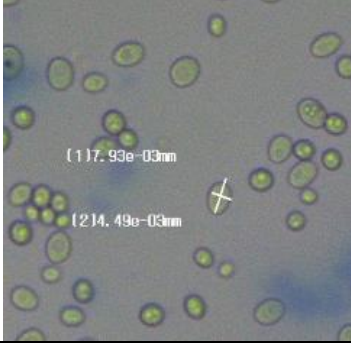
- and orange and study of metal's effectiveness on ethanol production. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 7 (1):76–91.
- Naufal, Muhammad & Warmadewanthi. 2015. Penambahan nitrogen pada produksi bioetanol dengan metode *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF). *Jurnal Purifikasi*. 15 (1):42-52.
- Nulhakim, L., B. Anggo, R. R. Febriana, H.Lukmana, F Erriana, A. D. Pratiwi & P. N. Azizah. 2019. Pembuatan bioetanol dari kulit nanas oleh *Saccharomyces cerevisiae* terimobilisasi dalam butiran alginat. Seminar Nasional AVoER XI Palembang, Fakultas Teknik Universitas Sriwijaya.
- Nutaratat, Pumin, Wanatchaporn Boontham & Pannida Khunnamwong. 2022. A novel yeast genus and two novel species isolated from pineapple leaves in Thailand: *Savitrella phatthalungensis* gen. nov., sp. nov. and *Goffeauzyma siamensis* sp. nov. *Journal of Fungi*. 8 (118):1-15.
- Oktavia, Ferys Ika, Bambang Dwi Argo, Musthofa Lutfi. 2014. Hidrolisis Enzimatik Ampas Tebu (Bagasse) Memanfaatkan Enzim Selulase dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* Sebagai Katalisator dengan Pretreatment Microwave. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*. 2 (3) : 256-262.
- Oswaldo, Z., S., Panca, P., S., & Faizal, M. 2012. Pengaruh Konsentrasi Asam dan Waktu pada Proses Hidrolisis dan Fermentasi Pembuatan Bioetanol dari Alang-Alang. Teknik Kimia, Universitas Sriwijaya, Palembang.
- Padoli. 2016. Mikrobiologi dan Parasitologi Keperawatan. Modul Bahan Ajar Cetak Keperawatan. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Pangaribuan, Romauli N., Gloria A. Tambunan , Merry M. Martgrita , & Adelina Manurung. 2021. Kajian Pustaka: Potensi Kulit Buah Untuk Menghasilkan Bioetanol Dengan Mengkaji Kondisi, Substrat, Dan Metode Fermentasi. 1 (1):1-14.
- Patel, A.K.; Singhanian, R.R.; Sim, S.J.; Pandey, A. 2019. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 279 : 385–392.
- Prihadana R.2007. *Bioetanol ubi kayu bahan bakar Masa depan*. Jakarta : Agromedia.
- Putri, R.D. 2018. Pembuatan Bioetanol Dari Jerami Nangka Dengan Metode Fermentasi Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae*. *Jurnal Integrasi Proses*. 7(1):32–38.
- Rahmah, Y. S. (2015). Fermentasi Nira Nipah Menjadi Bioetanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan Penambahan Urea Sebagai Sumber Nitrogen. *JOM FTEKNIK*. 2 (2) : 1 - 5.
- Rahmah, Y., & Bahri, S. 2015. Fermentasi Nira Nipah Menjadi Bioetanol Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae* dengan Penambahan Urea Sebagai Sumber Nitrogen. *Skripsi*, Riau University.
- Rama, P., 2008, *Bioetanol Ubi Kayu Bahan Bakar Masa Depan*, Penerbit Agro, Jakarta.
- Rodrigues, Fernando, Paula Ludovico & Cecília Leão. 2006. *Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism*. Germany : Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

