

**PENAPISAN BAKTERI-PENGHASIL ASAM  
DAN UJI KARAKTERISTIK PERTUMBUHANNYA  
PADA MEDIUM NIRA KELAPA**

**SKRIPSI**



Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains  
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember



Oleh :

**A F I F A**

NIM. 971810401067

Hadiah	Klass
Pembelian	664.13
Terima Tel: 16 AUG 2002	AFI
No. Induk: 1408	P
KOPR / PENYALIN:	e1

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
MEI, 2002**

## MOTTO

*“Allah sekali-kali tidak merubah sesuatu nikmat yang telah dianugerahkan-Nya kepada sesuatu kaum, hingga kaum itu merubah apa yang ada pada diri mereka sendiri”*

**(QS. Al-Anfal, 8:53)**

*“Tidak ada orang yang berputus asa dari rahmat Tuhannya, kecuali orang-orang yang sesat”.*

**(QS. Al-Hijr, 15:56)**

*“Hanya kepadaMu kami menyembah dan hanya kepadaMu kami meminta pertolongan”*

**(QS. Al-Faatihah, 1:5)**

*“Karena itu hendaklah kepada Allah saja orang-orang mukmin bertawakkal”*

**(QS. Al-Imron, 3:160)**

*“Manusia dalam hidup dituntut untuk merubah jalannya sendiri, bukan Tuhan. Seiring dengan usaha yang dilakukan, keyakinan akan rahmat Tuhan menyertai kita, karena hanya kepada Tuhanlah kita menyembah dan meminta pertolongan. Bagaimana kita akan ditolong oleh Tuhan jika kita tidak menyembahNya.....setelah berusaha maksimal disertai doa, hasilnya serahkan kepada Tuhan. Ingat .....manusia hanya berusaha Tuhanlah yang menentukan”*

**(Afif)**

**HALAMAN PERSEMBAHAN**

*Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, tulisan ini kupersembahkan untuk:*

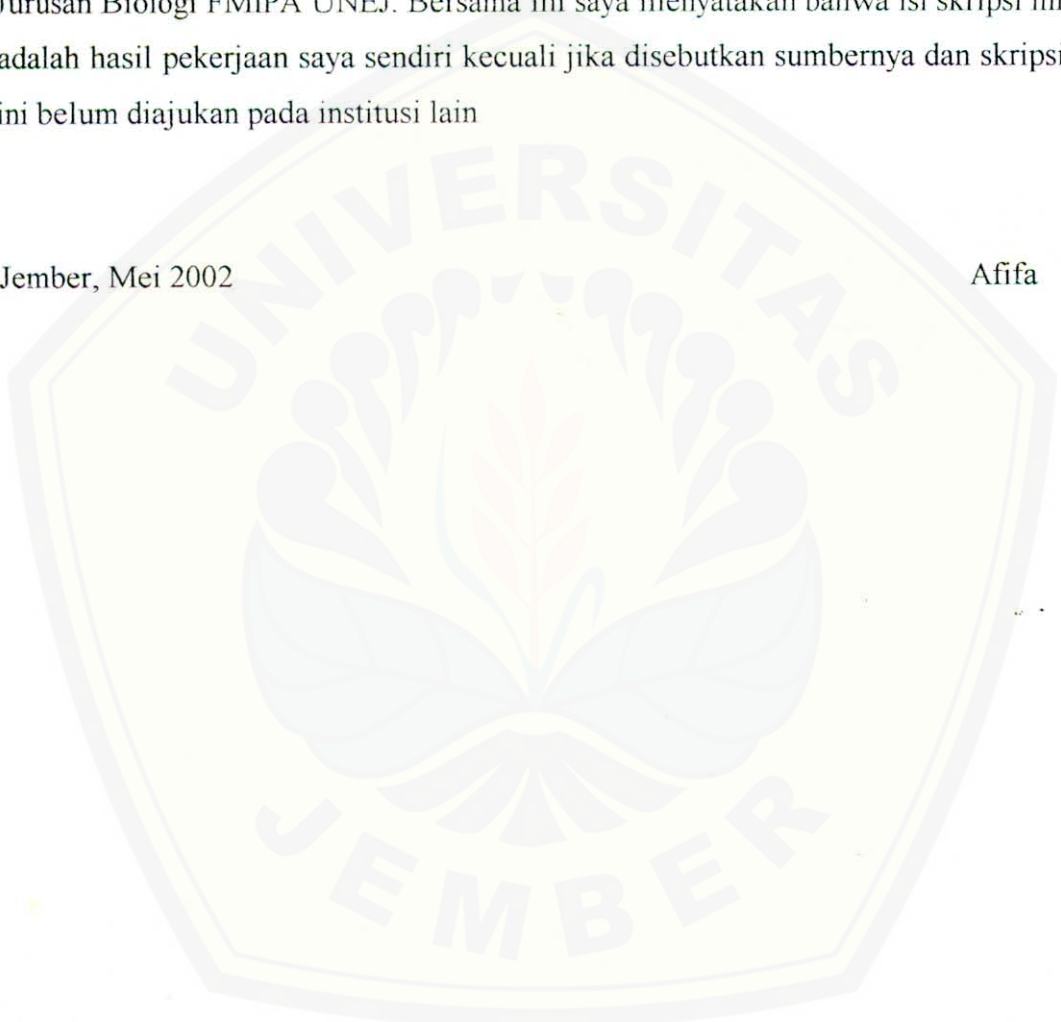
- 1. Ayah dan ibu tercinta dirumah, terima kasih atas semua pengorbanan dan kasih sayang yang telah ayah ibu berikan.*
- 2. Saudaraku tersayang Sholeh, Jalaluddin, Layli, Jazilah dan Zaki yang membuat aku senantiasa semangat dan bahagia, tak lupa nenekku Syafia*
- 3. Sahabat sejatiku dan saudaraku Muhib, Ma'arif, Mahrus, Andy, Helmy dan Ufis semoga kesuksesan selalu menyertai.*
- 4. Rekanku di MIPA BIOLOGI diantaranya Irma, Didin, Mukijeh, Titik noor, Ila, Yeti, Robby, Mujib, Amin dan Verda yang telah membantu selama penelitian*
- 5. Teman dekatku Ary yang pernah menemani mengetik, terima kasih dan adhikku Numung, Lely, Intan, dan Yulia di PPI ASHRI II terima kasih dan semoga sukses selalu menyertai.*
- 6. Semua yang telah mendoakan dan memberiku semangat serta kasih sayang.*

## DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil penelitian mulai bulan Juli sampai dengan Oktober 2001 di Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA UNEJ. Bersama ini saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum diajukan pada institusi lain

Jember, Mei 2002

Afifa



ABSTRAK

Afifa. Mei 2002. Penapisan Bakteri Penghasil Asam dan Uji Karakteristik Pertumbuhannya pada Medium Nira Kelapa.

Skripsi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

DPU:Drs. Sutoyo, M.Si

DPA:Drs. Rudju Winarsa, M.Kes

Produksi asam asetat yang efektif dan efisien dapat dilakukan dengan menggunakan inokulum Bakteri Asam Asetat (BAA). Untuk Produksi asam asetat menggunakan nira kelapa sebagai mediumnya, diduga akan lebih baik jika menggunakan isolat BAA asal nira kelapa. Penelitian ini dilaksanakan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil asam dari kelompok BAA yang mampu tumbuh pada nira kelapa. Isolasi dan penapisan bakteri penghasil asam dilakukan dengan prosedur yang terdiri dari tahapan isolasi, seleksi dan karakterisasi BAA. Hasil penelitian ini mendapatkan 2 isolat yaitu U1 dan S3 masing-masing berasal dari sampel nira dari daerah yang berbeda. Kedua isolat tersebut memiliki karakteristik seperti BAA dari kelompok genus *Gluconobacter* dan diduga pula sebagai bakteri *E. coli*. Morfologi seluler dan karakteristik fisiologis isolat tersebut yaitu bentuk sel batang, bersifat gram negatif, mampu membentuk asam dari glukosa, tidak mampu membentuk asam dari etanol, tidak melakukan overoksidasi, tidak membentuk DHA dari gliserol, tetapi memiliki aktifitas katalase. Selama uji produksi asam yang dilakukan, pada akhir inkubasi isolat U1 menghasilkan total asam 0,62%, isolat S3 0,53%, dan *A. aceti* 0,47%. Hasil uji produksi asam menunjukkan bahwa isolat asal nira kelapa U1 dan S3 lebih berpotensi dan lebih baik dari pada isolat acuan *A. aceti* jika digunakan sebagai inokulum produksi asam. Karakteristik pertumbuhan kedua isolat selama produksi asam dalam medium nira kelapa adalah perubahan jumlah total bakteri, perubahan pH medium yang semakin menurun, perubahan kadar gula reduksi yang semakin berkurang dan perubahan kadar etanol yang relatif tetap.

