

**BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH BROMELIN NANAS
MENGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces MANGROVE* TERPILIH
MENJADI ASAM LAKTAT MELALUI *SEPARATE HYDROLYSIS AND
FERMENTATION* (SHF)**

(Skripsi)

Oleh

Marcella Indriani



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH BROMELIN NANAS MENGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces* MANGROVE TERPILIH MENJADI ASAM LAKTAT MELALUI *SEPARATE HYDROLISIS AND FERMENTATION* (SHF)

Oleh

MARCELLA INDRIANI

Bromelin merupakan limbah biomassa lignoselulosa dari hasil samping proses ekstraksi bagian bonggol nanas yang potensial untuk dimanfaatkan pada masa yang akan datang. Kandungan selulosa dapat dikonversi dengan menggunakan isolat *Actinomyces* menjadi gula pereduksi yang menjadi sentral dalam produksi asam laktat secara biokimia. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat *Actinomyces* yang memiliki aktivitas selulase dan xilanase dan jumlah asam laktat yang diperoleh dari fermentasi menggunakan *Lactococcus lactis*. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi karakterisasi biomassa bromelin, isolasi *Actinomyces* dari *mangrove*, penapisan bakteri selulolitik dan xilanolitik, hidrolisis enzimatis oleh isolat *Actinomyces* terpilih, dan fermentasi hidrolisat. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa bromelin nanas mengandung 52,58% karbohidrat. Hasil isolasi memperoleh 1 isolat unggul ActM-25 dengan indeks aktivitas selulolitik 3,42 dan xilanolitik 0,33. Hidrolisis pada kondisi optimum menghasilkan glukosa dengan persen rendemen 89,26%. Fermentasi hidrolisat menggunakan *Lactococcus lactis* menghasilkan asam laktat sebesar 72,45 gL⁻¹ dengan persen efisiensi 88,83%.

Kata kunci: Bromelin, *Actinomyces*, asam laktat, hidrolisis, fermentasi.

ABSTRACT

BIOCONVERSION OF CELLULOSE FROM PINEAPPLE BROMELAIN WASTE USING SELECTED MANGROVE *Actinomyces* ISOLATE TO LACTIC ACID THROUGH SEPARATE HYDROLISIS AND FERMENTATION (SHF)

By

MARCELLA INDRIANI

Bromelin is a lignocellulosic biomass waste from the pineapple core fibers which has the potential to be used in the future. The content of cellulose can be converted by using *Actinomyces* isolates into reducing sugars which are central in the biochemical production of lactic acid. This study aims to obtain *Actinomyces* isolates that have cellulase and xylanase activity as well as the amount of lactic acid obtained from bromelain flour using *Lactococcus lactis*. The stages of the research carried out included characterization of bromelain biomass, isolation of *Actinomyces* from mangroves, screening of cellulolytic and xylanolytic bacteria, enzymatic hydrolysis by selected *Actinomyces* isolates, and hydrolyzate fermentation using *Lactococcus lactis*. The characterization results show that pineapple bromelain contains 52.58% carbohydrates. The results 1 superior isolate ActM-25 with a cellulolytic activity index of 3.42 and 0.33 xylanolytic. Hydrolysis at optimum conditions produces glucose with a percentage yield of 89.26%. Hydrolyzed fermentation using *Lactococcus lactis* produced 72.45 gL⁻¹ of lactic acid with an efficiency percentage of 88.83%.

Keywords: Bromelain, *Actinomyces*, lactic acid, hydrolysis, fermentation.

**BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH BROMELIN NANAS
MENGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces MANGROVE* TERPILIH
MENJADI ASAM LAKTAT MELALUI *SEPARATE HYDROLYSIS AND
FERMENTATION (SHF)***

Oleh

MARCELLA INDRIANI

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
SARJANA SAINS

Pada
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023

Judul Skripsi : **BIOKONVERSI SELULOSA DARI LIMBAH BROMELIN NANAS MENGGUNAKAN ISOLAT *Actinomyces MANGROVE* TERPILIH MENJADI ASAM LAKTAT MELALUI *SEPARATE HYDROLYSIS AND FERMENTATION* (SHF)**

Nama Mahasiswa : **Marcella Indriani**

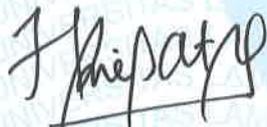
Nomor Pokok Mahasiswa : **1917011086**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. **Komisi Pembimbing**



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP 19711001 200501 1 002



Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP 19720530 200003 2 001

2. **Ketua Jurusan Kimia**

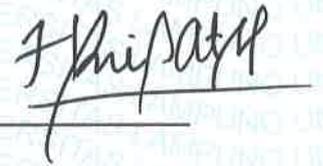


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.



Sekretaris : Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP 19711001 200501 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 7 Agustus 2023

PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Marcella Indriani
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011086
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul "**Biokonversi Selulosa dari Limbah Bromelin Nanas menggunakan Isolat *Actinomyces Mangrove* Terpilih menjadi Asam Laktat melalui *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF)**" adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 7 Agustus 2023

Yang menyatakan,



Marcella Indriani

NPM. 1917011086

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Marcella Indriani, lahir di Depok, Jawa Barat pada tanggal 4 Maret 2001 dan merupakan anak sulung dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Wagiman dan Ibu Rubiani. Saat ini penulis bertempat tinggal di Perumahan Pesona Laguna Blok F2 No. 27, Kelurahan Cilangkap, Kecamatan Tapos, Kota Depok, Jawa Barat.

Penulis mengawali pendidikan formal di Taman Kanak-Kanak (TK) Islam At-Tawwaabiin pada tahun 2005-2006, kemudian melanjutkan ke Sekolah Dasar (SD) Negeri Cilangkap 2, pada tahun 2006 dan lulus pada tahun 2012. Pada tahun 2015 telah menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 3 Depok, dan mengikuti Ujian Masuk SMK-Sekolah Menengah Analis Kimia Bogor hingga akhirnya dapat menyelesaikan studi selama 4 tahun hingga 2019. Pada tahun 2019, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menempuh pendidikan sebagai mahasiswa di Universitas Lampung, penulis aktif berorganisasi mulai sebagai kader muda, anggota inti, dan dewan

pembina Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) periode 2020-2022. Pada tahun 2020 penulis bertanggung jawab sebagai anggota bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK). Pada tahun 2021 melanjutkan estafet kepengurusan sebagai Sekretaris Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) dan di periode selanjutnya diamanahkan sebagai Dewan Pembina (DP). Penulis melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Kecamatan Beji, Depok pada bulan Januari 2022. Selama menjalani perkuliahan, penulis berkesempatan untuk menjadi Asisten Praktikum Biokimia untuk Jurusan Kimia dan Biologi Terapan. Penulis juga pernah meraih prestasi pada Lomba Esai Nasional sebagai Juara Harapan I oleh SSC FMIPA Universitas Negeri Semarang pada Juli 2021. Penulis juga menjadi Peraih Pendanaan Bidang Riset Eksakta pada Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) pada Oktober 2022 dalam riset “Inovasi *Edible Film Eco-Health Friendly* Berbasis Glukomanan dari Umbi Porang Lokal dengan Kombinasi *Plasticizer* Karagenan dan Sorbitol”.

MOTTO



“Wahai orang-orang yang beriman! Mohonlah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan shalat. Sungguh, Allah beserta orang-orang yang sabar.”

(Q.S. Al-Baqarah: 153)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.”

(Q.S. Al-Insyirah: 5-6)

“...Dan bersabarlah kamu, sesungguhnya janji Allah adalah benar.”

(Q.S. Ar-Rum: 60)

“Pembelajaran tidak didapat dengan kebetulan. Ia harus dicari dengan semangat dan disimak dengan tekun.”

(Abigail Adams)

“Live as if you were to die tomorrow, learn as if you were to live forever.”

(Mahatma Gandhi)



Dengan mengucapkan alhamdulillahirobbil' alamin puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, shalawat serta salam semoga selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang senantiasa diharapkan syafaatnya di hari akhir. Rasa syukur yang luar biasa ku persembahkan karya sederhanaku sebagai wujud cinta, bakti, dan tanggung jawabku kepada:

Kedua orang tuaku Ayah Wagiman dan Ibu Rubiani, yang telah membesarkan, mendidik, mendo'akan, memberikan kasih sayang dan motivasi selama ini. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang selalu diberikan.

Adik-adikku tersayang M. Galen Al-Rescha dan Nathania Camilla, yang selalu menjadi penyemangat dan motivasiku.

Pembimbing penelitianku Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., dan Dr. Mita Rilyanti, M.Si., serta seluruh dosen Jurusan Kimia, yang telah dengan sabar membimbing, mendidik, memberikan banyak Ilmu, dan pengalamannya kepadaku selama menempuh pendidikan dan penelitian di kampus.

Seluruh rekan-rekan saudara-saudariku keluarga besar Kimia 2019 yang selalu mewarnai hari-hari selama menjalani perkuliahan.

Dan almamater yang kubanggakan, Universitas Lampung.

SANWACANA

Alhamdulillah *rabbil'alamin*. Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Biokonversi Selulosa dari Limbah Bromelin Nanas menggunakan Isolat *Actinomyces Mangrove* Terpilih menjadi Asam Laktat melalui *Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)*”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Penyelesaian skripsi penulis tidak luput dari bantuan seluruh pihak baik berupa bimbingan, arahan, saran, informasi, serta dukungan moril maupun materiil. Pada kesempatan ini teriring do'a yang tulus, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT atas kenikmatan dan karunia yang telah diberikan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Kedua orang tua, Ayah dan Ibu dari penulis yang sangat berjasa karena selalu mendukung, mendo'akan, memotivasi, menjadi tempat berkeluh kesah, dan selalu berusaha memberikan yang terbaik kepada penulis meskipun terhalang jarak. Semoga Allah selalu memberikan perlindungan, kesehatan, rezeki, kebahagiaan dunia akhirat, dan umur yang panjang sehingga dapat mendampingi penulis hingga sukses.
3. Adik-adikku, Muhamad Galen Al-Rescha dan Nathania Camilla yang selalu menjadi motivasi penulis selama menjalani perkuliahan, meskipun terhalang jarak terimakasih telah menghibur dan menjadi penyemangat selama ini. Semoga selalu berbakti kepada orang tua dan sukses untuk kedepannya.

4. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku pembimbing pertama atas segala kebaikan, ilmu, kesabaran, motivasi, dan bimbingan kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Ditengah waktu yang sibuk, selalu berusaha meluangkan waktu dan senantiasa memberikan dukungan kepada penulis sehingga penulis tidak pernah kehilangan semangat hingga berada dititik ini. Semoga Allah selalu memberikan perlindungan dan keberkahan atas semua yang telah bapak berikan.
5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku pembimbing kedua atas segala saran, dan bimbingan yang sangat bermanfaat kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Atas ilmu yang selama ini diberikan sejak penulis masih sebagai mahasiswa baru dan pengalaman belajar di kelas yang luar biasa sehingga memotivasi penulis untuk selalu berusaha lebih baik. Semoga Allah memberikan rida-Nya dan membalas semua kebaikan ibu.
6. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si., selaku pembahas atas kritik, saran, dan ilmu yang bermanfaat. Atas segala kesediaannya untuk memberikan yang terbaik kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah berikan keberkahan atas semua yang telah ibu diberikan.
7. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku pembimbing akademik atas segala bantuan dan dukungan kepada penulis selama perkuliahan.
8. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Ibu Hapin Afriyani, S.Si., M.Si., atas bimbingan, kesempatan, dan pengalamannya selama penulis bersama tim menjalankan riset untuk Program Kreativitas Mahasiswa Bidang Riset Eksakta (PKM-RE). Pengalaman tersebut memotivasi penulis untuk bisa menjadi peneliti yang lebih baik di masa depan.
10. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia atas ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat dan berharga kepada penulis selama menjadi mahasiswa jurusan kimia.

11. Segenap Staf dan Laboran Jurusan Kimia FMIPA Unila, terkhusus Mba Della yang sudah sangat baik memberikan bantuan kepada penulis saat menjalankan PKL dan penelitian di Laboratorium Biokimia.
12. Keluarga besar penulis yang senantiasa memberikan do'a dan dukungan kepada penulis.
13. Teman seperjuangan penelitian *Actinomyces fighter* sekaligus teman dekat penulis, Arifah Rara Afiria. Terimakasih atas kesediaannya untuk berbagi senang dan sedih baik selama penelitian maupun perkuliahan. Atas segala bantuan, saran, kritik, motivasi, dan senantiasa menjadi pengingat dikala penulis lengah akan banyak hal. Perbincangan dikala waktu luang denganmu menjadi salah satu momen untuk penulis dapat lebih jauh melihat kedepan. Semoga kebersamaan ini terus terjalin dan impian kita dapat tercapai.
14. Teman seperjuangan penelitian *Actinomyces fighter* sekaligus teman satu kampung halaman, Febiana Nabila. Atas segala hal yang telah diberikan berupa kerjasama, waktu, dukungan, dan kesediaan untuk berjuang melewati semuanya bersama-sama. Semoga dilancarkan setiap urusan dan sukses selalu.
15. Teman seperjuangan penelitian *Actinomyces fighter*, Abdillah Wira Dienussalim. Atas bantuan, dukungan, dan kerjasama dalam menjalankan penelitian. Semoga sukses selalu.
16. Kakak-kakak *Heri Research '18*, Kak Oliv, Kak Raifar, dan Kak Nafisah atas segala bantuan, saran, motivasi, dan dukungan selama penulis menjalani PKL dan penelitian. Semoga kakak-kakak senantiasa dilindungi Allah dan sukses selalu.
17. Teman-teman *Al's x Nab*, Rizah, Ahda, Jihan, Rara, dan Ulfa atas segala bantuan, dukungan, dan waktu yang telah kita habiskan bersama-sama selama ini. Terimakasih atas kesediaan hatinya untuk berbagi cerita dan pengalaman selama perkuliahan dan perantauan. Semoga persahabatan ini dapat terus terjalin hingga tiap-tiap dari kita telah sukses dan dapat berkumpul kembali.
18. Teman-teman *Biochemistry '19* sekaligus para Asisten Praktikum Biokimia, Virginia, Ayur, Indah, Dita, Cindi, Partini, dan teman-teman lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan dukungan yang

diberikan. Terimakasih telah mewarnai hari-hari penulis sehingga dapat menjalankan penelitian di Lab dengan sukacita. Semoga sukses selalu.

