



**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN STARTER  
KOMERSIAL DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN  
AERASI AGITASI PADA MEDIA MOLASES**

**SKRIPSI**

Oleh

**Ayu Mayzuhroh  
NIM 0101710101004**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**



**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN STARTER  
KOMERSIAL DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN  
AERASI AGITASI PADA MEDIA MOLASES**

**SKRIPSI**

Oleh

**Ayu Mayzuhroh  
NIM 101710101004**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN STARTER  
KOMERSIAL DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN  
AERASI AGITASI PADA MEDIA MOLASES**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

**Ayu Mayzuhroh  
NIM 101710101004**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2015**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Siti Zahrotul Akhiroh dan Ayahanda Ainur Rofiq (alm) tercinta, serta keluarga dan kerabat yang telah mendoakan, memotivasi, memberi kasih sayang serta pengorbanan selama ini;
2. Adik-adikku May Putri Wilujeng dan Panji Hertri Putra kebanggaanku yang telah memberikan banyak dukungan, inspirasi, dan motivasi selama penyelesaian pendidikanku;
3. Pembimbing dan penyalur ilmuku, guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

**MOTTO**

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan”

(QS: Al-insyirah: 5)

“.....Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap sesuatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya; dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia.”

(QS: Ar-Ra'd Ayat: 11)

“Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah”

(Thomas Alfa Edison)

*“Man Jadda WaJada, Man Shabara Zhafira”*

*(Where There is A Will There is A Way; Whom Be Patient, Will Be Get Lucky)*

( A. Fuadi dalam Novel Negeri 5 Menara dan Ranah 3 Warna)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ayu Mayzuhroh

NIM : 101710101004

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Produksi Bioetanol Menggunakan Starter Komersial dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Agitasi pada media Molases” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 16 Januari 2015

Yang menyatakan,

Ayu Mayzuhroh

NIM 101710101004

**SKRIPSI**

**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN STARTER  
KOMERSIAL DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN  
AERASI AGITASI PADA MEDIA MOLASES**

Oleh

Ayu Mayzuhroh

NIM 101710101004

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Jayus

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si.



**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Produksi Bioetanol Menggunakan Starter Komersial dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Agitasi pada Media Molases” karya Ayu Mayzuhroh NIM. 101710101004 telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 04 Maret 2015

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota,

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.  
NIP 196411091989021002

Ir. Giyarto, M.Sc.  
NIP 196607181993031013

Mengesahkan  
Dekan,

Dr. Yuli Witono, S.TP., MP  
NIP 196912121998021001



## RINGKASAN

**Produksi Bioetanol Menggunakan Starter Komersial Dengan Dan Tanpa Pemberian Aerasi Agitasi Pada Media Molases;** Ayu Mayzuhroh; 101710101004; 2015; 48 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Konsumsi Bahan Bakar Minyak (BBM) di Indonesia meningkat setiap tahun, namun belum diimbangi dengan kemampuan produksi, sehingga perlu dilakukan penelitian dan pengembangan dalam meningkatkan produksi energi alternatif. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan adalah bioetanol. Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam upaya optimasi produksi bioetanol diantaranya pemilihan jenis substrat (media fermentasi), jenis mikroorganisme, dan metode fermentasi.

Produksi bioethanol di dunia umumnya menggunakan media molases karena memiliki beberapa keunggulan diantaranya kandungan gula yang cukup tinggi, merupakan limbah industri gula yang ketersediaannya melimpah dan memiliki harga murah, serta dapat langsung dikonversi menjadi etanol dengan sedikit perlakuan pendahuluan. Umumnya mikroorganisme yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Namun, produksi bioetanol menggunakan *S. cerevisiae* pada media molases selama ini belum optimal. Beberapa upaya optimasi produksi bioetanol menggunakan *S.cerevisiae* pada media molases adalah pemilihan strain unggul dan optimasi kondisi fermentasi seperti pemberian aerasi dan agitasi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dikaji aktivitas dua jenis starter komersial dalam produksi bioetanol dengan kondisi fermentasi yang berbeda pada media molases.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui jumlah etanol yang dihasilkan oleh starter komersial selama fermentasi bioetanol tanpa dan dengan pemberian aerasi agitasi pada media molases. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan manfaat diantaranya meningkatkan nilai ekonomi molases; meningkatkan efektivitas dan

efisiensi produksi bioetanol dari molases; serta memberikan alternatif pengganti BBM yang ramah lingkungan.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua jenis mikroorganisme yaitu starter komersial merek *New Aule Alcohol yeast* dan *Angel Alcohol Active Dry Yeast*, serta variasi kondisi fermentasi berupa kondisi fermentasi tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm (vessel volume perminute) (L oksigen/L Substrat/menit) dan agitasi 100 rpm. Fermentasi dilakukan secara *batch*, dengan medium 1000 ml molases yang telah dipreparasi hingga mencapai °Brix 24%, pH 4,3, dan ditambahkan ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 100 ppm sebagai sumber nitrogen. Penggunaan starter sebanyak 1% (b/v) dari jumlah medium fermentasi. Fermentasi dilakukan selama 72 jam pada suhu ruang ( $\pm 27^{\circ}$  C) dan diamati secara periodik setiap 12 jam, meliputi perubahan populasi mikroba, kadar gula reduksi, kadar padatan terlarut (°Brix), dan jumlah etanol.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa starter komersial *Angel Alcohol Active Dry Yeast* dan *New Aule Alcohol Yeast* memiliki aktivitas pertumbuhan yang berbeda pada masing-masing kondisi fermentasi. *Angel Alcohol Active dry yeast* memiliki jumlah populasi maksimum lebih tinggi dibandingkan *New Aule Alkohol Yeast* pada kedua variasi kondisi fermentasi, namun populasi maksimum kedua jenis yeast dicapai pada lama fermentasi yang berbeda. Terjadi penurunan jumlah gula reduksi pada masing-masing perlakuan seiring dengan peningkatan jumlah populasi, karena ketersediaan substrat gula dari molases digunakan oleh yeast untuk aktivitas pertumbuhan, perkembangbiakan, dan menghasilkan metabolit berupa etanol, akibatnya terjadi peningkatan jumlah etanol hingga 36 jam fermentasi

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jumlah etanol yang dihasilkan selama 36 jam fermentasi pada kondisi tanpa pemberian aerasi dan agitasi oleh starter komersial *Angel Alcohol Active Dry Yeast* (A1) yaitu  $76,305 \pm 4,258$  g/L dengan produktivitas ethanol  $2,120 \pm 0,237$  g/L/jam dan yield (Yp/s)  $0,391 \pm 0,050$  g/g, sedangkan starter komersial *New Aule Alcohol Yeast* (A2) yaitu  $74,8 \pm 9,386$  g/L dengan produktivitas ethanol  $2,078 \pm 0,521$  g/L/jam dan yield (Yp/s)  $0,378 \pm 0,032$  g/g. Pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm mampu meningkatkan jumlah etanol

yang dihasilkan oleh starter komersial merek *Angel Alcohol Active Dry Yeast* (A1) menjadi  $95,464 \pm 0,774$  g/L dengan yield ( $Y_p/s$ )  $0,527 \pm 0,019$  g/g dan produktivitas  $2,652 \pm 0,043$  g/L/jam; Namun, pemberian aerasi  $0,3$  vvm dan agitasi 100 rpm tidak berpengaruh signifikan terhadap jumlah etanol yang dihasilkan oleh starter komersial merek *New Aule Alcohol Yeast* (A2) yaitu  $74,663 \pm 1,355$  g/L dengan yield ( $Y_p/s$ )  $0,338 \pm 0,036$  g/g dan produktivitas  $2,074 \pm 0,075$  g/L/jam.

## SUMMARY

***Bioethanol Production Of Commercial Yeast With And Without Aeration Agitation Using Molases as The Media***; Ayu Mayzuhroh; 101710101004; 2015; 48 pages; Department of Agricultural Product of Technology, Faculty Of Agricultural Technology, University Of Jember.

Fossil fuel consumption in Indonesia is increasing every year, but not balanced with production capability, so it needs to be done in improving the research and development of alternative energy production. One of the alternative energy sources that can be used are bioethanol. There are several things to consider in order to optimization of bioethanol production, which are the selection of substrate (fermentation medium), selection of the type microorganisms, and fermentation methods.

Generally, bioethanol production in the world used molases as media, because it has several advantages such as a fairly high sugar content, a sugar industry waste its availability abundant and have a low price, and can be directly converted to ethanol with a little pretreatment. Commonly the microorganism used was *Saccharomyces cerevisiae*. However, the production of bioethanol from sugar cane molases using *S.cerevisiae* has not been optimal. Some optimization efforts of bioethanol production from molases using *S.cerevisiae* were the selection of superior strains and optimization of fermentation conditions such as the provision of aeration and agitation in the fermentation media. Therefore, in this research was studied the activity of two types of commercial starter in bioethanol production with different fermentation conditions on molases media.

The purpose of this research was to determine the amount of ethanol produced by commercial starter during bioethanol fermentation with and without aeration and agitation in molases medium. This study expected to provide benefits such as increasing the economic value of molasses; improve the effectivity and efficiency of



bioethanol production from molasses; and provide an alternative fuel that friendly for environment.

This research was conducted with variations types of microorganisms i.e instant alcohol yeast (*Angel Alcohol Active Dry Yeast* and *New Aule Alcohol Yeast*) and variations of fermentation conditions i.e with and without addition of 0.3 vvm aeration and 100 rpm agitation. The process is done in batch fermentation. Fermentation medium consisting of 1000 ml of molases that has been prepared 24% of total soluble solid, pH 4.3, and added diammonium hydrogen phosphate 100 ppm as a source of nitrogen. Yeast was added as much as 1% (w/v) of the fermentation medium used. The fermentation was carried out for 72 hours at room temperature  $\pm 27^{\circ}\text{C}$  and observed several parameters periodically every 12 hours.

The results showed that two types of instant alcohol yeast (*Angel Alcohol Active Dry Yeast* and *New Aule Alcohol Yeast*) has a different growth activity in each fermentation conditions. Angel Alcohol Active dry yeast has a higher number of maximum population than New Aule Alcohol Yeast in the second variation of fermentation conditions. There was a decrease the amount of reducing sugar in each treatment along with the increasing number of population, because the availability of sugar from molases was used by the yeast for the growth activity, proliferation, and produce metabolites such as ethanol. So that, levels of ethanol was increased during 36 hours of fermentation.

Based on the results of this study concluded that the amount of ethanol during 36 hours of fermentation that produced by commercial starter Angel Alcohol Active Dry Yeast was  $76,305 \pm 4,258$  g/L with the productivity was  $2,120 \pm 0,237$  g/L/h and yield ( $Y_p/s$ ) was  $0,391 \pm 0,050$  g/g, while the ethanol produced by commercial starter New Aule Alcohol Yeast was  $74,8 \pm 9,386$  g/L with the productivity was  $2,078 \pm 0,521$  g/L/h and the yield ( $Y_p/s$ ) was  $0,378 \pm 0,032$  g/g on the fermentation conditions without aeration and agitation. The provision of aeration 0.3 vvm and agitation 100 rpm was able to increase the amount of ethanol produced by commercial starter Angel Alcohol Active Dry Yeast became  $95,464 \pm 0,774$  g/L,  $Y_p/s$  became  $0,527 \pm 0,019$  g/g and the

productivity became  $2,652 \pm 0,043$  g/L/h; However 0.3 vvm of aeration and 100 rpm of agitation was not significantly influence the amount of ethanol produced by commercial starter New Aule Alcohol Yeast, it was  $74,663 \pm 1,355$  g/L with Yp/s was  $0,338 \pm 0,036$  g/g and the productivity was  $2,074 \pm 0,075$  g/L/h.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Produksi Bioetanol Menggunakan Starter komersial dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Agitasi pada Media Molases”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr. Yuli Witono, S.TP., MP., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember sekaligus dosen pembimbing akademik, dan anggota tim penguji yang telah meluangkan waktu, perhatian, dan pikiran dalam bentuk nasihat dan teguran yang sangat berarti baik selama kegiatan bimbingan akademik maupun bimbingan dan pengarahan demi kemajuan penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi;
3. Dr. Ir. Jayus, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota sekaligus sebagai pemilik proyek penelitian yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat melaksanakan penelitian ini serta segala bantuan dan pengarahan selama penelitian dan penulisan skripsi ini;
4. Dr. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku ketua tim penguji, atas saran dan evaluasi demi perbaikan penulisan skripsi;
5. Dr. Charoen Charonchai Selaku dosen pembimbing selama penelitian di Rajamangala University of Technology Thanyaburi Thailand yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk dapat melaksanakan penelitian ini serta segala bantuan dan pengarahan selama penelitian dan penulisan skripsi ini;



6. Seluruh staff dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Analisa Terpadu, dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
7. Ibunda dan Ayahanda, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa dan dorongan demi terselesaikannya skripsi ini;
8. Sahabat dan teman-temanku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan dukungan dan semangat;
9. Teman seperjuangan dalam suka maupun duka, Sabrina Arindhani, Dyah ayu, Anis, Ayok, Cici, Hastri, Septy, Rani, Iga, leli, Astri *thanks for everything dear*.
10. Keluarga besar pondok silvia Kalimantan X/3 rion, mbak anis, mbak mia, ajeng, nana, hima atas motivasi dan doa yang telah diberikan.
11. Keluarga besar THP 2010 Mantap Jaya yang telah memberikan inspirasi, motivasi, dan persahabatan.
12. Keluarga besar HIMAGIHASTA tetaplah “Jaya dan Selalu Berkarya” serta KOSINUSTETA jangan pernah lelah “Membina Muslim Unggulan”.
13. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 31 Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

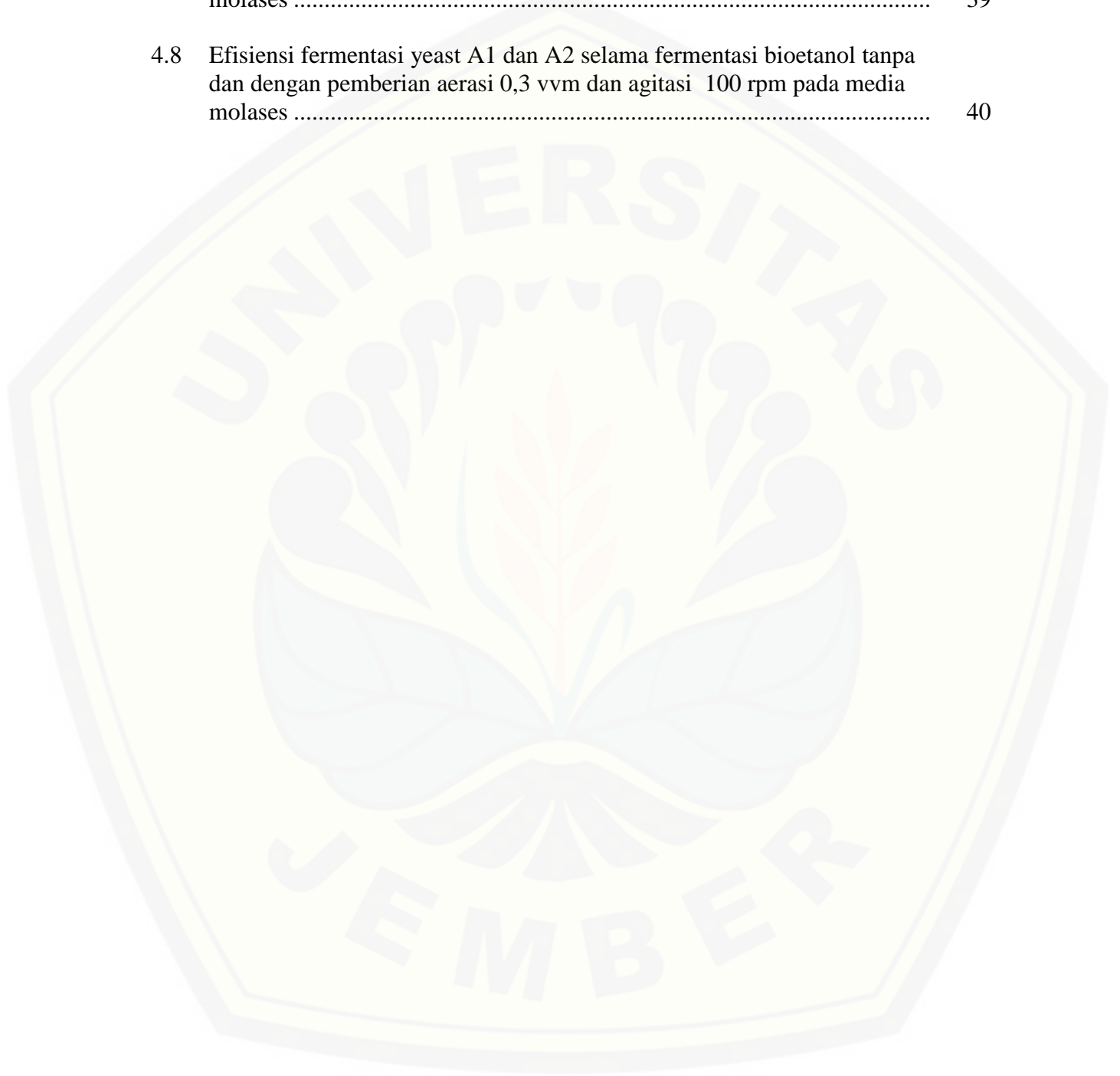
	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY .....	ix
PRAKATA.....	xiv
DAFTAR ISI .....	xvi
DAFTAR TABEL .....	xviii
DAFTAR GAMBAR.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Perumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Manfaat dan Sifat Bioetanol.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Karakteristik dan Keunggulan Molases Sebagai Media     Produksi Bioetanol.....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Karakteristik dan Jenis <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yang     Digunakan dalam Fermentasi Bioetanol .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Mekanisme Fermentasi Bioetanol dan Faktor-Faktor yang     Mempengaruhi Fermentasi Bioetanol .....</b>	<b>11</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>16</b>

<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Bahan dan Alat Penelitian .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Metode Penelitian .....</b>	<b>16</b>
3.3.1 Rancangan Percobaan .....	16
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian .....	17
<b>3.4 Parameter Pengamatan .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Prosedur Analisis .....</b>	<b>20</b>
3.5.1 Populasi Mikroba .....	20
3.5.2 Kadar Gula Reduksi .....	20
3.5.4 Jumlah etanol .....	22
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Profil fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 tanpa aerasi dan Agitasi pada media molases .....</b>	<b>25</b>
4.1.1 Profil Fermentasi Bioetanol Tanpa Aerasi dan Agitasi.....	25
4.1.2 Profil Fermentasi Bioetanol dengan Aerasi 0,3 vvm dan Agitasi 100 rpm .....	27
<b>4.2 Kinetika Fermentasi Bioetanol Oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi pada Media Molases .</b>	<b>30</b>
4.2.1 Populasi Yeast.....	30
4.2.2 Laju Konsumsi Gula Reduksi .....	31
4.2.3 <i>Growth Yield</i> .....	34
4.2.4 Jumlah Etanol dan Produktivitas Etanol .....	35
4.2.5 Yield Etanol.....	38
4.2.6 Efisiensi Fermentasi .....	40
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>42</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN DATA .....</b>	<b>46</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Komposisi molases/100 g berat kering .....	7
2.2 Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan molases menjadi bioetanol .....	8
2.3 Spesifikasi starter komersial merek <i>Angel Alcohol Active Dry Yeast</i> dan <i>New Aule Alcohol Yeast</i> .....	10
4.1 Jumlah populasi yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases.....	30
4.2 Laju konsumsi gula reduksi yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases.....	32
4.3 Laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases .....	33
4.4 <i>Growth yield</i> yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases.....	35
4.5 Jumlah etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases.....	36
4.6 Produktivitas yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases.....	36

4.7	Yield etanol yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases .....	39
4.8	Efisiensi fermentasi yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases .....	40