Kata kunci: Nira kelapa rusak, penapisan, bakteri penghasil asam, BAA *Gluconobacter*, produksi asam, karakteristik pertumbuhan.

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

Hari : KAMIS  
Tanggal : 27 JUN 2002  
Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan  
Alam Universitas Jember.

Tim Penguji

Ketua

(Drs. Sutoyo, M.Si)  
NIP.131 993 435

Sekretaris

(Drs. Rudju Winarsa, M.Kes)  
NIP. 131 832 331

Anggota I

(Drs. Siswanto, M.Si)  
NIP. 131 046 350

Anggota II

(Dr. Kahar Muzakhar, S.Si)  
NIP. 132 083 605

Mengesahkan

Dekan FMIPA UNEJ



(Ir. Sumadi, M.S)  
NIP. 130 368 784

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena dengan rahmatNya penulis diberi kemampuan untuk menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada Drs. Sutoyo, M.Si sebagai Dosen Pembimbing Utama dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes sebagai Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bantuan fikiran, tenaga serta waktu dengan penuh kesabaran membimbing penulis mulai awal hingga penulisan laporan ini.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan tugas skripsi ini, yaitu Drs. Siswanto, M.Si, dan drh. Wuryanti, M.Si yang telah memberi ijin kepada kami untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium masing-masing. Terima kasih juga kami sampaikan kepada teknisi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia yang telah membantu penulis selama penelitian. Selanjutnya terima kasih penulis sampaikan juga kepada teman-teman yang telah membantu penulis mulai awal hingga akhir penulisan laporan skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dan mampu memberi informasi baru terhadap ilmu pengetahuan khususnya bidang ilmu mikrobiologi industri.

Jember, Mei 2002

Penulis,

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN MOTTO .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN DEKLARASI .....	iv
ABSTRAK .....	v
HALAMAN PENGESAHAN .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	2
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tinjauan Umum Nira Kelapa .....	4
2.2 Proses Mikrobiologi pada Nira Kelapa yang Rusak .....	5
2.3 Pembentukan Asam oleh Mikroorganisme .....	6
2.4 Bakteri Asam Asetat .....	7
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Tempat dan Waktu .....	9
3.2 Alat dan Bahan .....	9
3.2.1 Alat .....	9
3.2.2 Bahan .....	9
3.3 Metode Penelitian .....	10
3.4 Prosedur Penelitian .....	10
3.4.1 Isolasi Bakteri Asam Asetat .....	10
3.4.2 Uji Kemampuan Isolat BAA Menghasilkan Asam pada Medium Nira Kelapa .....	12
3.4.3 Prosedur Analisis .....	13



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme Asal Nira Kelapa ....	17
4.1.1	Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis .....	17
4.1.2	Pembentukan Asam dan Karakteristik Berdasarkan Uji Biokimia .....	18
4.2	Pertumbuhan dan Produksi Asam oleh Isolat bakteri Penghasil Asam pada Medium Nira Kelapa .....	26
4.2.1	Pola Pertumbuhan Isolat Bakteri pada Medium Nira Kelapa .....	26
4.2.2	Pola Produksi Asam .....	27

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan .....	34
5.2	Saran .....	34

DAFTAR PUSTAKA .....	35
----------------------	----

LAMPIRAN .....	37
----------------	----

DAFTAR TABEL

Nomor	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis Mikroorganisme Asal Nira Kelapa .....	17
2.	Hasil Uji Pembentukan Asam dan Uji Biokimia Lainnya Terhadap Isolat Bakteri Asal Nira Kelapa .....	19
<b><u>Lampiran</u></b>		
1.	Komposisi Medium <i>Tomato Peptone Sucrose Salt</i> (TPSS) .....	37
2.	Komposisi Medium Glucose Ethanol Yeast Extract CaCO <sub>3</sub> .....	37
3.	Komposisi Medium Pembentukan Asam dari Etanol .....	37
4.	Komposisi Medium Uji Overoksidasi .....	37
5.	Komposisi Medium Pembentukan Asam dari Glukosa .....	38
6.	Komposisi Medium Pembentukan DHA dari Gliserol .....	38
7.	Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) Isolat U1 dalam Pembuatan Kurva Pertumbuhan .....	38
8.	Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) Isolat S3 dalam Pembuatan Kurva Pertumbuhan .....	38
9.	Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) Isolat <i>A. aceti</i> dalam Pembuatan Kurva Pertumbuhan .....	39
10.	Nilai Absorbansi pada Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	39
11.	Nilai Absorbansi pada Pembuatan Kurva Standar Etanol .....	39
12.	Hasil Perhitungan Jumlah Total Bakteri Selama Uji Produksi Asam .....	40
13.	Hasil Pengukuran pH Medium Selama Uji Produksi Asam .....	40
14.	Hasil Perhitungan Total Asam Selama Uji Produksi Asam .....	40
15.	Hasil Perhitungan Kadar Gula Reduksi Selama Uji Produksi Asam .....	41
16.	Hasil Perhitungan Kadar Etanol Selama Produksi Asam .....	41

DAFTAR GAMBAR

Nomor	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Proses Biokimia Perubahan sukrosa Menjadi Asam Asetat Menurut Prescott dan Dunn (dalam Doerwanto 1993).....	5
2.	Skema Kerja Kegiatan Penelitian .....	16
3.	Morfologi Sel Isolat Bakteri Penghasil Asam Asal Nira Kelapa dan <i>A. aceti</i> yang diamatidengan Pewarnaan Gram .....	18
4.	Pembentukan Asam oleh Isolat Penghasil Asam Asal Nira Kelapa pada Medium GEY CaCO <sub>3</sub> .....	20
5.	Kemampuan Pembentukan Asam dari Glukosa oleh Isolat Bakteri Penghasil Asam Asal Nira Kelapa dan <i>A. aceti</i> .....	22
6.	Kemampuan Pembentukan Asam dari etanol oleh Isolat Bakteri Penghasil Asam Asal Nira Kelapa dan <i>A. aceti</i> .....	23
7.	Kemampuan Overoksidasi oleh Isolat Bakteri Penghasil Asam Asal Nira Kelapa dan <i>A. aceti</i> .....	24
8.	Kemampuan Pembentukan DHA dari Gliserol oleh Isolat Bakteri Penghasil Asam Asal Nira Kelapa dan <i>A. aceti</i> .....	25
9.	Kurva Pertumbuhan Normal Isolat U1 dan S3 dalam Medium Nira Kelapa.....	27
10.	Kurva Pertumbuhan Normal Isolat <i>A. aceti</i> dalam Medium Nira Kelapa .....	27
11.	Pola Perubahan Jumlah Total Bakteri Isolat U1, S3, dan <i>A. aceti</i> Selama Produksi Asam Menggunakan Medium Nira Kelapa .....	29
12.	Pola Perubahan pH Medium Isolat U1, S3, dan <i>A. aceti</i> Selama Produksi Asam Menggunakan Medium Nira Kelapa .....	29
13.	Pola Perubahan Jumlah Total Asam Isolat U1, S3, dan <i>A. aceti</i> Selama Produksi Asam Menggunakan Medium Nira Kelapa .....	30
14.	Pola Perubahan Kadar Gula Reduksi Isolat U1, S3, dan <i>A. aceti</i> Selama Produksi Asam Menggunakan Medium Nira Kelapa .....	31
15.	Pola Perubahan Kadar Etanol Isolat U1, S3, dan <i>A. aceti</i> Selama Produksi Asam Menggunakan Medium Nira Kelapa .....	32
<b><u>Lampiran</u></b>		
1.	Kurva Standar Glukosa .....	41
2.	Kurva Standar Etanol .....	42



## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Nira adalah cairan yang menetes dari tangkai bunga kelapa yang telah dilukai atau dipotong. Manfaat nira antara lain sebagai minuman, bahan baku dalam pembuatan arak dan pembuatan gula kelapa. Nira sebagai bahan baku dalam pembuatan gula kelapa memerlukan perlakuan khusus, salah satunya penyimpanan harus dihindarkan walaupun dalam waktu yang relatif singkat karena nira akan mengalami kerusakan. Gula Kelapa yang berasal dari nira yang mengalami kerusakan merupakan produk yang teksturnya lembek sehingga sulit dicetak, gula yang demikian ini dikategorikan sebagai gula yang berkualitas rendah (Unus, 1988).

