



**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN RAGI ROTI INSTAN
DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN AERASI
PADA MEDIA MOLASES**

SKRIPSI

Oleh

**Sabrina Arindhani
NIM 101710101061**

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



**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN RAGI ROTI INSTAN
DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN AERASI
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

**Sabrina Arindhani
NIM 101710101061**

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, puji syukur atas segala rahmat, hidayah serta Inayah-Nya;
2. Ibunda Agus Riani Dwiana dan Ayahanda Hadiri tercinta, adik-adikku tersayang, Dwi Puspitarini dan Putri Mauidhotul Hasanah, serta keluarga dan kerabat yang telah senantiasa mendoakan, memberi semangat, serta kasih sayang, serta dukungan selama ini;
3. Pembimbing dan penyalur ilmuku, guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.
(terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)

Verily, along with every hardship is relief.
(English translation of the meaning of Al-Qur'an, Surah Al Inshirah: 5-6)

Our greatest weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just one more time.
(Thomas A. Edison)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sabrina Arindhani

NIM : 101710101061

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Produksi Bioetanol Menggunakan Ragi Roti Instan dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi 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, 25 Mei 2015

Yang menyatakan,

Sabrina Arindhani

NIM 101710101061

SKRIPSI

**PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN RAGI ROTI
INSTAN DENGAN DAN TANPA PEMBERIAN AERASI
PADA MEDIA MOLASES**

Oleh

Sabrina Arindhani
NIM 101710101061

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Jayus

Dosen Pembimbing Anggota : Miftahul Choiron, S.TP, M.Sc.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Produksi Bioetanol Menggunakan Ragi Roti Instan dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases” karya Sabrina Arindhani NIM. 101710101061 telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 25 Mei 2015

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota,

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

Dr. Puspita Sari, S.TP., M.Ph.
NIP 197203011998022001

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Produksi Bioetanol Menggunakan Ragi Roti Instan dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases; Sabrina Arindhani; 101710101061; 2015; 74 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Produksi bioetanol dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada media molases telah banyak dilakukan namun hasil yang didapatkan masih belum optimal. Salah satu upaya optimasi produksi bioetanol dapat dilakukan melalui pemilihan strain unggul dan optimasi kondisi fermentasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian aerasi 0,3 vvm selama fermentasi terhadap produksi bioetanol oleh ragi roti instan *Forise Instant Yeast* dan *New Aule Instant Dry Yeast* pada media molases.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan variasi penggunaan jenis ragi (*Forise Instant Yeast* dan *New Aule Instant Dry Yeast*) dan kondisi fermentasi (dengan dan tanpa pemberian aerasi 0,3 vvm). Proses fermentasi dilakukan secara batch selama 72 jam dengan pengamatan terhadap media fermentasi dilakukan setiap 12 jam. Data hasil penelitian diolah dengan statistik sederhana seperti rerata, standart deviasi, dan uji T. Hasil penelitian menunjukkan bahwa masing-masing ragi menunjukkan perbedaan aktivitas yang tidak signifikan dalam pertumbuhan populasi yeast, konsumsi gula reduksi, dan produksi bioetanol selama fermentasi. Secara umum dapat diketahui bahwa terdapat hubungan berbalik nilai antara jumlah populasi yeast, konsumsi gula reduksi, dan konsentrasi etanol. Ketika terjadi peningkatan jumlah populasi dan konsentrasi etanol, maka akan diikuti oleh penurunan kadar gula reduksi. Hal ini dikarenakan adanya ketersediaan gula dalam substrat selain digunakan untuk tumbuh dan berkembang biak oleh yeast juga untuk mengkonversi gula menjadi etanol. Oleh karena itu, adanya konsumsi gula selama fermentasi

mengakibatkan terjadinya penurunan kadar gula reduksi dan peningkatan konsentrasi etanol.

Jumlah populasi maksimum *Forise Instant Yeast* pada kondisi tanpa pemberian aerasi tidak berbeda jika dibandingkan dengan pemberian aerasi, yaitu berturut-turut sebesar 8,40 log cfu/ml dan 8,49 log cfu/ml. Sedangkan jumlah populasi maksimum *New Aule Instant Dry Yeast* pada kondisi tanpa pemberian aerasi menunjukkan perbedaan jika dibandingkan dengan pemberian aerasi, yaitu berturut-turut sebesar 8,13 log cfu/ml dan 8,50 log cfu/ml. Konsumsi gula reduksi masing-masing yeast pada kondisi fermentasi yang berbeda selama 36 jam fermentasi berkisar antara 237,582-267,937 g/L. Konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan oleh *Forise Instant Yeast* dan *New Aule Instant Dry Yeast* dengan kondisi tanpa pemberian aerasi 0,3 vvm pada 36 jam fermentasi berturut-turut sebesar 100,253 g/L dan 102,854 g/L. Pemberian aerasi 0,3 vvm selama fermentasi mampu meningkatkan konsentrasi etanol dan menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan. Konsentrasi etanol maksimum melalui pemberian aerasi 0,3 vvm dihasilkan oleh *New Aule Instant Dry Yeast* dengan konsentrasi etanol sebesar 120,917 g/L, serta produktivitas dan yield etanol secara berturut-turut sebesar 3,359 g/L/jam dan 0,669 g/g pada 36 jam fermentasi.