**DAFTAR GAMBAR**

	<b>Halaman</b>
3.1 Diagram alir penyiapan starter.....	18
3.2 Diagram alir tahap penelitian utama.....	19
3.3 Kurva standart glukosa .....	21
3.4 Kurva standart etanol.....	22
3.5 Prosedur penggunaan cawan conway .....	23
4.1 Hubungan peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml), peningkatan kadar etanol (g/L), dan penurunan jumlah gula reduksi (g/L) selama fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 tanpa pemberian aerasi dan agitasi pada media molases.....	26
4.2 Hubungan peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml), peningkatan kadar etanol (g/L), dan penurunan jumlah gula reduksi (g/L) selama fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm .....	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>A. Gula Reduksi</b> .....	46
A.1 Nilai Absorbansi Glukosa dan Kurva Standar .....	46
A.2 Data Kadar Gula Reduksi Selama fermentasi .....	47
A.3 Data Laju Konsumsi Gula Reduksi .....	49
<b>B. Kadar Brix</b> .....	50
B.1 Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi .....	50
B.2 Dengan Pemberian Aerasi 0,3 vvm dan Agitasi 100 rpm .....	50
<b>C. Populasi <i>S.cerevisiae</i></b> .....	51
C.1 Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi .....	51
C.2 Dengan Pemberian Aerasi 0,3 vvm dan Agitasi 100 rpm .....	51
C.3 Growth yield .....	52
<b>D. Jumlah etanol</b> .....	54
D.1 Nilai Absorbansi Etanol dan Kurva Standar .....	54
D.2 Data Jumlah etanol Selama Fermentasi .....	56
D.3 Perhitungan Etanol teoritis, Yield Etanol, dan Produktivitas etanol .....	58
<b>E. Kinetika Fermentasi Bioetanol dari Molases dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi Menggunakan Startear Komersial</b> .....	60
<b>F. Uji T</b> .....	62
F.1 Uji T Jumlah etanol Yang Dihasilkan Oleh Yeast A1 dan A2 dengan Kondisi Tanpa Pemberian Aerasi Dan Agitasi Pada Media Molases .....	62
F.2 Uji T Jumlah etanol Tanpa Dan Dengan Pemberian Aerasi 0,3 Vvm Dan Agitasi 100 Rpm Yang Dihasilkan Oleh Yeast A1 Dan A2 Pada Media Molases .....	62
F.3 Uji T Populasi Yeast A1 Dan A2 selama fermentasi bioetanol Dengan Kondisi Tanpa Pemberian Aerasi Dan Agitasi Pada Media Molases .....	63
F.4 Uji T Populasi Yeast A1 Dan A2 selama fermentasi bioetanol Tanpa Dan Dengan Pemberian Aerasi 0,3 Vvm Dan Agitasi 100 Rpm Selama Fermentasi Bioetanol .....	63



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Konsumsi Bahan Bakar Minyak (BBM) di Indonesia meningkat setiap tahun, namun belum diimbangi dengan kemampuan produksi. Berdasarkan data Ditjen Migas Tahun 2011 konsumsi BBM dalam negeri pada tahun 2011 mencapai 394.052 ribu barel, sedangkan produksi BBM nasional hanya sebesar 238.957 ribu barel. Berdasarkan data tersebut hanya sekitar 60% kebutuhan BBM nasional yang dapat dipenuhi dengan produksi nasional, sedangkan 40% sisanya dipenuhi dengan impor. Produksi bahan bakar minyak yang tidak dapat dipenuhi negara merupakan permasalahan yang harus diselesaikan. Selain itu, bahan bakar minyak (BBM) merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbaharui dan meninggalkan emisi gas yang menyebabkan polusi udara. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian dan pengembangan dalam meningkatkan produksi energi alternatif. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan adalah bioetanol.

Bioetanol ( $C_2H_5OH$ ) adalah bahan bakar nabati (BBN) yang dihasilkan dari fermentasi biomassa dengan bantuan mikroorganisme. Penelitian mengenai upaya optimasi produksi bioetanol telah banyak dilakukan untuk menggantikan minyak bumi yang ketersediaannya semakin langka dan harganya semakin meningkat. Bioetanol memiliki beberapa keunggulan diantaranya ketersediaannya dapat diperbaharui dan ramah lingkungan karena memiliki bilangan oktan lebih tinggi, sehingga terbakar lebih sempurna dan dapat mengurangi emisi karbon monoksida serta gas-gas lainnya yang menyebabkan polusi (Prihandana *et al.*, 2008). Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam upaya optimasi produksi bioetanol diantaranya pemilihan jenis substrat (media fermentasi), jenis mikroorganisme, dan pengaturan kondisi fermentasi.

Bioetanol dapat diproduksi dari beberapa jenis media/substrat diantaranya adalah bahan yang mengandung pati, selulosa, dan gula. Molases merupakan salah satu media fermentasi yang banyak digunakan dalam produksi bioetanol, karena memiliki

kandungan gula yang cukup tinggi yaitu sukrosa (32%), fruktosa (16%), dan glukosa (14%). Selain itu molases merupakan limbah industri gula yang memiliki harga murah dan dapat langsung dikonversi menjadi etanol dengan sedikit *pretreatment* dibandingkan dengan bahan-bahan lain (Hidayat *et al.*, 2006). Ketersediaan molases sebagai bahan baku bioetanol di Indonesia cukup melimpah. Setiap ton tebu diperkirakan dapat menghasilkan 2,7% molases (El-gendy *et al.*, 2013; Mukhtar *et al.*, 2010). Berdasarkan keunggulan tersebut, pemanfaatan molases sebagai media fermentasi bioetanol diharapkan dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi produksi bioetanol.

Pemilihan jenis mikroorganisme juga memiliki peranan penting dalam produksi bioetanol karena berpengaruh terhadap etanol yang dihasilkan. Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, mikroorganisme yang umum digunakan dalam produksi bioetanol pada media molases adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Lin dan Tanaka (2005), *S.cerevisiae* mampu mengkonversi media yang memiliki kandungan gula sederhana dan disakarida dengan baik, sehingga mampu menghasilkan jumlah etanol 12-18% v/v pada media fermentasi molases. Selain itu, *S.cerevisiae* memiliki waktu germinasi singkat sehingga dapat meningkatkan efektifitas fermentasi.

Menurut Elena *et al.* (2009), perbedaan jenis yeast mempengaruhi efektivitas fermentasi dan jumlah etanol yang dihasilkan. Elena *et al.* (2009), melaporkan bahwa produksi bioetanol pada media molases menggunakan lima biakan starter *S.cerevisiae* yang berbeda (*Safdistil C- 70*, *Etanol Red<sup>TM</sup>*, *Fali<sup>R</sup>*, *Tokenhefe*, dan *Pakmaya*) menghasilkan etanol yang berbeda pula. Hasil penelitian menunjukkan selama fermentasi 36 jam starter *Fali<sup>R</sup>* memiliki produktivitas etanol yang paling rendah yaitu 1,46 g/L/jam dan starter *Safdistil C-70* memiliki produktivitas etanol tertinggi yaitu 2,33 g/L/jam. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, perbedaan jenis yeast memiliki aktivitas yang berbeda dalam fermentasi bioetanol, karena jenis mikroorganisme berpengaruh terhadap jumlah etanol yang akan dihasilkan.

Aktivitas *S.cerevisiae* dalam menghasilkan etanol akan berbeda apabila kondisi selama fermentasi berbeda. Upaya optimasi kondisi fermentasi diantaranya adalah

pemberian aerasi dan agitasi. Menurut Yan *et al.* (2009), pemberian aerasi dan agitasi dalam fermentasi mampu meningkatkan produksi bioetanol dibandingkan dengan media tanpa pemberian aerasi dan agitasi. Yan *et al.* (2009), melaporkan bahwa produksi bioetanol pada kondisi *very high gravity* (media glukosa konsentrasi 305 g/L) dengan pemberian agitasi 200 rpm dan aerasi 4 mg/L menggunakan *S. cerevisiae* menghasilkan yield etanol (Yp/s) lebih tinggi yaitu 0,471 g/g dibandingkan dengan kondisi fermentasi tanpa aerasi dan agitasi yaitu 0,249 g/g. Selain itu, menurut Khongsay *et al.* (2012), perbedaan kecepatan agitasi selama fermentasi berpengaruh terhadap produksi bioetanol oleh *S. cerevisiae*. Produktivitas bioetanol dengan kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm selama fermentasi mengalami peningkatan tetapi pada kecepatan agitasi 300 rpm produksi etanol menurun. Berdasarkan beberapa hal tersebut, produksi bioetanol menggunakan beberapa jenis starter komersial dengan perbedaan kondisi fermentasi (tanpa dan dengan pemberian aerasi dan agitasi) pada media molases perlu diteliti sebagai upaya optimasi produksi bioetanol, sehingga diperoleh produktivitas bioetanol optimal selama fermentasi.

## 1.2 Perumusan Masalah

Produksi bioetanol menggunakan *S.cerevisiae* pada media molases masih belum optimal. Beberapa penelitian mengenai upaya optimasi produksi bioetanol menggunakan *S.cerevisiae* pada media molases telah dilakukan, diantaranya pemilihan strain unggul dan optimasi kondisi fermentasi seperti pemberian aerasi dan agitasi (Elena *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Alfenore *et al.* 2004; dan Yan *et al.*, 2009). Berdasarkan penelitian sebelumnya, kedua upaya tersebut mampu meningkatkan produksi bioetanol. Jumlah etanol yang dihasilkan oleh starter komersial merek *Angel Alcohol Active dry Yast* dan *New Aule Alcohol Yeast* dalam produksi bioethanol menggunakan media molases belum diketahui. Oleh karena itu, penggunaan starter komersial (*Angel Alcohol Active dry Yeast* dan *New Aule Alcohol Yeast*) dalam produksi bioetanol dengan kondisi fermentasi yang berbeda (tanpa dan dengan

pemberian aerasi dan agitasi) pada media molases perlu diteliti guna menghasilkan jumlah etanol yang optimal selama fermentasi.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui jumlah etanol yang dihasilkan oleh starter komersial *New Aule Alcohol yeast* dan *Angel Alcohol Active Dry Yeast* selama fermentasi bioetanol tanpa pemberian aerasi dan agitasi pada media molases.
2. Mengetahui pengaruh pemberian aerasi 0,3 vvm (*Vessel Volume Perminute*) (L oksigen /L substrat /menit) dan agitasi 100 rpm selama fermentasi terhadap produksi bioetanol oleh starter komersial *New Aule Alcohol yeast* dan *Angel Alcohol Active Dry Yeast*.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat diantaranya yaitu :

1. Meningkatkan nilai ekonomi limbah produksi gula (molases);
2. Meningkatkan efektivitas dan efisiensi produksi bioetanol dari limbah produksi gula (molases);
3. Memberikan alternatif pengganti bahan bakar minyak (BBM) yang ramah lingkungan.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Manfaat dan Sifat Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang diperoleh dari fermentasi menggunakan substrat tertentu oleh mikroorganisme. Menurut Prihandana (2008), etanol adalah senyawa hidrokarbon berupa gugus hidroksil (-OH) dengan 2 atom karbon (C) dan memiliki rumus molekul  $C_2H_5OH$ . Etanol berupa larutan jernih tak berwarna, beraroma khas yang dapat diterima, berada dalam fase cair pada suhu kamar dan mudah terbakar. Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), etanol memiliki berat jenis 0,789 pada suhu  $15^{\circ}C$  dan titik didih  $78,32^{\circ}C$  pada tekanan 76 mmHg, larut dalam air dan eter, dan mempunyai panas pembakaran 328 kkal. Dalam dunia perdagangan yang disebut alkohol adalah etanol atau etil alkohol, dan sering pula disebut sebagai “*Grain Alcohol*”.

Menurut Murdiyatmo (2006), terdapat dua macam etanol yaitu etanol sintetis dan bioetanol. Etanol sintetis sering disebut juga sebagai metanol atau metil alkohol atau alkohol kayu, terbuat dari etilen, salah satu derivat minyak bumi atau batu bara. Bahan ini diperoleh dari proses sintesis kimia yang disebut hidrasi. Sedangkan bioetanol diperoleh dari rekayasa biomassa (tanaman) melalui proses biologi (enzimatik dan fermentasi). Bahan baku bioetanol diantaranya adalah bahan berpati, bahan berselulosa, dan bahan mengandung gula seperti molases, nira tebu, nira lontar, nira aren, nira kelapa, dan lain- lain. Jenis bahan baku etanol yang berasal dari tanaman dan dapat diperbaharui merupakan bahan yang dianjurkan dalam pembuatan etanol.

Etanol memiliki banyak manfaat bagi masyarakat. Secara umum bioetanol digunakan sebagai bahan baku industri turunan alkohol, bahan dasar industri farmasi, dan campuran bahan bakar untuk kendaraan. Sebanyak 68% etanol di dunia digunakan sebagai bahan bakar (Balat *et al.*, 2008). Produksi etanol tersebut banyak dikembangkan dengan komoditi pertanian melalui fermentasi (Murdiyatmo, 2006). Salah satu fungsi etanol sebagai campuran bahan bakar adalah sebagai *octane booster*. Hal tersebut disebabkan karena alkohol mampu menaikkan nilai oktan dengan dampak

positif terhadap efisiensi bahan bakar dan menyelamatkan mesin serta menyelamatkan lingkungan karena dapat mengurangi emisi gas yang menyebabkan polusi udara (Prihandana *et al.*, 2008).

Keunggulan produksi etanol melalui fermentasi oleh mikroba adalah rendahnya biaya produksi, persentase rendemen yang tinggi, prosesnya relatif lebih cepat, penanganannya sederhana, produk samping yang relatif lebih sedikit, aman bagi lingkungan, serta ketersediaan bahan baku yang melimpah berupa biomassa dari tumbuhan yang dapat dibudidayakan oleh manusia (Prihandana *et al.*, 2008). Sedangkan etanol sintetis diproduksi dari hidrasi batu bara yang merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbarui. Oleh karena itu, produksi bioetanol melalui teknologi fermentasi perlu dikembangkan sebagai salah satu upaya pencarian energi alternatif untuk menggantikan Bahan Bakar Minyak (BBM) yang menjadi salah satu masalah di Indonesia.

## 2.2 Karakteristik dan Keunggulan Molases sebagai Media Produksi Bioetanol

Molases adalah hasil samping dari pembuatan gula tebu (*Saccharum officinarum* L). Molases berupa cairan kental dan diperoleh dari tahap pemisahan kristal gula. Molases tidak dapat lagi dibentuk menjadi sukrosa namun masih mengandung gula dengan kadar tinggi 50-60% (sukrosa 30-40%, glukosa 4-9%, dan fruktosa 5-12%), asam amino, dan mineral. Selain itu, molases memiliki kandungan beberapa vitamin diantaranya biotin (0.36% mg/kg), choline (745 mg/kg), pantothenic acid (21 mg/kg), ribovlafin (1.8 mg/kg), thiamine (0.9 mg/kg), inositol (6000 mg/kg), niacin (800 mg/kg), and pyridoxine (5 mg/kg) (Olbrich, 1963). Molases bersifat asam dan memiliki kisaran pH antara 5,5 – 6,5 (Hidayat *et al.*, 2006). Komposisi molases bervariasi sesuai dengan lokasi, varietas/jenis tebu, karakter tanah, iklim, dan metode pemrosesannya di pabrik gula. Secara garis besar rata-rata komposisi molases dalam berat kering ditunjukkan pada **Tabel 2.1**.

Molases digunakan secara luas sebagai sumber karbon untuk denitrifikasi, fermentasi anaerobik, pengolahan limbah aerobik, dan diaplikasikan pada budidaya

perairan. Karbohidrat dalam molases telah siap digunakan untuk fermentasi tanpa perlakuan pendahuluan seperti sakarifikasi karena sudah berbentuk gula (Hidayat *et al.*, 2006). Pemilihan molases sebagai bahan baku dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi produksi bioetanol dan merupakan salah satu upaya pemanfaatan limbah, karena kandungan gula dalam molases masih cukup tinggi dan dapat langsung dikonversi menjadi ethanol dengan sedikit *pretreatment*. Ketersediaan molases cukup banyak, harganya murah dan mudah didapat, karena jumlah pabrik gula di beberapa negara cukup banyak, sehingga limbah pengolahan gula berupa molases yang dihasilkan juga banyak, 1 ton gula mampu menghasilkan 2,7% molases (b/b) (El-gendy *et al.*, 2013; Mukhtar *et al.*, 2010).

**Table 2.1** Komposisi molases/100 g berat kering

Komponen	Persentase
Total gula	46-52%
Sukrosa	30-40%
Dekstrosa	4-9%
Fruktosa	5-12%
Gula Reduksi lain	1-5%
Karbohidrat lain	2-5%
Senyawa nitrogen	2-6%
Asam-asam non-nitrogen	2-8%
Abu	7-15%
Lilin sterol dan fosfolipid	0.1-1%

(Sumber: Hidayat, 2006).

Terdapat dua jenis molases yang dihasilkan dari pengolahan gula tebu yaitu *black strap molases* merupakan residu dari kristalisasi pengolahan gula dan *light test molases* merupakan residu dari evaporasi pengolahan gula yang memiliki kandungan gula rendah. Jenis molases yang umum digunakan dalam fermentasi untuk produksi bioethanol adalah *black strap molases* karena masih memiliki kandungan gula yang cukup tinggi (Hidayat *et al.*, 2006). Pemilihan molases sebagai substrat dalam produksi bioetanol lebih efisien dibandingkan dengan menggunakan bahan-bahan lain. Berdasarkan penelitian Nurdyastuti (2008), konversi glukosa menjadi bioetanol



tertinggi berasal dari substrat molases. Konversi bahan baku beberapa tanaman menjadi bioetanol ditunjukkan pada **Tabel 2.2**.

**Tabel 2.2** Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan molases menjadi bioetanol

Bahan baku		Kandungan gula dalam Bahan Baku (kg)	Jumlah Hasil Konversi Bioetanol (liter)	Perbandingan Bahan Baku dan bioetanol
Jenis	Konsumsi (kg)			
Ubi kayu	1000	250- 300	166,6	6,5 : 1
Ubi jalar	1000	150- 200	125	8:1
Jagung	1000	600- 700	200	5: 1
Sagu	1000	120- 160	90	12: 1
Molases	1000	500	250	4: 1

(Sumber: Nurdyastuti, 2008).

### 2.3 Karakteristik dan Jenis *Saccharomyces cerevisiae* yang Digunakan dalam Fermentasi Bioetanol

*Saccharomyces cerevisiae* adalah jenis khamir yang biasanya digunakan dalam industri fermentasi alkohol. Menurut Volk dan Wheeler (1993), kelebihan yang dimiliki *S.cerevisiae* adalah kemampuan menghasilkan alkohol dalam jumlah yang cukup tinggi (12-18% v/v), mampu tumbuh cepat pada substrat organik, dan toleransi terhadap perubahan kondisi sekeliling yang besar. Menurut Winarno dan Fardiaz (1984), *S.cerevisiae* tahan terhadap kadar gula tinggi dan tetap aktif melakukan fermentasi pada suhu 4°C.

Pertumbuhan *S. cerevisiae* biasanya dilakukan dengan pertunasan. Tunas akan tumbuh hingga sebesar sel induk dan kemudian melepaskan diri (Judoamidjojo *et al.*, 1992). *S.cerevisiae* merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat menggunakan baik sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi dari pemecahan glukosa. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *S.cerevisiae* dan produksi alkohol yang dihasilkan adalah suhu, pH, oksigen, dan kadar alkohol. Gross *et al.* (1995), menyatakan bahwa sebagian besar khamir umumnya tumbuh baik pada kisaran suhu 25°-46°C dengan nilai pH optimum 2,5- 5,5. Selain itu, menurut Elevri (2006), *S. cerevisiae* memiliki toleransi yang tinggi terhadap alkohol. Namun, jenis strain yang berbeda memiliki toleransi terhadap alkohol berbeda pula.

Hasil penelitian Pereira *et.al.* (2009), dilaporkan bahwa dari sebelas strain *S.cerevisiae* yang digunakan dalam fermentasi bioetanol memiliki kemampuan produksi bioetanol berbeda-beda. Tiga strain diantaranya adalah CEN.PK 113-7D menghasilkan 17,5% (v/v) etanol dalam waktu kurang dari 80 jam, CEN.PK 122 menghasilkan etanol dalam jumlah yang sama, namun fermentasinya menjadi sedikit lebih lambat. Strain S288C yang memiliki waktu fermentasi jauh lebih lambat, yaitu 120 jam.