Nira rusak umumnya ditemukan pada musim hujan. Kerusakan yang terjadi pada nira disebabkan oleh penyadapan dan pengambilan nira yang tertunda karena hujan. Nira yang rusak akan berubah rasanya dari manis menjadi asam, akibatnya tidak dapat digunakan dalam pembuatan gula kelapa dengan hasil yang baik (Wiyono, Sujito, Ahmad, Imron, Asmoro, 1999).

Hasil penelitian membuktikan bahwa rasa asam pada nira adalah akibat adanya pertumbuhan mikroorganisme yang ada dalam nira kelapa. Selama penyadapan ataupun setelah nira diambil dari penyadapan, mikroorganisme tersebut melakukan aktifitasnya dan akan berakhir setelah kandungan gula dalam nira habis di konversi menjadi alkohol dan asam (Doerwanto, 1993).

Produsen gula kelapa akan mengalami kerugian apabila nira berubah menjadi asam. Produsen gula kelapa umumnya lebih senang membuang nira kelapa yang telah rusak daripada mengolah gula kelapa yang berkualitas rendah. Keadaan ini dapat dimengerti karena para produsen gula kelapa tidak mengetahui penyebab rasa asam pada nira kelapa juga zat kimia yang terkandung didalamnya. Berdasarkan hasil penelitian dan perhitungan secara ekonomis oleh Wiyono, dkk. (1999), nira kelapa dapat dijadikan sebagai bahan dasar dalam produksi asam asetat. Hal ini dikarenakan nira mengandung kadar gula (sukrosa) tinggi yang

dapat diubah oleh mikroorganisme menjadi alkohol dan selanjutnya alkohol diubah menjadi asam asetat.

Menurut Wiyono, dkk. (1999) pembuatan asam asetat menggunakan bahan dasar nira kelapa merupakan proses yang sangat sederhana dan mudah. Proses itu adalah dengan mengumpulkan nira kelapa ke dalam bak fermentasi dan diinkubasi selama beberapa hari sampai mencapai pH rendah. Nira yang terfermentasi, dapat mengandung asam asetat dengan konsentrasi yang cukup tinggi. Untuk mendapatkan nira dengan kandungan asam asetat yang cukup tinggi dan memiliki pH rendah seperti yang diinginkan dapat dilakukan dengan selalu menambahkan nira kelapa secara bertahap ke dalam bak fermentasi. Penambahan nira dihentikan bila pH telah mencapai  $\pm 4$ . Proses produksi dengan teknik diatas menghasilkan produk asam asetat yang tidak terkontrol kualitas dan kuantitasnya, karena proses fermentasi terjadi secara spontan oleh mikroorganisme campuran. Berdasarkan era teknologi saat ini, teknik yang paling efektif dan efisien dalam pembuatan asam asetat adalah dengan penggunaan inokulum murni.

## 1.2 Permasalahan

Nira kelapa yang mengalami kerusakan dengan rasa manis yang berubah menjadi asam sangatlah merugikan produsen gula kelapa. Rasa asam pada nira kelapa adalah karena adanya mikroorganisme yang tumbuh di dalamnya. Keberadaan mikroorganisme pada nira yang mampu menghasilkan asam asetat khususnya Bakteri Asam Asetat (BAA) dapat diisolasi dan diseleksi sehingga akan diperoleh biakan murni yang potensial. Hal ini perlu dilakukan karena BAA merupakan mikroorganisme yang melakukan metabolisme terakhir pada nira kelapa (dalam jalur proses pembentukan asam asetat), dan kadar asam asetat yang ada pada akhir produksi tergantung pada produktifitas dari BAA tersebut. Berdasarkan alasan itu maka perlu dilakukan penapisan BAA pada nira yang telah rusak.

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Melakukan isolasi dan penapisan bakteri penghasil asam dari kelompok BAA asal dari nira kelapa.
2. Mengetahui morfologi seluler dan karakteristik fisiologi bakteri hasil penapisan
3. Menguji pertumbuhan dan kemampuan isolat hasil penapisan dalam memproduksi asam pada medium nira kelapa.

### 1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan akan memberikan informasi mengenai karakteristik bakteri penghasil asam yang hidup dalam nira kelapa serta pola produksinya dalam menghasilkan asam. Isolat bakteri penghasil asam asal nira kelapa jika diketahui sebagai BAA akan digunakan sebagai inokulum dalam produksi asam asetat menggunakan bahan dasar nira kelapa seperti yang diharapkan. Cara seperti ini akan membuat nira kelapa semakin meningkat nilai ekonominya jika hasilnya dapat dikembangkan untuk produksi asam asetat skala industri.



## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Umum Nira Kelapa

Nira kelapa adalah cairan yang berasal dari penyadapan pada tangkai bunga kelapa yang dipotong. Pada saat baru panen dalam keadaan segar, nira rasanya manis, tidak berwarna dan berbau harum. Rasa manis pada nira disebabkan oleh adanya kandungan sukrosa yang cukup tinggi (Doerwanto, 1993). Nira dapat dihasilkan oleh berbagai tanaman palma antara lain kelapa, aren, lontar, dan juga tebu (Unus, 1998). Menurut Wiyono, dkk. (1999) sukrosa yang ada pada nira kelapa berkisar antara 8-21 %.

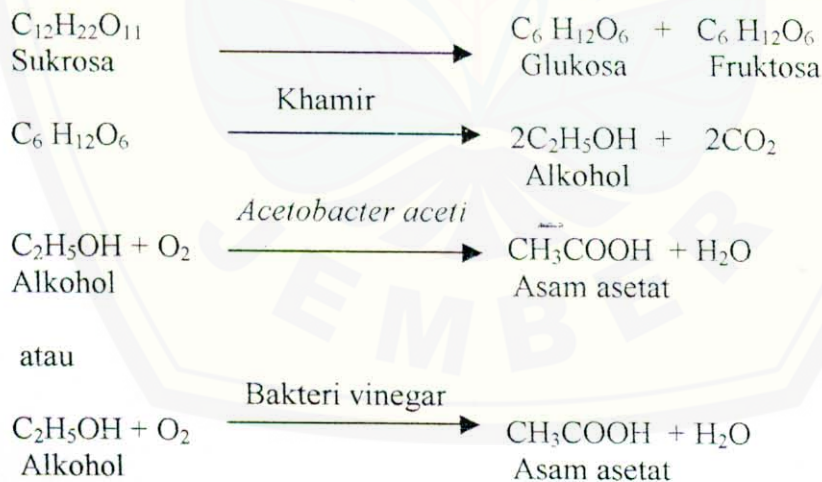
Menurut Doerwanto (1993) hasil penyadapan nira kelapa dipengaruhi oleh banyak faktor, misalnya umur tanaman, ada tidaknya hama penyakit, keadaan tanah serta keadaan iklim. Pada musim hujan hasil yang akan diperoleh lebih sedikit bila dibandingkan dengan saat musim kemarau. Masuknya air hujan pada tempat penyadapan dan adanya pengambilan nira yang tertunda karena hujan, menyebabkan kegagalan panen nira. Kegagalan nira tersebut karena pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme fermentatif yang mengkontaminasi ke dalam nira bersamaan dengan masuknya air hujan.