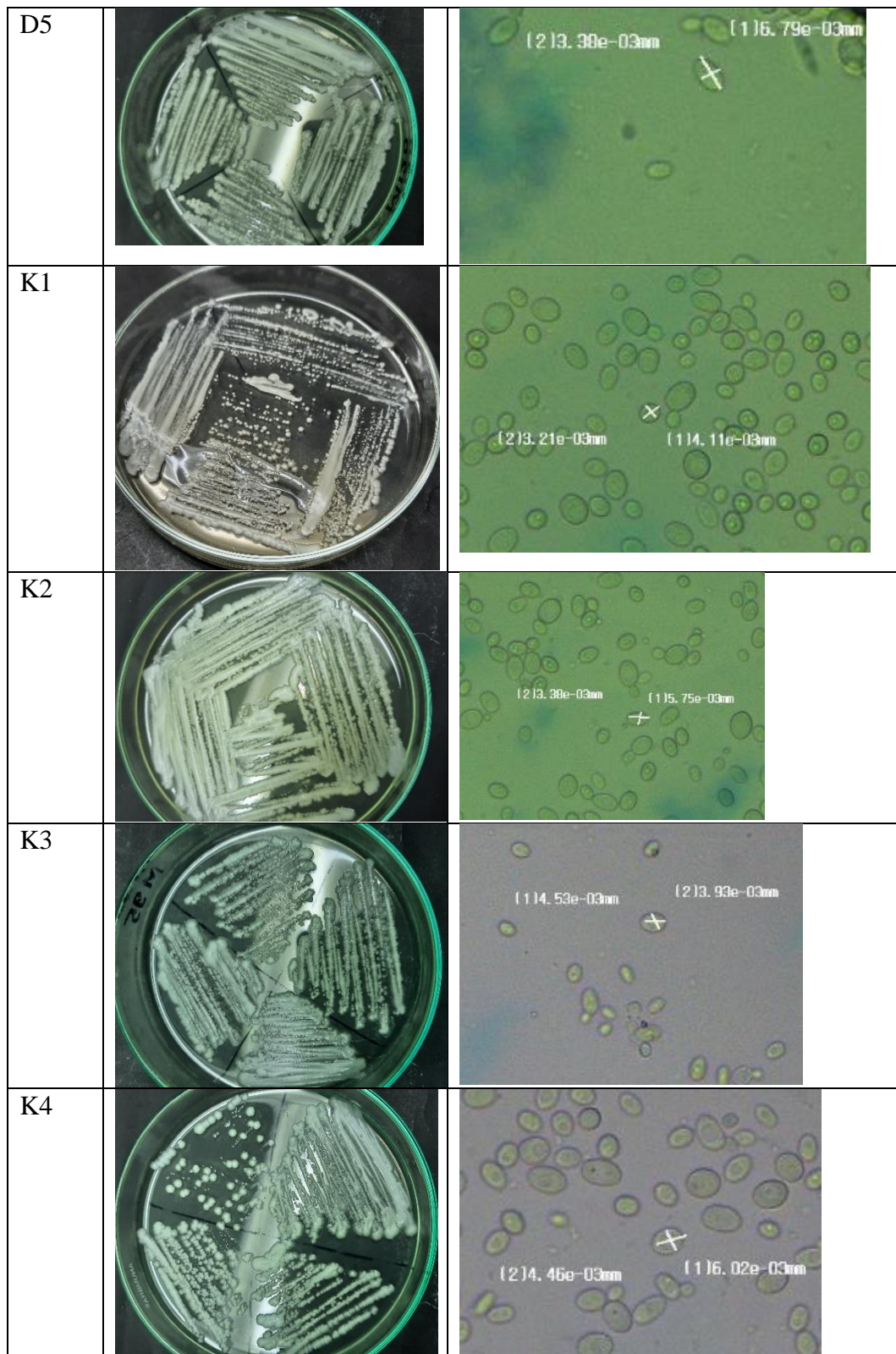
- Rosdee, N. A. S. M., N. Masngut, S. M. Shaarani, S. Jamek, and M. S. M. Sueb. 2020. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from pineapple leaves by using endo-1,4-xylanase: Effect of pH, temperature, enzyme loading and reaction time. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 736 (2):1-6.
- S. Rulianah., Prayitno., Sindhuwati C., Ayu, D. R. A., dan Sa'diyah, K., 2020, Penurunan Kadar Lignin pada Fermentasi Limbah Kayu Mahoni Menggunakan *Phanerochaete chrysosporium*. *Jurnal Teknik Kimia dan Lingkungan*. 4 : 81-89.
- Sahriani, Andi, Rudi Kartika, & Bohari Yusuf. 2016. Analisis variasi nutrisi ammonium sulfat dan urea dalam pembuatan bioetanol dari kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*. L) dengan hidrolisis enzimatik dan fermentasi menggunakan *Sacchromyces cerevisiae*. *Jurnal Atomik*.1 (2):65-70.
- Salafia, F., Ferracane, A., & Tropea, 2022. A. pineapple waste cell wall sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for second generation bioetanol production. *Fermentation*. 8 (100):1-10.
- Sari, Endang Purnama, Putri Azurah Fani, Abubakar, & Mukhlisien. 2020. Proses Hidrolisis dan Fermentasi Tandan Kosong Kelapa Sawit sebagai Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Inovasi Ramah Lingkungan (JIRL)*. 1 (3):16-19.
- Satyanarayana & Gotthard Kunze. 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Science + Business Media B.V.
- Schoch CL, et al. 2020. *NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools*. Database (Oxford). 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.
- Sumerta, I Nyoman & Atit Kanti. 2017. Keragaman jenis khamir penghasil etanol yang diisolasi dari makanan fermentasi di kepulauan riau. *Jurnal Biologi Indonesia*. 13(1):61-69.
- Susanti, Ari Diana, Puspito Teguh Prakoso, & Hari Prabawa. 2013. Pembuatan bioetanol dari kulit nanas melalui hidrolisis dengan asam. *Ekuilibrium*. 12 (1):11 – 16.
- Susmanto, Prahady, Yandriani, Badria Dania, & Ellen. 2020. Pengaruh jenis nutrisi dan waktu terhadap efisiensi substrat dan kinetika reaksi fermentasi dalam produksi bioetanol berbahan baku biji durian. *Jurnal Integrasi Proses*. 9 (2):01 – 08.
- Swinnen, Erwin, Valeria Wanke, Johnny Roosen, Bart Smets, Frédérique Dubouloz, Ivo Pedruzzi, Elisabetta Cameroni, Claudio De Virgilio and Joris Winderickx. 2006. Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Division*. 1(3):1-8.
- Talaro, K. P., dan Barry, C. 2012. *Foundations In Microbiology*. MC Graw-Hill Companies, New York.
- Thammasttirong,S.N.,Thirasahtana,T.,Thamma sttirong,A et al..(2013) Improvement of ethanol production by ethanol –tolerant *Saccharomyces cerevisiae* UVNR 56 SpringerPlus, 2,583-600.
- Wachi, Mohammad & Pratiwi Mutia. 2019. Optimasi Media Kulit Singkong pada Pertumbuhan *Sacharomyces Cerreviceae*. *Reka Buana : Jurnal Ilmiah Teknik Sipil dan Teknik Kimia*. 4 (2):92-101.