19. Teman pertama penulis saat menginjakkan kaki di Universitas Lampung, Happy Yunia Putri. Atas segala kesediaan hatinya untuk menerima penulis menjadi teman satu kamar disaat menjadi mahasiswa baru, terimakasih atas dukungan, bantuan, do'a, kesabaran, dan waktu yang telah diberikan. Semoga pertemanan ini dapat terus terjalin dan sukses selalu.
20. Teman dekat penulis sejak menjadi mahasiswa baru, Zahra Luthfiyyah. Atas segala dukungan, bantuan, dan kesediaan hatinya untuk berbagi cerita selama perkuliahan. Semoga diberikan yang terbaik dan sukses selalu.
21. Teman-teman seperjuangan penulis dalam menjalani bahtera perkuliahan, Kania, Melati, Ayu Aulia, Bellia, Rizky Arpan, Arya, Unggul, Thio, Dito, Kipang, dan Fatur. Terimakasih atas kesediaan hati dan segala bantuan yang diberikan. Semoga sukses selalu.
22. Teman-teman *Chemistry'19* atas segala keceriaan, kebersamaan, semangat, dan energi positif yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan.
23. Teman-teman Pimpinan Himaki 2021, atas segala kerjasama dan kekeluargaannya selama ini. Menjadi salah satu momen dan langkah terbaik bagi penulis bersanding dengan kalian. Terimakasih atas kesediaan hatinya, pengalaman yang diberikan, dan ilmu-ilmu bersosialisasi yang hanya penulis dapatkan disini. Semoga sukses selalu dan tetap berkarya.
24. Teman-teman Anggota Bidang SPIK 2021, Elsa, Lisa, Intan, Bunga, Salwa, Qori, Bintang, Rafli dan yang lainnya yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu. Atas segala hal yang telah diberikan kepada penulis. Sebuah pengalaman yang membahagiakan dapat bekerjasama dengan orang-orang yang hebat. Terimakasih atas kepercayaan kalian kepada penulis, do'a, dukungan, motivasi, dan hubungan baik yang masih terjalin hingga saat ini. Semoga sukses selalu.
25. Keluarga Himaki 2020 dan 2021, atas segala ilmu dan pengalaman yang diberikan. Semoga sukses selalu. Himaki Jaya!

26. Adik-adik *Heri Research '20* Widya, Muti, Rahmad, dan Geo atas dukungan serta do'a yang diberikan. Semoga penelitiannya dimudahkan dan dilancarkan selalu.
27. Almamater tercinta Universitas Lampung.
28. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi.
29. *Last but not least*, teruntuk diriku yang telah berjuang dan tidak pernah menyerah. Selalu optimis dalam menghadapi setiap tantangan dan rintangan selama menjalani 4 tahun perkuliahan, terimakasih telah berusaha memberikan yang terbaik dalam setiap langkah untuk meraih impianmu. Semoga akhir dari perjalanan ini menjadi awal yang baik untuk karir hidupmu maupun bekal untuk masa-masa yang akan datang.

Terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu, semoga Allah SWT membalas segala amal kebaikan kalian. Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Bandar Lampung, 7 Agustus 2023
Penulis

Marcella Indriani
NPM. 1917011086

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	xvi
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xxi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Limbah Nanas	5
2.2 Lignoselulosa	6
2.2.1 Selulosa.....	7
2.2.2 Hemiselulosa.....	9
2.2.3 Lignin	9
2.3 Enzim Xilanase	10
2.4 Enzim Selulase.....	11
2.5 Asam Laktat	14
2.5.1 Proses Produksi Asam Laktat	16
2.5.1.1 Sintesis Kimia	16
2.5.1.2 Fermentasi	16
2.5.2 Aplikasi dan Penggunaan Asam Laktat.....	20
2.6 Analisis Asam Laktat	21
2.6.1 <i>Methyl-Red Test</i>	21
2.6.2 <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	22

III. METODE PENELITIAN	24
3.1 Waktu dan Tempat	24
3.2 Alat dan Bahan	24
3.3 Metode Penelitian	25
3.3.1 Preparasi Limbah Bromelin	25
3.3.2 Preparasi <i>strain Lactococcus lactis</i>	25
3.3.3 Pengukuran Indeks Kristalinitas Limbah Bromelin	26
3.3.4 Analisis Komponen Limbah Bromelin dengan Metode TAPPI	26
3.3.5 Penapisan Isolat <i>Indigineous Actinomycetes Mangrove</i>	28
3.3.6 <i>Bio-pretreatment</i> dan Hidrolisis Limbah Bromelin	29
3.3.7 Biokonversi dan Fermentasi Asam Laktat	30
3.3.8 Analisis Kualitatif Asam Laktat Biokonversi	31
3.3.9 Analisis Kuantitatif Asam Laktat Biokonversi	31
3.4 Diagram Alir	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Analisis Komponen Limbah Bromelin Nanas dengan Metode TAPPI	33
4.1.1 Kadar Lignin	34
4.1.2 Kadar Karbohidrat Total	35
4.2 Karakter Substrat	37
4.3 Hasil Penapisan Isolat <i>Actinomycetes</i>	39
4.4 Biokonversi Hidrolisat menjadi Asam Laktat dengan Metode SHF	44
4.4.1 Hidrolisis Limbah Bromelin	45
4.4.2 Fermentasi Hidrolisat	48
4.5 Analisis Kualitatif Asam Laktat Biokonversi	51
4.6 Analisis Kuantitatif Asam Laktat Biokonversi	53
V. KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1. Kesimpulan	57
5.2. Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Mikroorganisme penghasil enzim selulase	13
2. Analisis kandungan glukosa hasil hidrolisis	36
3. Indeks aktivitas selulolitik dari isolat <i>Actinomyces</i>	42
4. Indeks aktivitas xilanolitik dari isolat <i>Actinomyces</i>	43
5. Hasil pH setelah fermentasi	52
6. Perhitungan kadar asam laktat biokonversi.....	54
7. Perhitungan kadar lignin dalam tepung bromelin	69
8. Perhitungan kadar total lignin dalam tepung bromelin.....	70
9. Perhitungan kadar karbohidrat total dalam tepung bromelin.....	72
10. Data standar glukosa untuk TAPPI.....	73
11. Data indeks aktivitas selulolitik isolat <i>Actinomyces mangrove</i>	74
12. Data indeks aktivitas xilanolitik isolat <i>Actinomyces mangrove</i>	75
13. Data standar glukosa untuk hidrolisis	76
14. Data hasil optimasi tepung bromelin menggunakan isolat Act-25 pada pH 7 dengan variasi waktu.....	78
15. Data hasil hidrolisis tepung bromelin menggunakan isolat Act-25 pada pH 7 dalam waktu optimum 9 hari.....	79
16. Data perhitungan <i>yield</i> glukosa hasil hidrolisis	80
17. Data absorbansi pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i> InaCC-B201	81
18. Informasi puncak kristalin pada difraktogram	82
19. Informasi puncak kristalin dan amorf pada difraktogram.....	82
20. Data standar asam laktat.....	83
21. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 1 µg/mL	84
22. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 2 µg/mL	84
23. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 5 µg/mL	85

24. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 10 $\mu\text{g/mL}$	85
25. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 25 $\mu\text{g/mL}$	86
26. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 50 $\mu\text{g/mL}$	86
27. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 100 $\mu\text{g/mL}$	87
28. Informasi puncak kromatogram standar asam laktat 200 $\mu\text{g/mL}$	87
29. Informasi puncak kromatogram sampel asam laktat biokonversi.....	89
30. Perhitungan akhir konsentrasi asam laktat biokonversi	90
31. Data perhitungan konsentrasi asam laktat pada fermentasi sempurna	99

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur lignoselulosa pada biomasa dan biopolimernya.	7
2. Struktur kimia selulosa.....	7
3. Ilustrasi dalam mikrofibril selulosa.....	8
4. Struktur hemiselulosa.....	9
5. Struktur lignin.	10
6. Struktur xilan dan mekanisme enzim hidrolitik xilanase.....	11
7. Skema hidrolisis selulosa oleh enzim selulase.....	12
8. Dua jenis isomer optikal asam laktat.	15
9. Jalur metabolisme <i>homofermentative lactic acid</i>	17
10. Jalur metabolisme <i>heterofermentative lactic acid</i>	18
11. Hasil potisif dan negatif <i>methyl-red test</i>	22
12. Kromatogram HPLC dari standar asam organik.....	23
13. Hasil preparasi limbah bromelin nanas.	33
14. Reaksi kimia penentuan gula pereduksi dengan metode DNS.....	35
15. Persentase selulosa dan lignin pada tepung bromelin.	36
16. Perbandingan pola difraktogram XRD (a) sampel tepung bromelin dan (b) standar selulosa	38
17. Hasil isolasi dengan pengenceran bertingkat.	40
18. Hasil inokulasi 28 isolat <i>Actinomyces mangrove</i>	41
19. Zona bening hasil penapisan aktivitas selulolitik	41
20. Zona bening hasil penapisan aktivitas xilanolitik.	43
21. Grafik optimasi waktu produksi glukosa hasil hidrolisis.....	46
22. Perbandingan berat glukosa sampel dan glukosa teoritis.....	47
23. Perbandingan persen <i>yield</i> glukosa sampel dan glukosa teoritis	47

24. Hasil <i>sampling</i> pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i>	49
25. Kurva pertumbuhan <i>Lactococcus lactis</i> berdasarkan waktu.....	50
26. Hasil analisis kualitatif dengan indikator metil merah.....	52
27. Persen <i>yield</i> fermentasi asam laktat pada waktu optimum.....	55
28. Kurva standar glukosa untuk TAPPI	73
29. Kurva standar glukosa untuk hidrolisis.....	76
30. Kurva standar asam laktat	83
31. Kromatogram standar asam laktat 1 µg/mL.....	84
32. Kromatogram standar asam laktat 2 µg/mL.....	84
33. Kromatogram standar asam laktat 5 µg/mL.....	85
34. Kromatogram standar asam laktat 10 µg/mL.....	85
35. Kromatogram standar asam laktat 25 µg/mL.....	86
36. Kromatogram standar asam laktat 50 µg/mL.....	86
37. Kromatogram standar asam laktat 100 µg/mL.....	87
38. Kromatogram standar asam laktat 200 µg/mL.....	87
39. Kromatogram asam laktat biokonversi untuk ulangan 1.....	88
40. Kromatogram asam laktat biokonversi untuk ulangan 2.....	88

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Nanas (*Ananas comosus* L.) termasuk komoditas buah tropik andalan yang kaya akan manfaat karena mengandung gizi yang cukup tinggi dan lengkap, seperti protein, lemak, karbohidrat, mineral, vitamin, serta enzim bromelin (Nurhidayah dkk., 2013). Berdasarkan Angka Tetap (ATAP) tahun 2016 produksi nanas mencapai 1,85 juta ton dan menjadikan Indonesia sebagai produsen terbesar ketiga di Asia Tenggara dengan kontribusi sekitar 23% (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2016). Sentral produksi nanas terdapat di pulau Sumatera tepatnya di provinsi Lampung dengan produksi sebesar 581,674 ton dari total produksi 1.191.485 ton (Roswita dan Lulrahman, 2022).

Pengolahan buah nanas menjadi produk yang siap dipasarkan meninggalkan limbah berupa tajuk, kulit, daun, bonggol, dan batang yang dibuang selama pemrosesan, pengangkutan, dan penyimpanan nanas (Roda and Lambri, 2019). Secara alami, dengan meningkatnya permintaan pasar terhadap produksi buah nanas, volume limbah produksi mengalami peningkatan. Selama beberapa dekade terakhir 48,6% limbah nanas dihasilkan dari total berat buah. Limbah nanas rentan terhadap pembusukan mikroba sehingga mengakibatkan masalah lingkungan (Banerjee *et al.*, 2018). Enzim bromelin telah diproduksi oleh PT. *Great Giant Pineapple* dari bonggol nanas, dimana hasil samping dari proses ekstraksi enzim bromelin adalah limbah padat serat bonggol nanas.

Limbah padat serat bonggol nanas merupakan biomassa yang mengandung lignoselulosa yang terdiri dari 3 komponen utama, yaitu selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Jumlah kandungan dalam limbah bromelin nanas dari masing-masing komponen tersebut secara berturut-turut diketahui sebesar 24,53%, 28,53%, dan 5,78% (Pardo *et al.*, 2014). Biokonversi dari lignoselulosa dapat ditingkatkan dengan pemanfaatan gula pereduksi yang terkandung didalamnya untuk diaplikasikan dalam berbagai bidang (Satria dkk., 2010). Selulosa merupakan polimer glukosa yang dapat dikonversi menjadi monomer gula. Umumnya, industri lebih tertarik menggunakan bahan baku berlignoselulosa karena biaya yang murah dan pemanfaatan yang luas. Berdasarkan komposisi tersebut, selulosa pada bonggol nanas dapat diisolasi sebagai substrat pada tahap *pretreatment*.

Pemisahan selulosa yang terikat pada hemiselulosa dan lignin dilakukan dengan tahap *pretreatment* yang berfungsi untuk memudahkan proses hidrolisis sehingga selulosa dapat dikonversi menjadi glukosa (Awatshi *et al.*, 2013). *Pretreatment* secara kimia untuk mendegradasi lignin yang membentuk segel fisik pada hemiselulosa dan selulosa dapat memberikan dampak negatif terhadap lingkungan sehingga, dilakukan *pretreatment* secara biologis menggunakan mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim pendegradasi lignin atau hemiselulosa seperti *Actinomycetes* (Satria dkk., 2010).

Actinomycetes dapat di isolasi salah satunya dari sedimen *mangrove*. *Mangrove* termasuk ekosistem dengan kondisi lingkungan dibawah kondisi salinitas tinggi, pasang surut yang ekstrim, tekanan angin yang kuat, suhu tinggi, berlumpur, dan tanah yang anaerobik (Retnowati *et al.*, 2017). Kompleksitas ekosistem *mangrove* mengharuskan mikroba menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu bekerja dalam kondisi ekstrim (Subagiyo *et al.*, 2017). *Actinomycetes* mampu menghasilkan berbagai macam senyawa bioaktif termasuk enzim xilanase dan selulase (Saini *et al.*, 2015). Aktivitas xilanolitik tersebut dapat digunakan untuk mendegradasi hemiselulosa sehingga lignin akan lepas dari struktur kompleksnya

dan menghasilkan selulosa (Rismanto dkk., 2020). Selulosa dapat dihidrolisis untuk menghasilkan monomer glukosa dengan menggunakan enzim selulase (Satria dkk., 2010). Glukosa merupakan senyawa sentral dalam metabolisme yang banyak digunakan dalam berbagai industri termasuk industri asam laktat. Asam laktat (*2-hydroxypropionic acid*) merupakan asam organik multifungsi yang banyak digunakan dalam industri makanan dan farmasi (Jin *et al.*, 2005). Saat ini, asam laktat menjadi komoditas kimia terbesar dengan produksi 100.000 ton per tahun (Idris and Suzana, 2006). Produksi asam laktat dengan metode fermentasi telah dilakukan dengan berbagai mikroorganisme seperti *Lactococcus lactis* (Ueno *et al.*, 2003) dan *Lactobacillus delbrueckii* (Maryanty dkk., 2019) yang keduanya merupakan Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri Asam Laktat dapat memanfaatkan sumber gula dari hasil hidrolisis selulosa. Proses biokonversi selulosa menjadi glukosa dan perubahan glukosa menjadi asam laktat dapat dilakukan secara bertahap melalui metode *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF).