SUMMARY

Bioethanol Production by Commercial Baker's Yeast With and Without Aeration using Sugarcane Molasses as The Media; Sabrina Arindhani; 101710101061; 2015; 74 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* on molasses media have been done in many researches, but optimal results are not obtained yet. Optimization in bioethanol production can be done through the selection of superior strains and fermentation conditions. The purpose of this research is to determine the effect of aeration 0,3 vvm during fermentation of bioethanol production by *Forise Instant Yeast* and *New Aule Instant Dry Yeast* on molasses media.

This research was conducted by using variation of instant baker's yeasts (*Forise Instant Yeast* and *New Aule Instant Dry Yeast*) and fermentation conditions (with and without addition of aeration 0,3 vvm). The fermentation is conducted in batch condition for 72 hours with the observation of fermentation media every 12 hours. The data was analyzed by basic statistics such as mean, standard deviation, and T test. The results showed that each yeast showed no significant differences in activity of yeast population growth, reducing sugar consumption, and biethanol production during fermentation. Generally, it can be seen that there is an inversely proportional relationship between yeast population growth, reducing sugar consumption, and ethanol concentration. The increasing in number of yeast population growth and ethanol concentration will be followed with the decreasing of reducing sugars concentration. This is happened because the availability of sugar in the substrate is used by yeast to grow and multiply and also to convert sugars to ethanol. Therefore, the consumption of sugars during fermentation resulted in decreased levels of reducing sugars and increased levels of ethanol.

The maximum population number of Forise Instant Yeast showed no significant difference between with and without aeration addition, which amounted to 8,40 log cfu/ml and 8,49 log cfu/ml, respectively. While the maximum population number of New Aule Instant Dry Yeast showed significant difference between two fermentation conditions, which amounted to 8,13 log cfu/ml and 8,50 log cfu/ml, respectively. Reducing sugar consumption at 36 hours of fermentation of each yeast under different fermentation conditions ranges from 237,582 to 267,937 g/L. The maximum ethanol concentration produced by Forise Instant Yeast and New Aule Instant Dry Yeast without addition of 0,3 vvm aeration at 36 hours of fermentation consecutively amounted to 100,253 g/L and 102,854 g/L. Addition of 0,3 vvm aeration can increase the ethanol concentration and showed significant difference in ethanol concentration produced. The maximum ethanol concentration with addition of 0,3 vvm aeration produced by New Aule Instant Dry Yeast with ethanol concentration amounted to 120,917 g/L, ethanol productivity and ethanol yield consecutively amounted to 3,359 g/L/h and 0,669 g/g at 36 hours fermentation.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Produksi Bioetanol Menggunakan Ragi Roti Instan dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi 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 terima kasih 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;
3. Dr. Ir. Jayus, selaku Dosen Pembimbing Utama dan pemilik proyek penelitian, yang telah memberikan bimbingan serta arahan selama penulisan skripsi;
4. Miftahul Choiron, S.TP., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu dan pikiran guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi kemajuan penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi;
5. Dr. Charoen Charoenchai, selaku dosen pembimbing selama pelaksanaan penelitian di *Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand* yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat melaksanakan penelitian serta atas segala bantuan dan pengarahan selama penelitian;
6. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. dan Dr. Puspita Sari, S.TP. M.Ph., selaku tim penguji, atas saran dan evaluasi demi perbaikan penulisan skripsi;
7. Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P, selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang telah meluangkan waktu dan perhatian dalam bentuk nasihat dan teguran yang sangat berarti selama kegiatan bimbingan akademik;

8. Seluruh karyawan dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, dan Laboratorium Analisa Terpadu Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
9. Ibunda Agus Riani Dwiana, Ayahanda Hadiri, adik-adikku Pipit dan Putri, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa dan dorongan demi terselesaikannya skripsi ini;
10. *My dearest best friends-sisters, AC* (Cita, Dwi, Mega, dan Rina); *BUGZ* (Mimi, Nova, Tari), Anin, Shela, Mbak Dina, Ela, Puji, dan Mas Zulman; *for the endless love, support, and time you share with me through the good and bad in my life*;
11. *My beautiful-amazing IW (Onndhee, Kak Yuan, Kak Nisa, Kak Fani, Kak Lia, Jenex Eonni, Maiza Eonni, Cici Molen, Ranni, Heidi, and Goldie; for the love, support, and coloring my life into such beautiful color that i have never imagine although we live far from each other*;
12. Teman-teman seperjuangan dalam suka maupun duka, Ayu May, Dyah, Anis, Laili, Ara, Iga, Intan, Lia, Astriani; *thanks a lot for everything lovelies*.
13. Teman-teman Jurusan Teknologi Hasil Pertanian angkatan 2010 yang telah memberikan dukungan, semangat, serta doa dan persahabatan;
14. 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, 25 Mei 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	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Sifat-Sifat dan Kegunaan Bioetanol	5
2.2 Karakteristik dan Pemanfaatan Molases	6
2.3 Karakteristik dan Aplikasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pada Produksi Bioetanol	9
2.4 Mekanisme dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi Bioetanol	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	18