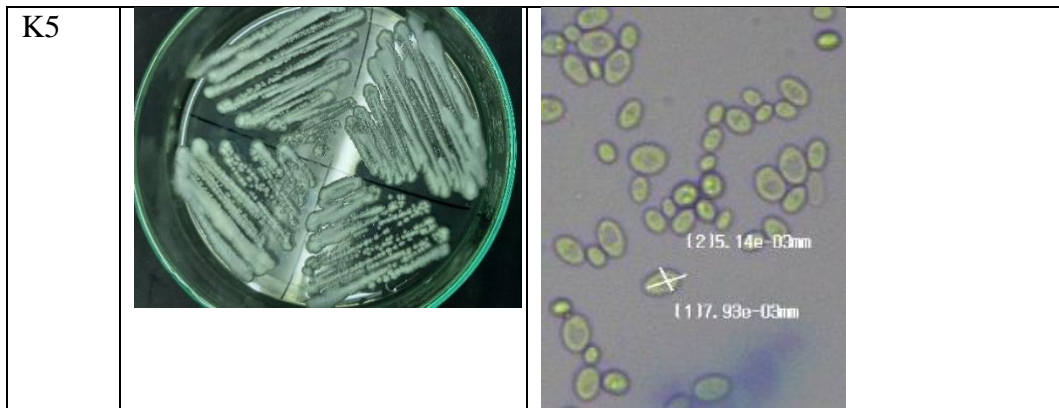
- Wahyono, Agung, Woo-Won Kang, Heui-Dong Park. Characterization and application of *Torulaspora delbrueckii* JK08 and *Pichia anomala* JK04 as baker's yeasts. 2015. *J. Food Nutr. Res.* 1-13.
- Walker, G. M., Bringham, T. A., & Brosnan, J. M. 2011. The ideal distiller's yeast? *Brewer And Distiller International.* 30-32.
- Waluyo, L. 2005. *Mikrobiologi Umum*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Wardani and R. Agustini. 2017. "Effect of concentration khamir hydrolysate enzymatic (yhe) as supplements culture media for growth *Lactobacillus bulgaricus*," *UNESA J. Chem.*, vol. 6, no. 1.
- Widyanti EM, dan Moehadi BI. 2016. Proses Pembuatan Etanol Dari Gula Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae* Amobil. *METANA*.12(2):31-38.
- Wiratmaja, I Gede & Edi Elisa. 2020. Kajian peluang pemanfaatan bioetanol sebagai bahan bakar utama kendaraan masa depan di Indonesia. *Jurnal Pendidikan Teknik Mesin Undiksha.* 8 (1):1-8.
- Yusmartini, E. S., Mardwita, M. & Marza, J. 2020 „Bioethanol from pineapple peel with variation of *Saccharomyces cerevisiae* mass and fermentation time“. *Indonesian Journal of Fundamental and Applied Chemistry.*