Metode SHF menjadi salah satu cara biokonversi material karbohidrat yang lebih efektif karena pada proses ini kondisi optimum dari setiap tahap dapat dipisahkan karena dilakukan dalam 2 sistem yang berbeda. Untuk mengaplikasikan proses SHF diperlukan seleksi mikroorganisme dengan memperhatikan suhu dan pH optimal pertumbuhan mikroorganisme saat proses fermentasi (Aulitto *et al.*, 2019). Salah satu penelitian dengan memanfaatkan metode ini telah dilakukan oleh Ueno *et al.*, (2003) dan menghasilkan asam laktat dengan konsentrasi sebesar 92,2 g/L.

Penelitian ini memanfaatkan sumber gula dari hidrolisis selulosa yang berasal dari biomassa lignoselulosa, yaitu limbah bromelin nanas untuk menghasilkan asam laktat. Isolat *Actinomycetes* dipilih untuk menghasilkan enzim xilanase sebagai pendegradasi hemiselulosa dan enzim selulase sebagai pendegradasi selulosa menjadi monomer glukosa. Glukosa yang dihasilkan, lalu dikonversi menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat. Produksi asam laktat ini dilakukan

menggunakan metode SHF. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi salah satu alternatif produksi asam laktat dengan pemanfaatan limbah berlignoselulosa, sehingga dapat meningkatkan nilai efisiensi dan ekonomis dari bahan tersebut.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan analisis komposisi kandungan lignoselulosa pada limbah bromelin nanas dengan metode TAPPI.
2. Melakukan isolasi *Actinomyces* dari sedimen *mangrove* yang berpotensi menghasilkan enzim pendegradasi selulosa dan hemiselulosa melalui tahap penapisan.
3. Memanfaatkan hidrolitik enzim selulase dan xilanase dari isolat *Actinomyces* terpilih sebagai agen *bio-pretreatment* untuk menentukan kadar gula pereduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis.
4. Melakukan biokonversi asam laktat dari limbah bromelin nanas dengan metode SHF.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan beberapa manfaat sebagai berikut :

1. Memberikan informasi terkait kandungan lignoselulosa di dalam limbah bromelin nanas.
2. Memberikan informasi isolat *Actinomyces* yang potensial untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa sehingga dapat dimanfaatkan dalam pembuatan asam laktat.
3. Memberikan informasi proses fermentasi glukosa yang bersumber dari limbah bromelin nanas dengan BAL menjadi asam laktat dapat meminimalkan biaya produksi dan bersifat ramah lingkungan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Limbah Nanas

Nanas mempunyai nama ilmiah (*Ananas comosus* L.) yang termasuk famili bromeliaceae. Perawakan (habitus) tumbuhannya rendah, herba (menahun) dengan 30 atau lebih daun yang panjang, tingginya antara 90-100 cm. Buah ini berasal dari Brasil, Amerika Selatan, buahnya dalam bahasa Inggris disebut sebagai *pineapple* (Septiatin, 2009). Produksi nanas di Indonesia mencapai 1,85 juta ton menjadikan Indonesia sebagai produsen terbesar ketiga di Asia Tenggara dengan kontribusi sekitar 23%. Hampir seluruh wilayah Indonesia merupakan daerah penghasil nanas karena didukung oleh iklim tropis yang sesuai (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2016). Sentral produksi nanas terdapat di pulau Sumatera tepatnya di provinsi Lampung dengan produksi sebesar 581,674 ton dari total produksi 1.191.482 ton (Roswita dan Lulrahman, 2022).

Meningkatnya permintaan pasar dalam produksi nanas mengakibatkan sejumlah besar limbah dihasilkan termasuk tajuk, kulit, daun, bonggol, dan batang dibuang selama pemrosesan, pengangkutan, dan penyimpanan nanas (Roda and Lambri, 2019). Limbah buah nanas dapat mencapai 48,6% dari total berat buah (Marlina dkk., 2018) dimana bonggol nanas menjadi bagian terbesar yang kurang dimanfaatkan. Limbah tersebut dapat diubah menjadi produk yang berharga melalui berbagai proses biokimia (fermentasi mikroba dan metabolisme anaerobik), termokimia (pirolisis, gasifikasi, pembakaran, dan insinerasi) dan

fisikokimia (transesterifikasi) untuk menghasilkan energi dan bioproduk (Hamzah *et al.*, 2021).

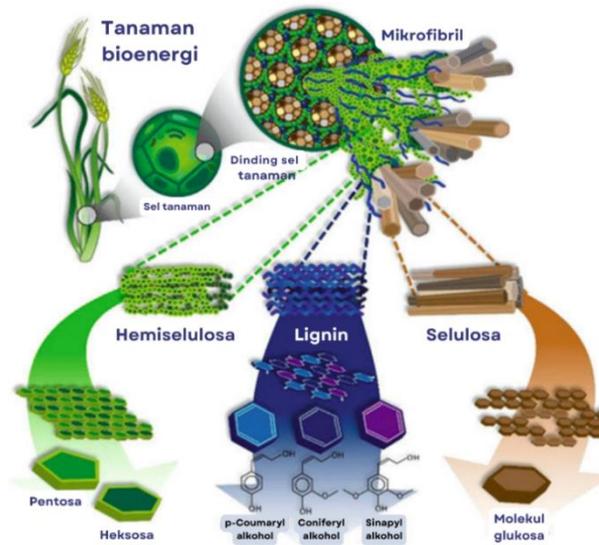
Limbah bromelin nanas mengandung 3 komponen utama dari lignoselulosa diantaranya ialah selulosa, hemiselulosa, dan lignin disamping kandungan kimia lainnya (Mansor *et al.*, 2019). Kandungan lignoselulosa dalam limbah bromelin nanas telah dianalisis sebelumnya dengan jumlah selulosa sebesar 24,5%, hemiselulosa 28,5%, dan lignin 5,78% (Pardo *et al.*, 2014). Kandungan tersebut berpotensi untuk dimanfaatkan menjadi sebuah produk, salah satunya untuk memproduksi asam organik (Hamzah *et al.*, 2021).

2.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan biomassa yang terdapat pada tanaman yang terbentuk dari proses fotosintesis. Komponen utama lignoselulosa adalah selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Umumnya, kandungan komponen pada biomassa dalam keadaan kering berturut-turut ialah 40-60%, 20-40%, dan 10-25% (McKendry, 2002). Beberapa penelitian mengenai analisis komposisi lignoselulosa yang dilakukan oleh (Mansor *et al.*, 2019), (Pardo *et al.*, 2014), (Zainuddin *et al.*, 2014) membuktikan setiap bagian limbah nanas memiliki kandungan lignoselulosa yang berbeda. Komponen-komponen tersebut merupakan sumber utama untuk menghasilkan produk yang bernilai seperti gula hasil fermentasi, bahan kimia, bahan bakar cair, sumber karbon dan energi. Konversi bahan lignoselulosa dapat dilakukan dengan bantuan mikroorganisme yang memiliki aktivitas selulolitik maupun xilanolitik (Anindyawati, 2010).

Polimer selulosa, hemiselulosa, dan lignin terjalin dengan kuat dan secara kimia berikatan secara non-kovalen dan saling bertautan melalui ikatan kovalen. Ikatan pada lignoselulosa terdapat pada Gambar 1. Ketiga polimer tersebut membentuk

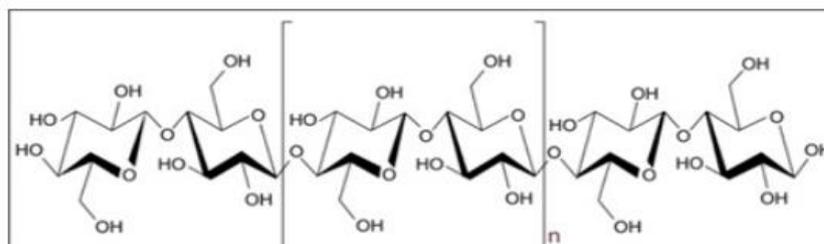
mikrofibril, di mana selulosa diselubungi oleh hemiselulosa dan lignin yang juga berikatan satu sama lain membentuk struktur tiga dimensi (Chen, 2014). Hal ini menjadi hambatan dalam pemanfaatan komponen di dalamnya.



Gambar 1. Struktur lignoselulosa pada biomasa dan biopolimernya (Hernandez-Beltran *et al.*, 2019).

2.2.1 Selulosa

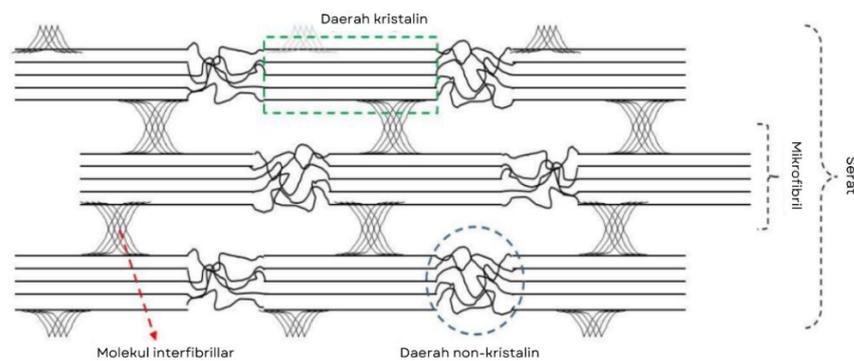
Selulosa terdiri dari unit-unit β -1,4-glukopiranososa yang membentuk homopolimer linier seperti pada Gambar 2. Selulosa memiliki berat molekul tinggi yang mana setiap unit glukopiranososa mengandung tiga gugus hidroksil yang memberikan selulosa karakteristik hidrofisilitas dan biodegradabilitas (Evelyna dkk., 2019).



Gambar 2. Struktur kimia selulosa (Evelyna dkk., 2019).

Unit ulangan dasar dari polimer selulosa terdiri atas dua unit glukosa anhidrida yang disebut unit selobiosa. Dua unit glukosa yang berdekatan bersatu dengan mengeliminasi satu molekul air di antara gugus hidroksil. Gugus-gugus OH pada C₁ dan C₄ memiliki perilaku yang berbeda, gugus C₁-OH merupakan gugus hidrat aldehida memiliki sifat pereduksi, sedangkan gugus C₄-OH merupakan gugus hidroksil alkohol yang bersifat bukan pereduksi (Trache *et al.*, 2016).

Mikrofibril selulosa terdiri atas daerah kristalin dan amorf seperti pada Gambar 3. Selulosa kristalin dengan struktur yang rapat dan kuat relatif sulit diputuskan ikatannya. Rasio antara bagian kristalin dan bagian amorf disebut derajat kristalinitas selulosa. Bagian kristalin dapat mencakup $\frac{2}{3}$ dari total selulosa (Fatriasari *et al.*, 2020).



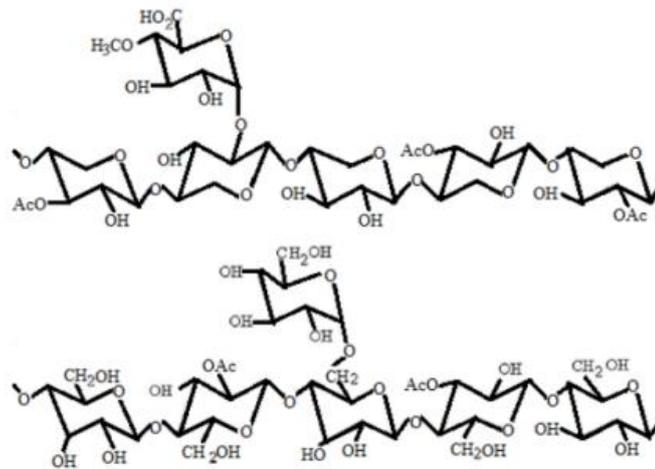
Gambar 3. Ilustrasi dalam mikrofibril selulosa (Borjesson *and* Westman, 2015).

Selulosa hampir tidak pernah ditemui dalam keadaan murni di alam, melainkan selalu berikatan dengan bahan lain seperti lignin dan hemiselulosa. Selulosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dengan menggunakan asam maupun enzim (Sutini dkk., 2020). Hidrolisis sempurna selulosa menghasilkan monomer selulosa, yaitu glukosa, sedangkan hidrolisis tidak sempurna menghasilkan oligosakarida dan disakarida dari selulosa yang disebut selooligosakarida dan selobiosa. Selulosa dapat dikonversi menjadi berbagai produk bernilai ekonomi yang lebih tinggi, melalui proses hidrolisis dengan bantuan enzim selulase sebagai biokatalis atau dengan hidrolisis menggunakan asam (Fatriasari *et al.*, 2020). Beberapa literatur

menunjukkan kombinasi dua metode *pretreatment* seperti metode secara biologis dengan kimia atau fisika dapat lebih efektif (Hernandez-Beltran *et al.*, 2019).

2.2.2 Hemiselulosa

Hemiselulosa terdapat pada dinding sel tumbuhan dengan ikatan yang kompleks menghubungkan serat selulosa menjadi mikrofibril dan berikatan silang dengan lignin (Isikgor *and* Becer, 2015). Hemiselulosa merupakan polisakarida dengan bobot molekul yang lebih rendah dibandingkan selulosa. Terdiri dari D-xylosa, D-manosa, D-galaktosa, D-glukosa, L-arabinosa, 4-O-metil-glukoronat, D-galakturonat, dan asam D-galakturonat. Perbedaan utama dari selulosa ialah hemiselulosa mengikat gula yang berbeda dengan rantai pendek sehingga dapat dengan mudah dihidrolisis (Perez *and* Munoz-Dorado, 2002).

