

Kadar Etanol dan Asam Asetat pada Fermentasi Ketan Putih (*Oryza Sativa* L. *Var Forma Glutinosa*) dengan *Saccharomyces Cerevisiae* dan Ragi Pasaran

Himayari Nufus Maryana¹, Ni Made Suaniti², Ketut Gede Dharma Putra³

^{1,2,3} Universitas Udayana

e-mail: himayarinufusmaryana@gmail.com¹, Suanitir@gmail.com²,
gededharmaputra@unud.ac.id³

Abstrak

Beras ketan putih (*Oryza sativa* L. *var forma glutinosa*) merupakan salah satu hasil pertanian di Indonesia yang dapat difermentasi menjadi etanol seperti tape menggunakan ragi (*Saccharomyces cerevisiae*). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kadar etanol dan asam asetat dalam tape beras ketan putih menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* murni dan ragi pasaran. Metode analisis kadar dan massa jenis etanol masing-masing menggunakan kromatografi gas dan piknometer serta asam asetat secara konvensional (titrasi). Kadar etanol rata-rata dalam tape beras ketan dengan *Saccharomyces cerevisiae* murni adalah 11,58 %v/v, dan ragi pasaran adalah 14,79 %v/v, dengan massa jenis dihasilkan 0,98 g/ml pada kedua sampel. Kadar asam asetat rata-rata hasil fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* murni dan ragi pasaran 0,06 %v/v dan 0,45 %v/v.

Kata kunci: *Beras Ketan Putih, Saccharomyces cerevisiae, Ragi Pasaran, Etanol, Asam Asetat*

Abstract

White glutinous rice (*Oryza sativa* L. *var forma glutinosa*) is one of the agricultural products in Indonesia that can be fermented into ethanol such as tape using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). This research purpose to compare the levels of ethanol and acetic acid in white glutinous rice tape using pure *Saccharomyces cerevisiae* and market yeast. The method of analysis of the content and density of ethanol respectively uses gas chromatography and pycnometer and conventional acetic acid (titration). The average ethanol content in the pure glutinous rice tape with *Saccharomyces cerevisiae* was 11,58 %v/v, and the market yeast was 14,79 %v/v, with the resulting density of 0.98 g/ml in both samples. The average acetic acid content of fermented with pure *Saccharomyces cerevisiae* and market yeast was 0,06 %v/v and 0,45 %v/v.

Keywords : *White Sticky Rice, Saccharomyces cerevisiae, Market Yeast, Ethanol Content, Acetic Acid Content*

PENDAHULUAN

Beras ketan putih (*Oryza sativa* L. *var glutinosa*) adalah salah satu bahan pangan dari hasil pertanian yang ada di Indonesia yang dapat diolah dalam bentuk makanan. Beras ketan putih memiliki beberapa kandungan, seperti karbohidrat yang lumayan tinggi yaitu 79,40 gram dari 100 gram bahan. Beras ketan putih biasanya dapat diolah menjadi produk makanan berupa tape dengan cara fermentasi (Fathnur, 2019).

Fermentasi adalah proses pengubahan karbohidrat kompleks yaitu pati oleh ragi menjadi etanol. Manfaat utama fermentasi adalah mengawetkan makanan dan dapat memperkaya cita rasa pada makanan. Proses fermentasi melibatkan penambahan mikroorganisme yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Maurice, 2011).

Saccharomyces cerevisiae memiliki keistimewaan untuk menguraikan berbagai jenis gula, memiliki kapasitas fermentasi yang relatif tinggi, pH pertumbuhan optimum yang

rendah 4,5–5, ketahanan terhadap kadar etanol yang tinggi yaitu 9-10% volume, suhu pertumbuhan optimum relatif tinggi pada 25-30°C, selektivitas yang tinggi dalam menghasilkan produk, dan akumulasi produk sampingan yang rendah (*Saccharomyces cerevisiae*) rendah. (Maurice, 2011).

Ragi merupakan bahan yang mengandung duntuk melakukan proses fermentasi. M. (Raharjanti, 2006) mengidentifikasi mikroorganisme dari ragi tape di tiga wilayah yakni Semarang, DKI Jakarta dan Bandung yang telah menemukan bahwa kapang dan khamir dapat digolongkan menjadi lima genus yaitu *Saccharomyces*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, dan *Saccharomycopsis*.