## Lampiran

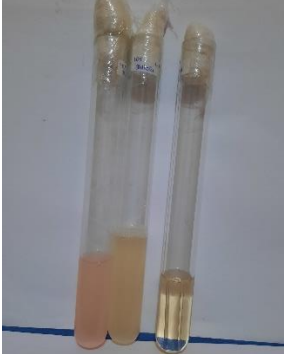



## 1. Isolat Hasil Isolasi






Nama Isolat	Makroskopik	mikroskopik
D1		
D2		
D3		
D4		








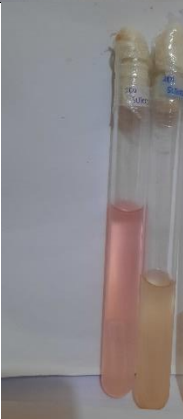
**2. Uji Fermentasi Karbohidrat**  
**a. Glukosa**




No.	Nama isolat	Gambar
1.	<b>1D1</b>	
2.	<b>1D2</b>	
3.	<b>2D1</b>	
4.	<b>2D2</b>	





5.	<b>2D3</b>	
6.	<b>1K1</b>	
7.	<b>1K2</b>	
8.	<b>2K1</b>	
9.	<b>2K2</b>	

10.	<b>2K3</b>	
-----	------------	---




**b. Sukrosa**





<b>No.</b>	<b>Nama isolat</b>	<b>Gambar</b>
1.	<b>1D1</b>	
2.	<b>1D2</b>	
3.	<b>2D1</b>	