Menurut Setyamidjaya (dalam Doerwanto, 1993) setiap 100 ml nira kelapa terdiri dari bahan-bahan penyusun yaitu bahan padat 15,200 – 19,700 gr, sukrosa 12,200-17,400 gr, kadar abu 0,11 – 0,41 gr, protein 1,230 gr, dan kandungan paling tinggi yaitu vitamin C dengan berat 16.000 - 32. 000 gr. Komposisi bahan penyusun nira kelapa ternyata mengandung sukrosa yang cukup tinggi. Adanya kandungan sukrosa yang cukup tinggi ini mengakibatkan dalam proses penyadapan sangat tidak diharapkan zat ini berubah, terutama jika digunakan sebagai bahan dasar pembuatan gula kelapa. Hal ini dikarenakan jika terjadi perubahan pada kandungan sukrosa maka akan mempengaruhi kualitas produk akhir gula kelapa yang diperoleh. Gula kelapa yang biasanya keras dan padat berubah menjadi lembek. Sehingga keadaan gula kelapa yang kualitas rendah ini sangat merugikan produsen nira kelapa (Unus, 1998).

## 2.2 Proses Mikrobiologi pada Nira Kelapa yang Rusak

Nira yang baru menetes dari tangkai bunga kelapa yang telah dilukai dan dilakukan penyadapan, menghasilkan nira kelapa yang mempunyai pH  $\pm 7$  dan kadar sukrosa tinggi antar 8-21 %. Kondisi ini dapat berubah karena faktor lingkungan sekitarnya. Keadaan lingkungan yang tidak steril menyebabkan secara spontan oleh mikroorganisme mengkontaminasi nira kelapa, akibatnya adalah nira kelapa menjadi rusak. Mikroorganisme dalam nira melakukan fermentasi yang menyebabkan perubahan susunan kimiawi nira, sehingga dalam tahap selanjutnya pH nira kelapa menjadi menurun (Wiyono dkk., 1999).

Selain hal tersebut mikroorganisme yang mampu tumbuh pada nira dapat mengubah rasa maupun bau. Berbagai jenis mikrob menggunakan nira sebagai substrat untuk pertumbuhannya. Berdasarkan hasil penelitian mikroorganisme yang ada pada nira kelapa antara lain yaitu khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) dan BAA yaitu *Acetobacter aceti* (Hartanti, 1988). Prescott dan Dunn (dalam Doerwanto 1993) lebih lanjut menjelaskan bahwa nira mengalami perubahan menjadi asam disebabkan adanya proses biokimia seperti tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Proses Perubahan Sukrosa Menjadi Asam Asetat Secara Biokimia Menurut Prescott dan Dunn (dalam Doerwanto 1993)

Proses biokimia seperti tersebut diatas belum dapat diketahui jenis mikroorganisme yang mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Menurut



Unus (1988) menyatakan bahwa khamir (*S. cerevisiae*) yang menghasilkan enzim invertase dan mengubah sukrosa menjadi bentuk glukosa dan fruktosa.

### 2.3 Pembentukan Asam oleh Mikroorganisme

Menurut Schlegel dan Schmidt (1994) menyatakan bahwa banyak alur yang menghantarkan glukosa ke senyawa C3 diantaranya salah satu senyawa metabolisme intermedial yang terpenting yaitu asam piruvat. Volk dan Wheeler (1993) menjelaskan bahwa peranan asam piruvat sangat penting dalam pembentukan berbagai macam asam

Berdasarkan Unus (1996) asam piruvat hasil pemecahan glukosa merupakan senyawa penting, karena senyawa tersebut dapat diubah menjadi senyawa lain. Bentuk senyawa- senyawa yang dihasilkan diantaranya asam laktat, etanol, asam formiat, asam butirrat, dan asam propionat.

Mikroorganisme yang melakukan fermentasi asam laktat terutama bakteri asam laktat. Bakteri ini berdasarkan tipe fermentasinya ada dua macam, yaitu: homofermentatif yang produk fermentasinya yang terbesar adalah 90% asam laktat, dan heterofermentatif yang menghasilkan asam kurang dari 90%. Hasil lain dari fermentasi dapat berupa asam asetat, etanol dan CO<sub>2</sub>. Bakteri asam laktat homofermentatif misalnya *Streptococcus faecalis* dan *S. licuifaciens* sedangkan yang termasuk heterofermentatif misalnya *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* dan *L. pentoaceticum*.

Proses pembentukan asam formiat sering disebut fermentasi asam formiat. Reaksi ini menghasilkan produk sampingan berupa CO<sub>2</sub>, asam asetat dan etanol. Jenis mikroorganisme yang berperan adalah bakteri coliform. Mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi asam butirrat adalah *Clostridium butyricum*, *C. welchii*, *C. pasteurianum*, dan *C. acetobutylicum*. Fermentasi asam butirrat menghasilkan produk berupa CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, asam asetat dan butadiol. Pembentukan asam propionat menghasilkan produk sampingan berupa asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Jenis mikroorganisme yang melakukan fermentasi ini adalah *Propionibacterium sp.*

## 2.4 Bakteri Asam Asetat

Berbagai macam bakteri penghasil asam banyak terdapat di alam, tanah, hasil pertanian mentah maupun bentuk olahannya. Produksi asam asetat merupakan salah satu yang terpenting diantara produksi asam lainnya yang dilakukan oleh bakteri (Sudarmadji, Kasmidju, Sarjodjono, Wibowo, Margio, Rahayu, 1989). Meskipun asam asetat diproduksi oleh berbagai jenis bakteri fermentasi, tetapi hanya anggota kelompok tertentu yang khusus digunakan dalam produksi. BAA dibagi dalam 2 genus yaitu *Gluconobacter* dan *Acetobacter*. *Gluconobacter* dan *Acetobacter* mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. *Acetobacter* termasuk kelompok overoksidasi, sehingga mampu mengoksidasi etanol atau alkohol menjadi asam asetat dan merubah lebih lanjut asam asetat menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O (Crueger dan Crueger, 1984).

Genus *Acetobacter* memiliki ciri yaitu bentuk selnya batang, lurus atau sedikit bengkok, ukuran 0,6-0,8 µm dengan panjang 1,0-4,0 µm, tunggal, berpasangan atau bentuk rantai, bergerak dengan flagela yang ada di seluruh permukaan sel atau lateral. Bakteri ini bersifat Gram negatif kadang-kadang Gram-variabel (berganti dari negatif ke positif), aerob sejati dengan warna koloni pucat, jarang membentuk pigmen. *Acetobacter* bersifat katalase positif, mengoksidasi etanol menjadi asam asetat dan selanjutnya asam asetat dioksidasi tuntas menjadi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Sumber senyawa karbon yang paling baik untuk pertumbuhannya adalah etanol, gliserol, dan laktat. *Gluconobacter* menyukai substrat gula, akan tetapi *Acetobacter* lebih menyukai substrat beralkohol dari pada gula. *Acetobacter* hidup pada suhu optimum 25-30 °C dan pH optimum 5,4- 6,3. Isolat yang sering digunakan adalah *Acetobacter aceti*, *A. peroxidans*, *A. pasteurians* (Sudarmadji dkk., 1989).

*Gluconobacter* memiliki ciri yaitu bentuk *elipsoid* sampai batang, ukuran lebar 0,5 - 0,8 µm dan panjang 0,9 - 4,2 µm, sendiri atau berpasangan, jarang bergandengan membentuk rantai, bersifat Gram negatif kadang variabel, motil dan non motil, jika motil pada selnya memiliki satu flagela. Bakteri ini bersifat aerob mutlak dengan warna koloni pucat atau tidak berwarna, aktifitas katalase positif kuat, dapat mengoksidasi etanol menjadi asam asetat, tetapi tidak dapat

meneruskan oksidasi asetat menjadi  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$ . *Gluconobacter* untuk pertumbuhannya memiliki suhu optimum 25-30 °C dan pada suhu 37°C sudah tidak ada pertumbuhan lagi. Sedangkan pH optimum 5,5-6,0 namun kebanyakan jenis dapat tumbuh sampai pH 3,6. Isolat yang biasa di gunakan dalam produksi adalah *Gluconobacter oxydans* dan beberapa sub species lainnya (Sudarmadji dkk., 1989).





### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi dan Laboratorium Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Jember. Pengambilan sampel nira kelapa dilaksanakan di Desa Sabrang kecamatan Ambulu Kabupaten Jember dan dari Desa Umbulsari Kecamatan Umbulsari Kabupaten Jember. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai dengan bulan Oktober 2001.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu ukur, labu Erlenmeyer, gelas ukur, biuret, pipet volume, pH meter, tabung reaksi, timbangan, cawan Conway, jarum ose, lampu Bunsen, spektrofotometer, alat semprot, *vortek*, *shaker*, pipet mikro dan pipet tetes.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah medium agar *Tomato Pepton Sucrose Salt* (TPSS) (Tabel lampiran 1), *Glucose Ethanol Yeast Extract* (GEY)  $\text{CaCO}_3$  (Tabel Lampiran 2), medium yang mengandung etanol (Tabel Lampiran 3), medium uji overoksidasi (Tabel Lampiran 4), medium glukosa (Tabel Lampiran 5), medium gliserol (Tabel Lampiran 6). Bahan lain yang digunakan adalah larutan phenoftalein 1%, larutan uji Gram, NaOH 0,1 N, reagen kalium dikromat, reagen kalium karbonat, larutan Dinitro Salicyl Acid (DNS), aquades steril, nira kelapa (dari Desa Sabrang Kecamatan Ambulu Kabupaten Jember dan dari Desa Umbulsari Kecamatan Umbulsari Kabupaten Jember), alkohol 70 % dan isolat *Acetobacter aceti* dari PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode deskriptif yang terdiri dari dua tahap. Tahap pertama yaitu penapisan bakteri penghasil asam kelompok BAA asal dari nira kelapa dengan cara isolasi, melihat gambaran, ciri morfologi seluler dan karakteristik fisiologi dari isolat hasil penapisan. Isolat yang dipilih kemudian diuji kemampuannya menghasilkan asam menggunakan medium uji pembentukan asam dari glukosa dan etanol, uji overoksidasi, pembentukan DHA (dihydroxyacetone) dari gliserol serta uji kataiase. Tahap kedua menguji karakteristik pertumbuhan isolat hasil penapisan tersebut menggunakan medium nira kelapa untuk mengetahui pola produksi asam. Skema kerja kegiatan penelitian dapat dilihat pada gambar 2. Pada produksi asam tersebut akan dianalisis mengenai perubahan-perubahan yang terjadi pada medium produksinya. Perubahan-perubahan tersebut antara lain jumlah total bakteri, derajat keasaman (pH) medium, total asam, kadar gula reduksi, dan kadar etanol yang akan digambarkan dengan bentuk grafik.

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Isolasi Bakteri Asam Asetat

Isolasi dilakukan pada nira kelapa dari alam yang sudah terfermentasi secara spontan selama beberapa hari dan belum mendapatkan perlakuan atau penambahan bahan aditif apapun. Sebelum diisolasi nira kelapa diencerkan secara bertingkat dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-7}$  dengan cara mengambil 1 ml nira kelapa dan ditambahkan ke dalam 9 ml garam fisiologis sehingga diperoleh suspensi dengan pengenceran  $10^{-1}$ . Hasil pengenceran  $10^{-1}$  di vortek dan diambil 1 ml kemudian ditambahkan ke dalam 9 ml garam fisiologis sehingga diperoleh suspensi dengan pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran dilakukan hingga  $10^{-7}$ . Pengenceran  $10^{-4}$  sampai  $10^{-7}$  ditanam pada media agar TPSS dengan metode spread plate sebanyak 2 kali ulangan (duplo). Setelah itu diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 24 – 48 jam. Tiap-tiap koloni yang tumbuh terpisah dan berbeda kenampakannya kemudian dipelihara pada medium yang sama yaitu TPSS.

Semua isolat yang diperoleh dengan karakter yang bervariasi tersebut kemudian diuji dengan pengecatan Gram. Isolat yang diketahui bersifat Gram negatif, kemudian diinokulasi menggunakan jarum ose pada medium GEY  $\text{CaCO}_3$ . Inokulasi tersebut dilakukan dengan cara mengambil sedikit sel bakteri pada tiap-tap koloni yang berbeda, kemudian ditanam pada satu titik. Sebagai acuan ditanam juga isolat *A. aceti* pada tiap-tiap cawan petri. Setelah itu semua cawan diberi label dan diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 24 - 48 jam. Isolat bakteri yang menghasilkan zona jernih disekitar koloninya kemudian diinokulasi kembali ke dalam medium agar miring GEY  $\text{CaCO}_3$ . Setelah terjadi pertumbuhan selama 24 sampai 48 jam kemudian dilakukan uji selanjutnya yaitu uji pembentukan asam dari glukosa dan etanol, overoksidasi, pembentukan DHA dari gliserol serta katalase.

Uji katalase dilakukan dengan mengambil sedikit biakan tiap-tiap isolat dan diletakkan pada kaca benda, kemudian ditambahkan 2-3 tetes  $\text{H}_2\text{O}_2$ , amati adanya gelembung gas. Uji lainnya dilakukan dengan cara penanaman isolat pada medium yang mengandung glukosa, etanol, gliserol serta medium uji overoksidasi. Setelah terjadi pertumbuhan diamati dan dicatat perubahan yang terjadi disekitar koloni untuk tiap-tiap medium uji tersebut. Pembentukan asam dari medium glukosa dan etanol ditandai dengan adanya zona jernih sekitar koloni, dan adanya overoksidasi ditandai dengan warna kuning oranye sekitar koloni kembali menjadi warna hijau seperti mediumnya, pembentukan DHA dari medium yang mengandung gliserol ditandai dengan adanya warna kuning oranye jika medium dituangi larutan fehling, serta bakteri bersifat katalase positif jika terbentuk gelembung gas setelah ditambahkan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Semua isolat yang telah diuji dicatat hasilnya, kemudian diuji lebih lanjut aktifitasnya dalam menghasilkan asam menggunakan medium nira kelapa.

### 3.4.2 Uji Kemampuan Isolat BAA Menghasilkan Asam pada Medium Nira Kelapa

#### a. Preparasi Medium Nira

Nira sebanyak 300 ml dari alam disaring kemudian dimasukkan ke dalam 3 erlemeyer 250 ml dengan volume masing-masing 90 ml. Selanjutnya nira dipasteurisasi pada suhu 60-75 °C selama 20 menit. Medium ini siap untuk digunakan sebagai pembuatan inokulum.

#### b. Pembuatan Inokulum

Biakan murni (2 isolat) hasil seleksi dan bakteri *A. aceti* sebagai acuan ditumbuhkan dalam medium TPSS Broth dan agar miring GEY CaCO<sub>3</sub> kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Biakan dalam medium miring selanjutnya disimpan dalam lemari es sedangkan pada medium TPSS Broth digunakan sebagai bahan inokulum.

Biakan yang tumbuh dalam TPSS Broth sebanyak 10 ml diinokulasikan ke dalam medium nira kelapa yang telah dipasteurisasi kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C (suhu kamar) menggunakan shaker dengan goncangan 120 rpm permenit. Selama inkubasi, dilakukan perhitungan pertambahan jumlah sel bakteri per ml sampel.

Perhitungan sel bakteri dilakukan setiap 6 jam selama inkubasi. Pengambilan sampel dimulai jam ke-0 sampai jam dimana jumlah sel bakteri semakin menurun atau mencapai fase kematian. Sampel diencerkan mulai pengenceran 10<sup>-1</sup> hingga 10<sup>-7</sup>. Perhitungan jumlah sel bakteri dilakukan pada pengenceran 10<sup>-4</sup> sampai 10<sup>-7</sup> dengan metode hitungan cawan. Setelah itu mencatat seluruh hasil perhitungan jumlah bakteri pada tiap-tiap pengenceran kemudian dibuat kurva pertumbuhan.