Sehubungan dengan riset yang tercantum (Buckle & Hongsprabhas, 2003) mengisolasi jamur ketela pohon yang telah difermentasi, ditemukan jamur *Absidia corymbifera*, *Aspergillus nidulans*, *Chlamydomucor oryzae*, dan *Penicillium glabrum*, pada ragi merk NKL dan, *A. flavus*, *A. Oryzae* dan *A. Nidulans* dari merk Roda Mas.

Hal ini menunjukkan bahwa ragi yang terdapat di pasaran tidak murni mengandung *S. cerevisiae*, dimana ragi yang terdapat di pasaran mengandung genus *Aspergillus* dan *Saccharomyces*. Sehingga akan dilakukan penelitian mengenai perbandingan antara kadar etanol dengan *S. cerevisiae* murni dan pasaran serta perbandingan hasil kadar asam asetat

METODE

Bahan

Dalam penelitian ini menggunakan beberapa bahan, yakni ketan putih, akuades, taoge, agar, gula pasir, kertas saring, paraffin, kapas, Etanol (C₂H₅OH) 99.9%, Asam Klorida (HCl) berderajat pro analisis (p.a), Natrium Hidroksida (NaOH) berderajat pro analisis (p.a), Asam Oksalat (H₂C₂O₄·2H₂O), indikator fenolftalien (pp), *Saccharomyces cerevisiae*, dan ragi pasar.

Peralatan

Alat yang diimplementasikan dalam penelitian kali ini adalah sebagai berikut, yakni labu ukur, gelas Erlenmeyer, pipet volume, ball filler, buret, statif, corong, pipet tetes, neraca analitik, batang pengaduk, aluminium foil, pH meter, kertas lakmus, bunsen, penangas, seperangkat alat destilasi, batu didih, piknometer, *shaker*, blender, ayakan, penangas, *autoclave*, kolom gas chromatography, gas chromatography (GC), botol vial, oven, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tisu, jarum ose, dan gelas beker.

Cara Kerja

Pembiakan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Agar Miring (Mahreni et. al., 2011). Sebanyak 12,5 gram taoge dan 2,5 gram agar-agar dimasukkan ke dalam gelas beker yang telah steril dengan menggunakan *autoclave*, kemudian dilarutkan dalam akuades hingga volume larutan menjadi 125 ml setelah itu, dididihkan selama 15 menit dan diaduk hingga homogen. Larutan yang sudah mendidih tersebut ditambahkan 7,5 gram gula dan dipanaskan kembali hingga volume menjadi 125 ml. Tabung reaksi yang telah disterilkan dimasukkan ke media yang sudah didapatkan, selanjutnya tutup menggunakan kapas yang telah direndam dalam paraffin. Sterilisasikan tabung reaksi yang sudah berisikan media keadaan suhu 121°C selama 15 menit. Berikutnya didinginkan dengan cara dimiringkan untuk media agar miring hingga mencapai suhu kamar. Media agar miring yang telah dipadatkan ditanami dua ose biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* dengan teknik gores (*streak plate method*) memakai jarum ose steril kemudian diinkubasi pada keadaan suhu kamar selama 48 jam. Setelah 48 jam, akan didapatkan pembiakan *Saccharomyces cerevisiae*.

Persiapan Sampel (Subakti et al., 2005)

Beras ketan putih sebanyak 500 g dicuci dengan akuades dan dikeringkan dengan sinar cahaya matahari hingga kering. Beras ketan putih yang telah kering diblender sampai halus, berikutnya dimasukkan ke dalam sebuah oven pada keadaan suhu 60°C selama 60 menit, kemudian turunkan suhunya pada suhu kamar. Setelah itu ketan putih yang telah dihaluskan diayak menggunakan ayakan sebesar 60 mesh untuk mendapatkan tepung ketan.

Hidrolisis Tepung Ketan (Sutamihardja, Srikandi, & Herdiani, 2017)

Timbang Tepung ketan dengan berat sebanyak 25 gram setelah itu dimasukkan ke sebuah Erlenmeyer untuk kemudian dicampur menggunakan 75 ml air mendidih. Selanjutnya Erlenmeyer diletakan di atas penangas untuk dipanaskan pada suhu 60-70°C sampai terbentuk suspensi ketan. Langkah berikutnya suspensi ketan ditambahkan sebanyak 15 ml HCl 0,5 N dan distrerilkan dalam autoclave pada kondisi suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 1,5 jam. Berikutnya didinginkan dalam suhu kamar. Suspensi ketan yang telah mengalami perlakuan hidrolisis asam dicuci dengan NaOH 1 N sampai netral (pH 6.0).