Berdasarkan penelitian Elena *et al.* (2009), dilaporkan lima strain *S.cerevisiae* yang digunakan dalam fermentasi bioetanol yaitu strain *Safdistil C-70*, *Ethanol Red<sup>TM</sup>*, *Fal<sup>R</sup>*, *Trockenhefe*, dan *Pakmaya* menghasilkan etanol yang berbeda-beda. Nilai rata-rata laju pertumbuhan spesifik dari lima strain ragi berurutan adalah sebesar 0,74 sel/jam, 0,76 sel/jam, 0,55 sel/jam, 0,47 sel/jam dan 0,50 sel/jam. Laju pertumbuhan masing-masing strain setelah diinkubasi selama 24 jam berbeda-beda. *Safdistil C-70* dan *Ethanol Red<sup>TM</sup>* tumbuh lebih optimum dibandingkan strain lain. *Safdistil C-70* memiliki kemampuan produksi etanol maksimum pada fermentasi 36 jam dengan produksi etanol sebesar 2,33 g/L. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa produktivitas etanol tidak selalu seiring dengan banyaknya sel mikroba yang tumbuh karena karakteristik masing-masing strain berbeda.

Yeast telah banyak diproduksi secara komersial sejak akhir abad ke 19 setelah diidentifikasi dan diisolasi oleh Pasteur. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi yang semakin pesat memungkinkan untuk dilakukan isolasi strain ragi dengan sifat tertentu sehingga fermentasi dapat berlangsung optimal. Yeast yang diproduksi secara komersial biasa disebut *commercial yeast*. Berdasarkan penelitian Milkessa (2009), dilaporkan bahwa *commercial yeast* memiliki beberapa keunggulan diantaranya adalah populasi pertumbuhan yang cepat, toleran terhadap konsentrasi gula tinggi, tahan terhadap kadar alkohol, dan tahan terhadap suhu tinggi. Fermentasi menggunakan *commercial yeast* berlangsung dalam waktu relatif singkat dan hasil lebih optimal jika dibandingkan dengan fermentasi menggunakan natural yeast. Produksi inokulum *commercial yeast* berlangsung terkontrol dan sesuai dengan

karakteristik *commercial yeast* yang ingin dihasilkan, serta ditambahkan unsur lain yang dapat mendukung aktivitas yeast ketika digunakan dalam fermentasi. Jenis *commercial yeast* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *active dry yeast* merek *angel alcohol active dry yeast* dan *new aule alcohol yeast*. Spesifikasi kedua jenis *commercial yeast* yang digunakan dapat dilihat pada **Tabel 2.3**.

**Tabel 2.3** Spesifikasi starter komersial merek *New Aule Alcohol Yeast* dan *Angel Alcohol Active Dry Yeast*

New Aule Alcohol Yeast	Angel Alcohol Active Dry Yeast
- Kadar air $\leq 5\%$	- Kadar air $\leq 6,5\%$
- Protein $\approx 46.79$	- Living cell rate $\geq 75\%$
- Trihalose $\approx 16.16$	- Total Yeast Cell $\geq 2,5 \times 10^7$ cell/ gram
- Abu 5%	- Pathogen : Negative
- Lemak 1-1.5 %	- Memiliki toleransi terhadap suhu tinggi (28 -42°C);
- Cellulose 1,2 – 1,5 g/100g	- Toleransi terhadap alkohol hingga 17 %;
- Cholestrin: Negative	- Resisten terhadap kondisi asam;
- Vitamin B1 1,5 mg/100 g	- Resisten terhadap tekanan osmotik tinggi;
- Vitamin B2 0,5 mg/100 g	- Mampu menghasilkan etanol tinggi.
- Vitamin B6 0,05 mg/100 g	
- Natrium 10-13,6 mg/100g	
- Ca 80 ~100 mg/100g	
- Total bacteria count $\leq 1.0 \times 10^7$ g	
- Salmonelia: Negative	
- Pb $\leq 1,0$ mg/Kg	
- As $\leq 1,5$ mg/Kg	
- Memiliki toleransi terhadap suhu tinggi (rentang suhu fermentasi 32-42°C);	
- Toleran terhadap asam (pH 2,5);	
- Toleran terhadap alkohol hingga 13%;	
- Toleran terhadap kadar gula hingga 60%;	
- Mampu menghasilkan etanol dalam jumlah tinggi;	
- Tidak menghasilkan metabolit asam.	

(Sumber: Angel Yeast Co., Ltd., 2008 dan Xinjiang Shengli Biotechnology Co., Ltd., 2007)

*Commercial yeast* dibedakan menjadi beberapa jenis. Masing-masing ragi memiliki karakteristik dan kualitas yang berbeda, tergantung pada jenis sel induk ragi (strain), kualitas media pengembangbiakan ragi, dan kemajuan teknologi produksi ragi. Salah satu jenis *Commercial yeast* adalah ragi kering aktif (*active dry yeast, ADY*). Ragi kering aktif adalah ragi yang terbuat dari *yeast cream* dengan pemanasan dan pengeringan hingga didapatkan 92-93% bahan kering. Pengeringan yang dilakukan dengan temperatur tinggi dapat mematikan sekitar 25% lapisan luar sel ragi, sehingga

membentuk lapisan sel pelindung yang dapat melindungi sel aktif. Ragi ini berbentuk butiran kering (*granular form*).

Ragi kering aktif harus dilarutkan dengan air hangat 35°–42°C (rehidrasi) sebelum digunakan, selama kurun waktu tertentu bergantung pada spesifikasi jenis ragi. Penyimpanan ragi kering aktif cukup dilakukan pada suhu ruang (jauh dari panas dan lembab). Ragi kering aktif memiliki umur simpan mencapai 2 tahun dalam kemasannya.

#### 2.4 Mekanisme Fermentasi Bioetanol dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi Bioetanol

Proses preparasi fermentasi etanol berbeda-beda, sesuai dengan sifat alami bahan dasar yang digunakan. Golongan monosakarida biasanya memerlukan sedikit ataupun tanpa persiapan khusus dalam fermentasi. Substrat polisakarida (pati dan selulosa) harus dihidrolisis terlebih dahulu menjadi gula sederhana sebelum digunakan oleh khamir dalam fermentasi alkohol. Hidrolisis dapat dilakukan dengan enzim atau pemanasan menggunakan asam (Gross *et al.*, 1995).

Menurut Judoamidjojo *et al.*, (1992), fermentasi etanol dilakukan dengan menggunakan khamir tertentu yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol. Khamir akan memetabolisme glukosa dan fruktosa membentuk asam piruvat melalui tahapan reaksi pada jalur Embden Meyerhof-Parnas. Asam piruvat yang dihasilkan akan mengalami dekarboksilasi menjadi asetaldehida yang kemudian mengalami dehidrogenasi menjadi etanol. Satu molekul glukosa akan membentuk 2 molekul etanol dan 2 molekul CO<sub>2</sub>. Reaksi pembentukan etanol dari glukosa berlangsung sesuai persamaan reaksi berikut ini :



Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan fermentasi alkohol, diantaranya adalah suhu, konsentrasi inokulum, lama inkubasi, kondisi media fermentasi meliputi pH, oksigen, nutrient, konsentrasi media dan kondisi lingkungan lain seperti penambahan agitasi dan aerasi.



Faktor-faktor tersebut perlu diperhatikan dan dikontrol selama fermentasi untuk mendapatkan hasil yang optimal.

Mikroorganisme memiliki suhu pertumbuhan maksimal, optimal, dan minimal. Suhu pertumbuhan optimal yeast berkisar antara 25° - 30°C dan maksimal antara 35° - 47°C. Suhu berpengaruh terhadap fermentasi melalui dua cara yaitu secara langsung dan tidak langsung. Secara langsung, suhu akan mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dan aktivitas enzim yang dihasilkan. Secara tidak langsung, suhu akan mengurangi jumlah alkohol karena penguapan. Suhu yang baik untuk fermentasi alkohol adalah sekitar 31° – 33°C (Machfud *et al.*, 1989).

Konsentrasi biomassa mempengaruhi jumlah produk yang dihasilkan. Jumlah sel khamir yang semakin banyak, akan menghasilkan enzim dengan konsentrasi yang semakin tinggi. Hal tersebut akan menyebabkan semakin banyak substrat yang terkonversi menjadi alkohol. Namun, konsentrasi biomassa yang terlalu tinggi akan mengurangi kadar alkohol yang dihasilkan, jika jumlah substrat yang tersedia tidak mencukupi. Bila substrat dalam media telah habis digunakan, maka untuk mencukupi kebutuhan sel terhadap unsur karbon (C), khamir akan menggunakan alkohol untuk aktivitas metabolismenya (Judoamidjojo *et al.*, 1992). Menurut Hidayat (2006), konsentrasi biomassa yang ditanam umumnya berkisar antara 3-10% dari volume media fermentasi.

Judoamidjojo *et al.* (1992), menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi substrat maka konsentrasi alkohol yang dihasilkan akan semakin tinggi pula. Hal ini berlangsung sampai pada batas tertentu, karena konsentrasi substrat yang terlalu tinggi akan menghambat fermentasi. Xin *et al.*, (2003) melaporkan bahwa pada konsentrasi gula diatas 35% pertumbuhan mikroorganisme telah terhambat akibat tingginya tekanan osmotik medium fermentasi.

Lama inkubasi berkaitan erat dengan waktu yang dapat digunakan oleh mikroba untuk tumbuh dan berkembang biak. Fermentasi yang semakin lama akan meningkatkan jumlah alkohol yang dihasilkan. Namun, fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kadar alkohol, karena substrat telah habis digunakan.

Selain itu, kadar alkohol yang terlalu tinggi yaitu di atas 12% dapat menyebabkan sel khamir lisis atau rusak (Judoamidjojo *et al.*, 1992).

Derajat keasaman (pH) media mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Setiap mikroorganisme memiliki pH pertumbuhan minimal, maksimal, dan optimal. Rata-rata pH pertumbuhan yeast berada pada kisaran 4,0 – 5,0, sedangkan pH optimal untuk produksi etanol ialah berkisar antara 4,0 sampai 4,5. Pada pH 3,0 atau lebih rendah lagi fermentasi alkohol akan berjalan dengan lambat (Volk dan Wheeler, 1993). Selain untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan produksi etanol oleh *S. cerevisiae*, pH media yang rendah juga dapat meminimalkan kontaminasi bakteri.

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), mikroba memerlukan senyawa nutrisi yang digolongkan menjadi dua yaitu senyawa nutrisi makro dan senyawa nutrisi mikro untuk pertumbuhannya. Nutrisi makro meliputi unsur C, N, P, K. Unsur C dalam produksi bioetanol diperoleh dari substrat yang mengandung karbohidrat terutama dalam bentuk sukrosa dan glukosa, karena sukrosa atau glukosa digunakan sebagai substrat yang akan dikonversi menjadi etanol oleh *S.cerevisiae*. Nitrogen (N) dan phosphor (P) merupakan nutrisi yang dibutuhkan yeast untuk optimalisasi pertumbuhan dan efisiensi pembentukan produk dalam fermentasi alkohol. Unsur N didapat dari penambahan urea, sedangkan unsur P dan K didapat dari penambahan pupuk NPK. Sedangkan unsur mikro meliputi vitamin dan mineral-mineral lain yang disebut *trace element* seperti Ca, Mg, Na, S, Cl, Fe, Mn, Cu, Co, Bo, Zn, Mo, dan Al. Selain itu, menurut Vasconcelos *et al.* (2004), sumber phosphor dan nitrogen juga dapat diperoleh dari penambahan DAP (Diammonium Hidrogen Phosphat). Phospor berperan penting pada proses glikolisis yang terjadi dalam sel yeast.

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerob sehingga pada awal fermentasi etanol dilakukan secara aerob untuk mengoptimalkan pertumbuhannya, sedangkan ketika produksi bioetanol berlangsung dilakukan secara anaerob agar khamir dapat memproduksi etanol (Winarno dan Fardiaz, 1984). Menurut Gross *et al.* (1995), fermentasi etanol dilakukan dalam keadaan anaerob dengan menggunakan khamir tertentu yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol. Namaun,

pertumbuhan khamir akan terhambat jika tidak terdapat oksigen. Pada dasarnya *S.cerevisiae* membutuhkan oksigen untuk proses sintesis lipid (sterol dan asam lemak tak jenuh) yang diperlukan untuk melindungi membran plasma. Jumlah oksigen yang terlalu tinggi dapat menurunkan produksi ethanol tetapi penggunaan aerasi dengan laju yang rendah dapat meningkatkan produksi ethanol oleh *S. cerevisiae* (Zayed dan Foley, 1987).

Menurut Khongsay (2012), produktivitas ethanol mengalami peningkatan dengan pemberian aerasi selama 2 hingga 4 jam pada awal fermentasi tetapi pemberian aerasi terlalu lama (hingga 6 jam) dapat menurunkan produktivitas ethanol karena yeast mengalami reaksi respirasi untuk memperbanyak jumlah sel dan tidak melakukan reaksi fermentasi untuk menghasilkan ethanol. Selain itu, Yan *et al.* (2009), menjelaskan pemberian aerasi dengan laju rendah dilakukan pada awal fermentasi hingga kadar oksigen mencapai 4-9 mg/L kemudian aerasi dihentikan agar yeast melakukan reaksi fermentasi. Namun, pemberian agitasi dapat dilakukan hingga akhir fermentasi karena dapat menghomogenkan nutrisi serta memberikan suplai oksigen pada media fermentasi, sehingga senyawa nutrisi dalam media fermentasi dapat dimanfaatkan yeast dengan optimal dan pertumbuhan yeast merata dalam media fermentasi. Pemberian agitasi selama proses fermentasi tidak memberikan efek negatif terhadap sistem fermentasi.

Aerasi dan agitasi bertujuan untuk mensuplai oksigen dan mencampur cairan fermentasi sehingga membentuk suspensi yang seragam. Bejana inokulum yang berisi media cair harus diaduk agar homogen untuk fermentasi aerobik. Pengadukan sangat penting sebab oksigen merupakan unsur yang memiliki kelarutan rendah. Pemenuhan kebutuhan oksigen untuk pertumbuhan mikroorganisme dalam fermentasi diberikan melalui agitasi (pengadukan) terhadap medium menggunakan *shaker*. Semakin tinggi kecepatan pengadukan, semakin besar kadar oksigen terlarut dalam medium dan nutrisi yang terkandung semakin homogen (Machfud, 1989). Ketersediaan oksigen pada awal fermentasi digunakan yeast untuk melakukan respirasi sehingga mampu mempercepat pertumbuhan yeast yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah ethanol, sedangkan



pemberian agitasi mampu menghomogenkan media fermentasi sehingga nutrisi dan suplai oksigen yang ditambahkan selama fermentasi dapat digunakan oleh yeast secara optimal (Liu *et al.*, 2009).

Menurut Yan *et al.* (2009), pemberian aerasi dan agitasi dalam fermentasi mampu meningkatkan produksi bioetanol dibandingkan dengan media tanpa pemberian aerasi dan agitasi, dalam penelitiannya dilaporkan bahwa produksi bioetanol pada kondisi *very high gravity* (media glukosa 305 g/L) dengan pemberian agitasi 200 rpm dan aerasi 4 mg/L menggunakan *S. cerevisiae* menghasilkan etanol lebih tinggi yaitu 143,8 g/L dibandingkan dengan kondisi fermentasi tanpa aerasi dan agitasi yaitu 75,8 g/L. Selain itu menurut Khongsay *et al.* (2012), perbedaan kecepatan agitasi selama fermentasi berpengaruh terhadap produksi bioetanol oleh *S. cerevisiae*. Produktivitas bioetanol dengan kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm selama fermentasi mengalami peningkatan tetapi pada kecepatan agitasi 300 rpm produksi etanol menurun.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Laboratory of Food Microbiology, Departement of Food Science, Faculty of Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi Thailand*, Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Analisa Terpadu, dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan April 2014 hingga November 2014.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan meliputi molases yang diperoleh dari PTPN XI Pabrik Pengolahan Gula Djatiroto, Diamonium Hidrogen Phospat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Asam Sitrat, NaOH (PA), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, dan reagen *dinitrosalisilic acid* (DNS), starter komersial merek Angel Alcohol Active Dry Yeast yang diperoleh dari Angel Yeast Co., Ltd. dan New Aule Alcohol Yeast yang diperoleh dari Xinjiang Shengli Biotechnology Co., Ltd.

Alat Penelitian yang digunakan yaitu fermentor kapasitas 2 L (*Applicon Dependable Instrument*), *Laminary Air Flow* (Microtech Model V3), *colony counter* (Funke Gerber), *autoclave* Sturdy (SA-300VL), *incubator* (Scientific Series 2000), *hand refractometer* ATAGO, oven (Scientific Series 2000), digital pH meter, spektrofotometer (Genesys 10 UV), refraktometer, dan alat gelas.

### 3.3 Metode Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dengan dua variasi perlakuan yaitu variasi jenis starter komersial dan variasi kondisi fermentasi, yang dituliskan dengan notasi sebagai berikut:

A1B1

A1B2

A2B1

A2B2

A1: *Angel Alcohol Active Dry Yeast*

A2: *New Aule Alcohol Yeast*

B1: Kondisi fermentasi tanpa pemberian aerasi dan agitasi

B2: Kondisi fermentasi dengan pemberian aerasi 0,3 vvm (300 ml oksigen/liter substrat/menit) dan agitasi 100 rpm

Masing masing perlakuan tersebut diulang sebanyak dua kali. Data penelitian diolah dengan statistik sederhana seperti rerata, standart deviasi, dan uji T. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk grafik.

### 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu preparasi media fermentasi serta starter dan fermentasi bioetanol.

#### i. Preparasi media fermentasi dan starter

Media fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah molases. Sedangkan mikroorganismenya yang digunakan adalah starter komersial merek *Angel Alcohol Active Dry Yeast* dan *New Aule Alcohol Yeast*.

#### a) Preparasi molases

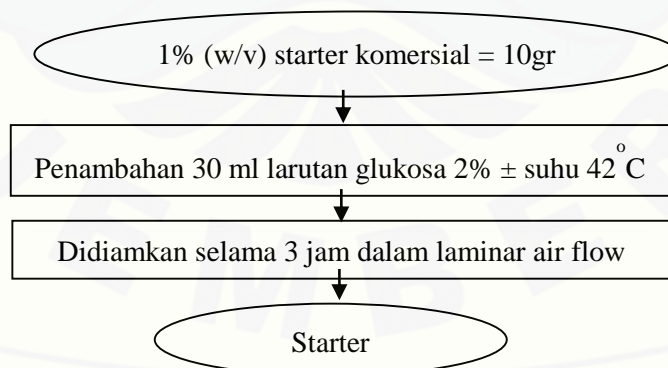
Molases diperoleh dari limbah industri pengolahan gula tebu. Molases yang diperoleh dari industri memiliki kadar brix tinggi yaitu 80%. Molases yang digunakan sebagai medium fermentasi diencerkan hingga mencapai kadar brix 24% dan pH molases diatur hingga 4,3 dengan menambahkan asam sitrat. Pengaturan kadar brix dan pH yang dilakukan merupakan kondisi optimal bagi pertumbuhan yeast. Nutrisi medium fermentasi molases diperkaya dengan menambahkan Diamonium Hidrogen Phospat  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sebanyak 100 ppm. Selanjutnya, molases yang telah dipreparasi didiamkan selama 24 jam untuk mengendapkan impuritas yang terdapat dalam molases, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1,72 atm selama 15 menit.

b) Preparasi starter

Starter dibuat dengan cara menimbang yeast sebanyak 1% (w/v) dari jumlah medium yang digunakan dalam fermentasi, kemudian yeast di campur dengan 30 ml larutan glukosa steril 2% ± suhu 42°C dan didiamkan selama 3 jam di dalam *laminar air flow*. Diagram alir penyiapan starter dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.