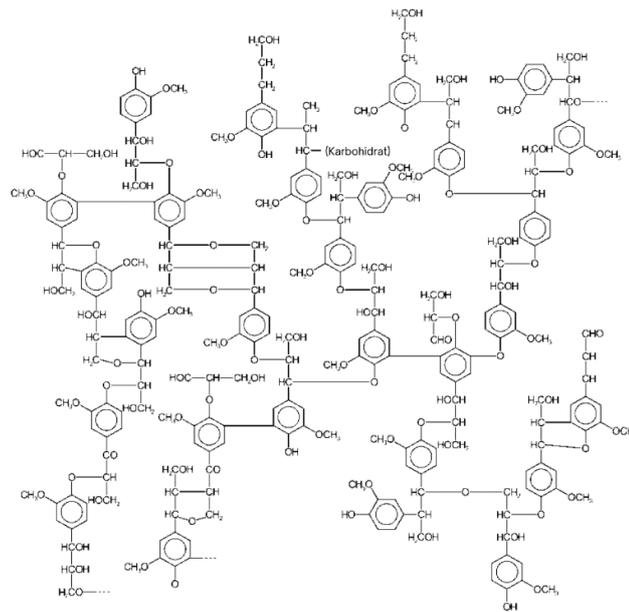


Gambar 4. Struktur hemiselulosa (Tezara *et al.*, 2016).

2.2.3 Lignin

Lignin merupakan polimer aromatik yang berasosiasi dengan polisakarida pada dinding sel sekunder tanaman. Pada umumnya, lignin mengandung tiga jenis

alkohol aromatik yaitu coniferyl, sinapyl, dan p-coumaryl (Howard *et al.*, 2003). Lignin berbentuk heteropolimer amorf yang terikat dengan ikatan berbeda. Fungsi utama lignin adalah memperkuat struktur tanaman dalam menahan serangan mikroba dan tekanan oksidasi. Lignin menjadi salah satu faktor utama yang menyulitkan degradasi lignoselulosa dengan enzim. Selain itu, interaksi hidrofobik lignin dengan molekul enzim menyebabkan ikatan yang menurunkan kemampuan enzim menghidrolisis selulosa (Anindyawati, 2010).



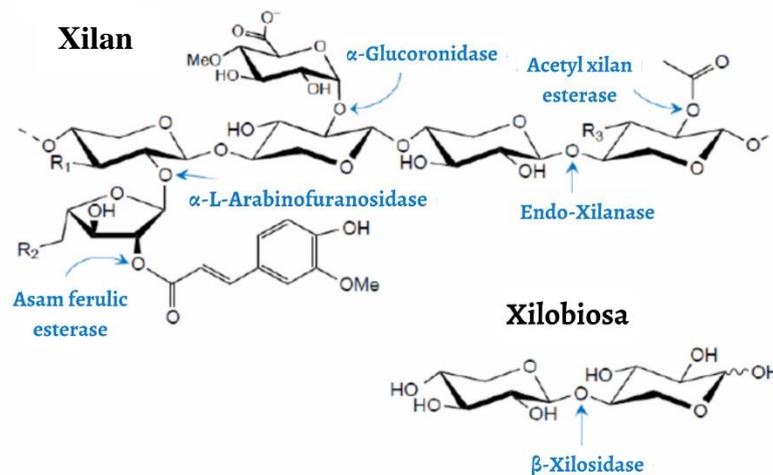
Gambar 5. Struktur Lignin (Tezara *et al.*, 2016).

2.3 Enzim Xilanase

Enzim xilanase merupakan enzim kompleks yang terdiri atas 1,4- β -endoxilanase, β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glukuronidase, asetil xilan esterase dan asam fenolat (Inayah dkk., 2016). Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis antara lain: β -xilosidase, eksoxilanasase, dan endoxilanase. β -xilosidase mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Eksoxilanasase mampu memutuskan rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung yang mereduksi sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk

utama dan sejumlah oligosakarida, sedangkan endoxilanase mampu memutuskan ikatan β -1,4- pada bagian dalam rantai xilan secara teratur seperti mekanisme yang ada pada Gambar 6 (Richana, 2002).

Xilanase banyak terdapat di alam dan dapat ditemukan pada beberapa jenis mikroba yaitu bakteri dari laut maupun darat. Dengan kemampuan tersebut struktur xilan yang merupakan penyusun hemiselulosa dapat terdegradasi dan memudahkan akses enzim hidrolitik lainnya untuk dapat menghidrolisis komponen lain dari lignoselulosa (Hanim, 2003).



Gambar 6. Struktur xilan dan mekanisme enzim hidrolitik xilanase (Pastor *et al.*, 2007).

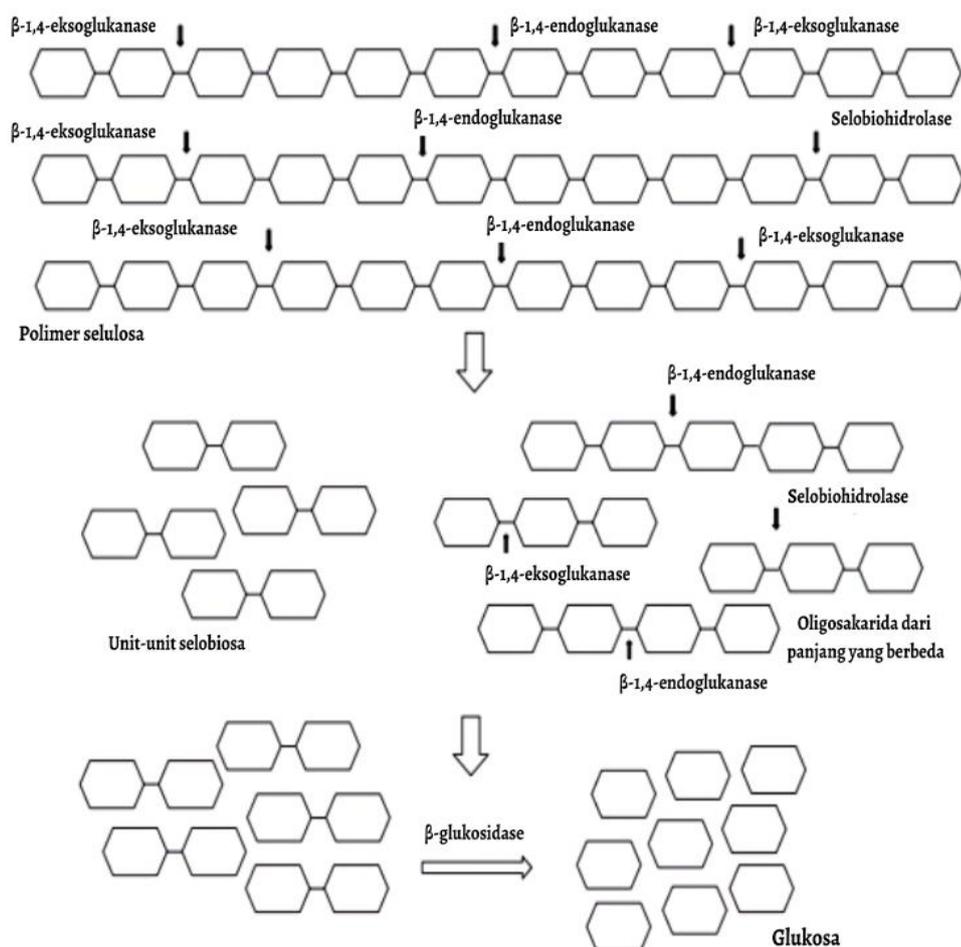
2.4 Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan salah satu kelompok enzim yang termasuk dalam suatu sistem enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme dalam degradasi material sel tumbuhan. Enzim selulase berperan dalam hidrolisis selulosa dengan memecah ikatan β -1,4-glikosida untuk menghasilkan oligosakarida maupun glukosa (Satria dkk., 2010).

Menurut Hermiati dkk., (2014) sedikitnya terdapat tiga kelompok enzim yang terlibat dalam hidrolisis selulosa, yaitu :

- 1) Endoglukanase yang berkerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah untuk memecah selulosa secara acak dan membentuk ujung rantai yang bebas.
- 2) Eksoglukanase atau selbiohidrolase yang mendegradasi lebih lanjut molekul tersebut dengan memindahkan unit-unit selobiosa dari ujung-ujung rantai yang bebas.
- 3) β -glukosidase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa.

Skema hidrolisis selulosa terdapat pada Gambar 7.



Gambar 7. Skema hidrolisis selulosa oleh enzim selulase (Saini *et al.*, 2015).

Jumlah enzim yang diperlukan untuk hidrolisis selulosa bergantung pada kadar padatan tidak larut dalam air pada bahan yang akan dihidrolisis. Sampai tahap tertentu, semakin banyak selulase yang digunakan, semakin tinggi rendemen dan kecepatan hidrolisis (Hermiati dkk., 2014). Mikroorganisme penghasil enzim selulase berasal dari kelompok fungi, bakteri, atau *Actinomycetes* seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Mikroorganisme penghasil enzim selulase

Mikroorganisme		
Kelompok	Genus	Spesies
Fungi/Jamur	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>
		<i>A. nidulands</i>
	<i>Fusarium</i>	<i>A. oryzae</i>
		<i>F. solani</i>
	<i>Humicola</i>	<i>F. oxysporum</i>
		<i>H. insoles</i>
	<i>Melanocarpus</i>	<i>H. grisea</i>
		<i>M. albomyces</i>
	<i>Penicilium</i>	<i>P. brasilianum</i>
		<i>P. occitanis</i>
	<i>Trichoderma</i>	<i>P. decumbans</i>
		<i>T. reesei</i>
		<i>T. longibrachiatum</i>
		<i>T. longibrachiatum</i>
Bakteri	<i>Acidothermus</i>	<i>T. harzianum</i>
		<i>A. cellulyticus</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>B. sp.</i>
		<i>C. acetobutylicum</i>
	<i>Clostridium</i>	<i>C. thermocellum</i>
<i>P. cellulose</i>		
<i>Actinomycetes</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>R. marinus</i>
		<i>R. marinus</i>
	<i>Rhodothermus</i>	<i>C. fimi</i>
		<i>C. bioazotea</i>
		<i>C. uda</i>
	<i>Cellulomonas</i>	<i>S. drozdowiczii</i>
		<i>S. sp.</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>S. lividans</i>	
	<i>T. fusca</i>	
	<i>T. curvata</i>	

(Sukumaran *et al.*, 2005).

2.5 *Actinomycetes*

Actinomycetes merupakan organisme tanah dengan sifat umum seperti bakteri dan jamur, tetapi juga mempunyai ciri khas yang cukup berbeda. Pada lempeng agar, *Actinomycetes* dapat dibedakan dengan bakteri pada umumnya dimana koloni *Actinomycetes* muncul secara perlahan menunjukkan konsistensi berbubuk dan melekat erat pada permukaan agar karakteristik tersebut berbeda dengan bakteri yang jelas berlendir dan tumbuh lebih cepat (Rozirwan *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil pengamatan Sulistyani and Akbar (2014) koloni isolat *Actinomycetes* yang muncul memperlihatkan bentuk pada umumnya yaitu bulat dengan elevasi timbul dan cembung, tepian rata dan tidak beraturan serta permukaan yang licin dan kasar atau keriput. Permukaan bertepung merupakan kumpulan hifa yang terdiri dari banyak spora. Morfologi ini terjadi pada koloni *Actinomycetes* dewasa sedangkan koloni yang masih muda hanya terdiri dari hifa. Koloni *Actinomycetes* yang masih muda tampak seperti bakteri pada umumnya yaitu permukaan bulat, cembung dan licin serta melekat kuat pada media agar.

Actinomycetes tumbuh dalam bentuk filamen miselium dan membentuk spora. Terdapat dua hal penting untuk membedakan antara fungi dengan *Actinomycetes*, yaitu :

1. *Actinomycetes* tidak mempunyai nukleus, sehingga tergolong organisme prokariotik.
2. Bentuk hifa *actinomycetes* dengan diameter 0,5-1,0 μm , sehingga lebih kecil dari hifa jamur (3-8 μm).

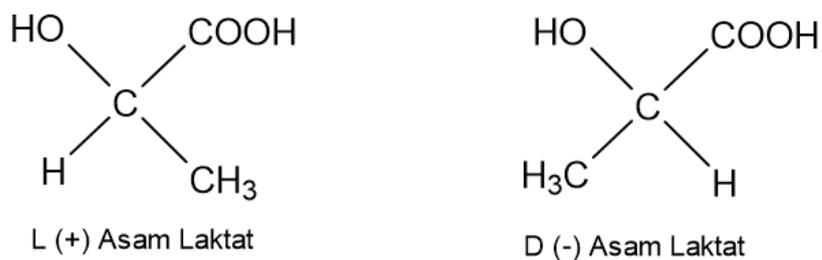
(Rozirwan *et al.*, 2020).

Actinomycetes termasuk bakteri yang tidak tahan asam, berbentuk batang, gram positif, bersifat anaerobik atau anaerobik fakultatif (mampu tumbuh baik jika ada terdapat O_2 bebas atau tidak ada O_2). *Actinomycetes* tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada keadaan lingkungan dengan pH dibawah 5,0. Rentang pH yang paling cocok untuk perkembangbiakkan *Actinomycetes* adalah antara 6,5–8,0. Pertumbuhan optimum pada suhu antara 28–37°C, tetapi beberapa

Actinomyces masih dapat tumbuh dalam jumlah besar pada suhu 55–65°C. *Actinomyces* merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa. Organisme ini ditemukan (hampir semua), dalam kompos dan tanah (Budi *et al.*, 2020).

2.6 Asam Laktat

Asam laktat (*2-hydroxypropanoic acid*) adalah asam karboksilat dengan rumus molekul (CH₃CHOHCOOH). Asam laktat mempunyai dua bentuk isomer, yaitu L (+) atau D (-) asam laktat (Purnavita dkk., 2021). D-asam laktat tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia atau dalam kata lain berbahaya untuk dikonsumsi, berbeda dengan L-asam laktat yang dapat dicerna oleh tubuh dan banyak dimanfaatkan dalam industri makanan dan farmasi (Maryanty dkk., 2019). Akan tetapi, banyak dari peneliti yang terus mengeksplorasi peluang pemanfaatan D-asam laktat yang dapat secara signifikan digunakan sebagai bahan baku pembuatan *polylactic acid* (Alexandri *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2011). Kedua bentuk isomer asam laktat tersebut ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Dua jenis isomer optikal asam laktat (Manfaati, 2010).

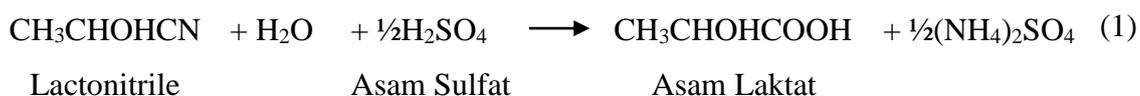
Asam laktat memiliki tiga karbon asam organik, satu atom karbon merupakan bagian dari asam atau grup karboksil, atom karbon lain merupakan bagian dari grup metil atau hidrokarbon, dan atom karbon pusat memiliki gugus alkohol. Asam laktat dalam larutan dapat melepaskan sebuah proton dari gugus asam dan menghasilkan ion *lactate* CH₃(OH)COO⁻ (Manfaati, 2010).