4.	<b>2D2</b>	
5.	<b>2D3</b>	
6.	<b>1K1</b>	

7.	<b>1K2</b>	
8.	<b>2K1</b>	
9.	<b>2K2</b>	
10.	<b>2K3</b>	

## c. Fruktosa

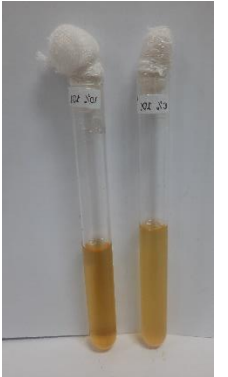





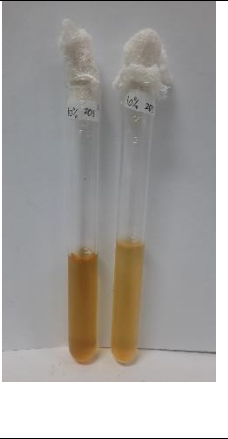




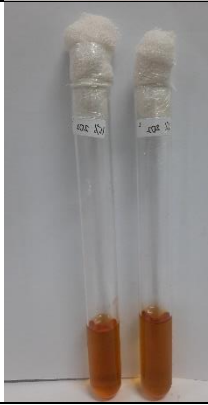
No.	Nama isolat	Gambar
1.	<b>1D1</b>	 Three test tubes are shown. The first two tubes on the left contain a pink liquid, and the third tube on the right contains a yellow liquid. All tubes have white caps.
2.	<b>1D2</b>	 Three test tubes are shown. The first two tubes on the left contain a pink liquid, and the third tube on the right contains a yellow liquid. All tubes have white caps.
3.	<b>2D1</b>	 Three test tubes are shown. The first two tubes on the left contain an orange liquid, and the third tube on the right contains a yellow liquid. All tubes have white caps.













4.	<b>2D2</b>	
5.	<b>2D3</b>	
6.	<b>1K1</b>	
7.	<b>1K2</b>	

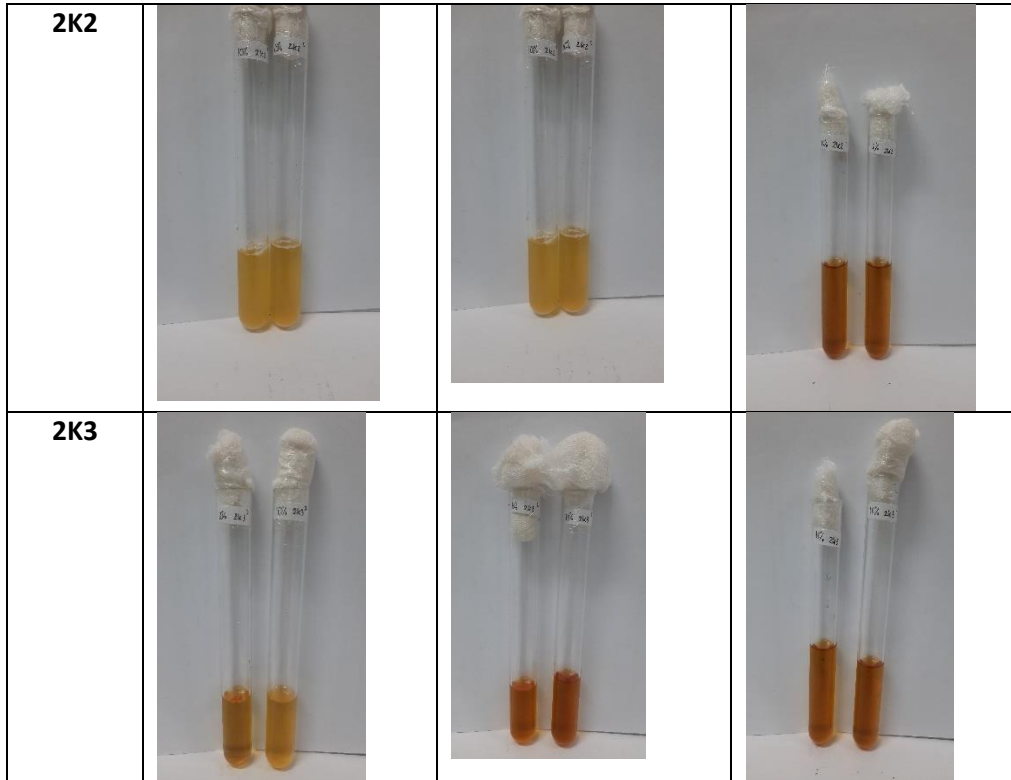
8.	<b>2K1</b>		
9.	<b>2K2</b>		
10.	<b>2K3</b>		