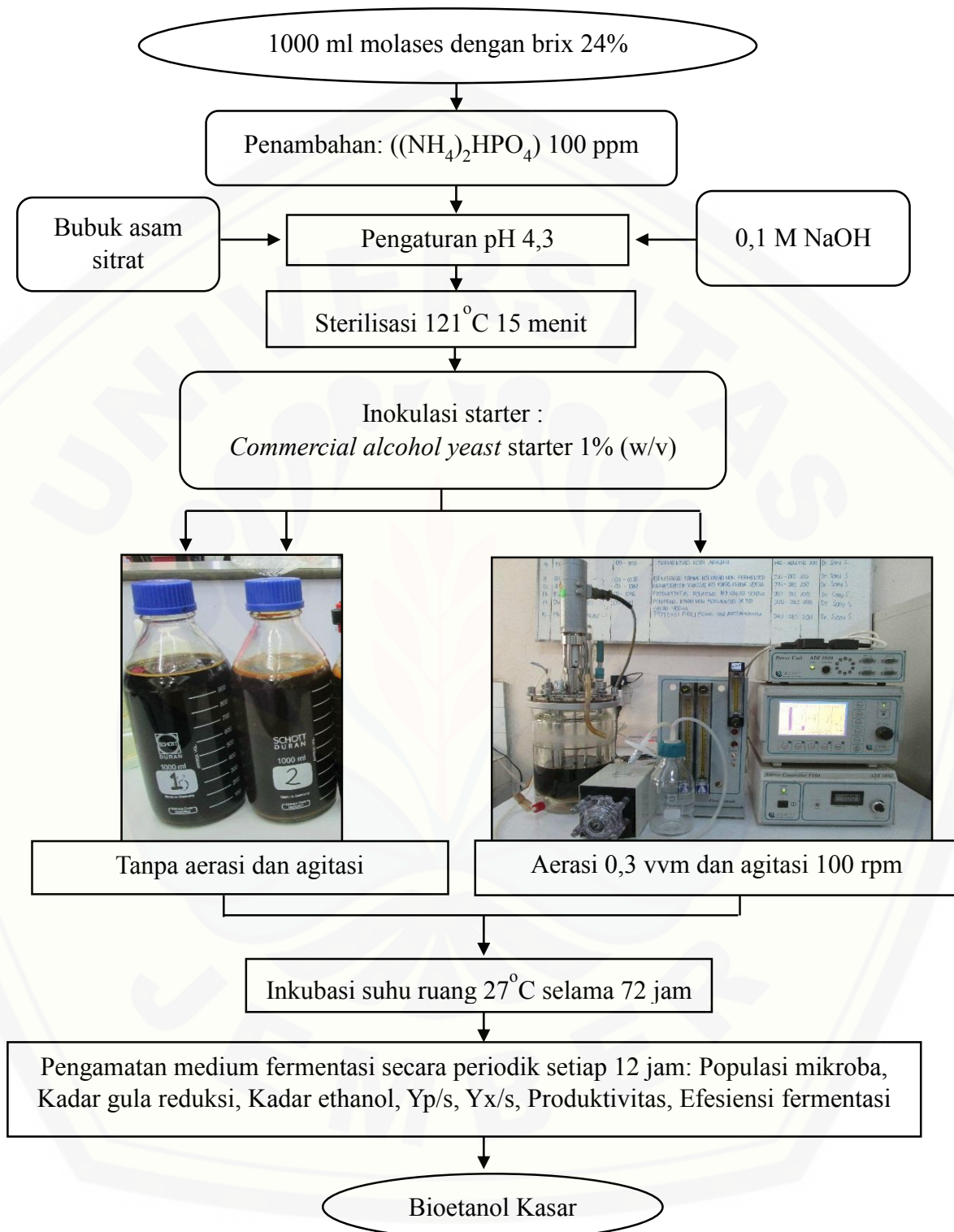
ii. Fermentasi Bioetanol

Fermentasi bioetanol dilakukan secara *batch*. Medium fermentasi terdiri dari 1000 ml molases yang telah dipreparasi dan disterilisasi. Kemudian, ditambahkan yeast sebanyak 1% (w/v) dari jumlah medium fermentasi yang digunakan pada masing-masing perlakuan, dengan dua variasi perlakuan terhadap medium fermentasi, yaitu kondisi fermentasi tanpa dan dengan pemberian aerasi dan agitasi selama fermentasi. Fermentasi berlangsung menggunakan fermentor dengan kecepatan agitasi 100 rpm dan aerasi 0,3 vvm, sedangkan fermentasi dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi, molases ditempatkan dalam botol sampling (*blue cap bottle*) 1000 ml kemudian ditutup rapat dan didiamkan dalam *laminar air flow* selama fermentasi. Fermentasi dilakukan selama 72 jam pada suhu ruang ± 27° C. Selama fermentasi, dilakukan pengamatan secara periodik setiap 12 jam meliputi perubahan populasi mikroba, kadar gula reduksi, jumlah etanol, dan pH. Diagram alir penelitian utama dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



**Gambar 3.1.** Diagram alir penyiapan starter





Gambar 3.2 Diagram alir fermentasi bioetanol



### 3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi: Perhitungan populasi mikroba metode lempeng agar (Ristiati, 2000), analisis gula reduksi metode *dinitrosalisilic acid* (DNS) (Miller, 1959), jumlah etanol metode *Chamber Conway* (Kartika *et al.*, 1992), dan derajat keasaman/pH.

### 3.5 Prosedur Analisis

#### 3.5.1 Populasi Mikroba Menggunakan Metode Lempeng Agar (Ristiati, 2000)

Disiapkan beberapa tabung reaksi yang berisi larutan *pepton water* 1% steril sebanyak 9 ml. Untuk masing masing tabung kemudian ditambah 1 ml sampel yang akan diperiksa secara bertahap yaitu :

- 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung pertama, hingga konsentrasi larutan di dalam tabung pertama menjadi  $10^{-1}$ .
- 1 ml di tabung pertama diambil dan dimasukkan ke tabung kedua, hingga konsentrasi di tabung kedua menjadi  $10^{-2}$ , demikian seterusnya hingga didapat larutan dengan konsentrasi terendah yaitu  $10^{-6}$ .

Tiga tabung dengan konsentrasi terendah kemudian diambil 0,1 ml larutan dan dipindah ke dalam cawan petri yang berisi media padat MEA (Agar sebar). Pertumbuhan koloni yang kemudian timbul pada tiap-tiap cawan dihitung menggunakan alat penghitung koloni (*colony counter*).

#### 3.5.2 Penentuan Kadar Gula Reduksi Menggunakan Metode *dinitrosalisilic acid* DNS (Miller, 1959)

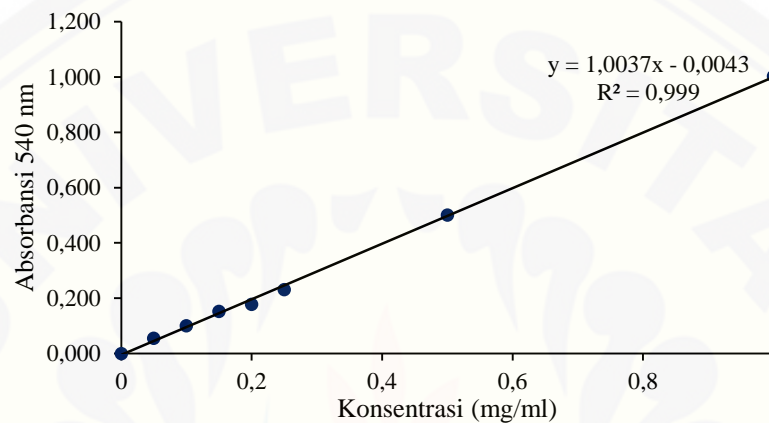
##### *Pembuatan reagen DNS*

Sebanyak 1,76 g NaOH (PA) 2 g DNS, dan 60 g K-Na Tartarat ditambahkan 100 ml akuades dan diaduk hingga larut. Setelah itu larutan ditera hingga 200 ml dan disimpan dalam botol coklat.

##### *Pembuatan kurva standar*

Kurva standar diperoleh dengan cara membuat seri konsentrasi glukosa 0; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25; 0,5; 1 mg/ml kemudian masing-masing konsentrasi dipipet

sebanyak 0,2 ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Sebanyak 1 ml DNS ditambahkan ke masing masing tabung dan dipanaskan dengan penangas 100°C selama 15 menit. Setelah dingin, semua tabung ditambahkan 5 ml akuades dan divorteks hingga homogen. Selanjutnya diukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standart gula reduksi dapat dilihat pada **Gambar 3.3**.



**Gambar 3.3** Kurva standart gula reduksi

#### *Penentuan kadar gula reduksi sampel*

Sebanyak 0,2 ml sampel diencerkan dengan aquades 0,8 ml, kemudian 0,2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml reagen DNS. Semua tabung dididihkan dalam penangas air selama 15 menit, didinginkan dan ditambah 5 ml akuades. Larutan dihomogenisasi dan diukur absorbansinya pada 540 nm. Jumlah gula reduksi sampel dihitung dari perbandingan persamaan linear yang diperoleh dari kurva standart dengan volume pengambilan sampel. Persamaan Linier yang diperoleh adalah  $y = 1,0037x - 0,0043$  dimana  $x = \frac{y+0,0043}{1,0037}$

Keterangan :

$y$  = Absorbansi sampel;  $x$  = jumlah gula reduksi

#### 3.5.3 Jumlah etanol, Metode *Chamber Conway* (Kartika *et al.*, 1992).

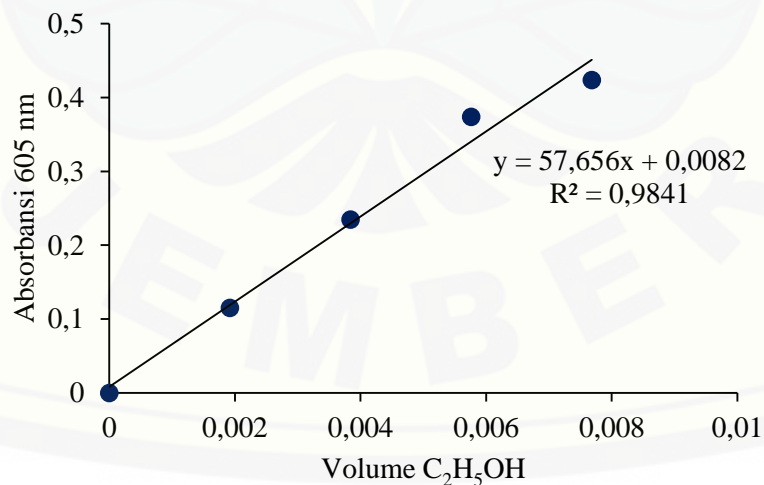
Analisis etanol menggunakan metode *Chamber Conway* membutuhkan 3 larutan, yaitu larutan A, larutan B, dan larutan C. Larutan A merupakan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  jenuh

yang diperoleh dengan menimbang 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  lalu dilarutkan dengan 50 ml akuades. Larutan B dibuat dengan melarutkan 0,74 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  dalam 30 ml akuades lalu ditambah 56 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat secara perlahan lahan dan diaduk dengan magnetik stirer. Larutan B diencerkan hingga 100 ml. Larutan C merupakan larutan stok yang dibuat dari 1 ml etanol 96% yang ditera akuades hingga 100 ml.

Pembuatan kurva standart dibuat dengan cara menambahkan campuran berikut ke dalam cawan conway :

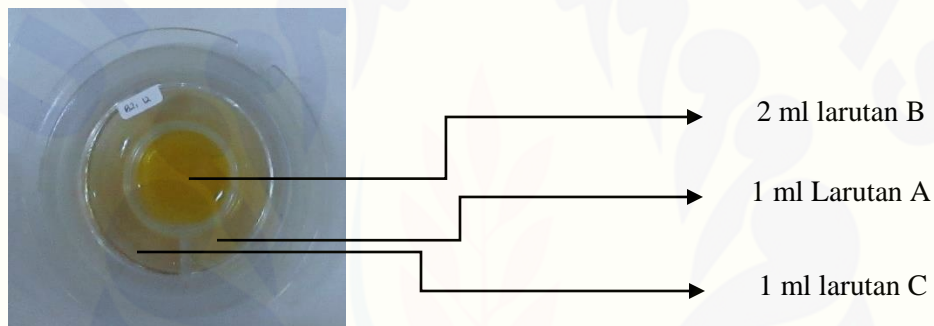
- 2 ml Larutan B + 1 ml akuades (blanko)
- 2 ml Larutan B + 0,2 ml larutan C + 0,8 ml akuades
- 2 ml Larutan B + 0,4 ml larutan C + 0,6 ml akuades
- 2 ml Larutan B + 0,6 ml larutan C + 0,4 ml akuades
- 2 ml Larutan B + 0,8 ml larutan C + 0,2 ml akuades
- 2 ml Larutan B + 1 ml larutan C

Sebelum cawan conway ditutup, ditambahkan 1 ml larutan A dan digoyangkan untuk mencampurkan larutan A dan C. Cawan conway didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam, 2 ml akuades ditambahkan dalam larutan B dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 605 nm. Kurva standart etanol dapat dilihat pada **Gambar 3.4**.



**Gambar 3.4** Kurva standart etanol

Prosedur analisa pengukuran jumlah etanol sampel dilakukan dengan cara memasukkan larutan B sebanyak 2 ml pada bagian tengah cawan conway, kemudian memasukkan 1 ml larutan A pada sisi kanan cawan conway dan memasukkan 1 ml larutan C (sampel) pada sisi kiri cawan conway, selanjutnya cawan conway yang telah berisi larutan A, B, dan C ditutup dan digoyangkan untuk mencampurkan larutan A dan C, kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam, 2 ml akuades ditambahkan dalam larutan B dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 605 nm. Prosedur penggunaan cawan conway dalam analisa jumlah etanol dapat dilihat pada **Gambar 3.5**.



**Gambar 3.5** Prosedur penggunaan cawan conway dalam analisa jumlah etanol

Jumlah etanol sampel dihitung dengan persamaan:

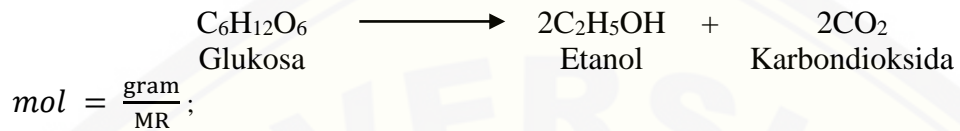
- Konsentrasi  $C_2H_5OH$  (ml/ml)  $x = \frac{y-0,0082}{57,656}$
- Konsentrasi  $C_2H_5OH$  (g/ml) = Konsentrasi  $C_2H_5OH$  (ml/ml) x BJ etanol
- Konsentrasi  $C_2H_5OH$  (g/L) = Konsentrasi  $C_2H_5OH$  (g/ml) x  $\frac{1000 \text{ ml}}{L}$
- Yield ( $Y_p/s$ ) =  $\frac{\text{jumlah etanol yang dihasilkan}}{\text{gula reduksi yang dikonsumsi}}$  (g/g)
- Produktivitas etanol =  $\frac{\text{etanol yang dihasilkan}}{\text{waktu fermentasi}}$  (g/L/jam)
- Efisiensi fermentasi =  $\frac{\text{etanol yang dihasilkan}}{\text{etanol teoritis}} \times 100\%$  (%)

Keterangan :

$y$  = Absorbansi sampel; Volume pengambilan = 1 ml; Berat jenis etanol = 0,789 g/mL

Perhitungan jumlah etanol teoritis :

1 mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol :



- MR  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  = 180; MR  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  = 46, sehingga 1 gram glukosa mampu menghasilkan 0,5111 gram etanol.



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi bioetanol menggunakan dua jenis starter komersial yaitu merek *Angel Alcohol Active Dry Yeast* (A1) dan *New Aule Alcohol Yeast* (A2) pada kondisi fermentasi tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm serta agitasi 100 rpm menggunakan substrat molases telah dilakukan secara *batch* selama 72 jam. Selama fermentasi, diamati jumlah populasi yeast, jumlah gula reduksi, dan jumlah etanol secara periodik setiap 12 jam. Hasil pengamatan setiap parameter dan pembahasan secara rinci diuraikan dalam sub-sub bab berikut.

### 4.1 Profil Fermentasi Bioetanol Oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Agitasi pada Media Molases

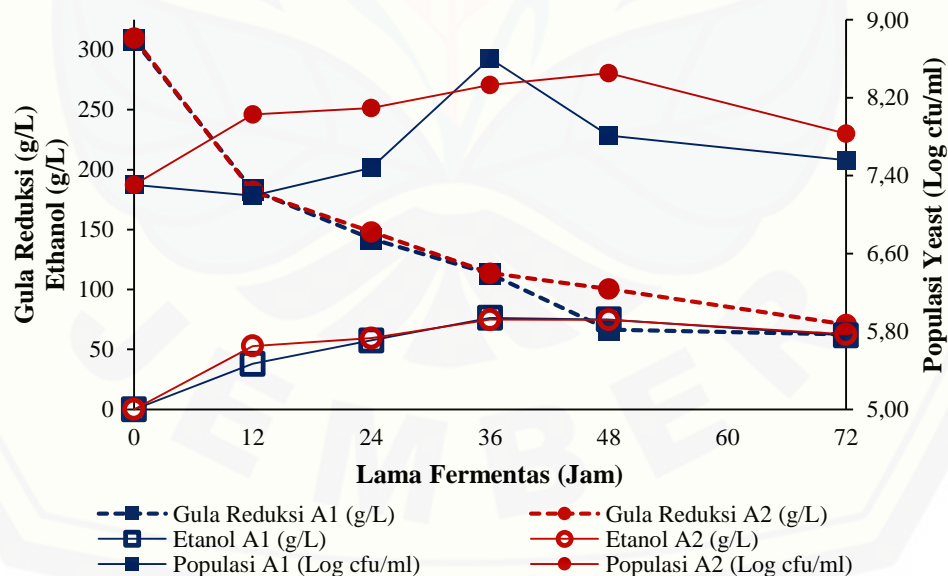
#### 4.1.1 Profil Fermentasi Bioetanol Tanpa Aerasi Agitasi

Yeast A1 dan A2 tumbuh dan berkembangbiak selama fermentasi yang ditandai dengan adanya peningkatan jumlah populasi hingga kurun waktu tertentu (lihat **Gambar 4.1**). Yeast A1 berada pada fase logaritmik (fase pertumbuhan sel hingga mencapai jumlah maksimum) selama 36 jam fermentasi dengan peningkatan jumlah populasi satu siklus log, sedangkan yeast A2 berada pada fase logaritmik selama fermentasi 48 jam dengan peningkatan jumlah populasi satu siklus log. Selanjutnya, kedua jenis yeast cenderung menunjukkan adanya penurunan jumlah populasi setelah fermentasi 48 hingga 72 jam. Penurunan jumlah populasi diduga karena yeast memasuki fase kematian. Jumlah populasi maksimum yeast A1 lebih tinggi dibandingkan A2. Namun, berdasarkan hasil uji T, jumlah populasi maksimum yeast A1 dan A2 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Peningkatan jumlah populasi yeast berkaitan dengan ketersediaan substrat pada media fermentasi. Ketersediaan substrat berupa gula pada media fermentasi yang masih cukup banyak digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan yeast, sehingga kedua jenis yeast mengalami peningkatan jumlah populasi hingga 36-48 jam fermentasi. Sebaliknya, jumlah gula reduksi pada masing-masing sampel menurun

hingga 72 jam fermentasi. Penurunan jumlah gula reduksi diikuti dengan penurunan jumlah populasi yeast, diduga karena ketersediaan substrat tidak mencukupi untuk yeast melakukan pertumbuhan lebih lanjut.

Ketersediaan substrat berupa gula dari molases digunakan oleh yeast untuk aktivitas pertumbuhan, perkembang biakan, dan menghasilkan metabolit berupa etanol, sehingga terjadi penurunan jumlah gula reduksi dan peningkatan jumlah etanol. Menurut Suliantari dan Rahayu (1990), *S.cerevisiae* menghasilkan metabolit berupa enzim alkohol dehidrogenase yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol. Semakin banyak jumlah populasi pertumbuhan yeast maka metabolit berupa enzim alkohol dehidrogenase yang dihasilkan akan semakin banyak pula, sehingga etanol yang dihasilkan akan semakin tinggi. Hal tersebut didukung dengan hasil pengamatan terhadap jumlah populasi yeast dan jumlah etanol yang mengalami peningkatan selama fermentasi, namun jumlah gula reduksi menurun hingga akhir fermentasi. Kurva hubungan antara peningkatan jumlah populasi, peningkatan jumlah etanol, dan penurunan jumlah gula reduksi selama fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 tanpa pemberian aerasi agitasi pada media molases dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.