2.6.1 Proses Produksi Asam Laktat

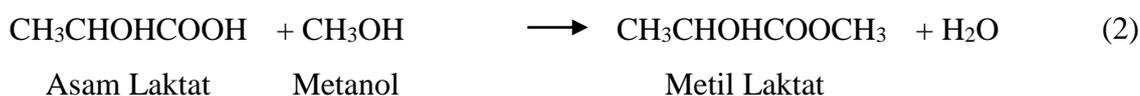
2.6.1.1 Sintesis Kimia

Bahan baku untuk proses produksi asam laktat secara sintesis kimia adalah *lactonitrile*. *Hydrogen cyanide* direaksikan dengan *acetaldehyde* dan menghasilkan *lactonitrile* dengan reaksi kimia sebagai berikut:

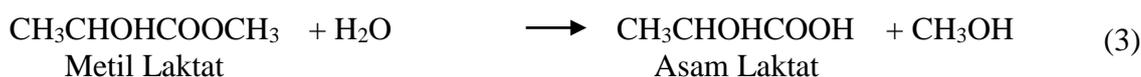
(a) Hidrolisis dengan H_2SO_4 (Persamaan 1)



(b) Esterifikasi (Persamaan 2)



(c) Hidrolisis Air (Persamaan 3)



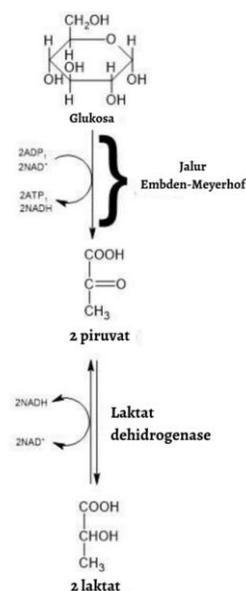
Reaksi ini terjadi pada fase cair dengan tekanan atmosfer yang cukup tinggi. Lactonitrile mentah yang dihasilkan kemudian dihidrolisa oleh H_2SO_4 pekat sehingga diperoleh asam laktat dan garam ammonium. Asam laktat dan metanol kemudian diesterifikasi menjadi metil laktat, dan dipisahkan dengan proses destilasi. Metil laktat dihidrolisa oleh air dalam kondisi asam sehingga dihasilkan asam laktat dan metanol. Proses secara kimia ini menghasilkan campuran isomer asam laktat (Manfaati, 2010).

2.6.1.2 Fermentasi

Asam laktat dapat dihasilkan juga melalui fermentasi karbohidrat. Menurut Rahmayetty dkk. (2015) sekitar 90% total produksi asam laktat di seluruh dunia dibuat melalui fermentasi secara biologis. Proses tersebut memiliki beberapa keunggulan dibandingkan sintesis secara kimia dari segi biaya produksi karena beroperasi pada temperatur rendah sehingga tidak membutuhkan energi yang

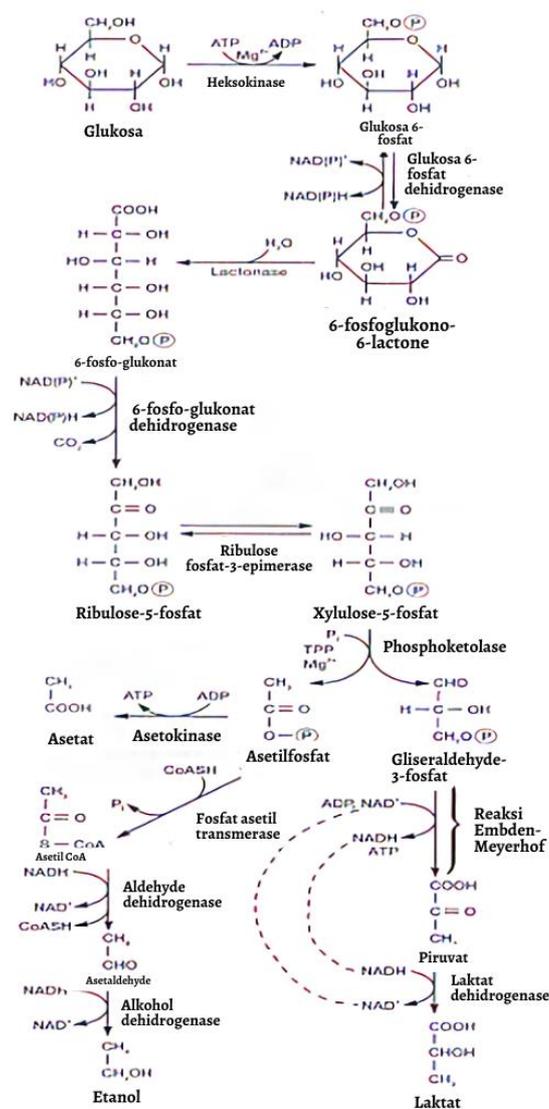
besar (John *et al.*, 2006). Fermentasi asam laktat dilakukan dalam kondisi aerob atau anaerob. Sumber karbon yang digunakan untuk memproduksi asam laktat dapat berupa gula dalam bentuk murni seperti glukosa (Rahmayetty dkk., 2015) dan pentosa seperti xilosa atau manosa yang merupakan hasil dari hidrolisis substrat lignoselulosa (Alexandri *et al.*, 2019).

Salah satu, mikroorganisme pengkonversi monomer gula menjadi asam laktat adalah Bakteri Asam Laktat atau BAL. BAL merupakan kelompok bakteri probiotik yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba seperti asam laktat dan bakteriosin, sehingga dapat digunakan sebagai organisme biokontrol karena kemampuannya dalam menghambat mikroorganisme lain (Wu Wu *et al.*, 2011). Beberapa studi dalam produksi asam laktat telah banyak dilakukan dengan menggunakan berbagai mikroorganisme seperti bakteri *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Sporolactobacillus sp.* (Kurniatul, 2010; Purnavita dkk., 2021; Subramanian *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2011), dan fungi *Rhizopus sp.* (Kumar and Shivakumar, 2014).



Gambar 9. Jalur metabolisme *homofermentative lactic acid* (Manfaati, 2010).

Jenis bakteri asam laktat juga dapat digolongkan sebagai *homofermentative lactic acid* karena pada proses metabolismenya mampu menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar sebagai produk utama dengan sedikit hasil samping melalui *Embden-Meyerhof pathway* (Manfaati, 2010). Jalur metabolisme pembentukan asam laktat ditunjukkan pada Gambar 9. Melalui jalur glikolisis, glukosa dikonversi menjadi asam piruvat secara anaerob sehingga dihasilkan 2 mol asam laktat dan 2-ATP dengan bantuan enzim L-laktat dehydrogenase atau D-laktat dehydrogenase yang terdapat pada mikroorganisme pengkonversi (Oehmcke-Hecht *et al.*, 2017).



Gambar 10. Jalur metabolisme *heterofermentative lactic acid* (Manfaati, 2010).

Pada penelitian yang dilakukan Wang (2011) yang menggunakan strain *Sporolactobacillus sp.* dihasilkan D-asam laktat sejumlah 207 g.L⁻¹ dengan waktu fermentasi 54 jam sedangkan, dengan menggunakan strain *Lactococcus lactis* dihasilkan L-asam laktat sejumlah 73 g.L⁻¹ dengan waktu fermentasi 48 jam (Mamta *et al.*, 2010). Mikroorganisme yang juga menghasilkan L-asam laktat adalah *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, dan *Bifidobacterium spp.*.

Proses produksi asam laktat dengan metode fermentasi dapat dilakukan melalui 2 cara yaitu, konversi enzimatik dari selulosa menjadi monomer gula yang kemudian difermentasi dalam proses yang disebut hidrolisis atau hidrolisis dan konversi monomer gula menjadi asam laktat melalui fermentasi. Hidrolisis dan fermentasi dapat dilakukan dengan metode *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF). Proses ini dilakukan dengan menghidrolisis bahan lignoselulosa menjadi glukosa dan kemudian difermentasi menjadi produk asam laktat dalam 2 sistem yang terpisah (Maryanty dkk., 2019).

Hal tersebut menjadi salah satu keunggulan proses ini dimana, masing-masing dari kedua tahap tersebut dapat dioptimalkan secara terpisah terkait suhu dan pH. Selain itu proses fermentasi pada metode SHF dilakukan dengan filtrat hasil hidrolisis dan bukan dalam campuran lignoselulosa padat seperti pada metode SSF (Galbe *et al.*, 2011). Untuk mengaplikasikan proses SHF diperlukan seleksi mikroorganisme dengan memperhatikan suhu dan pH optimal pertumbuhan mikroorganisme saat proses fermentasi (Aulitto *et al.*, 2019).

Lactococcus lactis telah digunakan menjadi mikroorganisme pengkonversi menggunakan metode SHF dalam banyak penelitian sebelumnya (Ueno *et al.*, 2003; Pattana *et al.*, 2010; Mamta *et al.*, 2010). Diketahui kondisi optimal untuk proses produksi asam laktat dengan *l. lactis* terdapat pada pH 6.5 dan suhu dibawah 42°C (Mamta *et al.*, 2010).

2.6.2 Aplikasi dan Penggunaan Asam Laktat

Asam laktat memiliki peluang pemanfaatan yang sangat luas karena memiliki kualitas yang berbeda baik dalam industri makanan, tekstil, kimia, atau farmasi. Menurut Jamshidian (2010) produksi asam laktat di dunia meningkat setiap tahunnya dengan estimasi 5-8% dari 370.000 ton. Jalur metabolisme *fermentative* menjadi hal yang penting dalam proses produksi asam laktat karena jumlah yang dihasilkan dan luasnya cakupan mikroorganisme yang dapat menghasilkan asam laktat dengan menggunakan banyaknya alternatif substrat (Rodrigues *et al.*, 2017).

Garam kalsium dari asam laktat dapat diproduksi dalam bentuk *granular* atau *powder*. Contohnya seperti, *calcium lactate trihydrate* yang dapat menjadi sumber kalsium diet dan zat pembeku darah pada kasus pendarahan saat operasi pembedahan. *Calcium lactate* juga dapat digunakan sebagai *buffer* pada sediaan antibiotik untuk industri farmasi (Manfaati, 2010). Asam laktat dalam bentuk ester (*stearoyl-2-lactylates*, *glyceryl lactostearate*, *glyceryl lactopalmitate*) dapat digunakan sebagai bahan pengemulsi makanan pada industri roti dan biskuit sehingga didapatkan tekstur yang lembut. Pengemulsi tersebut membutuhkan asam laktat sebagai bahan baku karena sifatnya yang stabil terhadap panas (Narayanan *et al.*, 2004).

Asam laktat sebagian besar juga digunakan sebagai zat aditif pada makanan. Hal tersebut karena asam laktat memiliki rasa asam yang sederhana dengan bau yang tidak tajam. Kombinasi asam laktat dengan asam propionat atau asam asetat dapat digunakan sebagai bahan pengawet. Harga asam laktat lebih mahal jika dibandingkan dengan perisa asam lainnya namun, asam laktat dipilih karena tidak mempengaruhi rasa asli dari suatu makanan (Manfaati, 2010).

L-asam laktat secara komersial banyak diproduksi dan dimanfaatkan karena aman untuk dikonsumsi oleh tubuh. Pengembangan aplikasi L-asam laktat sebagai *poly*

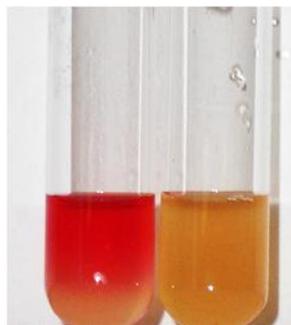
lactic acid untuk pembuatan *biofilm* telah banyak dilakukan. Saat ini beberapa peneliti mengembangkan polimer terbarukan seperti *stereocomplex* PLA menggunakan kedua isomer asam laktat. Selain karena tingginya stabilitas dari hasil yang diperoleh, pemanfaatan asam laktat juga dapat lebih maksimal (Rodrigues *et al.*, 2017).

2.7 Analisis Asam Laktat

Untuk mengetahui keberhasilan proses biokonversi selulosa dari limbah bromelin nanas perlu dilakukan analisis kandungan asam laktat sebagai produk yang dihasilkan. Analisis dilakukan secara kualitatif untuk mengidentifikasi jenis asam organik yang dihasilkan dan dilanjutkan secara kuantitatif untuk mengetahui konsentrasi asam laktat yang terkandung dalam substrat hasil biokonversi.

2.7.1 Methyl-Red Test

Uji kualitatif dengan indikator dapat dilakukan untuk mengidentifikasi produk asam laktat yang dihasilkan. Umumnya, pH optimum asam laktat standar dari fermentasi mikroba adalah 5.0-6.0 dengan pKa 3.86 (Alexandri *et al.*, 2019). Hasil dari proses metabolisme glukosa dengan *homofermentative lactic acid* adalah asam laktat yang dapat menyebabkan menurunnya pH sekitar 4.4 (Thakur *et al.*, 2017). Indikator metil merah (*p-dimethyl aminoaeobenzene-O-carboxylic acid*) memiliki range pH 4.4-6.0. Apabila media pertumbuhan berubah warna menjadi merah setelah penambahan indikator metil merah artinya pH berada disekitar *range* indikator yang menandakan campuran asam organik dari proses fermentasi dihasilkan. Sedangkan, warna kuning mengindikasikan campuran asam organik tidak terbentuk karena pH yang tidak sesuai keadaan optimum atau diatas 6. Indikator metil merah dapat digunakan untuk mengidentifikasi asam laktat seperti pada Gambar 11.

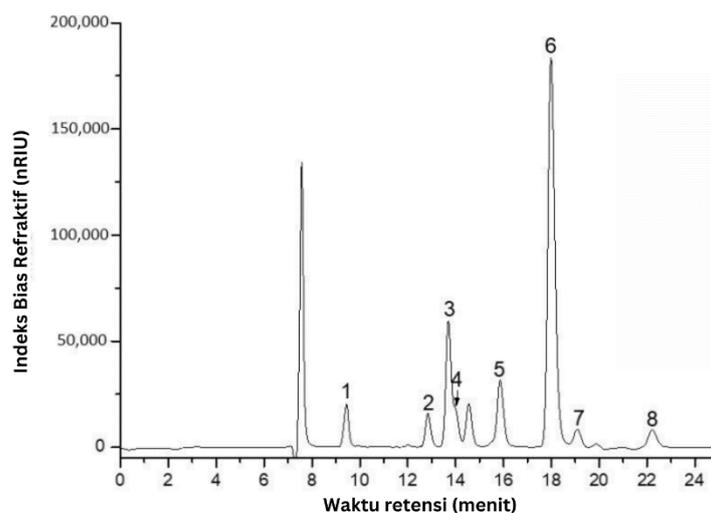


Gambar 11. Hasil positif dan negatif *methyl-red test* (McDevitt, 2009).