Pemurnian dan Penentuan Kadar Etanol Destilasi Frasional (Destilasi Bertingkat)

Filtrat hasil fermentasi dipipet sebanyak 25 ml kemudian dimasukkan ke sebuah labu alas bulat dan diberikan beberapa butir batu didih. Kemudian labu alas bulat disambungkan pada alat destilasi bertingkat. Proses destilasi dilakukan pada suhu 78-81°C, 81 -90°C dan 90 – 100°C. Destilat yang diperoleh digunakan untuk analisis kadar etanol menggunakan piknometer dan kromatografi gas.

Analisis Kadar etanol dengan menggunakan piknometer

Piknometer kosong ditimbang dalam keadaan kering, Kemudian piknometer diisi dengan akuades yang telah diketahui massa jenisnya (ρ). Piknometer yang telah diisi akuades ditimbang dan dicatat. Kemudian dibersihkan kembali dan diisi dengan destilat dari hasil fermentasi ketan putih serta ditimbang.

Analisis Kadar Etanol dengan Menggunakan Kromatografi Gas (Sudarma & Parwata, 2017)

10 ml destilat dimasukkan ke labu ukur sampai 50 ml setelah itu, diberikan akuades sampai batasan yang ditentukan, berikunya sampel dimasukkan ke dalam botol vial. Alat instrumen dikondisikan pada suhu kolom 170°C, suhu injektor 170°C serta suhu detektor 200°C. Kemudian standar etanol 30% disuntikan ke kolom injeksi pada alat kromatografi gas. Selepas disuntikkan standar etanol, sampel disuntikan ke dalam kolom injeksi. Luas puncak etanol dan etanol dari kromatogram dihitung dan di cari rasio luas puncak alkohol dan etanol.

Pembakuan Larutan NaOH

Sebanyak 10 ml asam oksalat 0,1 N dipipet menggunakan pipet volume kemudian dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer, selanjutnya ditambahkan indikator fenolftalein sebanyak 2-3 tetes lalu dititrasi menggunakan larutan NaOH sampai berubah warnanya menjadi warna merah muda. Volume NaOH hasil akhir titrasi dicatat dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Penentuan Kadar Asam Asetat (Sudarma & Parwata, 2017)

Persiapkan sebuah labu ukur 100 ml yang akan dimasukkan dengan filtrat hasil fermentasi sebanyak 10 ml, untuk kemudian dicampurkan akuades hingga tanda batas. Larutan sampel dipipet dengan pipet volume sebanyak 25,0 ml selanjutnya dimasukkan langsung ke dalam Erlenmeyer. Sampel yang terdapat dalam Erlenmeyer ditetesin dengan indikator fenolftalien sebanyak 2-3 tetes. Sampel dititrasi bersama larutan NaOH 0,1 N sampai warna berubah menjadi merah muda. Pada akhir titrasi dicatat volume NaOH dan titrasi dilakukan 3 kali pengulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan *Saccharomyces cerevisiae*

Pada penelitian ini dilakukan peremajaan *Saccharomyces cerevisiae* yang bertujuan untuk mengaktifkan kembali kapang yang telah lama tidak aktif. Proses ini dilakukan dengan cara menanam kembali kapang pada media yang telah ditentukan. Pada peremajaan *Saccharomyces cerevisiae* digunakan taube untuk menggantikan penggunaan kentang pada media PDA (*Potato Dekstrosa Agar*). Penggunaan ekstrak taube digunakan sebagai media bagi pertumbuhan kapang. Taube mengandung makronutrien, mikronutrien, asam amino, vitamin, serta gula yang dibutuhkan bagi pertumbuhan kapang.

Media ekstrak tauge yang telah siap selanjutnya dilakukan proses penggoresan sebanyak 2 kali untuk memperoleh hasil yang lebih baik. Pada metode ini digunakan dua media yaitu media datar dan media miring. Hasil pertumbuhan kapang pada media datar dan miring dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. *Saccharomyces cerevisiae* yang terbentuk berwarna kuning muda, berbentuk bulat, dan memiliki sel bulat lebih dari 10, sedangkan menurut Nikon, 2004 dalam Ahmad 2005 penampilan makroskopik khamir *Saccharomyces cerevisiae* mempunyai warna kuning muda, koloni berbentuk bulat, permukaan berkilau, licin, memiliki sel bulat dengan askospora sebanyak 1-8 buah, dan tekstur lunak, sehingga dapat disimpulkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan pada penelitian ini adalah *Saccharomyces cerevisiae* murni.



Gambar 1. Media datar *Saccharomyces cerevisiae*.



Gambar 2. Media miring *Saccharomyces cerevisiae*.