#### c. Uji Produksi Asam

Disediakan 3 erlemeyer 1500 ml, kemudian masing-masing diisi medium nira kelapa 450 ml dan dipasteurisasi pada suhu 60 – 70 °C. Inokulum isolat hasil penapisan dan *A. aceti* sebanyak 50 ml dimana telah memasuki fase logaritmik atau mengandung ± 10<sup>7</sup> cfu/ml, masing-masing ditambahkan kedalam 450 ml medium produksi (nira kelapa) yang telah dipersiapkan, kemudian diinkubasi

pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  dalam shaker dengan 120 rpm permenit selama 7 hari. Sampel diambil setiap 24 jam sebanyak 40 ml untuk dianalisa mengenai derajat keasaman (pH), kadar alkohol, total asam dan jumlah sel bakteri. Pengambilan sampel dan analisa dilakukan mulai hari ke-0 sampai hari ke-7. Hasil yang diharapkan berupa grafik pola produksi asam dari 2 macam isolat hasil penapisan.

### 3.4.3 Prosedur Analisis

#### a. Analisis pH (3320 JENWAY)

Kalibrasi alat dilakukan sebelum digunakan pertama power saklar ditekan dan dibiarkan selama 15 menit, kemudian elektroda dikeringkan dengan kertas tissue. Memasukkan elektroda ke dalam larutan pH 5,0 dan ditunggu hingga mencapai angka 5 dengan cara menekan enter setelah muncul grafik. Selanjutnya elektroda dicuci dengan aquades dan dibersihkan dengan kertas tissue kemudian dimasukkan kedalam pH 7,0 dan 9,0 secara bergantian. Mengeluarkan elektroda dari larutan buffer, kemudian dicuci dengan aquades dan mengeringkannya dengan tissue, selanjutnya alat siap digunakan. Caranya adalah dengan memasukkan elektroda ke dalam sampel yang akan diukur, setelah muncul grafik tekan enter kemudian membaca angka pada layar.

#### b. Analisis Kadar Gula Reduksi Metode DNS (Muller, 1959)

Membuat larutan standar glukosa (mg/ml) dengan konsentrasi 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1. Selanjutnya mengambil 1 ml masing-masing larutan standar, dimasukkan dalam tabung yang bersih, ditambahkan 1 ml aquades steril dan 3 ml larutan DNS, kemudian divortek sampai homogen. Masing-masing tabung ditutup dan diletakkan dalam penangas air mendidih sampai 15 menit. Setelah dingin, kemudian dilihat absorbansinya pada spektrofotometer 575 nm. Selanjutnya membuat grafik kurva standar sehingga didapatkan persamaan garis linier.

Penentuan absorbansi larutan sampel menggunakan langkah yang sama dengan penentuan larutan standar perhitungan kadar gula reduksi menggunakan persamaan linier kurva standar. Jumlah gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan kerapatan optik (Optical Density/ OD) larutan sampel dan kurva standar larutan glukosa.



Komposisi larutan DNS ialah DNS 10 gram, Phenol 2 gram,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 gram, NaOH 10 gram, K Na tartat 1,82 gram, seluruh komposisi tersebut ditambah aquades hingga 1000 ml.

### c. Analisis kadar etanol metode Conway (Mulyadi, 1984)

#### 1. Pembuatan reagen

- 1) Pembuatan reagen kalium dikromat dengan cara kalium dikromat sebanyak 4,904 gram dilarutkan dalam aquades sebanyak 100 ml, ditempatkan dalam water bath  $0-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kemudian ditambahkan secara bertahap 278 asam sulfat pekat dan diencerkan sampai menjadi 1000 ml.
- 2) Pembuatan reagen kalium karbonat jenuh dilakukan dengan cara kalium karbonat sebanyak 465 gram dilarutkan dalam 300 ml aquades dan dipanaskan.

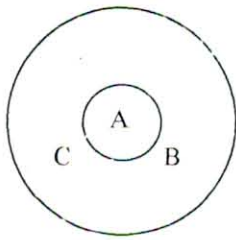
#### 2. Penentuan kadar etanol

- 1) Membuat kurva standar dengan cara pertama membuat etanol standar dengan konsentrasi 0,00%, 0,005%, 0,025%, 0,050%, 0,075%, 0,1%. Kemudian cawan Conway dibersihkan dan dikeringkan, pada tepi penutupnya dioleskan vaselin. Selanjutnya memasukkan 1 ml reagen kalium dikromat pada A dan 1ml reagen kalium karbonat pada B serta 1 ml etanol standar pada C (A, B dan C dapat dilihat pada gambar cawan Conway). cawan Conway ditutup dengan cepat dan diinkubasi pada suhu  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Setelah itu larutan yang ada pada A diambil semua dan diencerkan menjadi 10 ml dengan aquades, kemudian diamati dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 480 nm.
- 2) Penentuan kadar etanol dalam suatu larutan sampel prosedurnya sama dengan membuat kurva standar, hanya 1ml etanol diganti dengan 1 ml sampel pada C. Untuk rumus perhitungan kadar etanol yaitu:

$Y = A + BX$  dimana  $X$  = kadar etanol

$A, B$  = Koefisien garis regresi

$Y$  = Absorbansi



Gambar cawan Conway dilihat dari atas

**d. Analisis Total Asam (Cappucino & Sherman, 1996)**

Mengambil sampel sebanyak 10 ml kemudian ditambah aquades 10 ml dalam erlemeyer 50 ml. Ditambahkan 5 tetes phenefalein 1 % kedalam larutan tersebut, kemudian dilakukan titrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N. Setelah itu menghitung volume NaOH yang di butuhkan sampai terbentuknya warna merah jambu.

Prosentase total asam dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ asam asetat} = \frac{N \text{ NaOH} \times \text{ml NaOH} \times 60,05}{\text{Berat sampel (gram)}} \times 100\% \text{ atau}$$

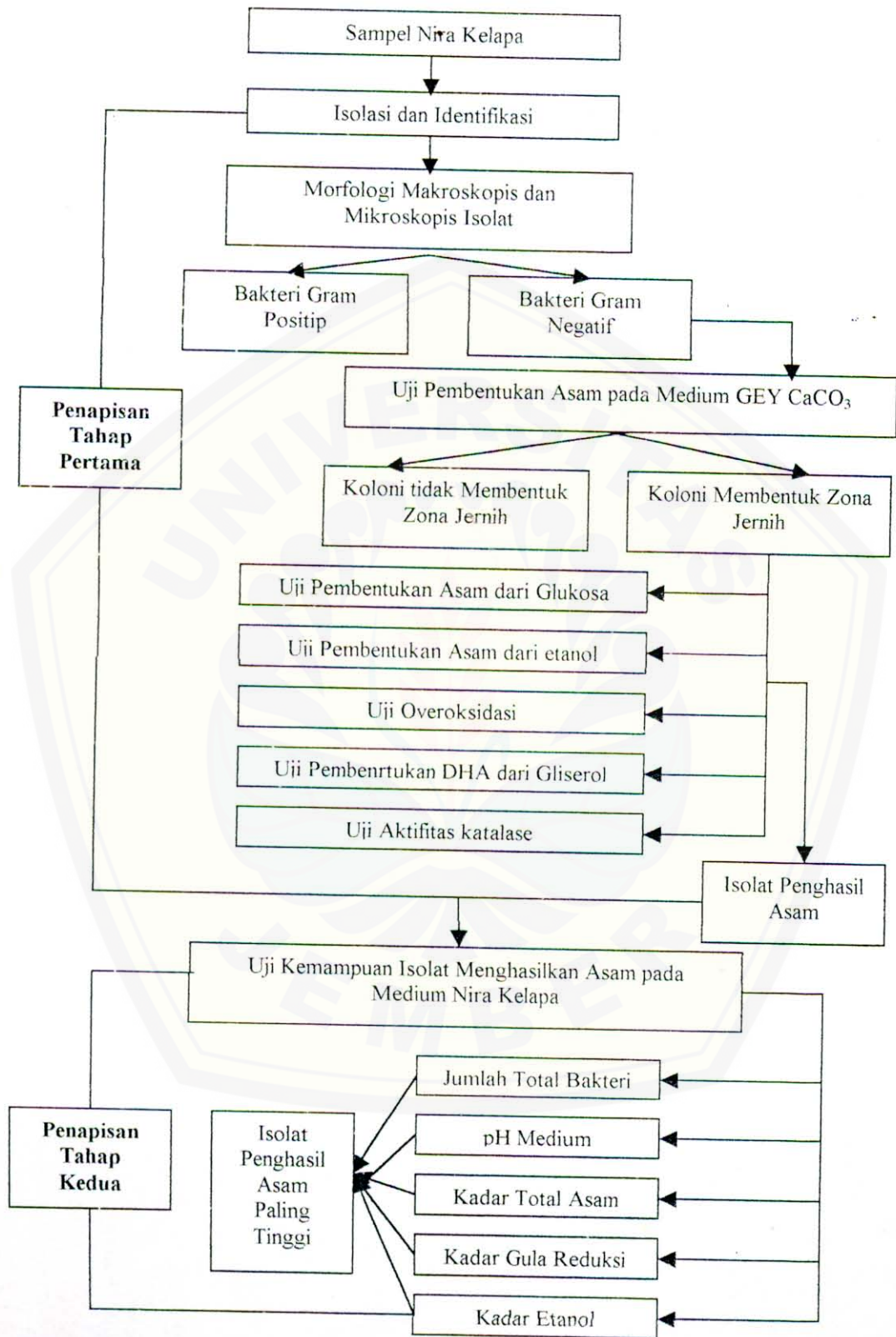
$$\% \text{ asam asetat} = \frac{N \text{ NaOH} \times \text{ml NaOH} \times 6,0}{\text{Berat sampel (gram)}}$$