2.7.2 *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

Prinsip dari metode *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* adalah pemisahan analit berdasarkan kepolarannya. Alat ini terdiri dari kolom sebagai fasa diam dan larutan tertentu sebagai fasa gerak. Perbedaan HPLC dengan kromatografi lainnya adalah pada HPLC digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fasa gerak. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya, dan kecepatannya untuk sampai ke detektor akan berbeda. Hal tersebut akan teramati pada kromatogram yang menunjukkan waktu retensi untuk setiap sampel yang diinjeksikan sebagai puncak-puncak yang terpisah (Ardianingsih, 2009).

Waktu retensi adalah selang waktu yang diperlukan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor. Waktu retensi analit yang tertahan pada fasa diam dinyatakan dengan t_R , sedangkan waktu retensi analit yang tidak tertahan pada fasa diam atau sering disebut waktu retensi pelarut pengelusi dinyatakan sebagai t_0 atau t_M (waktu migrasi) (Sukma dan Fajri, 2019). Waktu retensi dari beberapa asam organik terdapat pada Gambar 12. Pada kromatogram HPLC dari analisis standar yang dilakukan oleh (Mitreia *et al.*, 2020) menggunakan *Refractive Index (RI) Detector* pada panjang gelombang 220 nm dapat diidentifikasi puncak dari asam laktat pada $t_R \pm 13,67$ min.



Gambar 12. Kromatogram HPLC dari standar asam organik. Puncak: 1 = asam sitrat, 2 = asam suksinat, 3 = asam laktat, 4 = asam format, 5 = asam asetat, 6 = asam propionat, 7 = asam butarat, dan 8 = asam malat (Mitre *et al.*, 2020).

Menurut Ardianingsih (2009), beberapa kelebihan yang dimiliki oleh HPLC adalah sebagai berikut :

1. Kecepatan dalam analisis suatu sampel menjadi aspek yang sangat penting dalam hal analisis ion yaitu untuk mengurangi biaya, bisa menghasilkan data yang akurat dan cepat dan bisa mengurangi limbah yang dihasilkan dari penggunaan eluen.
2. Sensitivitasnya tinggi. Perkembangan teknologi mikro prosesor yang dikombinasi dengan efisiensi kolom pemisah, mulai ukuran diameter dalam millimeter sampai skala mikro membuat pendeteksian ion dalam sampel menjadi lebih baik meskipun jumlah sampel yang diinjeksikan kedalam kolom pemisah sangat sedikit.
3. Selektivitasnya tinggi sehingga dapat menganalisis senyawa organik maupun senyawa anorganik.
4. Teknik pendeteksiannya secara serempak untuk memperkecil jumlah limbah yang dihasilkan, memperpendek waktu analisis serta memaksimalkan hasil yang diinginkan.
5. Kolom pemisah bersifat stabil.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan Oktober 2022 hingga bulan Juni 2023 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Biomassa limbah bromelin diperoleh dari PT. *Great Giant Pineapple*. Isolat *Actinomycetes* diisolasi dari tanah *mangrove* yang diambil dari Pantai Sari Ringgung, Pesawaran, Lampung. Isolat *Lactococcus lactis* InaCC-B201 diperoleh dari BRIN Cibinong. Analisis karakter substrat tepung bromelin menggunakan *X-Ray Diffractometer* (XRD) dilakukan di Universitas Negri Padang. Analisis penentuan konsentrasi gula pereduksi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung serta analisis konsentrasi asam laktat standar dan sampel menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dilakukan di LPPT Universitas Gadjah Mada.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat-alat gelas, gunting, blender, pengayak 60 mesh, spatula, bunsen, jarum ose, mikropipet, pipet tetes, neraca analitik, termometer, cawan petri, corong, rak tabung reaksi, mortal dan alu, *freezer*, desikator, oven, penangas air, sentrifus, tabung sentrifus, pengaduk magnet, *shaker*, autoklaf, pH meter, spatula, inkubator, Spektrofotometer UV-Vis

merek *Agilent Technologies* tipe *Cary 100*, *X-Ray Diffractometer* (XRD) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merek *Knauer*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah substrat bromelin nanas, sedimen tanah *mangrove*, strain *Lactococcus lactis* InaCC-B201, asam sulfat pekat (H_2SO_4), kalsium karbonat ($CaCO_3$), media *International Streptomyces Project-2* (ISP-2), media *Yeast Malt Broth* (YMB), *carboxymethyl cellulose* (CMC), *Birchwood Xylan*, natrium klorida (NaCl), *congo-red*, glukosa, indikator metil merah, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), media *de Man, Rogosa, and Sharpe Broth* (MRSB), buffer fosfat pH 7, indikator *universal*, aluminium foil, kertas saring, akuades.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Preparasi Limbah Bromelin

Limbah bromelin nanas dari PT. *Great Giant Pineapple* dikeringkan dibawah sinar matahari selama 4 jam. Kemudian, dipotong-potong hingga berukuran kecil sehingga mudah dihaluskan untuk menjadi tepung bromelin. Tepung diayak menggunakan ayakan 60 mesh (250 μm) dan disimpan dalam keadaan tertutup.

3.3.2 Preparasi Strain *Lactococcus lactis*

Kultur *Lactococcus lactis* InaCC-B201 yang diisolasi dari buah srikaya diperoleh dari stok kultur BRIN Cibinong. Kultur diinokulasi dalam gliserol 20% dan disimpan pada *freezer* untuk penyimpanan jangka panjang. Untuk proses fermentasi isolat diinokulasi sejumlah 1 ose pada 25 mL MRS-*broth* dan diinkubasi pada suhu optimum 30°C selama 24 jam. 7,5 mL hasil inkubasi kemudian dipindahkan ke 50 mL media MRS-*broth* steril lalu

diinkubasi kembali pada suhu 30°C pada waktu optimum (Bustamante *et al.*, 2020). Kultur siap digunakan untuk tahap fermentasi sebagai inokulum.

3.3.3 Pengukuran Indeks Kristalinitas Limbah Bromelin

Pengukuran kristalinitas tepung bromelin dilakukan dengan analisis XRD. Analisis dilakukan untuk mengetahui struktur kristal selulosa pada tepung bromelin yang melalui proses *pre-treatment* secara fisika. Indeks kristalinitas selulosa dapat dihitung dengan metode empiris yang dihitung dengan rumus pada Persamaan 4.

$$\%CrI = \frac{\text{Area fase kristalin}}{\text{Area total fase kristalin dan amorf}} \times 100\% \quad (4)$$

3.3.4 Analisis Komponen Limbah Bromelin dengan Metode TAPPI

3.3.4.1 Hidrolisis Asam

Tepung bromelin ditimbang sebanyak 300 mg lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 50 mL dan ditambahkan asam sulfat (H₂SO₄) 72% sebanyak 7 mL. Erlenmeyer ditutup aluminium foil dan distirer selama 90 menit. Setelah itu, campuran dipindahkan ke Erlenmeyer 300 mL dan ditambahkan 199 mL akuades sehingga asam menjadi 4%. Kemudian, dipanaskan dengan autoklaf 121°C 1 atm selama 1 jam. Hasil proses tersebut berupa filtrat (*soluble lignin*) dan endapan (*insoluble lignin*). Filtrat dan endapan dipisahkan melalui penyaringan dengan kertas saring yang telah ditimbang. Setelah terpisah, endapan dicuci dengan akuades sebanyak 50 mL untuk melarutkan zat-zat lain yang dapat larut dalam air.

3.3.4.2 Analisis

3.3.4.2.1 Analisis *Soluble Lignin*

Filtrat hasil hidrolisis diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 240 nm. Sampel diencerkan menggunakan akuades agar nilai absorbansi berkisar 0,7-1,0. Jumlah lignin larut asam (LLA) dapat dihitung menggunakan Persamaan 5 dan 6.

$$\text{Soluble Lignin} = \frac{\text{UV abs} \times \text{V filtrat} \times \text{Pengenceran}}{\varepsilon \times \text{ODW sampel} \times \text{lebar kuvet}} \times 10 \quad (5)$$

$$\text{Pengenceran} = \frac{\text{Vsampel} + \text{Vpelarut}}{\text{Vsampel}} \quad (6)$$

Keterangan:

LLA adalah lignin larut asam (%), abs adalah absorbansi UV-Vis, Volume filtrat adalah filtrat hasil hidrolisis (mL), ε adalah absorptivitas biomassa, ODW sampel adalah berat sampel (mg), dan lebar kuvet yang dipakai adalah 1 cm.

3.3.4.2.2 Analisis *Insoluble Lignin*

Endapan pada kertas saring yang telah dicuci dikeringkan dalam oven hingga beratnya konstan, kira-kira selama 4 jam. Kertas saring didinginkan pada suhu ruang lalu ditimbang dan dicatat. Untuk menghitung jumlah lignin tidak larut asam menggunakan Persamaan 7.

$$\text{Insoluble Lignin} = \frac{\text{Berat endapan akhir hidrolisis}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\% \quad (7)$$

3.3.4.2.3 Analisis Karbohidrat Total

Filtrat hasil hidrolisis dinetralkan menggunakan kalsium karbonat hingga pH 5-6 dalam gelas beaker 100 mL. Kalsium karbonat ditambahkan secara perlahan

kedalam filtrat dan diaduk menggunakan magnetic stirrer. Setelah mencapai pH 5-6, penambahan kalsium karbonat dihentikan dan dibiarkan hingga sampel mengendap. Filtrat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda 540$ nm dengan mereaksikan sampel dengan pereaksi DNS dan diinkubasi selama 15 menit.

3.3.5 Penapisan Isolat *Indigineous Actinomyces Mangrove*

Penapisan isolat *Actinomyces* dilakukan untuk memperoleh bakteri yang memiliki aktivitas selulolitik dan xilanolitik. Penapisan dilakukan dengan menggunakan media ISP-2 yang mengandung 0,4 gram glukosa, 0,4 gram *yeast extract*, 2 gram agar, 1 gram malt dalam 100 mL akuades dan ditambahkan CMC 0,5 g (untuk uji aktivitas selulolitik) dan xilan 0,5 g (untuk uji aktivitas xilanolitik). Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit lalu ditambahkan ampisilin sebagai anti-bakteri sebanyak 4 mL dan 1 tetes kandistatin sebagai anti-jamur yang kemudian dituang dalam cawan petri sebanyak ± 20 mL dan didiamkan hingga mengeras. Isolat murni hasil isolasi ditotolkan pada media yang telah disiapkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5-7 hari. Setelah isolat inkubasi tercapai, media yang telah ditumbuhi bakteri disiram menggunakan *congo-red* selama 15 menit yang berfungsi menghidrolisis selulosa pada media CMC dan xilan menjadi glukosa membentuk zona bening disekitar koloni dan dibilas menggunakan NaCl 1% untuk memperjelas zona bening yang terbentuk sehingga lebih mudah diamati. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa bakteri memiliki aktivitas selulolitik dan xilanolitik. Setelah didapatkan zona bening, indeks aktivitas selulolitik dan xilanolitik diukur dengan Persamaan 8.

$$\text{Indeks Aktivitas} = \frac{A-B}{B} \quad (8)$$

Keterangan :

A = diameter zona bening (mm)

B = diameter koloni (mm)

3.3.6 *Bio-pretreatment* dan Hidrolisis Tepung Bromelin

3.3.6.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat dengan menimbang glukosa sejumlah 0,05 gram dalam 50 mL aquades sehingga konsentrasinya 1 g/L. Kemudian dibuat deret standar dengan konsentrasi berturut-turut adalah 0,8 g/L ; 0,6 g/L ; 0,4 g/L dan 0,2 g/L. Masing-masing larutan kemudian ditambahkan pereaksi DNS dan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 540 nm.

3.3.6.2 Optimasi Waktu

Media fermentasi *Yeast Malt Broth* (YMB) mengandung komposisi media dekstrosa 0,4%, ekstrak malt 1%, ekstrak ragi 0,4% sejumlah 250 mL dengan pH awal diatur menggunakan larutan buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2 N pH 7,0 disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dalam autoklaf (Satria *et al.*, 2020). Kemudian, ditambahkan 5% substrat tepung bromelin dan 4 ose isolat *Actinomycetes* terpilih kemudian dishaker pada kecepatan 120 rpm. *Sampling* dilakukan selama 12 hari setiap 24 jam sekali dengan dilakukan pemisahan supernatan menggunakan sentrifus 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berlabel dan dimasukkan kedalam freezer untuk ditentukan kadar gula pereduksi menggunakan metode DNS dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 540 nm.

3.3.6.3 Produksi Hidrolisat

Produksi hidrolisat dilakukan menggunakan media fermentasi *Yeast Malt Broth* (YMB) dengan komposisi dan perlakuan yang sama seperti tahap (3.3.6.2) dibuat sejumlah 1 L. Media yang telah steril didiamkan selama ± 12 jam dalam LAF. Selanjutnya, ditambahkan 16 ose isolat *Actinomycetes* terpilih. *Sampling* dilakukan pada waktu optimum yang diperoleh pada tahap sebelumnya dengan dilakukan pemisahan supernatan menggunakan sentrifus 5000 rpm selama 20

menit. Supernatan dimasukkan ke dalam wadah rapat dan dimasukkan ke dalam *freezer* untuk ditentukan kadar gula pereduksi menggunakan metode DNS dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 540 nm.

3.3.7 Biokonversi dan Fermentasi Asam Laktat

3.3.7.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Lactococcus lactis*

Kurva pertumbuhan dibuat untuk mengetahui waktu optimum pertumbuhan bakteri pada suhu optimalnya. Kultur *Lactococcus lactis* diinokulasikan sejumlah 1 ose pada 25 mL media MRS-broth kemudian diinkubasi pada suhu optimum 30°C selama 24 jam. 7,5 mL inokulum awal dipindahkan ke 50 mL media MRS-broth steril lalu diinkubasi kembali pada suhu 30°C dan dilakukan pengadukan secara berkala. *Sampling* dilakukan dengan interval waktu 4 jam sekali selama 28 jam. Hasil *sampling* kemudian diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 600 nm.

3.3.7.2 Fermentasi Hidrolisat

Prosedur tahap fermentasi mengacu pada penelitian (Bustamante *et al.*, 2020) dengan modifikasi. Fermentasi dilakukan dengan memanfaatkan hidrolisat hasil hidrolisis dengan menggunakan 95% (V/V) dalam media MRS-broth steril dengan pH sistem yang telah diatur sebesar 6,5 dengan NaOH 4 M. Kemudian ditambahkan 5% (V/V) inokulum *Lactococcus lactis* dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30°C. *Sampling* dilakukan pada jam ke-20 dimana *Lactococcus lactis* memasuki fase stasioner, selama fermentasi dilakukan pengadukan secara berkala kemudian dilakukan pemisahan supernatan menggunakan sentrifus 5000 rpm selama 20 menit.