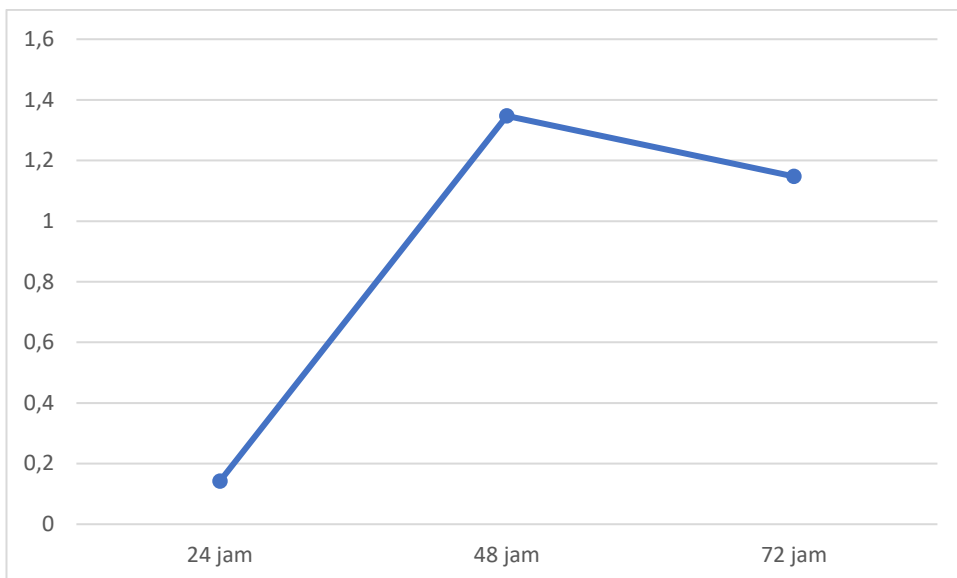
### 3. Uji Toleransi Etanol

Nama Isolat	10%		13%		15%	
	Sebelum 24 jam	Sesudah 72 jam	Sebelum 24 jam	Sesudah 72 jam	Sebelum 24 jam	Sesudah 72 jam
<b>D1</b>	0.48	0.894	0.246	0.65	0.133	0.648
<b>D2</b>	0.14	0.727	0.347	1.147	0.811	0.183
<b>D3</b>	0.066	0.116	0.097	0.079	0.12	0.048
<b>D4</b>	0.046	0.353	0.055	0.615	0.056	0.057
<b>D5</b>	0.053	0.514	0.067	0.054	0.084	0.058
<b>K1</b>	0.048	0.313	0.05	0.057	0.498	0.058
<b>K2</b>	0.142	1.347	0.129	0.837	0.112	0.459
<b>K3</b>	0.144	0.718	0.097	0.809	0.243	0.967
<b>K4</b>	0.098	0.932	0.222	0.661	0.225	0.944
<b>K5</b>	0.045	0.161	0.056	0.061	0.048	0.06