Keterangan: N = Normalitas  
 60,05 = Berat molekul asam asetat  
 1gram = 1ml

**e. Perhitungan Jumlah Total Bakteri Metode Hitungan Cawan (Fardiaz,1993)**

Sampel diencerkan hingga  $10^{-7}$ , kemudian tingkat pengenceran  $10^{-4}$  sampai  $10^{-7}$  ditanam dengan metode taburan (spread plate) pada permukaan medium GEY  $\text{CaCO}_3$ . Penanaman dilakukan secara duplo untuk tiap pengenceran, selanjutnya diinkubasi pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selam 24-48 jam. Menghitung jumlah koloni dengan zona jernih disekitar koloninya. Kemudian menghitung jumlah total bakteri dalam cfu/ml dengan rumus sebagai berikut:

$$\Sigma \text{ bakteri per ml sampel} = \frac{\text{Jumlah koloni per cawan}}{\text{Jumlah volume sampel yang diinokulasikan}} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$



Gambar 2. Skema Kerja Kegiatan Penelitian



### 5.1 Kesimpulan

Penapisan bakteri penghasil asam dari kelompok BAA diperoleh 2 isolat dari lokasi desa yang berbeda yaitu isolat U1 asal Desa Umbulsari Kecamatan Umbulsari dan S3 asal Desa Sabrang Kecamatan Ambulu Kabupaten Jember. Kedua isolat tersebut memiliki karakteristik yang sama yaitu bentuk sel batang, bersifat Gram negatif, mampu menghasilkan asam dari sumber karbon glukosa, tumbuh tetapi tidak menghasilkan asam dari sumber karbon etanol, tidak melakukan overoksidasi dan tidak membentuk DHA dari gliserol, tetapi memiliki aktifitas katalase. Isolat U1 dan S3, keduanya diduga BAA dari kelompok genus *Gluconobacter* dan *E. coli*. Pertumbuhan kedua isolat selama produksi asam menggunakan medium nira kelapa, menunjukkan potensi lebih baik dari pada *A. aceti* sebagai isolat acuan..

### 5.2 Saran

Isolat hasil penapisan asal nira kelapa yang diduga BAA dari kelompok genus *Gluconobacter* dan *E. coli*, perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan berbagai uji yang lebih akurat. Untuk mengetahui keberadaan potensi isolat U1 dan S3 secara nyata, maka dalam produksi asam sebaiknya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode statistik. Untuk total asam yang dihasilkan perlu dianalisis dengan teknik yang lebih canggih antara lain dengan kromatografi cair gas.

DAFTAR PUSTAKA

- Cappucinno, J. G. and N. Sherman. 1996. *Microbiology A laboratory Manual*. Addison – Wesley Publishing Company. London.
- Crueger, W. and A. Crueger. 1984, *Biotechnology A Textbook Of Industrial Microbiology*. Science Tech. America.
- Cullimore, D. R. 2000. *Practical Atlas for Bacterial Identification*. Lewis. USA.
- Doelle, H. W. 1969. *Bacterial Metabolism*. Academic Press. New York.
- Doerwanto, B. 1993. *Pengaruh Proses Defikasi pada Awal Pembuatan Gula Kelapa Terhadap Penerimaan Nilai Organoleptik*. Politeknik Pertanian Universitas Jember. Jember.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Hartanti, S. 1998. *Pembuatan Minyak Secara Fermentasi dengan Nira Kelapa dan Krim Kelapa*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Jember.
- Holt, J. G., R. N. Krieg, p. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins A Waverly Company. USA.
- Muller, G.I. 1959. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagen Metode for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry.
- Mulyadi, T. S. 1984. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Industri untuk Perguruan Tinggi*. laboratorium Mikrobiologi F Biologi UGM. Yogyakarta.
- Pudjiraharti, S., O. Suwaryono, B. Sofia, A.T. Karossi . 1998. *Pemanfaatan Air Kelapa Sebagai Medium untuk Produksi Asam Asetat dari Etanol oleh Acetobacter aceti*. Buletin IPT, No 4 Vol IV Oktober/ Nofember 1998.
- Santoso, I. 1994. *Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria from Flowers and Cuka Aren (Aren Vinegar)*. Departement of Faculty of Matematics and Natural Sciences University of Indonesia. Depok- Indonesia.
- Santoso, I. 1995. *Bakteri Asam Asetat*. Makalah disampaikan dalam Penelitian Peningkatan Kemampuan Mengajar Mata Kuliah Mikrobiologi di Jurusan Biologi F. MIPA UI 21 – 23 Agustus 1995. Jakarta.
- Schlegel, H. G. and K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Sudarmadji, S., R. Kasmidju, Sarjodjono, D. Wibowo, S. Margio, E. S. Rahayu. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: Proyek Pengembangan Pusat Fasih

- Suriawiria, U. 1996. *Mikrobiologi Air*. Alumni. Bandung
- Svehla, G. 1990. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Kalman Media Pustaka. Jakarta.
- Unus. 1988. *Pengaruh Pengawetan Nira terhadap Kualitasnya selama Penyimpanan*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Jember.
- Volk and Wheeler. 1993. *Mikrobiologi Dasar* (terjemahan). Erlangga. Jakarta.
- Wijono, D., B. Haryono, dan Sarjono. 1983. *Kinetika Mikroba dan Fermentasi*. Jurusan Pengolahan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wiyono, T. H., Sujito, H. Ahmad, I. Rosyidi, A. Lelono. 1999. *Pemanfaatan Limbah Nira Kelapa Sebagai Bahan Baku Pembuatan Nata de Coco*. Makalah Seminar dalam Rangka Dies natalis Universitas Jember 1999.