3.3.8 Analisis Kualitatif Asam Laktat Biokonversi

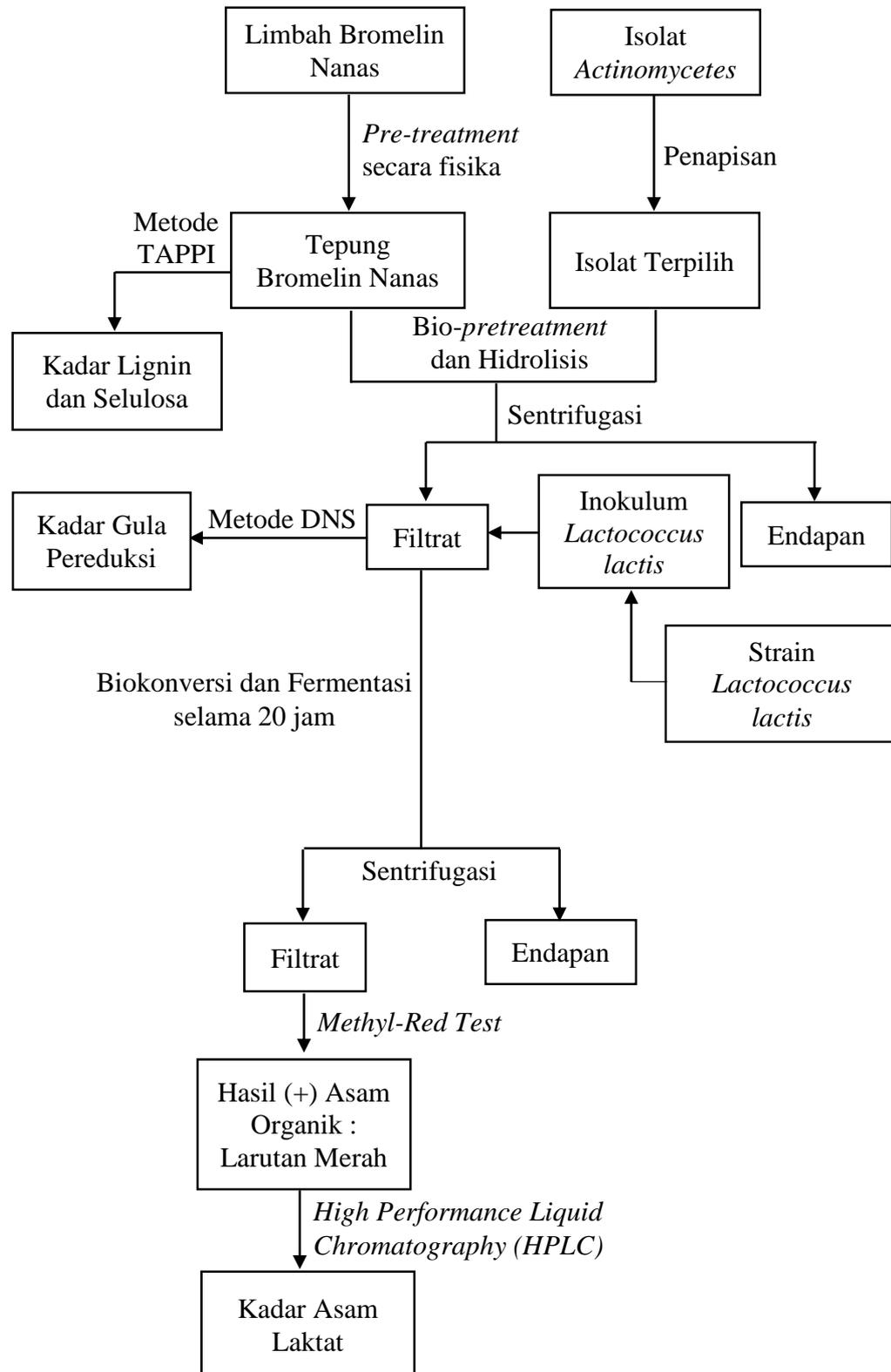
Filtrat hasil pemisahan sampel biokonversi diuji secara kualitatif dengan menggunakan indikator metil merah. Dilakukan pengujian kontrol dari hasil fermentasi menggunakan 5% glukosa dalam media pertumbuhan *Lactococcus lactis* sebagai kontrol positif dan tanpa penambahan glukosa sebagai kontrol negatif. Hasil yang diperoleh bertujuan untuk mengidentifikasi adanya asam organik karna perubahan pH yang terjadi pada tahap fermentasi (Thakur *et al.*, 2017).

3.3.9 Analisis Kuantitatif Asam Laktat Biokonversi

Filtrat hasil pemisahan sampel biokonversi asam laktat yang telah teridentifikasi positif pada uji kualitatif dilanjutkan dengan uji kuantitatif menggunakan HPLC. Sampel dipipet sebanyak 20 μL dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Ditambahkan akuades *pro injection* hingga tanda batas. Sampel disaring menggunakan filter 0,45 μm dan dimasukkan ke dalam vial. Sampel dilakukan pengulangan sejumlah 2 kali dan masing-masing diinjek sebanyak 20 μL pada sistem HPLC. Analisis sampel dilakukan dengan waktu retensi 25 menit. Setelah itu, dibuat larutan standar asam laktat untuk mendapatkan kurva standar asam laktat. Larutan standar asam laktat yang digunakan adalah larutan 10.000 $\mu\text{g/mL}$ dengan deret standar 8 seri konsentrasi yaitu 1; 2; 5; 10; 25; 50; 100; dan 200 $\mu\text{g/mL}$. Larutan deret standar diinjek sebanyak 20 μL pada sistem HPLC.

3.4 Diagram Alir

Adapun diagram alir dari penelitian ini adalah sebagai berikut :



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Kandungan lignoselulosa pada limbah bromelin nanas telah dianalisis dengan metode TAPPI yang terdiri dari karbohidrat (selulosa) dan lignin berturut-turut sebesar 52,58% dan 39,16%.
2. Isolat *Actinomyces* terpilih diperoleh dengan kode ActM-25 yang diisolasi dari sedimen *mangrove* memiliki aktivitas selulolitik tertinggi dari hasil penapisan yaitu 3,42 dan xilanolitik 0,33.
3. Tahap hidrolisis dilakukan dengan memanfaatkan enzim yang dihasilkan oleh isolat ActM-25 pada kondisi waktu optimum hidrolisis pada hari ke-9 sehingga menghasilkan konsentrasi gula pereduksi maksimum sebesar 81,4870 g/L dengan *yield* 89,26%.
4. Biokonversi asam laktat dilakukan pada tahap fermentasi dengan memanfaatkan mikroorganisme *Lactococcus lactis* pada waktu optimum 20 jam dengan konsentrasi asam laktat dalam sampel sebesar 72,45 g/L dan *yield* dari proses fermentasi sebesar 88,83%.

5.2. Saran

Penelitian yang telah dilakukan dapat meningkatkan *yield* asam laktat yang dihasilkan dari metode biokonversi secara SHF dengan memperhatikan kondisi optimum dalam setiap tahap. Parameter fermentasi yang sudah diamati adalah waktu, sedangkan parameter lainnya seperti suhu, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi substrat belum diamati lebih jauh. Hal tersebut disarankan untuk dilakukan pada penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A., and Winaningsih, I. (2020). Effect of Some Parameter on Lactic Acid Fermentation from Pineapple Waste by *Lactobacillus Delbrueckii*. *Proceedings of 2nd International Conference on Chemical Process and Product Engineering*, 2197(1), 060002.
- Alexandri, M., Schneider, R., Mehlmann, K., and Venus, J. (2019). Recent Advances in D-Lactic Acid Production from Renewable Resources : case studies on agro-industria; waste streams. *Food Technology Biotechnology.*, 57(3), 293–304.
- Amore, A., & Pepe, Olimpia., Ventorino, Valeria., Leila, Birolo., Chiara Giangrande., and V. F. (2012). Cloning and Recombinant Expression of A Cellulase from The Cellulolytic Strain *Streptomyces sp.* G12 Isolated from Compost. *Microbial Cell Factories*, 11, 164.
- Anindyawati, T. (2010). Potensi Selulase dalam Mendegradasi Lignoselulosa Limbah Pertanian untuk Pupuk Organik. *Berita Selulosa*, 45(2), 70–77.
- Ardianingsih, R. 2009. (2009). Penggunaan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dalam Proses Analisa Deteksi Ion. *Berita Dirgantara*, 10(4), 101–104.
- Aulitto, M., Fusco, S., Nickel, D.B., Bartolucci, S., Contursi, P., and Franzen, C. J. (2019). Seed Culture Pre-Adaptation of *Bacillus Coagulans* MA-13 Improves Lactic Acid Production in Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Biotechnology and Biofuels*, 12(45).
- Awatshi, M., Kaur, J., and Rana, S. (2013). Bioetanol Production Through Water Hiyacint *Eichornia Crassipes* via Optimization of The Pretreatment Condition. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 3, 42–46.
- Banerjee, S., Ranganathan, V., Patti, A., and Arora, A. (2018). Valorisation of Pineapple Wastes for Food and Therapeutic Applications. *Trends in Food Science & Technology*.
- Bertrand, R. L. (2019). Lag Phase is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *Journal of Bacteriology*, 201(7), 1–21.
- Borjesson, M., and Westman, G. (2015). Crystalline Nanocellulose-Preparation, Modification, and Properties. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 6(4), 159–191.

- Boshagh, F. (2021). Measurement Methods of Carbohydrates in Dark Fermentative Hydrogen Production- A Review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46, 24028–24050.
- Budi, M.B.S., Giyanto, Tondok, E. T. (2020). Isolation of Actinomycetes from Peatland to Suppress The Growth of Ganoderma Boninense The Causal Agent of Basal Stem Rot Disease in Oil Palm. *Biodiversitas*, 23(11), 5914–5922.
- Bustamante, Daniel., Tortajada, Marta., Ramon, Daniel., Rojas, A. (2020). Production of D-Lactic Acid by the Fermentation of Orange Peel Waste Hydrolysate by Lactic Acid Bacteria. *Fermentation*, 6(1), 2–6.
- Carrión-Prieto, Paula., Martin-Ramos, Pablo., Hernández-Navarro, Salvador., Sánchez-Sastre, Luis., Marcos-Robles, José., Martín-Gil, J. (2019). Crystallinity of cellulose microfibers derived from *Cistus ladanifer* and *Erica arborea*. *Maderas: Ciencia y Tecnología.*, 21(4), 447–456.
- Chen, H. (2014). Biotechnology of Lignocellulose. In *Springer*.
- Dewiyanti, Irma., Darmawi, Darmawi., Muchlisin, Zainal Abidin., Helmi, Teuku Zahrial., Arisa, Iko Imelda., Defira, Cut Nanda., Fitriyani., and Yura, S. (2021). Cellulase Activity of Bacteria Isolated from Water of Mangrove Ecosystem in Aceh Province. *Depik Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir Dan Perikanan*, 10(3), 243–250.
- Dewiyanti, Irma., Darmawi, Darmawi., Muchlisin, Zainal Abidin., Helmi, Teuku Zahrial., Arisa, Iko Imelda., Rahmiati, Rahmiati., Destri, Erly., and Fanisha, S. (2022). Characteristic and Activity of Cellulolytic Bacteria Isolated from Mangrove Soil in Northern Coast of Aceh Province. *Biodiversitas*, 23(12), 6587–6599.
- Evelyna, A., Prakusya, N., Ariswari, A.N., Suprana, D.J.D.S., dan Purwasasmita, B. S. (2019). Sintesis dan Karakterisasi Nanoselulosa Berbahan Serat Nanas sebagai Komponen Penguat Material Kedokteran Gigi. *Jurnal Material Kedokteran Gigi*, 8(2), 60–64.
- Fatmawati, Putri., Dewi, M. N., Wigayanti., Visca, R., & Latirah., Sulistiyo, J. (2022). Penentuan Terbinafine Hidroklorida dalam Kosmetik Sediaan Pemutih Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Serambi Engineering*, 7(4), 4065–4072.
- Fatriasari, W., Hamzah, F.N., Pratomo, B.I., Fajrutami, R.A.E., Falah, R., Laksana, R.P.B., Ghozali, M., Iswanto, A.H., Hermiati, E., and Winarni, I. (2020). Optimizing The Synthesis of Lignin Derivatives from *Acacia Mangium* to Improve the Enzymatic Hydrolysis of Kraft Pulp Sorghum Bagasse. *International Journal of Renewable Energy Development*, 9(2), 227–235.

- Galbe, M., Wallberg, O., Zacchi, G. (2011). Techno-Economic Aspects of Ethanol Production from Lignocellulosic Agricultural Crops and Residues. *Wastes from Agriculture, Forestry, and Food Processing*, 2, 615–628.
- Gaspersz, Marce Monica., Fitrihidajati, H. (2022). Utilization of Eco-enzyme from Citrus Peels and Pineapple Peels Waste as Detergent LAS Remediation Agent. *LenteraBio*, 11(3), 503–513.
- Hamzah, A.F.A., Hamzah, M.H., Man, H.C., Jamali, N.S., Siajam, S.I., and Ismail, M. H. (2021). Recent Updates on the Conversion of Pineapple Waste (Ananas comosus) to Value-Added Products, Future Perspective and Challenges. *Agronomy*.
- Hanim, C. (2003). Optimalisasi Pertumbuhan Bakteri Xilanolitik dari Ketam (Eriocheir sinensis). *Buletin Peternakan*, 27(4), 168–176.
- Hermiati, E., Risanto, L., Anita, S.H., Aristiawan, Y., Sudiyani, Y., Hanafi, A., dan Abimayu, H. (2014). Sakarifikasi Serat Tandan Kosong dan Pelepah Kelapa Sawit Setelah Pretreatment Menggunakan Kultur Campuran Jamur Pelapuk Putih *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 32(2), 111–122.
- Hernandez-Beltran, J., U., Hernandez-De Lira, I., O., Cruz-Santos, M., M., Saucedo-Luevanos, A., Hernandez-Teran, F., Balagurusamy, N. (2019). Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield. *Applied Sciences.*, 9(18).
- Herrera, L.K., Justo, A., Duran, A., Jimenez de Haro, M. C., Franquelo, M. L., and Perez Rodríguez, J. L. (2010). Identification of Cellulose Fibres Belonging to Spanish Cultural Heritage using Synchrotron High Resolution X-ray Diffraction. *Applied Physics*, 99, 391–398.
- Idris, A., and Suzana, W. (2006). Effect of Sodium Alginate Concentration, Bead Diameter, Initial pH and Temperature on Lactic Acid Production from Pineapple Waste using Immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 1117–1123.
- Inayah, M.N., Ambarsari, L., dan Meryandini, A. (2016). Karakterisasi Xilanase dari Bakteri Xilanolitik XJ20 asal Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi Indonesia. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 2(1), 25–30.
- Isikgor, F.H., and Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic Biomass : A Sustainable Platform for The Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polymer Chemistry.*, 6, 4497–4559.
- Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Imran, M., Jacquot, M., and Desorby, S. (2010). Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 552–571.