**Gambar 4.1** Hubungan antara peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml), peningkatan etanol (g/L), dan penurunan jumlah gula reduksi (g/L) selama fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 tanpa pemberian aerasi agitasi pada media molases

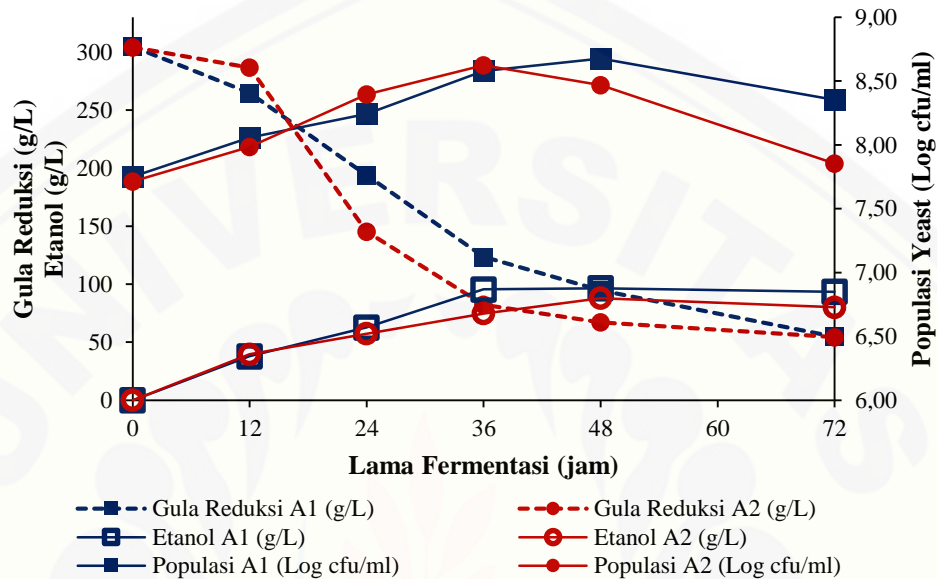
**Gambar 4.1** menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah populasi yeast dan jumlah etanol seiring dengan penurunan jumlah gula reduksi. Yeast A1 dan A2 mampu menghasilkan jumlah etanol maksimum selama 36-48 jam fermentasi dan selanjutnya mulai mengalami penurunan setelah 48 hingga 72 jam fermentasi. Yeast A1 mampu menghasilkan jumlah etanol lebih tinggi dibandingkan yeast A2, hal tersebut diduga karena yeast A1 memiliki jumlah populasi pertumbuhan maksimum lebih tinggi dibandingkan yeast A2, sehingga gula reduksi yang dikonversi menjadi etanol akan lebih banyak pula karena diduga enzim alkohol dehidrogenase yang dihasilkan yeast A1 lebih banyak.

**Gambar 4.1** juga menunjukkan bahwa jumlah etanol mulai mengalami penurunan pada 48 hingga 72 jam fermentasi. Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), semakin lama fermentasi akan meningkatkan jumlah alkohol yang dihasilkan, namun lamanya proses fermentasi memiliki batas maksimum. Fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kadar alkohol, karena substrat telah habis digunakan. Bila substrat dalam media telah habis digunakan, maka untuk mencukupi kebutuhan sel terhadap unsur karbon (C), khamir akan menggunakan alkohol untuk aktivitas metabolismenya. Kadar alkohol yang terlalu tinggi dari 12% dapat menyebabkan sel khamir lisis atau rusak. Oleh karena itu, jumlah populasi dan jumlah etanol yang dihasilkan oleh kedua jenis yeast pada fermentasi 48 hingga 72 jam mengalami penurunan. Penurunan jumlah etanol pada fermentasi 48 hingga 72 jam juga disebabkan oleh yeast telah memasuki fase kematian, sehingga kemampuan yeast untuk mengkonversi gula menjadi etanol menurun.

#### **4.1.2 Profil Fermentasi Bioetanol dengan Aerasi 0,3 vvm dan Agitasi 100 rpm**

Salah satu strategi yang dapat diterapkan dalam upaya optimasi produksi bioetanol adalah pemberian aerasi dan agitasi selama fermentasi. Aerasi bertujuan untuk menyediakan oksigen bagi mikroorganisme dalam fermentasi untuk keperluan metabolisme, sedangkan agitasi bertujuan untuk menghomogenkan media fermentasi (Stanburry dan Whitaker, 1990). Kurva hubungan antara jumlah populasi, jumlah

etanol, dan jumlah gula reduksi selama fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 dengan pemberian aerasi dan agitasi pada media molases dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



**Gambar 4.2** Hubungan antara peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml), peningkatan etanol (g/L), dan penurunan jumlah gula reduksi (g/L) selama fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases.

**Gambar 4.2** menunjukkan bahwa, terjadi peningkatan jumlah populasi yeast dan jumlah etanol seiring dengan penurunan jumlah gula reduksi. Yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm tumbuh dan berkembangbiak hingga kurun waktu tertentu. Jumlah populasi maksimum yeast A1 dicapai selama 48 jam fermentasi, sedangkan jumlah populasi pertumbuhan maksimum yeast A2 dicapai selama 36 jam fermentasi. Yeast A1 dan A2 mengalami peningkatan jumlah populasi satu siklus log. Jumlah populasi maksimum yeast A1 dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm dicapai lebih lama (pada 48 jam fermentasi) dibandingkan dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi (pada 36 jam fermentasi). Namun sebaliknya, jumlah populasi maksimum yeast A2 dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm dicapai lebih cepat (pada 36 jam fermentasi) dibandingkan dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi (pada 48 jam



fermentasi). Jumlah populasi maksimum yeast A1 dan A2 dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi fermentasi tanpa pemberian aerasi dan agitasi.

Peningkatan jumlah populasi yeast berkaitan dengan penurunan jumlah substrat dan peningkatan jumlah etanol pada media fermentasi. Ketersediaan substrat berupa gula dari molases digunakan oleh yeast untuk aktivitas pertumbuhan, perkembangan biakan, dan menghasilkan metabolit berupa etanol sehingga terjadi penurunan jumlah gula reduksi dan peningkatan jumlah etanol, seperti penjelasan pada sub bab sebelumnya. Berdasarkan **Gambar 4.2**, jumlah gula reduksi pada kedua sampel mengalami penurunan hingga akhir fermentasi. Laju konsumsi gula reduksi yeast A2 lebih cepat dibandingkan dengan laju konsumsi yeast A1.

**Gambar 4.2** menunjukkan bahwa, jumlah etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 lebih tinggi dibandingkan dengan yeast A2. Jumlah etanol maksimum yang dihasilkan oleh kedua jenis yeast dicapai selama 48 jam fermentasi. Jumlah etanol maksimum kedua jenis yeast dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm dicapai lebih lama (pada 48 jam fermentasi) dibandingkan dengan jumlah etanol maksimum dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi (pada 36 jam fermentasi), namun memiliki nilai lebih tinggi jika dibandingkan dengan jumlah etanol pada kondisi tanpa aerasi dan agitasi.

Peningkatan jumlah etanol terjadi seiring dengan peningkatan jumlah populasi. Menurut Suwasono *et al.* (2002), berdasarkan perbandingan produk dan pertumbuhan sel, fermentasi alkohol termasuk tipe fermentasi pertumbuhan terpadu (*associated growth*), yaitu suatu proses dengan pertumbuhan sel dan pembentukan produk berjalan seiring. Etanol merupakan metabolit primer yang dihasilkan pada fase logaritmik (Stanburry dan Whitaker, 1990). Oleh karena itu, jumlah etanol yang dihasilkan kedua jenis yeast meningkat selama 36-48 jam fermentasi karena pada kisaran waktu fermentasi tersebut kedua jenis yeast berada pada fase logaritmik (Lihat **Gambar 4.1** dan **Gambar 4.2**).



## 4.2 Kinetika Fermentasi Bioetanol Oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Agitasi pada Media Molases

### 4.2.1 Populasi Yeast

Pada kondisi tanpa aerasi dan agitasi selama fermentasi 36 jam, jumlah populasi yeast A1 (B1) sebesar  $8,60 \pm 0,189$  Log cfu/ml, sedangkan jumlah populasi yeast A2 sebesar  $8,33 \pm 0,250$  Log cfu/ml. Pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm (B2) mampu meningkatkan jumlah populasi yeast A2. Jumlah populasi yeast A1 dengan aerasi agitasi stagnan pada 0,3 vvm dan 100 rpm menjadi  $8,58 \pm 0,10$  Log cfu/ml, sedangkan yeast A2 dengan kondisi yang sama meningkat menjadi  $8,62 \pm 0,02$  Log cfu/ml. Perbandingan jumlah populasi yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1** Jumlah populasi yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	$7,305 \pm 0,10$	$7,305 \pm 0,03$	$7,84 \pm 0,80$	$7,71 \pm 0,07$
12	$7,19 \pm 1,27$	$8,06 \pm 0,26$	$8,03 \pm 0,55$	$7,98 \pm 0,51$
24	$7,48 \pm 0,94$	$8,24 \pm 0,01$	$8,09 \pm 0,63$	$8,39 \pm 0,05$
36	$8,60 \pm 0,19$	$8,58 \pm 0,10$	$8,33 \pm 0,25$	$8,62 \pm 0,02$
48	$7,81 \pm 0,97$	$8,68 \pm 0,10$	$8,45 \pm 0,15$	$8,47 \pm 0,02$
72	$7,56 \pm 0,62$	$8,23 \pm 0,12$	$7,83 \pm 0,40$	$7,85 \pm 0,38$

Pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media fermentasi memberikan suplai oksigen dan mampu meningkatkan jumlah populasi yeast. Menurut Winarno dan Fardiaz (1984), *S.cerevisiae* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerob, sehingga pada awal fermentasi alkohol dilakukan secara aerob untuk mengoptimalkan pertumbuhannya, sedangkan ketika produksi alkohol berlangsung dilakukan secara anaerob agar khamir dapat memproduksi alkohol. Khongsay *et al.* (2012), melaporkan bahwa ketersediaan oksigen pada awal fermentasi digunakan

untuk proses sintesis komponen membran sel yaitu lipid (sterol dan asam lemak tak jenuh) yang sangat penting bagi pertumbuhan sel dan dapat mempertahankan ketahanan dinding sel. Menurut Alfenore *et al.* (2004), pemberian aerasi 0,2 vvm pada media fermentasi secara *fed-batch* mampu meningkatkan viabilitas sel hingga 23%. Oleh karena itu, jumlah populasi yeast A2 dengan kondisi B2 lebih tinggi dibandingkan B1, karena ketersediaan oksigen dalam media fermentasi masih dapat dimanfaatkan dengan baik untuk pertumbuhan kedua jenis yeast.

#### 4.2.2 Laju Konsumsi Gula reduksi

Jumlah gula reduksi media fermentasi yeast A1 dan A2 dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi pada jam ke-0 berturut-turut sebesar  $308,509 \pm 0,324$  g/L dan  $304,772 \pm 0,637$  g/L, selanjutnya mengalami penurunan hingga 72 jam fermentasi, yaitu A1 sebesar  $62,419 \pm 0,007$  g/L dan A2 sebesar  $54,698 \pm 0,271$  g/L. Sementara itu jumlah gula reduksi media fermentasi yeast A1 dan A2 dengan aerasi agitasi pada jam ke-0 berturut-turut sebesar  $310,003 \pm 0,359$  g/L dan  $304,179 \pm 0,172$  g/L, selanjutnya mengalami penurunan hingga 72 jam fermentasi, yaitu A1 sebesar  $70,888 \pm 0,021$  g/L dan A2 sebesar  $54,254 \pm 0,147$  g/L. Laju konsumsi gula reduksi yeast A1 dan A2 dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi secara berturut-turut hingga akhir fermentasi sebesar  $246,089 \pm 0,331$  g/L dan  $250,075 \pm 0,366$  g/L, sedangkan laju konsumsi gula reduksi yeast A1 dan A2 dengan aerasi agitasi secara berturut-turut hingga akhir fermentasi sebesar  $239,115 \pm 0,38$  g/L dan  $249,926 \pm 0,246$  g/L. Perbandingan laju konsumsi gula reduksi oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa aerasi dan agitasi serta dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Laju konsumsi gula reduksi oleh yeast A1 maupun A2 dengan aerasi agitasi hingga akhir fermentasi lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi. Ketersediaan substrat berupa gula reduksi pada media fermentasi berkaitan dengan peningkatan jumlah populasi yeast. Kedua jenis yeast dengan aerasi dan agitasi memiliki laju konsumsi gula reduksi lebih tinggi hingga mencapai jumlah populasi

maksimum, sehingga mampu menghasilkan populasi maksimum lebih tinggi pula. Ketersediaan substrat berupa gula pada media fermentasi yang masih cukup banyak digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan yeast, sehingga kedua jenis yeast mengalami peningkatan jumlah populasi hingga 36-48 jam fermentasi, selanjutnya terjadi penurunan jumlah gula reduksi yang diikuti dengan penurunan jumlah populasi yeast, diduga karena ketersediaan substrat tidak mencukupi untuk yeast melakukan pertumbuhan lebih lanjut (Lihat **Tabel 4.1** dan **Tabel 4.2**).

**Tabel 4.2** Laju konsumsi gula reduksi ( $\Delta S$ ) oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	$\Delta S$ (g/L)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
12	125,536 $\pm$ 0,303	40,102 $\pm$ 0,468	128,026 $\pm$ 0,352	17,621 $\pm$ 0,003
24	166,135 $\pm$ 0,328	110,840 $\pm$ 0,468	161,901 $\pm$ 0,345	158,840 $\pm$ 0,007
36	195,527 $\pm$ 0,031	181,329 $\pm$ 0,035	196,274 $\pm$ 0,331	221,880 $\pm$ 0,154
48	242,104 $\pm$ 0,331	210,222 $\pm$ 0,021	209,475 $\pm$ 0,384	237,020 $\pm$ 0,088
72	246,089 $\pm$ 0,331	250,075 $\pm$ 0,366	239,115 $\pm$ 0,380	249,926 $\pm$ 0,025

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), yeast membutuhkan senyawa nutrisi selama fermentasi. Salah satu nutrisi makro yang penting untuk pertumbuhan yeast adalah unsur karbon (C). Sumber C untuk produksi bioetanol berasal dari media fermentasi berupa karbohidrat terutama dalam bentuk gula yaitu sukrosa dan glukosa yang digunakan sebagai substrat oleh *S.cerevisiae* untuk pertumbuhan, perkembangbiakan, dan pembentukan metabolit. Oleh karena itu, jumlah gula reduksi pada media fermentasi molases menurun hingga akhir fermentasi.

Laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 selama 36 jam fermentasi secara berturut-turut sebesar 5,431 $\pm$ 0,088 g/L/jam dan 5,452 $\pm$ 0,920 g/L/jam, sedangkan laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 secara berturut-turut sebesar 5,037 $\pm$ 0,098 g/L/jam dan 6,163 $\pm$ 0,429 g/L/jam. Perbandingan laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi

tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

**Tabel 4.3** Laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	Laju Konsumsi (g/L/jam)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	10,461±2,524	3,342±3,904	10,669±2,935	1,468±0,029
24	6,922±1,365	4,618±1,952	6,746±1,438	6,618±0,029
36	5,431±0,088	5,037±0,098	5,452±0,920	6,163±0,429
48	5,044±0,690	4,380±0,044	4,364±0,800	4,938±0,183
72	3,418±0,460	3,473±0,509	3,321±0,528	3,471±0,034

**Tabel 4.3** menunjukkan bahwa laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A2 hingga mencapai jumlah populasi maksimum dengan kondisi B2 lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi B1. Hal tersebut sejalan dengan jumlah populasi yeast A2 yang memiliki nilai lebih tinggi dengan kondisi B2 (lihat **Tabel 4.1**). Menurut Liu *et al.* (2009), ketersediaan oksigen pada awal fermentasi digunakan yeast untuk melakukan respirasi sehingga mampu mempercepat pertumbuhan yeast, sedangkan pemberian agitasi mampu menghomogenkan media fermentasi sehingga nutrisi dan suplay oksigen yang ditambahkan selama fermentasi dapat digunakan oleh yeast secara optimal. Begitu pula Alfenore *et al.* (2004), melaporkan bahwa pemberian aerasi 0,2 vvm pada media fermentasi secara *fed-batch* mampu meningkatkan viabilitas sel hingga 23%. Oleh karena itu, jumlah populasi maksimum yang dihasilkan pada kondisi B2 lebih tinggi sehingga konsumsi gula reduksi yeast A2 dengan kondisi B2 lebih tinggi pula.

Namun, laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dengan kondisi B1 hingga 36 jam fermentasi memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi B2. Nilai laju kaonsumsi/jam yang tinggi berpengaruh terhadap peningkatan jumlah populasi



yeast. Hal tersebut sejalan dengan jumlah populasi yeast A1 dengan kondisi tanpa aerasi dan agitasi (B1) yang memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian aerasi dan agitasi selama 36 jam fermentasi (lihat **Tabel 4.1**). Hal tersebut dikarenakan ketersediaan oksigen tidak mampu dimanfaatkan oleh yeast A1 dengan baik. Menurut Elena, et al. (2009), perbedaan jenis yeast memiliki kemampuan metabolisme yang berbeda pula. Perbedaan kondisi fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas metabolisme yeast. Oleh karena itu, laju konsumsi yeast A1 maupun A2 dengan kondisi B1 berbeda dengan kondisi B2.

#### 4.2.3 *Growth yield*

*Growth yield* merupakan suatu cara untuk menyatakan kebutuhan nutrisi oleh suatu mikroba secara kuantitatif. Nilai *growth yield* diperoleh dari perbandingan kenaikan jumlah mikroba terhadap jumlah substrat yang digunakan oleh mikroba (Stanburry dan Whitaker, 1990). *Growth yield* yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 hingga mencapai populasi pertumbuhan maksimum berturut-turut sebesar  $0,009 \pm 0,002$  log cfu/ml/g/L dan  $0,004 \pm 0,001$  log cfu/ml/g/L, sedangkan *Growth yield* yeast A1 dan A2 dengan kondisi B2 hingga mencapai populasi pertumbuhan maksimum berturut-turut sebesar  $0,004 \pm 0,007$  log cfu/ml/g/L dan  $0,004 \pm 0,000$  log cfu/ml/g/L. Perbandingan nilai *growth yield* yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

**Tabel 4.4** menunjukkan bahwa nilai *growth yield* yeast A1 hingga mencapai jumlah populasi maksimum dengan kondisi B1 lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi B2. *Growth yield* tidak sejalan dengan jumlah populasi maksimum kedua jenis yeast yang mengalami peningkatan dengan kondisi B2. Yeast A1 dengan kondisi B1 mengalami kenaikan jumlah populasi hingga dua siklus log, sedangkan yeast A1 dengan kondisi B2 hanya mengalami kenaikan 1 siklus log (Lihat **Tabel 4.1**), sehingga *growth yield* yeast A1 dengan kondisi B1 memiliki nilai lebih tinggi. Selain itu, *growth yield* berkaitan dengan jumlah konsumsi gula reduksi masing-masing yeast. Yeast



dengan jumlah konsumsi gula lebih kecil mampu menghasilkan nilai *growth yield* tinggi. Oleh karena itu, meskipun yeast A2 dengan kondisi B1 maupun B2 mengalami kenaikan jumlah populasi pertumbuhan 1 siklus log, namun jumlah konsumsi gula yeast A2 dengan kondisi B1 lebih kecil dibandingkan dengan kondisi B2 (Lihat **Tabel 4.2** dan **Tabel 4.3**), sehingga *growth yield* yeast A2 dengan kondisi B1 lebih besar.

**Tabel 4.4** *Growth yield* ( $Y_x/s$ ) yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	<i>Growth yield</i> (Log cfu/ml/g/L)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	0,002±0,015	0,009±0,002	0,002±0,003	0,015±0,035
24	0,003±0,008	0,005±0,002	0,002±0,002	0,004±0,001
36	0,009±0,002	0,005±0,000	0,003±0,008	0,004±0,000
48	0,004±0,006	0,004±0,001	0,004±0,007	0,003±0,000
72	0,003±0,004	0,002±0,001	0,0001±0,002	0,001±0,003

#### 4.2.4 Jumlah Etanol dan Produktivitas Etanol

Jumlah etanol yang dihasilkan yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 selama 36 jam fermentasi secara berturut-turut yaitu 76,305±0,085 g/L dengan produktivitas 2,120±0,237 g/L/jam dan 74,800±0,188 g/L dengan produktivitas 2,078 ± 0,521 g/L/jam, sedangkan jumlah etanol yang dihasilkan yeast A1 dan A2 dengan kondisi B2 selama 36 jam fermentasi secara berturut-turut yaitu 95,464±0,015 g/L dengan produktivitas 2,652±0,043 g/L/jam dan 74,663±0,027 g/L dengan produktivitas 2,074±0,075 g/L/jam. Perbandingan jumlah dan produktivitas etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.5** dan **Tabel 4.6**.