**Tabel Lampiran 1. Komposisi Medium *Tomato Peptone Sucrose Salt* (TPSS) Agar**

Bahan	Jumlah (%)
Perasan Tomat	25 %
Pepton	0,5 %
Ekstrak Yeast	0,3 %
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 %
NaCl	0,01 %
Sukrosa	10 %
Agar	2 %
Aquades steril	1000 cc

**Tabel Lampiran 2. Komposisi Medium Glucosa Ethanol Yeast Extract CaCO<sub>3</sub> (GEY CaCO<sub>3</sub>)**

Bahan	Jumlah (%)
Glukosa	2 %
Etanol	5 %
Ekstrak Yeast	0,5 %
CaCO <sub>3</sub>	2 %
Agar	2 %
Aquades Steril	1000 cc

**Tabel Lampiran 3. Komposisi Medium Pembentukan Asam dari Etanol**

Bahan	Jumlah(%)
Etanol	5 %
Ekstrak Yeast	0,5 %
CaCO <sub>3</sub>	2 %
Agar	2 %

**Tabel lampiran 4. Komposisi Medium Uji Overoksidasi**

Bahan	Jumlah (%)
Etanol	5 %
Ekstrak Yeast	3 %
Agar	2 %
Bromocresol Green	0,1 % (2,2 % dalam larutan etanol)



**Tabel Lampiran 5. Komposisi Medium Pembentukan Asam dari Glukosa**

Bahan	Jumlah (%)
Glukosa	2 %
Ekstrak Yeast	0,5 %
CaCO <sub>3</sub>	2 %
Agar	2 %

**Tabel Lampiran 6. Komposisi Medium Pembentukan DHA dari Gliserol**

Bahan	Jumlah (%)
Ekstrak Yeast	0,5 %
Agar	2%
Gliserol	2%

**Tabel Lampiran 7. Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) Isolat U1 dalam Pembuatan Kurva Pertumbuhan**

Waktu Inkubasi (jam)	log	Angka
0	8.73239376	5.40E+08
6	8.071882007	1.18E+08
12	8.230448921	1.70E+08
18	8.804820679	6.38E+08
24	8.556302501	3.60E+08
30	8.322219295	2.10E+08
36	7.84509804	7.00E+07
42	7.77815125	6.00E+07

**Tabel Lampiran 8. Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) isolat S3 dalam Pembuatan Kurva Pertumbuhan**

Waktu Inkubasi (jam)	Log	Angka
0	8.77815125	6.00E+08
6	7.989004616	9.75E+07
12	8.962842681	9.18E+08
18	8.788875116	6.15E+08
24	7.916453949	8.25E+07
30	8.079181246	1.20E+08
36	8.187520721	1.54E+08
42	7.556302501	3.60E+07

**Tabel Lampiran 9. Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) Isolat *A. aceti* dalam Pembuatan Kurva Pertumbuhan**

Waktu Inkubasi (jam)	log	Angka
0	8.346352974	2.22E+08
3	8.475671188	2.99E+08
6	8.462397998	2.90E+08
9	8.146128036	1.40E+08
12	8.187520721	1.54E+08
15	8.350248018	2.24E+08
18	8.641474111	4.38E+08
21	8.123851641	1.33E+08
24	8	1.00E+08
27	7.795880017	6.25E+07

**Tabel Lampiran 10. Nilai Absorbansi pada Pembuatan Kurva Standar Glukosa**

Kadar Etanol (%)	Absorbansi
0	407
0.005	384
0.025	319
0.05	277
0.075	240
0.1	169

**Tabel Lampiran 11. Nilai Absorbansi pada Pembuatan Kurva Standar Etanol**

Kadar Glukosa mg/ml	Absorbansi
0	10
0.1	11
0.2	104
0.4	242
0.6	395
0.8	552
1	680

**Tabel Lampiran 12. Hasil Perhitungan Jumlah Total Bakteri (cfu/ml) Selama Produksi Asam**

Waktu Inkubasi (hari)	Isolat U1	Isolat S3	Isolat <i>A. aceti</i>
0	1.34E+07	9.70E+07	4.00E+07
1	6.88E+08	3.78E+08	7.00E+06
2	3.08E+08	4.73E+08	3.50E+07
3	2.44E+08	6.40E+08	1.50E+06
4	2.23E+08	2.70E+08	2.75E+06
5	2.50E+08	2.63E+08	2.50E+07
6	2.76E+08	2.13E+08	5.00E+06
7	1.24E+08	1.80E+08	5.00E+05

**Tabel Lampiran 13. Hasil Pengukuran pH Medium Selama Produksi Asam**

Waktu Inkubasi (hari)	Isolat U1	Isolat S3	Isolat <i>A. aceti</i>
0	4.35	4.38	4.38
1	4.16	4.14	4.36
2	3.93	4.05	4.29
3	3.76	3.83	4.04
4	3.67	3.75	3.87
5	3.67	3.72	3.74
6	3.6	3.7	3.68
7	3.55	3.7	3.56

**Tabel Lampiran 14. Hasil Perhitungan Total Asam (%) Selama Produksi Asam**

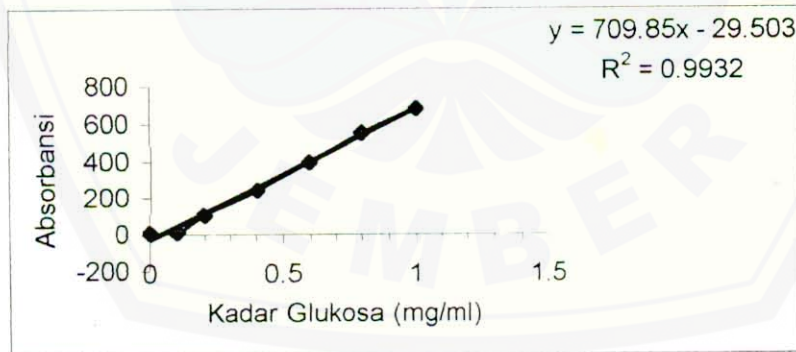
Waktu inkubasi (hari)	Isolat U1	Isolat S3	Isolat <i>A. aceti</i>
0	0.156	0.15	0.138
1	0.333	0.279	0.153
2	0.444	0.372	0.213
3	0.501	0.414	0.294
4	0.543	0.459	0.339
5	0.585	0.486	0.375
6	0.606	0.513	0.411
7	0.624	0.531	0.471

**Tabel Lampiran 15. Hasil Perhitungan Kadar Gula Reduksi (mg/ml) Selama Produksi Asam**

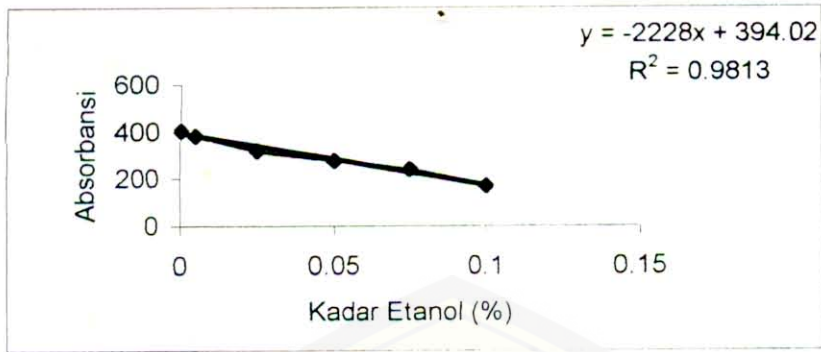
Waktu Inkubasi (hari)	Isolat U1	Isolat S3	Isolat <i>A. aceti</i>
0	14.86	15.29	16.55
1	14.16	14.58	16.27
2	13.59	14.16	15.99
3	11.9	12.33	14.16
4	7.68	8.1	9.09
5	5.06	5.1	5.29
6	4.81	4.93	5.04
7	4.09	4.79	4.87

**Tabel Lampiran 16. Hasil Perhitungan Kadar Etanol (%) Selama Produksi Asam**

Waktu Inkubasi (hari)	Isolat U1	Isolat S3	Isolat <i>A. aceti</i>
0	0.0319	0.0355	0.0296
1	0.0332	0.0368	0.0291
2	0.0444	0.0399	0.0015
3	0.0487	0.0417	0.0036
4	0.0557	0.0449	0.0036
5	0.0561	0.0507	0.0009
6	0.062	0.0557	0.0071
7	0.0655	0.0628	0.0085



Gambar Lampiran 1. Kurva Standar Glukosa



Gambar Lampiran 2. Kurva Standar Etanol