- Jayus, Jay., Suwasono, Sony., Wijayanti, I. (2017). Produksi Bioetanol Secara SHF dan SSF Menggunakan *Aspergillus Niger*, *Trichoderma Viride* dan *New Aule Instant Dry Yeast* Pada Media Kulit Ubi Kayu. *Jurnal Agroteknologi*, 11(1), 61–68.
- Jin, B., Yin, P., Ma, Y., and Zhao, L. (2005). Production of Lactic Acid and Fungal Biomass by *Rhizopus fungi* from Food Processing Waste Streams. *Journal Microbiol Biotechnolgy*, 32, 678–686.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. (2006). Solid-state Fermentation for L-lactic Acid Production from Agro Wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 759–763.
- Kumar, R., and Shivakumar, S. . (2014). Production of L-Lactic Acid from Starch and Food Waste by Amylolytic *Rhizopus oryzae* MTCC 8784. *International Journal of Chemical Technology Research*, 6(1), 527–537.
- Kurniasari, Insannul., Sulistyaningtyas, Ayu Rahmawati., Darmawati, S. (2022). Isolasi Bakteri Proteolitik Hasil Fermentasi Inasua Ikan Bawal (*Colossoma macropomum*). *Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, 1285–1296.
- Kurniatul, F. L. (2010). *Peningkatan Produksi Asam Laktat Oleh Lactococcus lactis FNCC-086 Terimobilisasi Melalui Optimasi Medium Fermentasi (Kajian : Konsentrasi Yeast Extract dan Konsentrasi MgSO4)*. Universitas Brawijaya.
- López-López, Azucena., Alejandro, Santiago-Hernández., Maribel, Cayetano-Cruz., Yolanda, García-Huante., Jorge, Campos., Ismael, Bustos-Jaimes., Rodolfo, Marsch-Moreno., Claudia, Cano-Ramírez., Claudia, Benitez-Cardoza., and María, E. H.-L. (2023). A Native Thermophilic Bifunctional Cellulose/Xylanase Exoglucanase from the Thermophilic Biomass-Degrading Fungus *Thielavia terrestris* Co3Bag1 and Its Application in Enzymatic Hydrolysis of Agroindustrial Derivatives. *Journal of Fungi*, 9, 152.
- Maier, R. M. (2010). *Bacterial Growth ; Review of Basic Microbiological Concepts*. Academic Press.
- Mamta Singhvi, Dipti Joshi, Mukund Adsul, A. V. and D. G. (2010). d(-)-Lactic Acid Production from Cellobiose and Cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-24. *Green Chemistry*, 12, 1106–1109.
- Manfaati, R. (2010). *Kinetika dan Variabel Optimum Fermentasi Asam Laktat dengan Media Campuran Tepung Tapioka dan Limbah Cair Tahu oleh Rhizopus oryzae*. Universitas Diponegoro.

- Mansor, A.M., Lim, J.S., Ani, F.N., Hashim, H., Ho, W. S. (2019). Characteristics of Cellulose, Hemicellulose and Lignin of MD2 Pineapple Biomass. *Chemical Engineering Transactions*, 72, 79–84.
- Marlina, E.T., Harlia, E., dan Hidayati, Y. A. (2018). Efektivitas Limbah Buah Nanas (*Ananas Comosus*) sebagai Desinfektan Alami pada Milk Can. *Jurnal Ilmu Ternak*, 18(1), 60–64.
- Maryanty, Y., Saputra, F.L.W., Prasetyo, R. (2019). Pembuatan Asam Laktat dari Selulosa oleh Bakteri *Lactobacillus delbrueckii* dengan Selulase dari Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Bacillus circulans*. *Jurnal Teknik Kimia Lingkungan.*, 4(2), 153–161.
- McDevitt, S. (2009). *Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols*. American Society for Microbiology.
- McKendry, P. (2002). Energy Production from Biomass: Overview of Biomass. *Bioresource Technology*, 83(1), 37–46.
- Meryandini A, Wahyu W, Besty M, Titi CS, Nisa R, H. S. (2009). Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakteristik Enzimnya. *Makara of Science Series*, 13(1), 33–38.
- Mitrea, Laura., Leopold, Loredana Florina., Bouari, Cosmina., and Vodnar, D. C. (2020). Separation and Purification of Biogenic 1,3- Propanediol from Fermented Glycerol through Flocculation and Strong Acidic Ion-Exchange Resin. *Biomolecules*, 10, 1601.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., Srivastava, A. (2004). L(+)-Lactic Acid Fermentation and its Product Polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), 167–179.
- Naresh S, Balakrishnan K, Ahmad ANG, Y. P. (2019). Isolation and Partial Characterization of Thermophilic Cellulolytic Bacteria from Tropical Mangrove Soil. *Tropical Life Sciences Research*, 30(1), 123–147.
- Nurhidayah, Masriany, dan Masri, M. (2013). Isolasi dan Pengukuran Aktivitas Enzim Bromelin dari Ekstrak Kasar Batang Nanas (*Ananas comosus*) Berdasarkan Variasi pH. *Biogenesis*, 1(2), 116–122.
- Oehmcke-Hecht, S., Nass, L.E., Wichura, J.B., Mikkat, S., Kreikemeyer, B., and Fiedler, T. (2017). Deletion of the L-Lactate Dehydrogenase Gene *Idh* in *Streptococcus pyogenes* Leads to a Loss of SpeB Activity and a Hypovirulent Phenotype. *Frontiers in Microbiology.*, 8(1841).
- Pardo, M.E.S., Cassellis, M.E.R., Escobedo, R.M., and Garcia, E., J. (2014). Chemical Characterisation of the Industrial Residues of the Pineapple (*Ananas comosus*). *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3, 53–56.

- Pastor, J.F., Oscar, G., Sanz-Apairicio, J., Diaz, P. (2007). Xylanases: Molecular Properties and Applications. In *Industrial Enzym.* Springer.
- Pattana Laopaiboon, Arthit Thani, V. L., & Laopaiboon, L. L. (2010). Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse for Lactic Acid Production. *Bioresource Technology*, 101(3), 1036–1043.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J. (2002). Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview. *International Microbiology*, 5, 53–63.
- Pujiati, Ardi, Muh. Waskito., Prasetyo, E. N. (2018). *Produksi Purifikasi Enzim Selulase dari Kapang Trichoderma viride dan Potensinya dalam Bioscouring*. CV. Ae Media Grafika.
- Purnavita, S., Hermawati, L., dan Rinihapsari, E. (2021). Karakteristik Poli Asam Laktat Glikolat (Kajian Rasio Asam Laktat Limbah Aren-Asam Glikolat). *Metana: Media Komunikasi Rekayasa Proses Dan Teknologi Tepat Guna*, 17(2), 88–96.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. (2016). *Outlook Nenas*. Kementerian Pertanian.
- Rahmayetty, Barleany, D.R., Irawan, A., dan Suhendi, E. (2019). Sintesa Asam Laktat Berbahan Baku Tandan Kosong Kelapa Sawit Menggunakan Trichoderma reesei dan Lactobacillus acidipillus. *Seminar Nasional Sains Dan Teknologi*.
- Richana, N. (2002). Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia. *Buletin Agroteknologi Bioteknologi*, 5(1), 29–36.
- Rismanto, Ngangi, J., dan Moko, E. (2020). Analisis Komponen Serat Jerami Padi Menggunakan Pretreatment Biologis dan Kimiawi. *Jurnal Nukleus Biosains*, 1(1), 26–30.
- Risna, Y. K., S.-H., & Wihandoyo, dan W. (2022). Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. *Jurnal Peternakan Indonesia*, 24(1), 1–7.
- Roda, A., and Lambri, M. (2019). Food Uses of Pineapple Waste and by Products: A Review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1009–1017.
- Rodrigues, C., Vandenberghe, L.P.S., Woiciechowski, A.L., de Oliveira, J., Letti, L.A.J., and Soccol, C. R. (2017). *Production and Application of Lactic Acid*. Elsevier.

- Rosdee, N. A. S. M., Masngut, N., & Shaarani, S. M., Jamek, S., and Sueb, M. S. M. (2020). Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass from Pineapple Leaves by using Endo-1,4-Xylanase: Effect of pH, Temperature, Enzyme Loading and Reaction Time. *Materials Science and Engineering*, 736, 1–6.
- Roswita, Lulrahman, F., dan F. (2022). Pemanfaatan Hasil Sampung Bonggol Nanas dari UMKM Kue Kering menjadi Serbuk Instan. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 11(1).
- Rozirwan, Muda, H.I., Ulqodry, T. Z. (2020). Antibacterial Potential of Actinomycetes Isolated from Mangrove Sediment in Tanjung Api-Api South Sumatra. *Biodiversitas*, 21(12), 5723–5728.
- S. Mills, R.P. Ross, A. C. (2011). Lactic Acid Bacteria : Lactococcus lactis. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edi, pp. 132–137). Academic Press.
- Saini, A., Aggarwal, N.K., Sharma, A., and Yadav, A. (2015). *Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes*. Hindawi Publishing Corporation.
- Saini, Anita., Aggarwal, Neeraj K., Yadav, A. (2016). Cellulolytic Potential of Actinomycetes Isolated from Different Habitats. *Bioengineering and Bioscience*, 4(5), 88–94.
- Sastrohamidjojo, H. (2005). *Kimia Organik, Stereokimia, Lemak, dan Protein*. Gadjah Mada University Press.
- Satria, H., Nurhasanah, dan Martasih, F. (2010). Aktivitas Selulase Isolat Actinomycetes Terpilih pada Fermentasi Padat Jerami Padi. *Prosiding: Seminar Nasional Sains & Teknologi*.
- Satria, Heri., Yandri., Nurhasanah., Yuwono, Dwi Suropto., Herasari, D. (2020). Extracellular Hydrolytic Enzyme Activities of Indigenous Actinomycetes on Pretreated Bagasse using Choline Acetate Ionic Liquid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24.
- Septiatin, E. (2009). *Apotek Hidup dari Tanaman Buah*. CV. Yrama Widya.
- Setiati, R, Deana, W., Septoratno, S., & Taufan, M. (2016). Optimasi Pemisahan Lignin Ampas Tebu Dengan Menggunakan Natrium Hidroksida. *Jurnal Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, 4(2), 257–264.
- Sherif Mohamed Abdel Salam Keshk and Mohamed Saad Hamdy. (2019). Preparation and Physicochemical Characterization of Zinc Oxide/Sodium Cellulose Composite for Food Packaging. *Turkish Journal of Chemistry*, 43, 94–105.

- Solahuddin, Hanifa, Nisa Isneni, Deccati, R. F., & Muliastari, H. (2021). Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dari Rumen Sapi (*Bibos javanicus*). *Journal of Science, Technology, and Entrepreneurship*, 3(1), 1–7.
- Subramanian, M.R., Talluri, S., and Christopher, L. P. (2014). Production of Lactic Acid using A New Homofermentative *Enterococcus faecalis* Isolate. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 221–229.
- Sukma, F.F., dan Fajri, R. (2019). Identifikasi Asam Dehidroasetat dalam Produk Kosmetika dengan Menggunakan HPLC (High Performance Liquid Chromatography). *Quimica: Jurnal Kimia Sains Dan Terapan*, 1(2), 15–17.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R.R., and Pandey, A. (2005). Microbial Cellulases: Production, Applications and Challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 832–844.
- Sulistiyani, Nanik and Akbar, A. N. (2014). ctivity of Actinomycetes Isolate from Seeweed (*Eucheuma cottonii*) as Antibiotic Producer against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 1–9.
- Sutini, Widiastuty, Y.R., Murdowo, M.R., dan Ramadhani, A. N. (2020). Optimasi Produksi Fermentable Sugar dengan Hidrolisis Enzimatis Limbah Daun Nanas sebagai Bahan Baku Biofuel Ramah Lingkungan. *Proceeding: National Conference PKM Center Sebelas Maret University*, 119–123.
- Tezara, C., Siregar, J.P., Lim, H.Y., Fauzi, F.A., Yazdi, M.H., Moey, L.K., and Lim, J. W. (2016). Factors that Affect The Mechanical Properties of Kenaf Fiber Reinforced Polymer: A Review. *Journal of Mechanical Engineering and Sciences (JMES)*, 10(2), 2159–2175.
- Thakur, M., Deshpande, H.W., and Bhate, M. . (2017). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria and their Exploration in Non-Dairy Probiotic Drink. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 1023–1030.
- Trache, D., Hussin, M.H., Hui Chuin, C.T., Sabar, S., Fazita, R., Taiwo, O.F., Hassan, T.M., and Haafiz, M. . (2016). Microcrystalline Cellulose: Isolation, Characterization and Bio-Composites Application-A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 789–804.
- Ueno, T., Ozawa, Y., Ishikawa, M., Nakanishi, K., and Kimura, T. (2003). Lactic Acid Production Using Two Food Processing Wastes, Canned Pineapple Syrup and Grape Invertase, As Substrate and Enzyme. *Biotechnology Letters*, 25, 573–577.
- Utarti, E. dan S. (2018). Limbah Berlignoselulosa Sebagai Media Produksi Xilanase Kapang Asal Jerami Padi Sawah Pantai. *Jurnal Ilmu Dasar*, 19(2), 117–124.

- Wang, Q., Ingram, L.O., and Shanmugam, K. . (2011). Evolution of D-Lactate Dehydrogenase Activity from Glycerol Dehydrogenase and Its Utility For D-Lactate Production from Lignocellulose. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 18920–18295.
- Wu Wu, J.W., Redondo-Solano, M., Uribe, L., WingChing-Jones, R., Usaga, J., and Barboza, N. (2011). First Characterization of The Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Costa Rican Pineapple Silages. *Peer-reviewed Journal.*, 9, 17–43.
- Zainuddin, M.F., Shamsudin, R., Mokhtar, M.N., and Ismail, D. (2014). Physicochemical Properties of Pineapple Plant Waste Fibers from the Leaves and Stems of Different Varieties. *Biology Resources*, 9(3), 5311–5324.