**Tabel 4.5** Produksi etanol oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	Etanol (g/L)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	37,988±0,004	37,852±0,017	52,768±0,019	39,494±0,226
24	57,557±0,165	62,758±0,048	59,336±0,043	57,284±0,075
36	76,305±0,085	95,464±0,015	74,800±0,188	74,663±0,027
48	74,937±0,035	96,422±0,048	74,663±0,174	87,937±0,118
72	61,663±0,021	93,411±0,014	62,621±0,015	80,000±0,068

**Tabel 4.6** Produktivitas etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	Produktivitas (g/L/jam)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	3,166±0,032	3,154±0,145	4,397±0,161	3,291±1,887
24	2,398±0,685	2,615±0,202	2,472±0,177	2,387±0,314
36	2,120±0,237	2,652±0,043	2,078±0,521	2,074±0,075
48	1,561±0,073	2,009±0,101	1,555±0,363	1,832±0,246
72	0,856±0,030	1,297±0,019	0,870±0,022	1,111±0,094

Berdasarkan **Tabel 4.5**, menunjukkan bahwa yeast A1 mampu menghasilkan jumlah etanol lebih tinggi dibandingkan yeast A2 baik dengan kondisi B1 maupun B2. Hal tersebut terjadi karena yeast A1 memiliki jumlah populasi pertumbuhan maksimum lebih tinggi dibandingkan yeast A2 pada kedua kondisi fermentasi, sehingga gula reduksi yang dikonversi menjadi etanol lebih banyak karena enzim alkohol dehidrogenase yang dihasilkan yeast A1 lebih banyak. Menurut Suliantari dan Rahayu (1990), *S.cerevisiae* menghasilkan metabolit berupa enzim alkohol dehidrogenase yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol. Semakin banyak jumlah populasi pertumbuhan yeast maka metabolit berupa enzim alkohol dehidrogenase yang

dihasilkan akan semakin banyak pula, sehingga etanol yang dihasilkan akan semakin tinggi.

Pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm mampu meningkatkan jumlah etanol dan produktivitas yang dihasilkan oleh yeast A1 selama 36 jam fermentasi. Peningkatan jumlah etanol dan produktivitas yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi B2 diduga karena ketersediaan suplai oksigen dapat dimanfaatkan dengan baik oleh yeast A1 untuk mendukung proses pertumbuhan, perkembangan biakan, dan pembentukan metabolit etanol, sehingga mampu menghasilkan jumlah etanol dan produktivitas lebih tinggi. Menurut Liu *et al.* (2009), ketersediaan oksigen pada awal fermentasi digunakan yeast untuk melakukan respirasi sehingga mampu mempercepat pertumbuhan yeast yang berpengaruh terhadap peningkatan jumlah etanol. Sementara itu pemberian agitasi mampu menghomogenkan media fermentasi sehingga nutrisi dan suplai oksigen yang ditambahkan selama fermentasi dapat digunakan oleh yeast secara optimal.

Liu *et al.* (2009), melaporkan bahwa pemberian aerasi dan agitasi pada media *very high gravity* (media dengan kadar gula tinggi yaitu 270-300 g/L) selama fermentasi alkohol mampu menghasilkan etanol lebih tinggi (143,8 g/L) dibandingkan kondisi fermentasi anaerob (75,8 g/L). Begitu pula Alfenore *et al.* (2004), melaporkan bahwa pemberian aerasi 0,2 vvm selama fermentasi secara *fed-batch* mampu meningkatkan konsentrasi etanol dari 128,1 g/L (tanpa aerasi) menjadi 143,8 g/L. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm mampu meningkatkan jumlah etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi B2 selama fermentasi.

Namun, pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah etanol dan produktivitas yang dihasilkan oleh yeast A2 selama 36 jam fermentasi. Peningkatan jumlah populasi yeast A2 dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm tidak diikuti dengan peningkatan jumlah etanol yang dihasilkan. Yan *et al.* (2009), melaporkan bahwa ketersediaan oksigen dalam media fermentasi digunakan oleh yeast untuk keperluan respirasi aerobik

membentuk biomassa, namun pemberian aerasi yang terlalu tinggi dapat mengurangi efisiensi fermentasi karena merusak metabolisme anaerob yang tidak dikehendaki dalam fermentasi alkohol, sehingga menurunkan produktivitas etanol.

#### 4.2.5 Yield Etanol

*S. cerevisiae* merupakan mikroba yang dapat memproduksi etanol dari glukosa melalui jalur EMP (*Embden Meyerhof Pathway*). Yield etanol (Yp/s) diperoleh dari perbandingan produk etanol dengan konsumsi gula reduksi. Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi B1 selama 36 jam fermentasi lebih besar dibandingkan dengan A2 secara berturut-turut yaitu  $0,391 \pm 0,050$  g/g dan  $0,378 \pm 0,032$  g/g. Begitu pula Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi B2 selama 36 jam fermentasi lebih besar dibandingkan dengan A2 secara berturut-turut yaitu  $0,527 \pm 0,019$  g/g dan  $0,338 \pm 0,036$  g/g. Yp/s yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 dan B2 sejalan dengan jumlah etanol yang dihasilkan oleh kedua jenis yeast selama 36 jam fermentasi yaitu yeast A1 memiliki jumlah etanol maksimum lebih tinggi dibandingkan dengan yeast A2 pada kedua kondisi fermentasi (Lihat **Tabel 4.5**), sehingga Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi fermentasi B1 maupun B2 memiliki nilai lebih besar dibandingkan dengan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A2. Perbandingan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.7**.

Berdasarkan **Tabel 4.7** menunjukkan bahwa, pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm mampu meningkatkan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 selama 36 jam fermentasi. Peningkatan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi B2 sejalan dengan peningkatan kadar etanol dan produktivitas yang dihasilkan yeast A1 dengan kondisi B2. Hal tersebut diduga karena ketersediaan suplai oksigen dapat dimanfaatkan dengan baik oleh yeast A1 untuk mendukung proses pertumbuhan, perkembang biakan, dan pembentukan metabolit berupa etanol, sehingga mampu meningkatkan jumlah etanol, produktivitas, dan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1



dengan kondisi B2 pada fermentasi 36 jam seperti penjelasan pada sub bab sebelumnya.

**Tabel 4.7** Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi bioetanol pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	Yp/s (g etanol/g gula reduksi)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	0,312±0,078	3,052±3,609	0,426±0,102	2,229±1,241
24	0,363±0,171	0,632±0,311	0,372±0,053	0,361±0,046
36	0,391±0,050	0,527±0,019	0,378±0,032	0,338±0,036
48	0,311±0,028	0,459±0,018	0,355±0,018	0,372±0,064
72	0,252±0,025	0,377±0,050	0,265±0,036	0,320±0,024

Namun, pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A2 selama 36 jam fermentasi. Hal tersebut sejalan dengan jumlah etanol dan produktivitas yeast A2 dengan kondisi B2 selama 36 jam fermentasi yang memiliki nilai lebih rendah dibandingkan dengan kondisi B1 seperti yang telah dijelaskan dalam sub bab sebelumnya. Menurunnya jumlah etanol, produktivitas, dan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A2 dengan kondisi B2 diduga karena tidak dilakukan pembatasan terhadap waktu pemberian aerasi selama fermentasi.

Waktu pemberian aerasi dalam fermentasi perlu dibatasi. Menurut Khongsay (2012), produktivitas etanol mengalami peningkatan dengan pemberian aerasi selama 2 hingga 4 jam pada awal fermentasi tetapi pemberian aerasi terlalu lama (hingga 6 jam) dapat menurunkan produktivitas etanol karena yeast mengalami reaksi respirasi untuk memperbanyak jumlah sel dan tidak melakukan reaksi fermentasi untuk menghasilkan etanol. Selain itu, Yan *et al.* (2009), menjelaskan pemberian aerasi dengan laju rendah dilakukan pada awal fermentasi hingga kadar oksigen mencapai 4-9 mg/L kemudian aerasi dihentikan agar yeast melakukan reaksi fermentasi. Namun,



pemberian agitasi dapat dilakukan hingga akhir fermentasi karena dapat menghomogenkan nutrisi serta memberikan suplai oksigen pada media fermentasi, sehingga senyawa nutrisi dalam media fermentasi dapat dimanfaatkan yeast dengan optimal dan pertumbuhan yeast merata dalam media fermentasi.

#### 4.2.6 Efisiensi Fermentasi

Berdasarkan reaksi stoikiometri, 1 mol glukosa akan menghasilkan 2 mol etanol atau 1 g glukosa setara dengan 0,5111 g etanol. Nilai efisiensi fermentasi diperoleh dari perbandingan antara jumlah etanol yang dihasilkan dengan jumlah etanol teoritis (Yingling *et al.*, 2011). Perbandingan nilai efisiensi fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases dapat dilihat pada **Tabel 4.8**.

**Tabel 4.8** Efisiensi fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm pada media molases

Lama fermentasi (Jam)	Efisiensi (%)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	61,059±0,153	597,112±7,061	83,392±0,199	436,099±2,427
24	71,077±0,333	123,629±0,608	72,814±0,104	70,541±0,089
36	76,435±0,097	103,042±0,037	74,040±0,062	66,082±0,069
48	60,938±0,055	89,723±0,036	69,413±0,035	72,821±0,124
72	49,359±0,049	73,798±0,098	51,794±0,035	62,606±0,047

Berdasarkan **Tabel 4.8** menunjukkan bahwa, efisiensi fermentasi yeast A1 dan A2 pada kondisi B1 selama 36 jam fermentasi secara berturut-turut yaitu 76,435±0,097 % dan 74,040±0,062 %, sedangkan efisiensi fermentasi yeast A1 dan A2 pada kondisi B2 selama 36 jam fermentasi secara berturut-turut yaitu 103,042±0,037 % dan 66,082±0,069 %. Efisiensi fermentasi yeast A1 dengan kondisi B1 dan B2 selama 36 jam fermentasi memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan yeast A2 pada kedua kondisi fermentasi. Hal ini sejalan dengan jumlah etanol, produktivitas, dan  $Y_p/s$  yang

dihasilkan. Diantara beberapa perlakuan tersebut, yeast A1 dengan kondisi B2 memiliki efisiensi paling tinggi, artinya pada perlakuan tersebut yeast mampu memanfaatkan substrat dengan baik untuk menghasilkan etanol. Adanya selisih antara etanol secara teoritis dengan hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak semua substrat berhasil dikonversi oleh *S.cerevisiae* menjadi etanol. Menurut Mukhtar, *et.al.* (2010), dalam fermentasi alkohol, selain menghasilkan alkohol, *S. cerevisiae* juga menghasilkan *by-product* berupa asam-asam organik dan asetaldehid yang dapat menurunkan jumlah alkohol, karena alkohol yang terakumulasi dalam sampel berikatan dengan asam-asam organik dan membentuk senyawa ester sehingga jumlah alkohol dalam sampel menurun dan mempengaruhi efisiensi fermentasi.

Berdasarkan **Tabel 4.8** menunjukkan bahwa, pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm mampu meningkatkan efisiensi yang dihasilkan oleh yeast A1 selama 36 jam fermentasi. Peningkatan efisiensi fermentasi yang dihasilkan oleh yeast A1 dengan kondisi B2 sejalan dengan peningkatan kadar etanol, produktivitas, dan Yp/s yang dihasilkan yeast A1 dengan kondisi B2 seperti penjelasan dalam sub bab sebelumnya. Namun, pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap efisiensi fermentasi yang dihasilkan oleh yeast A2 selama 36 jam fermentasi. Hal tersebut sejalan dengan penurunan jumlah etanol, produktivitas, dan Yp/s yang dihasilkan oleh yeast A2 dengan kondisi B2 selama 36 jam fermentasi seperti penjelasan dalam sub bab sebelumnya.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Jumlah etanol yang dihasilkan selama 36 jam fermentasi pada kondisi tanpa pemberian aerasi dan agitasi oleh starter komersial *Angel Alcohol Active Dry Yeast* (A1) yaitu  $76,305 \pm 4,258$  g/L dengan produktivitas etanol  $2,120 \pm 0,237$  g/L/jam dan yield (Yp/s)  $0,391 \pm 0,050$  g/g, sedangkan starter komersial *New Aule Alcohol Yeast* (A2) yaitu  $74,8 \pm 9,386$  g/L dengan produktivitas etanol  $2,078 \pm 0,521$  g/L/jam dan yield (Yp/s)  $0,378 \pm 0,032$  g/g.
2. Jumlah etanol yang dihasilkan selama 36 jam fermentasi pada kondisi pemberian aerasi  $0,3$  vvm dan agitasi 100 rpm yang dihasilkan oleh starter komersial merek *Angel Alcohol Active Dry Yeast* (A1) meningkat menjadi  $95,464 \pm 0,774$  g/L dengan produktivitas  $2,652 \pm 0,043$  g/L/jam dan yield (Yp/s)  $0,527 \pm 0,019$  g/g. Namun, pemberian aerasi  $0,3$  vvm dan agitasi 100 rpm tidak berpengaruh signifikan terhadap jumlah etanol yang dihasilkan oleh starter komersial merek *New Aule Alcohol Yeast* (A2) yaitu  $74,663 \pm 1,355$  g/L dengan produktivitas  $2,074 \pm 0,075$  g/L/jam dan yield (Yp/s)  $0,338 \pm 0,036$  g/g.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh variasi laju dan waktu pemberian aerasi dan agitasi pada masing-masing starter komersial, sehingga dapat diperoleh jumlah etanol optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribe Larrea, J.L., Goma, C., Molina-Jouve, C., dan Guillouet, S.E. 2004. Aeration Strategy: A Need for Very High Ethanol Performance in *Saccharomyces cerevisiae* Fed-Batch Process. *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol.63:537–542.
- Angel Yeast Co., Ltd., 2008. Angel Alcohol Active Dry Yeast. <http://www.Fazendomedia.com/pz21b0d8a-czf35b1e-angel-brand-thermal-tolerant-alcohol-actie-dry-yeast.html>. [diakses 6 Maret 2015].
- Balat, M., Balat, H., Oz, C. 2008. Progress in Bioethanol Processing. *Prog. Energ. Combust.* Vol.34: 551-573
- Direktorat Jenderal Minyak dan Gas Bumi. 2011. Statistika Minyak Bumi 2011. [serial online]. <http://prokum.esdm.go.id/Publikasi/Statistik/Statistik%20Minyak%20Bumi.pdf>. [diakses 22 Agustus 2014].
- Elena, P., Gabriella, R., Camelia, B., Traian, H. 2009a. Bioethanol Production from Molasses by Different Strain of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Food Technology International Symposium Euro-aliment The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*. Vol.3(23): 49-56.
- Elena, P., Rapeanu, G., Bonciu, C., Vicol, C., dan Bahrim, G. 2009b. Investigation of Yeast Performances In The Fermentation of Beet and Cane Molasses to Ethanol Production. *Ovidius University Press*, Vol.20 (2):202- 203.
- Elevri, P. dan Surya, R. P. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kimia Indonesia*. Vol.1(2): 109-110.
- El-Gendy, N. S., Madian, H. R., dan Abu-Amr, S. S. 2013. Design and Optimization of a Process for Sugarcane Molasses Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Using Response Surface Methodology. *International Journal of microbiology*. Vol.2013. Article ID 815631: 1-9.
- Gross, T., Faull, J., Ketteridge, S., dan Springham, D. 1995. *Introductory Microbiology I*. London: Chapman and Hill Boundry Row.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi offset.
- Judoamidjojo, M., Said, E. G., dan Darwis, A. A. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Press.



- Kartika, B., A.D., Guritno, D., Purwadi, & Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Khongsay, N., Laopaiboon, L., Jaisil, P., dan Laopaiboon, P. 2012. Optimization of Agitation and Aeration for Very High Gravity Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Orthogonal Array Design. *Energies*. Vol.5: 561-576.
- Kuswanto dan Sudarmaji, S. 1997. *Prosedur Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Lin, T. dan Tanaka, S. 2006. Ethanol Fermentation From Biomass Resources: Current Status And Prospects. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.69:627-642.
- Machfud, Said, E. G., Krisnani. 1989. *Manual Laboratorium Fermentor*. Bogor: Laboratorium Rekayasa Proses Pangan, Pusat Antar Universitas (PAU) Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Milkessa, T. 2009. "Evaluation Of Yeast Biomass Production Using Molases And Supplements". Tidak Diterbitkan. Tesis. School Of Graduate Studies Department Of Biology Faculty Of Science Addis Ababa University.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. Vol.31:426-428.
- Mukhtar, K., Asgher, M., Afgham, S., Hussain, K., Zia-Ul-Hussnain, S. 2010. Comparative Study On Two Commercial Strain Of *Saccharomyces Cerevisiae* For Optimum Ethanol Production On Industrial Scale. *Journal of biomedicine and biotechnology*. Vol.2010(Article ID 419584):1-5.
- Murdiyatmo. 2006. *Pengembangan Industri Bioetanol: Prospek Kendala dan Tantangan*. Jakarta : Kadin dan IPB.
- Nurdyastuti, I. 2008. *Teknologi Proses Bio-Etanol*. Jakarta: Balai Besar Teknologi Pati-BPPT.
- Nurhayati, Jenie, B. S. L., Kusumaningrum, H. D. 2010. Fermentasi Suhu Rendah Garam dengan Menggunakan Beberapa Kapang Indigenus dan *Lactobacillus plantarum* KIK. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 21(1): 11-17.
- Olbrich, H. 1963. *The Molases*. Berlin: Institut Für Zuckerindustrie.
- Pereira, B. F., Pedro, M. R., Guimara., Teixeira, A., dan Domingues, L. 2010. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Efficient Very High Gravity Bio-ethanol Fermentation Processes. *Biotechnol Lett*. Vol.10 (32):1655–1661.



- Prihandana, R., Noerwijati, K., Adinurani, P.G., Setyaningsih, D., Setiadi, S., dan Hendroko, R. 2008. *Bioetanol Ubi Kayu Bahan Bakar Masa Depan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Ristiati, N. P. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional.
- Stanburry, P. F. dan Whitaker, A. 1990. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Press.
- Suliantari dan Rahayu, W.P. 1990. *Teknologi Fermentasi Umbi-umbian dan Biji-bijian*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB.
- Suwasono, S., Fauzi, M., Lindriati, T. 2002. *Teknologi Fermentasi*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.
- Vasconcelos, J. N. D., Lopes, C.E., dan de Franca, F.P. 2004. Continuous ethanol Production Using Yeast Immobilized on Sugarcane Stalks. *Braz J Chem Eng*. Vol.21 (3): 357–365.
- Volk, W. A. dan Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan oleh Soenartono Adisoemarto. Jakarta: Erlangga.
- Winarno, F.G. dan Fardiaz, S. 1984. *Biofermentasi dan Biosintesa Protein*. Bandung: Angkasa.
- Xin, Yongfei, Zuoying dan Zhouygui. 2003. The effect of different substrate concentration on ethanol fermentation. *Fd Ferment Indus*. Vol.29: 21-23.
- Xinjiang Shengli Biotechnology Co., Ltd., 2007. New Aule Alcohol Yeast. <http://newaule.en.alibaba.com/product/60092767669-218517345/Yeast.html>. [diakses 6 Maret 2015].
- Yan, L., Tiansheng, Q., Naikun, S., Mingzhe, G., Yanling, G., dan Hai, Z. 2009. Improvement of Ethanol Concentration and Yield by Initial Aeration and Agitation Culture in Very High Gravity Fermentation. *Chin J Appl Environ Biol*. ISSN 1006-687X. Vol.15(4): 563-567.
- Yingling, B., Zongcheng, Y., Honglin, W., dan Li, C. 2011. Optimization of Bioethanol Production During Simultaneous Saccharification and Fermentation in Very High Gravity Cassava Mash. *Springer Science+Business Media Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol.99: 329-339.
- Zayed, G.Z.A. dan Foley, J. 1987. The Influence of Fermentation Conditions on Ethanol Yields from Sugar Beet Molasses and Fodder Beet Juice Using *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Irish Journal of Food Science and Technology*. Vol.11:119-133.