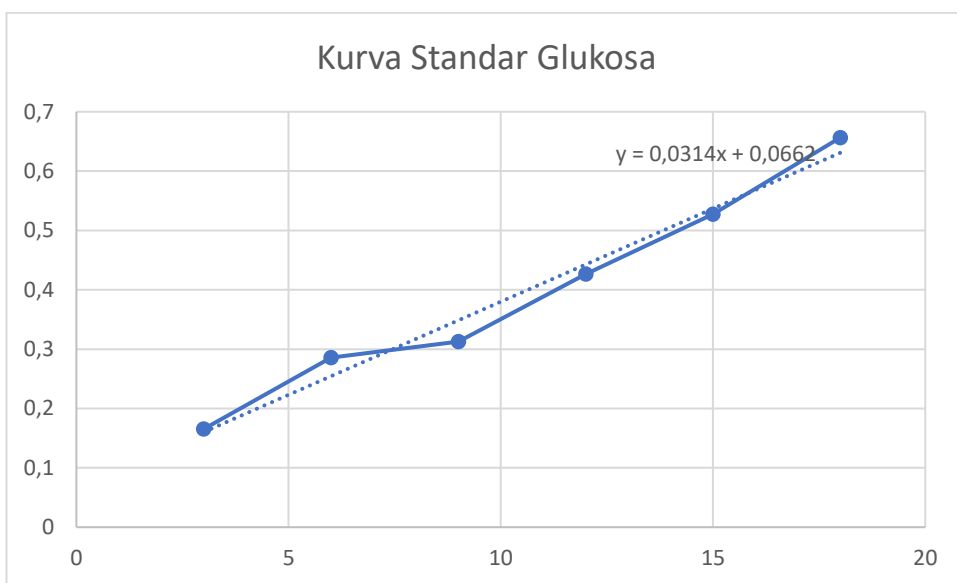
Nama isolat	10%	13%	15%
<b>1D1</b>			
<b>1D2</b>			
<b>2D1</b>			
<b>2D2</b>			

<b>2D3</b>			
<b>1K1</b>			
<b>1K2</b>			
<b>2K1</b>			





Gambar 1 Kurva Pertumbuhan Khamir K2



### Pengukuran Kadar Etanol

Perlakuan	Hasil Timbangan			Hasil Rumus			Rata-rata
	1	2	3	1	2	3	
A1W1	42,4238	42,4314	42,4435	0,9951947 (3,4)	0,99549 (3)	0,995978 (2,8)	3,06%
A2W1	42,2492	42,2521	42,2549	0,988249 (8,4)	0,988364 (8,4)	0,988476 (8,2)	8,33%

A3W1	42,291 6	42,288 9	42,294 6	0,989935 (7,2)	0,98982 85 (7,2)	0,990055 (7)	7,13%
A1W2	42,160 5	42,151 7	42,160 5	0,98472 (11,2)	0,98437 1 (11,4)	0,984720 (11,2)	11,26%
A2W2	41,949 2	41,945 5	41,954 9	0,976315 6 (18,2)	0,97616 8 (18,4)	0,976542 42 (18)	18,2%
A3W2	41,974 8	41,971 9	41,970 5	0,977334 02 (17,4)	0,97721 8 (17,4)	0,977162 (17,4)	17,4%
A1W3	42,025 5	42,057 0	42,033 5	0,979350 8 (15,6)	0,98060 3 (14,6)	0,979669 (15,4)	15,2%
A2W3	41,977	41,966 6	41,967 3	0,977421 (17,2)	0,97700 8 (17,6)	0,977035 (17,6)	17,46%
A3W3	42,096 7	42,080 5	42,094 2	0,982183 (13,2)	0,98153 8 (13,8)	0,982083 6 (13,4)	13,46%

## Hasil SPSS

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
bioetanol	.107	27	.200*	.942	27	.135

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
bioetanol	Based on Mean	1.074	2	24	.357
	Based on Median	.063	2	24	.939
	Based on Median and with adjusted df	.063	2	21.420	.939
	Based on trimmed mean	.881	2	24	.427