Kadar Etanol pada Fermentasi Ketan Putih dengan *Saccharomyces cerevisiae*

Uji pendahuluan dilakukan sebelum proses fermentasi bertujuan untuk menentukan pH optimum dalam menghasilkan etanol pada *Saccharomyces cerevisiae*. Berdasarkan uji pendahuluan diperoleh pH optimum pada waktu 96 jam, setelah itu dilanjutkan dengan proses fermentasi ketan putih. Fermentasi dilakukan dengan cara menghaluskan ketan putih hingga menjadi tepung untuk memudahkan proses hidrolisis, kemudian dicampurkan dengan HCl 0,5 N sebanyak 15 ml. Fungsi dari penambahan HCl 0,5 N adalah sebagai penghidrolisis agar tepung menjadi pati sehingga glukosa dapat terurai. Ketan putih yang telah terhidrolisis menjadi suspensi ketan selanjutnya dinetralkan menggunakan NaOH agar kapang tidak mati pada saat melakukan fermentasi. Pada proses fermentasi ketan putih dilakukan 3 kali pengulangan. Filtrat yang dihasilkan pada saat fermentasi dimurnikan dengan cara destilasi yang selanjutnya dianalisis menggunakan *gas chromatography* (GC). Proses injeksi sampel, dilakukan dengan menginjeksi etanol murni terlebih dahulu untuk mengetahui perbandingan waktu retensinya (rt). Waktu retensi yang diperoleh pada etanol murni 20 % v/v adalah 3,92 sedangkan waktu retensi rata-rata yang dihasilkan pada *Saccharomyces cerevisiae* adalah dan ragi pasaran adalah 4,098 dan 4,056. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sampel etanol yang diinjeksikan merupakan senyawa yang sama dengan etanol murni.

Pada penelitian ini diperoleh kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* murni selama 96 jam berturut-turut adalah 9,84; 13,06; dan 11,84 %v/v dengan rata-rata 11,93% v/v, serta kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan menggunakan ragi pasaran selama 96 jam berturut-turut adalah 16,64; 13,81; dan 13,93 %v/v dengan rata-rata 14,79% v/v. Analisis statistik dengan uji-T dilakukan agar mengetahui adanya suatu perbedaan yang berarti diantara kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran. Pada hasil uji-T diperoleh nilai probabilitas 0,904, nilai ini lebih besar dari 0,05.

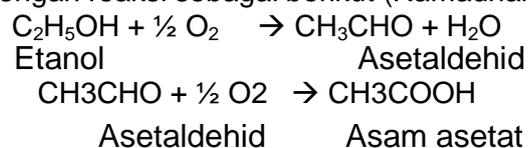
Menurut (Widarjono, 2010) menetapkan besarnya *level of significance* sebesar 0,05, yang artinya jika lebih besar dari 0,05 maka terdapat perbedaan yang cukup relevan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat sebuah perbedaan yang berarti antara kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran.

Berdasarkan kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi pasaran menunjukkan bahwa kadar etanol fermentasi ketan putih dengan menggunakan ragi pasaran lebih besar daripada kadar etanol fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae*. Perbandingan kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran, dan kadar etanol pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* tidak berbeda jauh. Hal ini disebabkan pada fermentasi dengan ragi pasaran terdapat aktivitas mikroorganisme lain yang membantu bekerja secara sinergik. Menurut (Dewi & Aziz, 2011) ragi tape terdiri dari kapang (*Aspergillus, sp, Mucor sp, dan Rhizopus sp*), khamir (*Candida utilis, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia burtonii, Saccharomycopsis malanga, dan Saccharomyces cereviceae*) dan bakteri (*Pediococcus sp, Acetobacter, dan Bacillus sp*). *Aspergillus* berfungsi untuk menyederhanakan amilum, sedangkan *Saccharomyces sp* dan *Candida sp* mengubah gula menjadi etanol dan zat organik lainnya. *Acetobacter* mengubah etanol menjadi asam asetat.

Tahapan selanjutnya setelah penentuan kadar etanol dilakukan pengukuran massa jenis dengan menggunakan piknometer dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Massa jenis yang didapatkan pada fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran berturut-turut adalah 0,98; 0,98; dan 0,98 g/ml. Massa jenis etanol pada fermentasi ketan putih dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* murni berturut-turut adalah 0,98; 0,98; dan 0,98 g/ml. Massa jenis etanol murni yaitu 0,79 g/ml dengan kadar 99,9 % v/v (Badan Standar Nasional, 2009). Berdasarkan data tersebut massa jenis etanol pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi pasaran adalah 0,98 g/ml dimana kadar etanol rata-rata pada fermentasi ketan putih *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi pasaran adalah 11,58 %v/v dan 14,79 %v/v. Dari data tersebut diambil sebuah kesimpulan bahwa etanol yang telah dihasilkan belum murni disebabkan masih terdapat kandungan air, hal tersebut dapat disebabkan karena adanya uap air yang ikut bercampur pada proses destilasi.