## LAMPIRAN

## Lampiran A

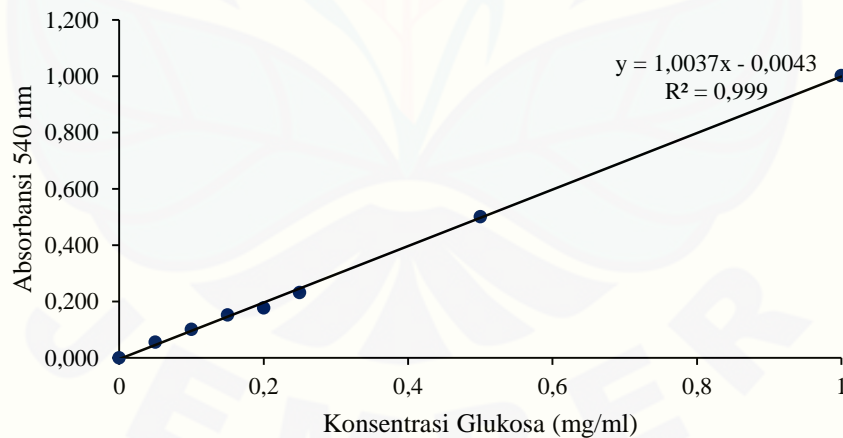
## Parameter : Kadar Gula Pereduksi

## A.1 Nilai Absorbansi Glukosa dan Kurva Standar

Konsentrasi Glukosa (mg/ml)*	DNS (ml)	Akuades (ml)	Absorbansi
0	1	5	0,000
0,05	1	5	0,056
0,1	1	5	0,101
0,15	1	5	0,153
0,2	1	5	0,178
0,25	1	5	0,232
0,5	1	5	0,501
1	1	5	1,003

Keterangan : \*) masing-masing seri konsentrasi glukosa sebanyak 0,2 ml

Kurva Standar Gula Reduksi :



Sebelum dianalisa 0,1 ml sampel suspensi reaksi fermentasi diencerkan menggunakan aquades dan ditera hingga 10 ml. Faktor pengenceran yang dilakukan dalam analisa jumlah gula reduksi adalah 100.

**A.2 Data Kadar Gula Reduksi Selama Fermentasi**

<b>A1B1</b>						
Waktu (Jam)	Absorbansi		Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	0,569	0,661	285,593	331,424	308,509	0,324
12	0,360	0,366	181,479	184,467	182,973	0,021
24	0,282	0,281	142,622	142,124	142,373	0,004
36	0,181	0,264	92,308	133,655	112,982	0,292
48	0,130	0,128	66,902	65,906	66,404	0,007
72	0,122	0,120	62,917	61,921	62,419	0,007

<b>A2B1</b>						
Waktu (Jam)	Absorbansi		Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	0,669	0,567	335,409	284,597	310,003	0,359
12	0,362	0,360	182,475	181,479	181,977	0,007
24	0,295	0,291	149,098	147,106	148,102	0,014
36	0,228	0,220	115,722	111,737	113,729	0,028
48	0,194	0,201	98,784	102,272	100,528	0,025
72	0,135	0,141	69,393	72,382	70,888	0,021

<b>A1B2</b>						
Waktu (Jam)	Absorbansi		Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	0,698	0,517	349,856	259,689	304,772	0,638
12	0,684	0,370	342,881	186,460	264,671	1,106
24	0,542	0,228	272,143	115,722	193,932	1,106
36	0,339	0,148	171,017	75,869	123,443	0,673
48	0,273	0,098	138,139	50,961	94,550	0,616
72	0,144	0,067	73,877	35,519	54,698	0,271

<b>A2B2</b>						
Waktu (Jam)	Absorbansi		Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	0,633	0,584	316,341	292,018	304,179	0,172
12	0,598	0,548	298,968	274,149	286,558	0,175
24	0,314	0,263	157,997	132,681	145,339	0,179
36	0,164	0,159	83,540	81,058	82,299	0,018
48	0,143	0,119	73,116	61,203	67,160	0,084
72	0,126	0,084	64,678	43,830	54,254	0,147

Contoh perhitungan jumlah gula reduksi :

Jumlah gula reduksi sampel A1B1 lama fermentasi 0 jam:

- Nilai Absorbansi A1B1 ulangan 1= 0,569

$$\text{Kadar Gula Pereduksi} = x; \text{ dimana } x = \frac{y+0,0043}{1,0037}$$

$$x = \frac{0,569+0,0043}{1,0037} = 0,571 \text{ mg/ml}$$

Volume total pada saat analisa adalah 7 ml yang terdiri dari:

sampel (ml)	Aquades (ml)	DNS (ml)	ditambah Aq setelah dipanaskan (ml)	vol. Total (ml)
0,2	0,8	1	5	7

Volume pengambilan sampel adalah 0,2 ml dengan faktor pengenceran 100 kali dan diencerkan kembali 5 kali.

Sehingga :

$$\text{Kadar gula pereduksi (g/L)} = 0,571 \text{ mg/ml} \times 5 \times 100 = 285,593 \text{ mg/ml} = 285,593 \text{ g/L}$$

- Nilai Absorbansi ulangan 2= 0,661

$$x = \frac{0,661+0,0043}{1,0037} = 0,663 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Kadar gula pereduksi (g/L)} = 0,663 \times 5 \times 100 = 331,424 \text{ mg/ml} = 331,424 \text{ g/L}$$

- Rerata gula reduksi A1B1 jam ke 0

$$\text{Kadar Gula Pereduksi} = \frac{285,593+331,424}{2} = 308,509 \text{ g/L}$$

## A.3 Laju konsumsi selama fermentasi

A1B1										
Lama fermentasi (Jam)	Gula reduksi (g/L)		$\Delta S$		$\Delta S$		laju konsumsi/jam		laju konsumsi/jam	
	1	2	1	2	Rerata	stdev	1	2	Rerata	STDEV
0	285,593	331,424	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	181,479	184,467	104,114	146,957	125,536	30,294	8,676	12,246	10,461	2,524
24	142,622	142,124	142,971	189,300	166,135	32,760	5,957	7,887	6,922	1,365
36	92,308	133,655	193,285	197,769	195,527	3,171	5,369	5,494	5,431	0,088
48	66,902	65,906	218,691	265,518	242,104	33,112	4,556	5,532	5,044	0,690
72	62,917	61,921	222,676	269,503	246,089	33,112	3,093	3,743	3,418	0,460

A2B1										
Lama fermentasi (Jam)	Gula reduksi (g/L)		$\Delta S$		$\Delta S$		laju konsumsi/jam		laju konsumsi/jam	
	1	2	1	2	Rerata	stdev	1	2	Rerata	STDEV
0	335,409	284,597	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	182,475	181,479	152,934	103,118	128,026	35,225	12,745	8,593	10,669	2,935
24	149,098	147,106	186,311	137,491	161,901	34,521	7,763	5,729	6,746	1,438
36	115,722	111,737	219,687	172,860	196,274	33,112	6,102	4,802	5,452	0,920
48	98,784	102,272	236,625	182,325	209,475	38,395	4,930	3,798	4,364	0,800
72	69,393	72,382	266,016	212,215	239,115	38,043	3,695	2,947	3,321	0,528

A1B2										
Lama fermentasi (Jam)	Gula reduksi (g/L)		$\Delta S$		$\Delta S$		laju konsumsi/jam		laju konsumsi/jam	
	1	2	1	2	Rerata	stdev	1	2	Rerata	STDEV
0	349,856	259,689	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	342,881	186,460	6,975	73,229	40,102	46,849	0,581	6,102	3,342	3,904
24	272,143	115,722	77,713	143,967	110,840	46,849	3,238	5,999	4,618	1,952
36	171,017	75,869	178,839	183,820	181,329	3,522	4,968	5,106	5,037	0,098
48	138,139	50,961	211,717	208,728	210,222	2,114	4,411	4,348	4,380	0,044
72	73,877	35,519	275,979	224,170	250,075	36,634	3,833	3,113	3,473	0,509

A2B2										
Lama fermentasi (Jam)	Gula reduksi (g/L)		$\Delta S$		$\Delta S$		laju konsumsi/jam		laju konsumsi/jam	
	1	2	1	2	Rerata	stdev	1	2	Rerata	STDEV
0	316,341	292,018	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	298,968	274,149	17,373	17,869	17,621	0,351	1,448	1,489	1,468	0,029
24	157,997	132,681	158,344	159,337	158,840	0,702	6,598	6,639	6,618	0,029
36	83,540	81,058	232,801	210,960	221,880	15,444	6,467	5,860	6,163	0,429
48	73,116	61,203	243,225	230,815	237,020	8,775	5,067	4,809	4,938	0,183
72	64,678	43,830	251,663	248,188	249,926	2,457	3,495	3,447	3,471	0,034



**Lampiran B****Parameter : Kadar Brix****B1. Data Pengukuran Kadar Brix Media Molases Selama Fermentasi Bioetanol Oleh *Saccharomyces erevisiae* Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi**

Waktu (Jam)	A1B1 (% Brix)		Rerata	STDEV	A2B1 (% Brix)		Rerata	Stdev
	1	2			1	2		
0	24,00	24,00	24,00	0,00	24,00	24,00	24,00	0,00
12	21,00	20,87	20,93	0,07	20,00	20,40	20,20	0,20
24	18,00	18,00	18,00	0,00	17,00	18,00	17,50	0,50
36	16,00	16,00	16,00	0,00	15,20	16,00	15,60	0,40
48	15,00	16,00	15,50	0,50	15,00	16,00	15,50	0,50
72	14,00	14,40	14,20	0,20	14,00	14,60	14,30	0,30

**B.2 Data Pengukuran Kadar Brix Media Molases Selama Fermentasi Bioetanol Oleh *Saccharomyces erevisiae* dengan Pemberian Aerasi 0,3 vvm dan Agitasi 100 rpm**

Waktu (Jam)	A1B2 (% Brix)		Rerata	STDEV	A2B2 (% Brix)		Rerata	STDEV
	U1	U2			U1	U2		
0	24,00	24,00	24,00	0,00	24,00	24,00	24,00	0,00
12	19,60	20,00	19,80	0,20	20,00	22,00	21,00	1,00
24	17,00	16,00	16,50	0,50	16,00	20,00	18,00	2,00
36	15,00	15,00	15,00	0,00	15,00	16,00	15,50	0,50
42	15,00	15,00	15,00	0,00	15,00	16,00	15,50	0,50
72	14,00	14,27	14,13	0,13	15,00	15,00	15,00	0,00

## Lampiran C

Parameter: Populasi *Saccharomyces cerevisiae*C.1 Populasi *Saccharomyces Cerevisiae* Tanpa Pemberian Aerasi Dan Agitasi Selama Fermentasi Bioetanol pada Media Molases.

Waktu (Jam)	Populasi A1B1 (cfu/ml)		Log cfu / ml		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$7,3 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$	6,863	6,672	6,672	0,10
12	$8,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^8$	5,924	8,462	7,193	1,27
24	$3,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	6,544	8,415	7,480	0,94
36	$2,6 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	8,415	8,792	8,604	0,19
48	$6,9 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$	6,839	8,785	7,812	0,97
72	$8,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	6,940	8,176	7,558	0,62

Waktu (Jam)	Populasi A2B1 (cfu/ml)		Log cfu / ml		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$4,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	8,643	7,041	7,842	0,80
12	$3,8 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	8,580	7,477	8,028	0,55
24	$5,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	8,724	7,462	8,093	0,63
36	$1,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	8,079	8,580	8,329	0,25
48	$2,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	8,301	8,602	8,452	0,15
72	$1,7 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	8,230	7,431	7,831	0,40

C.2 Populasi *Saccharomyces cerevisiae* dengan pemberian aerasi 0,3 vvm dan agitasi 100 rpm Selama Fermentasi Bioetanol Pada Media Molases

Waktu (Jam)	Populasi A1B2 (cfu/ml)		Log cfu / ml		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$5,3 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	7,72	7,78	7,75	0,03
12	$6,3 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	7,79	8,32	8,06	0,26
24	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	8,23	8,26	8,24	0,01
36	$3,0 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	8,48	8,68	8,58	0,10
48	$3,8 \times 10^8$	$5,9 \times 10^8$	8,58	8,77	8,68	0,10
72	$1,7 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	8,23	8,48	8,23	0,12

Waktu (Jam)	Populasi A2B2 (cfu/ml)		Log cfu / ml		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	4,4 x 10 <sup>7</sup>	6,1 x 10 <sup>7</sup>	7,64	7,79	7,71	0,07
12	3,0 x 10 <sup>7</sup>	3,1 x 10 <sup>8</sup>	7,48	8,49	7,98	0,51
24	2,8 x 10 <sup>8</sup>	2,2 x 10 <sup>8</sup>	8,45	8,34	8,39	0,05
36	4,4 x 10 <sup>8</sup>	4,0 x 10 <sup>8</sup>	8,64	8,60	8,62	0,02
48	3,1 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	8,49	8,45	8,47	0,02
72	1,7 x 10 <sup>8</sup>	3,0 x 10 <sup>7</sup>	8,23	7,48	7,85	0,38

Waktu (Jam)	Populasi yeast (log cfu/ml)			
	A1B1	A2B1	A1B2	A2B2
0	6,672	7,842	7,75	7,71
12	7,193	8,028	8,06	7,98
24	7,480	8,093	8,24	8,39
36	8,604	8,329	8,58	8,62
48	7,812	8,452	8,68	8,47
72	7,558	7,831	8,23	7,85

### C.3 Data Perhitungan *Growth Yield*

Waktu (Jam)	A1B1						Rerata	STDEV
	ΔX		ΔS		Y x/s			
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	-0,939	1,790	104,114	146,957	-0,009	0,012	0,002	0,015
24	-0,319	1,743	142,971	189,300	-0,002	0,009	0,003	0,008
36	1,552	2,120	193,285	197,769	0,008	0,011	0,009	0,002
48	-0,024	2,113	218,691	265,518	0,000	0,008	0,004	0,006
72	0,077	1,504	222,676	269,503	0,000	0,006	0,003	0,004

Waktu (Jam)	A2B1						Rerata	STDEV
	ΔX		ΔS		Y x/s			
	1	2	1	2	u1	u2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	-0,063	0,436	152,934	103,118	0,000	0,004	0,002	0,003
24	0,081	0,421	186,311	137,491	0,000	0,003	0,002	0,002
36	-0,564	1,539	219,687	172,860	-0,003	0,009	0,003	0,008
48	-0,342	1,561	236,625	182,325	-0,001	0,009	0,004	0,007
72	-0,413	0,390	266,016	212,215	-0,002	0,002	0,0001	0,002

A1B2								
Waktu (Jam)	$\Delta X$		$\Delta S$		Y x/s		Rerata	STDEV
	1	2	1	2	u1	u2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,068	0,544	6,975	73,229	0,010	0,007	0,009	0,002
24	0,506	0,477	77,713	143,967	0,007	0,003	0,005	0,002
36	0,753	0,903	178,839	183,820	0,004	0,005	0,005	0,000
48	0,856	0,993	211,717	208,728	0,004	0,005	0,004	0,001
72	0,506	0,699	275,979	224,170	0,002	0,003	0,002	0,001

A2B2								
Waktu (Jam)	$\Delta X$		$\Delta S$		Y x/s		Rerata	STDEV
	1	2	1	2	u1	u2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	-0,166	0,706	17,373	17,869	-0,010	0,040	0,015	0,035
24	0,804	0,557	158,344	159,337	0,005	0,003	0,004	0,001
36	1,000	0,817	232,801	210,960	0,004	0,004	0,004	0,000
48	0,848	0,662	243,225	230,815	0,003	0,003	0,003	0,000
72	0,587	-0,308	251,663	248,188	0,002	-0,001	0,001	0,003

Contoh perhitungan *growth yield* sampel A1B1 ulangan 1 lama fermentasi 36 jam :

$$\text{Growth yield (Y x/s)} = \Delta X / \Delta S$$

$$\text{Ulangan 1 : Populasi yeast jam ke 0 (X}_1\text{)} = 6,863 \text{ log cfu/ml}$$

$$\text{Populasi yeast jam ke 36 (X}_2\text{)} = 8,415 \text{ log cfu/ml}$$

$$\text{Gula reduksi jam ke 0 (S}_1\text{)} = 285,593 \text{ g/L}$$

$$\text{Gula reduksi jam ke 36 (S}_2\text{)} = 92,308 \text{ g/L}$$

$$Y \text{ x/s} = \frac{X_2 - X_1}{S_1 - S_2} = \frac{8,415 - 6,863}{285,593 - 92,308} = 0,008 \text{ log cfu/ml/g/L}$$



**Lampiran D****Parameter : Jumlah etanol****D.1 Nilai Absorbansi Etanol dan Kurva Standart**

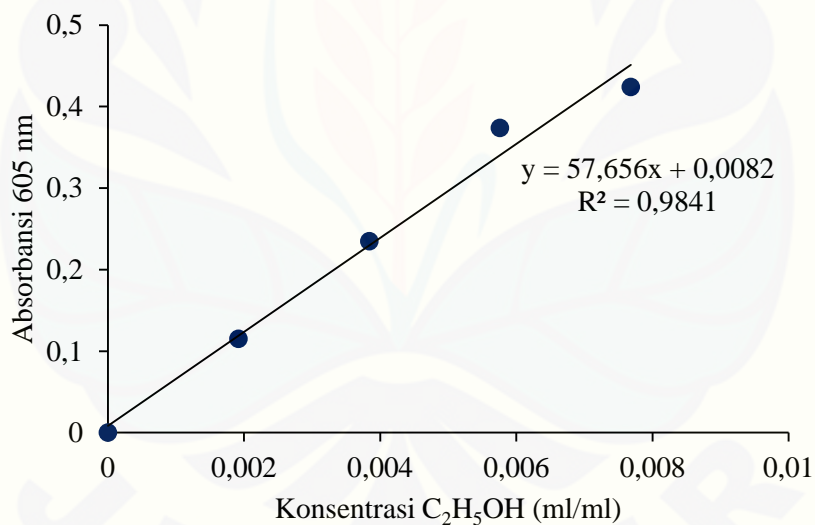
Sebanyak 1 ml Etanol 96% (v/v) ditera menjadi 100 ml :

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2 \rightarrow 1 \text{ ml} \times 96\% = 100 \times M_2 \rightarrow M_2 = 0,96\%$$

Selanjutnya dari etanol 0,96% (v/v) diambil :

Ethanol 0,96% (ml)	Aquadest (ml)	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (ml/ml)	Absorbansi
0	1	0	0
0,2	0,8	0,00192	0,115
0,4	0,6	0,00384	0,235
0,6	0,4	0,00576	0,374
0,8	0,2	0,00768	0,424

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2 \rightarrow 0,2 \times 0,96\% = 1 \times M_2 \rightarrow M_2 = 0,192\% = 0,00192 \text{ ml/ml}$$

**Kurva Standart Etanol**

- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (ml/ml)  $x = \frac{y-0,0082}{57,656}$
- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (g/ml)  $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \text{BJ etanol}$
- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (g/ml)  $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{1000 \text{ ml}}{L}$

Keterangan :

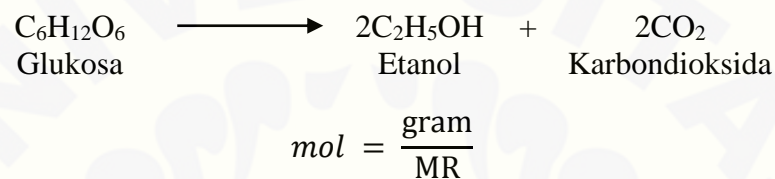
- Sebelum dilakukan analisa, sampel 0,5 ml ditera dengan aquades hingga 10 ml

$$\frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = \frac{1}{20} \text{ Faktor pengenceran} = 20 \text{ kali}$$

- $y$  = Absorbansi sampel; Volume pengambilan = 1 ml; Berat jenis etanol = 0,789 g/mL;

### Perhitungan jumlah etanol teoritis

1 mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol :



MR  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  = 180; MR  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  = 46, sehingga 1 mol glukosa mampu menghasilkan 2 mol etanol atau 180g glukosa mampu menghasilkan 92 g etanol atau 1 g glukosa mampu menghasilkan 0,5111g etanol.