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: bioetanol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	4263.440 <sup>a</sup>	9	473.716	7613.286	.000
waktu	176.483	2	88.241	1418.167	.000
urea	409.932	2	204.966	3294.095	.000

waktu * urea	6.690	4	1.673	26.881	.000
Error	1.120	18	.062		
Total	4264.560	27			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

### etanol

Duncan<sup>a</sup>

urea_waktu	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A1W1	3	3.067							
A3W1	3		7.133						
A2W1	3			8.333					
A1W2	3				11.267				
A3W3	3					13.467			
A1W3	3						15.200		
A3W2	3							17.400	
A2W3	3							17.467	
A2W2	3								18.200
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.755	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



**KEMENTERIAN AGAMA**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**PROGRAM STUDI BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

**Form Checklist Plagiasi**

**Nama** : Indah Puji Lestari  
**NIM** : 19620005  
**Judul** : Pengaruh Penambahan Urea dan Lama Fermentasi Khamir Hasil Isolasi dari Buah Nanas (*Ananas comosus* L.) Dalam Produksi Etanol

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	158	
4	Tyas Nyonita Punjungsiari, M.Sc		
5	Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc		

Mengetahui,  
 Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
 NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
 Jalan Gajayana Nomor 50, Telepon (0341) 551354, Fax. (0341) 572533  
 Website: <http://www.uin-malang.ac.id> Email: [info@uin-malang.ac.id](mailto:info@uin-malang.ac.id)

### JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

#### IDENTITAS MAHASISWA

NIM : 19620005  
 Nama : INDAH PUJI LESTARI  
 Fakultas : SAINS DAN TEKNOLOGI  
 Jurusan : BIOLOGI  
 Dosen Pembimbing 1 : IR. HJ. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.  
 Dosen Pembimbing 2 : OKY BAGAS PRASETYO, M.Pd  
 Judul Skripsi/Tesis/Disertasi : PENGARUH PENAMBAHAN UREA DAN LAMA FERMENTASI KHAMIR HASIL ISOLASI DARI BUAH NANAS (*Ananas comosus* L.) DALAM PRODUKSI ETANOL

#### IDENTITAS BIMBINGAN

No	Tanggal Bimbingan	Nama Pembimbing	Deskripsi Proses Bimbingan	Tahun Akademik	Status
1	20 Oktober 2022	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Pengajuan Judul Skripsi	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
2	28 Oktober 2022	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Studi Literatur/ pustaka yang mendukung penelitian	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
3	03 November 2022	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	BAB I	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
4	18 November 2022	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	BAB 1, 2 dan 3	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
5	08 Desember 2022	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Perbaikan BAB 1, 2, 3	Ganjil 2022/2023	Sudah Dikoreksi
6	15 Desember 2022	OKY BAGAS PRASETYO, M.Pd	Bimbingan Integrasi BAB I	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
7	17 Desember 2022	OKY BAGAS PRASETYO, M.Pd	Revisi Integrasi BAB I	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
8	20 Desember 2022	OKY BAGAS PRASETYO, M.Pd	ACC Integrasi Islam	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
9	22 Desember 2022	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Konsultasi Bab 1,2,3 dan ACC	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
10	22 Mei 2023	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Bimbingan hasil penelitian	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
11	23 Mei 2023	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Bimbingan hasil penelitian	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
12	22 Juni 2023	OKY BAGAS PRASETYO, M.Pd	Bimbingan Integrasi	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi
13	22 Juni 2023	Ir Hj. LILIEK HARIANIE A.R., M.P.	Bimbingan BAB I, II, III, IV, dan V	Genap 2022/2023	Sudah Dikoreksi

Telah disetujui  
 Untuk Mengajukan Ujian Skripsi

Pembimbing 1  
  
 Ir. Hj. Liliek Haranie A.R., M.P.

Pembimbing 1  
  
 Oky Bagas Prasetyo, M.Pd