Kadar Asam pada Fermentasi Ketan Putih dengan *Saccharomyces cerevisiae*

Fermentasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah fermentasi anaerob untuk menghasilkan etanol, akan tetapi ada kemungkinan terjadi proses oksidasi untuk menghasilkan asam asetat. Pada proses fermentasi pembentukan asam asetat terdapat perubahan etanol menjadi asam asetat melewati pembentukan asetaldehid dibantu oleh bakteri *Acetobacter aceti* dengan reaksi sebagai berikut (Ramadhani, 2018):



Pada penelitian ini diperoleh kadar asam asetat pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* berturut-turut adalah 0,05; 0,06; dan 0,06 %v/v dengan rata-rata 0,06 % v/v. Kadar asam asetat pada fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran berturut-turut adalah 0,45; 0,45; dan 0,45 %v/v dengan rata-rata 0,45 % v/v. Berdasarkan data tersebut, menunjukkan terdapat perbedaan antara kadar asam asetat pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran yang memiliki nilai probabilitas 0,034. Hasil ini sesuai dengan uji Mann-Whitney test yang menyatakan bahwa jika lebih kecil dari 0,05, maka menjumpai perbedaan antara kadar asam asetat pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran.

Pada penelitian ini, kadar asam asetat fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi pasaran adalah 0,06 dan 0,45 %v/v, sehingga kadar asam asetat pada fermentasi ketan dengan menggunakan ragi pasaran lebih besar dibandingkan fermentasi ketan putih dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini menunjukkan bahwa

pada fermentasi ketan putih dengan ragi pasaran terdapat beberapa organisme salah satunya adalah bakteri *Acetobacter aceti*, sedangkan pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme tunggal yang digunakan. Dengan demikian penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* lebih memungkinkan untuk mencegah proses oksidasi pada pembuatan fermentasi etanol.

SIMPULAN

Kadar etanol rata-rata pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi pasaran adalah 11,93 %v/v dan 14,79 %v/v. Sedangkan kadar asam asetat rata-rata pada fermentasi ketan putih dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan ragi pasaran adalah 0,06 %v/v dan 0,45 %v/v.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K. A., & Hongsprabhas, P. (2003). Cooked and Raw Cassava Fermentation by Fungi Isolated from Traditional Fermented Foods. *Australia: University of New South Wales*.
- Dewi, Ratna Stia, & Aziz, Saefuddin. (2011). Isolasi *Rhizopus oligosporus* pada beberapa inokulum tempe di Kabupaten Banyumas. *Molekul*, 6(2), 93–104.
- Fathnur, Fathnur. (2019). Uji Kadar Alkohol Pada Tapai Ketan Putih (*Oryza Aativa L. Var Glutinosa* dan Singkong (*Manihot Sp.*) Melalui Fermentasi Dengan Dosis Ragi Yang Berbeda. *Jurnal Agrisistem*, 15(2), 89–93.
- Maurice, Michelle Lynn. (2011). *Factors effecting ethanol fermentation via simultaneous saccharification and fermentation*.
- Raharjanti, Dyah Sista. (2006). *Penghambatan pertumbuhan Aspergillus parasiticus dan reduksi aflatoksin oleh kapang dan khamir ragi tape*.
- Ramadhani, Dimas Luthfi. (2018). *Pembuatan Asam Cuka dari Nira Siwalan dengan Proses Fermentasi*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Sudarma, Nyoman, & Parwata, I. Made Oka Adi. (2017). Determination Ethanol In Arak With Gas Chromatography. *Bali Medika Jurnal*, 4(2), 126–135.
- Sutamihardja, R. T. M., Srikandi, Srikandi, & Herdiani, Dian Purnamasari. (2017). Hidrolisis asam klorida tepung pati singkong (*Manihot esculenta Crantz*) dalam pembuatan gula cair. *Jurnal Sains Natural*, 5(1), 83–91.
- Widarjono, Agus. (2010). Analisis statistika multivariat terapan. *Yogyakarta: UPP STIM YKPN*.