- $\text{Yield (Yp/s)} = \frac{\text{jumlah etanol yang dihasilkan } (\Delta P)}{\text{gula reduksi yang dikonsumsi } (\Delta S)}$
- $\text{Produktivitas etanol} = \frac{\text{etanol yang dihasilkan}}{\text{waktu fermentasi}}$
- $\text{Efisiensi fermentasi} = \frac{\text{etanol yang dihasilkan}}{\text{etanol teoritis}} \times 100\%$

**D.2 Data Jumlah etanol dan Produktivitas etanol Selama Fermentasi**

Waktu (jam)	Absorbansi A1B1		Volume Etanol (ml/L)		Etanol (g/L)		Rerata	STDEV	Produktivitas g/L Jam		Rerata	STDEV
	u1	u2	u1	u2	u1	u2			u1	u2		
12	0,148	0,146	2,425	2,390	38,262	37,715	37,988	0,039	3,189	3,143	3,166	0,032
24	0,261	0,176	4,385	2,910	69,189	45,926	57,557	1,645	2,883	1,914	2,398	0,685
36	0,309	0,265	5,217	4,454	82,327	70,284	76,305	0,852	2,287	1,952	2,120	0,237
48	0,273	0,291	4,593	4,905	72,474	77,400	74,937	0,348	1,510	1,613	1,561	0,073
72	0,228	0,239	3,812	4,003	60,158	63,168	61,663	0,213	0,836	0,877	0,856	0,030

Waktu (jam)	Absorbansi A2B1		Volume Etanol (ml/L)		Etanol (g/L)		Rerata	STDEV	Produktivitas g/L Jam		Rerata	STDEV
	u1	u2	u1	u2	u1	u2			u1	u2		
12	0,206	0,196	3,431	3,257	54,136	51,399	52,768	0,194	4,511	4,283	4,397	0,161
24	0,236	0,214	3,951	3,569	62,347	56,326	59,336	0,426	2,598	2,347	2,472	0,177
36	0,330	0,233	5,581	3,899	88,074	61,526	74,800	1,877	2,447	1,709	2,078	0,521
48	0,326	0,236	5,512	3,951	86,979	62,347	74,663	1,742	1,812	1,299	1,555	0,363
72	0,241	0,233	4,038	3,899	63,716	61,526	62,621	0,155	0,885	0,855	0,870	0,022

Waktu (jam)	Absorbansi A1B2		Volume Etanol (ml/L)		Etanol (g/L)		Rerata	STDEV	Produktivitas g/L Jam		Rerata	STDEV
	u1	u2	u1	u2	u1	u2			u1	u2		
12	0,151	0,142	2,477	2,321	39,083	36,620	37,852	0,174	3,257	3,052	3,154	0,145
24	0,250	0,225	4,194	3,760	66,179	59,336	62,758	0,484	2,757	2,472	2,615	0,202
36	0,361	0,353	6,119	5,980	96,559	94,369	95,464	0,155	2,682	2,621	2,652	0,043
48	0,373	0,348	6,327	5,894	99,843	93,001	96,422	0,484	2,080	1,938	2,009	0,101
72	0,353	0,346	5,980	5,859	94,369	92,453	93,411	0,135	1,311	1,284	1,297	0,019

Waktu (jam)	Absorbansi A2B2		Volume Etanol (ml/L)		Etanol (g/L)		Rerata	STDEV	Produktivitas g/L Jam		Rerata	STDEV
	u1	u2	u1	u2	u1	u2			u1	u2		
12	0,094	0,211	1,488	3,517	23,483	55,505	39,494	2,264	1,957	4,625	3,291	1,887
24	0,198	0,237	3,292	3,968	51,947	62,621	57,284	0,755	2,164	2,609	2,387	0,314
36	0,274	0,288	4,610	4,853	72,747	76,579	74,663	0,271	2,021	2,127	2,074	0,075
48	0,299	0,360	5,044	6,102	79,590	96,285	87,937	1,181	1,658	2,006	1,832	0,246
72	0,318	0,283	5,373	4,766	84,790	75,211	80,000	0,677	1,178	1,045	1,111	0,094

**Contoh perhitungan jumlah etanol fermentasi 12 jam sampel A1B1:**

Ulangan 1

- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (ml/ml) =  $\frac{y-0,0082}{57,656}$
- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (g/ml) =  $\frac{y-0,0082}{57,656} \times BJ\ Ethanol$
- Etanol (g/L) = Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (g/ml)  $\times \frac{1000\ mL}{1\ L} \times Faktor\ Pengenceran$
- Produktivitas (g/L/jam) = Etanol (g/L) / Lama fermentasi
- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (ml/ml) =  $\frac{0,148-0,0082}{57,656} = 0,00242$
- Konsentrasi C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (g/ml) = 0,00242  $\times 0,789 = 0,0019\ g/ml$
- Etanol (g/L) = 0,0019  $\times \frac{1000\ mL}{1\ L} \times 20 = 38,262\ g/L$
- Produktivitas = 38,262 / 12 jam = 3,1885 g/L/jam



**D.3 Data Perhitungan Yield Etanol dan Efisiensi Fermentasi**

## A1B1

Waktu (jam)	$\Delta S$ (g/L)		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi (%)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2			1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	104,114	146,957	0,368	0,257	0,312	0,078	71,904	50,213	61,059	0,153
24	142,971	189,300	0,484	0,243	0,363	0,171	94,686	47,468	71,077	0,334
36	193,285	197,769	0,426	0,355	0,391	0,050	83,337	69,534	76,435	0,098
48	218,691	265,518	0,331	0,292	0,311	0,028	64,840	57,035	60,938	0,055
72	222,676	269,503	0,270	0,234	0,252	0,025	52,858	45,859	49,359	0,049

## A2B1

Waktu (jam)	$\Delta S$ (g/L)		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi (%)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2			1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	152,934	103,118	0,354	0,498	0,426	0,102	69,259	97,525	83,392	0,200
24	186,311	137,491	0,335	0,410	0,372	0,053	65,475	80,154	72,814	0,104
36	219,687	172,860	0,401	0,356	0,378	0,032	78,440	69,640	74,040	0,062
48	236,625	182,325	0,368	0,342	0,355	0,018	71,920	66,906	69,413	0,035
72	266,016	212,215	0,240	0,290	0,265	0,036	46,863	56,725	51,794	0,070

## A1B2

Waktu (jam)	$\Delta S$ (g/L)		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi (%)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2			1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	6,975	73,229	5,604	0,500	3,052	3,609	1096,382	97,843	597,112	7,061
24	77,713	143,967	0,852	0,412	0,632	0,311	166,617	80,640	123,629	0,608
36	178,839	183,820	0,540	0,513	0,527	0,019	105,639	100,446	103,042	0,037
48	211,717	208,728	0,472	0,446	0,459	0,018	92,269	87,177	89,723	0,036
72	275,979	224,170	0,342	0,412	0,377	0,050	66,903	80,693	73,798	0,098

## A2B2

Waktu (jam)	$\Delta S$ (g/L)		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi (%)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2			1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	17,373	17,869	1,352	3,106	2,229	1,241	264,458	607,739	436,099	2,427
24	158,344	159,337	0,328	0,393	0,361	0,046	64,187	76,895	70,541	0,090
36	232,801	210,960	0,312	0,363	0,338	0,036	61,140	71,024	66,082	0,070
48	243,225	230,815	0,327	0,417	0,372	0,064	64,024	81,619	72,821	0,124
72	251,663	248,188	0,337	0,303	0,320	0,024	65,920	59,292	62,606	0,047

**Contoh perhitungan kinetika fermentasi sampel A1B1 selama 36 jam fermentasi:****Ulangan 1:**

- $Yield (Y_p/s) = \frac{\text{jumlah etanol yang dihasilkan } (\Delta P)}{\text{gula reduksi yang dikonsumsi } (\Delta S)}$
- $Efisiensi\ fermentasi = \frac{\text{yield etanol yang dihasilkan (g/L)}}{\text{yield etanol teoritis (g/L)}} \times 100\%$

Gula reduksi jam ke 0 ( $S_1$ ) = 285,593 g/L

Gula reduksi jam ke 36 ( $S_2$ ) = 92,308 g/L

Jumlah etanol selama 36 jam fermentasi = 82,327 g/L

- $Yield (Y_p/s) = \frac{82,327}{285,593 - 92,308} = 0,426 \text{ g etanol/g glukosa}$
- $Efisiensi\ fermentasi = \frac{0,426}{0,511} \times 100\% = 83,34\%$

**E. Kinetika Fermentasi Bioetanol dari Molases dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi Menggunakan Starter Komersial**

Lama fermentasi (Jam) (A1B1)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi (%)
0	6,67±0,10	0,000±0,000	308,509±0,324	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	7,19±1,27	0,002±0,015	182,973±0,021	125,536±0,303	10,461±2,524	64,161±0,155	37,988±0,004	3,166±0,032	0,312±0,078	61,059±0,153
24	7,48±0,94	0,003±0,008	142,373±0,004	166,135±0,328	6,922±1,365	84,912±0,167	57,557±0,165	2,398±0,685	0,363±0,171	71,077±0,333
36	8,60±0,19	0,009±0,002	112,982±0,292	195,527±0,031	5,431±0,088	99,934±0,016	76,305±0,085	2,120±0,237	0,391±0,050	76,435±0,097
48	7,81±0,97	0,004±0,006	66,404±0,007	242,104±0,331	5,044±0,690	123,739±0,169	74,937±0,035	1,561±0,073	0,311±0,028	60,938±0,055
72	7,56±0,62	0,003±0,004	62,419±0,007	246,089±0,331	3,418±0,460	125,776±0,169	61,663±0,021	0,856±0,030	0,252±0,025	49,359±0,049
Lama fermentasi (Jam) (A2B1)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi (%)
0	7,84±0,80	0,000±0,000	310,003±0,359	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	8,03±0,55	0,002±0,003	181,977±0,007	128,026±0,352	10,669±2,935	65,434±0,180	52,768±0,019	4,397±0,161	0,426±0,102	83,392±0,199
24	8,09±0,63	0,002±0,002	148,102±0,014	161,901±0,345	6,746±1,438	82,748±0,176	59,336±0,043	2,472±0,177	0,372±0,053	72,814±0,104
36	8,33±0,25	0,003±0,008	113,729±0,028	196,274±0,331	5,452±0,920	100,316±0,169	74,800±0,188	2,078±0,521	0,378±0,032	74,040±0,062
48	8,45±0,15	0,004±0,007	100,528±0,025	209,475±0,384	4,364±0,800	107,063±0,196	74,663±0,174	1,555±0,363	0,355±0,018	69,413±0,035
72	7,83±0,40	0,0001±0,002	70,888±0,021	239,115±0,380	3,321±0,528	122,212±0,194	62,621±0,015	0,870±0,022	0,265±0,036	51,794±0,035
Lama fermentasi (Jam) (A1B2)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi (%)
0	7,75±0,03	0,000±0,000	304,772±0,638	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	8,06±0,26	0,009±0,002	264,671±1,106	40,102±0,468	3,342±3,904	20,496±0,239	37,852±0,017	3,154±0,145	3,052±3,609	597,112±7,061
24	8,24±0,01	0,005±0,002	193,932±1,106	110,840±0,468	4,618±1,952	56,650±0,239	62,758±0,048	2,615±0,202	0,632±0,311	123,629±0,608
36	8,58±0,10	0,005±0,000	123,443±0,673	181,329±0,035	5,037±0,098	92,677±0,018	95,464±0,015	2,652±0,043	0,527±0,019	103,042±0,037
48	8,68±0,10	0,004±0,001	94,550±0,616	210,222±0,021	4,380±0,044	107,445±0,010	96,422±0,048	2,009±0,101	0,459±0,018	89,723±0,036
72	8,23±0,12	0,002±0,001	54,698±0,271	250,075±0,366	3,473±0,509	127,813±0,187	93,411±0,014	1,297±0,019	0,377±0,050	73,798±0,098
Lama fermentasi (Jam) (A2B2)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi (%)
0	7,71±0,07	0,000±0,000	304,179±0,172	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
12	7,98±0,51	0,015±0,035	286,558±0,175	17,621±0,003	1,468±0,029	9,006±0,002	39,494±0,226	3,291±1,887	2,229±1,241	436,099±2,427
24	8,39±0,05	0,004±0,001	145,339±0,179	158,840±0,007	6,618±0,029	81,183±0,004	57,284±0,075	2,387±0,314	0,361±0,046	70,541±0,089
36	8,62±0,02	0,004±0,000	82,299±0,018	221,880±0,154	6,163±0,429	113,403±0,079	74,663±0,027	2,074±0,075	0,338±0,036	66,082±0,069
48	8,47±0,02	0,003±0,000	67,160±0,084	237,020±0,088	4,938±0,183	121,141±0,045	87,937±0,118	1,832±0,246	0,372±0,064	72,821±0,124
72	7,85±0,38	0,001±0,003	54,254±0,147	249,926±0,025	3,471±0,034	127,737±0,013	80,000±0,068	1,111±0,094	0,320±0,024	62,606±0,047

Sampel dengan Lama fermentasi 36 jam	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	$\Delta S$ (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi (%)
A1B1	8,60±0,19	0,009±0,002	112,982±0,292	195,527±0,031	5,431±0,088	99,934±0,016	76,305±0,085	2,120±0,237	0,391±0,050	76,435±0,097
A2B1	8,33±0,25	0,003±0,008	113,729±0,028	196,274±0,331	5,452±0,920	100,316±0,169	74,800±0,188	2,078±0,521	0,378±0,032	74,040±0,062
A1B2	8,58±0,10	0,005±0,000	123,443±0,673	181,329±0,035	5,037±0,098	92,677±0,018	95,464±0,015	2,652±0,043	0,527±0,019	103,042±0,037
A2B2	8,62±0,02	0,004±0,000	82,299±0,018	221,880±0,154	6,163±0,429	113,403±0,079	74,663±0,027	2,074±0,075	0,338±0,036	66,082±0,069

Lampiran F

F.1 Uji T Jumlah etanol Yang Dihasilkan Oleh Yeast A1 Dan A2 Dengan Kondisi Tanpa Pemberian Aerasi Dan Agitasi Pada Media Molases

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	stdev A1	stdev A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S <sup>2</sup>	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	kesimpulan
12	3,799	5,277	0,039	0,194	0,001	0,037	25,000	161,450	0,019	0,010	0,010	-151,771	4,303	beda
24	5,756	5,934	1,645	0,426	2,706	0,181	14,928	161,450	1,444	0,722	0,722	-0,246	4,303	tdk beda
36	7,631	7,480	0,852	1,877	0,725	3,524	4,860	161,450	2,125	1,062	1,062	0,142	4,303	tdk beda
48	7,494	7,466	0,348	1,742	0,121	3,034	25,000	161,450	1,578	0,789	0,789	0,035	4,303	tdk beda
72	6,166	6,262	0,213	0,155	0,045	0,024	1,891	161,450	0,035	0,017	0,017	-5,530	4,303	BEDA

F.2 Uji T Jumlah etanol Tanpa Dan Dengan Pemberian Aerasi 0,3 Vvm Dan Agitasi 100 Rpm Yang Dihasilkan Oleh Yeast A1 Dan A2 Pada Media Molases

Waktu	Rerata An	Rerata Ae	stdev A1	stdev A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S <sup>2</sup>	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	kesimpulan
24	5,756	6,276	1,645	0,484	2,706	0,234	11,560	161,450	1,470	0,735	0,735	-0,707	4,303	tdk beda
36	7,631	9,546	0,852	0,155	0,725	0,024	30,250	161,450	0,375	0,187	0,187	-10,230	4,303	BEDA
48	7,494	9,642	0,348	0,484	0,121	0,234	1,929	161,450	0,178	0,089	0,089	-24,179	4,303	BEDA
72	6,166	9,341	0,213	0,135	0,045	0,018	2,469	161,450	0,032	0,016	0,016	-199,451	4,303	BEDA
	7,631	9,642	0,852	0,484	0,725	0,234	3,098	161,450	0,480	0,240	0,240	-8,389	4,303	BEDA

Waktu	Rerata An	Rerata Ae	stdev A1	stdev A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S <sup>2</sup>	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	kesimpulan
12	5,277	3,949	0,194	2,264	0,037	5,127	136,890	161,450	2,582	1,291	1,291	1,028	4,303	tdk beda
24	5,934	5,728	0,426	0,755	0,181	0,570	3,143	161,450	0,375	0,188	0,188	1,093	4,303	tdk beda
36	7,480	7,466	1,877	0,271	3,524	0,073	48,005	161,450	1,799	0,899	0,899	0,015	4,303	tdk beda
48	7,466	8,794	1,742	1,181	3,034	1,394	2,177	161,450	2,214	1,107	1,107	-1,199	4,303	tdk beda
72	6,262	8,000	0,155	0,677	0,024	0,459	19,141	161,450	0,241	0,121	0,121	-14,400	4,303	beda
	7,480	8,794	1,877	1,181	3,524	1,394	2,529	161,450	2,459	1,229	1,229	-1,069	4,303	tdk beda



**F.3 Uji T Populasi Yeast A1 Dan A2 Dengan Kondisi Tanpa Pemberian Aerasi Dan Agitasi Pada Media Molases**

waktu	Rerata A1	Rerata A2	stdev A1	stdev A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S <sup>2</sup>	S	S x <sub>1.x2</sub>	T hitung	T tabel	kesimpulan
24	7,48	8,09	0,935	0,631	0,875	0,398	2,198	161,450	0,637	0,798	0,798	-0,769	4,303	tdk beda
36	8,60	8,33	0,189	0,250	0,036	0,063	1,759	161,450	0,049	0,222	0,222	1,237	4,303	tdk beda
48	7,81	8,45	0,973	0,151	0,947	0,023	41,810	161,450	0,485	0,696	0,696	-0,918	4,303	tdk beda
72	7,56	7,83	0,618	0,400	0,382	0,160	2,395	161,450	0,271	0,521	0,521	-0,525	4,303	tdk beda
	8,60	8,45	0,189	0,151	0,036	0,023	1,572	161,450	0,029	0,171	0,171	0,891	4,303	tdk beda

**F.4 Uji T Populasi Yeast A1 Dan A2 Tanpa Dan Dengan Pemberian Aerasi 0,3 Vvm Dan Agitasi 100 Rpm Selama Fermentasi Bioetanol**

waktu	Rerata An	Rerata Ae	stdev A1	stdev A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S <sup>2</sup>	S	S x <sub>1.x2</sub>	T hitung	T tabel	kesimpulan
24	7,48	8,24	0,935	0,012	0,875	0,000	5680,344	161,450	0,438	0,662	0,662	-1,154	4,303	beda
36	8,60	8,58	0,189	0,102	0,036	0,010	3,419	161,450	0,023	0,152	0,152	0,162	4,303	tidak beda
48	7,81	8,68	0,973	0,096	0,947	0,009	103,782	161,450	0,478	0,691	0,691	-1,248	4,303	tidak beda
72	7,56	8,23	0,618	0,123	0,382	0,015	25,130	161,450	0,199	0,446	0,446	-1,509	4,303	tidak beda
	8,60	8,68	0,189	0,096	0,036	0,009	3,902	161,450	0,022	0,150	0,150	-0,479	4,303	tidak beda

waktu	Rerata A1	Rerata A2	stdev A1	stdev A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S <sup>2</sup>	S	S x <sub>1.x2</sub>	T hitung	T tabel	kesimpulan
24	8,09	8,39	0,631	0,052	0,398	0,003	0,007	161,450	0,200	0,448	0,448	-0,673	4,303	tdk beda
36	8,33	8,62	0,250	0,021	0,063	0,000	146,264	161,450	0,032	0,178	0,178	-1,651	4,303	tidak beda
48	8,45	8,47	0,151	0,022	0,023	0,000	46,377	161,450	0,012	0,108	0,108	-0,165	4,303	tidak beda
72	7,83	7,85	0,400	0,377	0,160	0,142	0,889	161,450	0,151	0,388	0,388	-0,059	4,303	tidak beda
	8,45	8,62	0,151	0,021	0,023	0,000	52,890	161,450	0,012	0,107	0,107	-1,594	4,303	tidak beda