3.2 Bahan dan Alat Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	19
3.3.1 Rancangan Percobaan	19
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	19
3.4 Parameter Pengamatan	22
3.5 Prosedur Analisis	22
3.5.1 Populasi Mikroba	22
3.5.2 Kadar Gula Reduksi	23
3.5.3 Derajat Keasaman/ pH	23
3.5.4 Konsentrasi etanol	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Profil Fermentasi Bioetanol oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi Pada Media Molases	26
4.1.1 Profil Fermentasi Bioetanol Tanpa Pemberian Aerasi	26
4.1.2 Profil Fermentasi Bioetanol dengan Pemberian Aerasi	30
4.2 Kinetika Fermentasi Bioetanol oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi pada Media Molases .	33
4.2.1 Laju Konsumsi Gula Reduksi	33
4.2.2 <i>Growth Rate</i>	35
4.2.3 <i>Growth Yield</i>	37
4.2.4 Produktivitas Etanol	38
4.2.5 Yield Etanol	40
4.2.6 Efisiensi Fermentasi	43
BAB 5. PENUTUP	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN DATA	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi rata-rata molases	7
2.2 Kandungan vitamin di dalam molases	8
2.3 Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan tetes menjadi bioetanol	9
4.1 Laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases.....	34
4.2 <i>Growth rate</i> yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases	36
4.3 <i>Growth yield</i> (Y x/s) yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases	38
4.4 Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases	39
4.5 Yield etanol (Y p/s) oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases	41
4.6 Efisiensi fermentasi oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur molekul etanol	5
2.2 <i>Instant yeast, active dry yeast, dan fresh yeast</i>	12
3.1 Rancangan percobaan produksi bioetanol	19
3.2 Diagram alir persiapan media fermentasi	20
3.3 Diagram alir pembuatan starter	21
3.4 Diagram alir produksi bioetanol	22
4.1 Hubungan peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml) dan konsentrasi etanol (g/L) dengan penurunan kadar gula reduksi (g/L) selama fermentasi oleh yeast A1 dan A2 tanpa pemberian aerasi pada media molases	28
4.2 Perubahan pH media molases oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi tanpa pemberian aerasi	30
4.3 Hubungan peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml) dan konsentrasi etanol (g/L) dengan penurunan kadar gula reduksi (g/L) selama fermentasi oleh yeast A1 dan A2 dengan pemberian aerasi pada media molases	32
4.4 Perubahan pH media molases oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi dengan pemberian aerasi	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Data Pengukuran pH	54
B. Data Pengukuran Kadar Brix	55
C. Data Populasi Pertumbuhan Yeast	56
D. Data Perhitungan <i>Growth Rate</i>	57
E. Data Perhitungan <i>Growth Yield</i>	58
F. Kadar Gula Reduksi	60
1. Nilai Absorbansi Glukosa dan Kurva Standar	60
2. Data Kadar Gula Reduksi Selama Fermentasi	62
3. Data Laju Konsumsi Gula Reduksi Selama Fermentasi	64
G. Konsentrasi etanol	65
1. Nilai Absorbansi Glukosa dan Kurva Standar	65
2. Data Konsentrasi etanol dan Produktivitas Etanol	67
3. Data Perhitungan Yield Etanol dan Efisiensi Fermentasi	68
H. Data Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast	71
1. Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A1 dan A2 Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases	71
2. Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A1 dan A2 dengan Pemberian Aerasi Pada Media Molases.....	71
3. Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A1 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases	72
4. Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases	72
I. Data Uji Tkonsentrasi etanol	73
1. Uji T Konsentrasi etanol Yeast A1 dan A2 Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases	73
2. Uji T Konsentrasi etanol Yeast A1 dan A2 dengan Pemberian Aerasi Pada Media Molases.....	73
3. Uji T Konsentrasi etanol Yeast A1 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases	74
4. Uji T Konsentrasi etanol Yeast A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases	74

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bahan bakar fosil merupakan sumber energi utama dunia. Kebutuhan energi yang berasal dari bahan bakar fosil terdiri dari batubara, minyak, minyak bumi dan produk gas alam semakin meningkat dari tahun ke tahun. Berdasarkan data dari *International Annual Energy Outlook* (2013), disebutkan bahwa total konsumsi energi dunia tahun 2005-2014 meningkat dari 995,1 juta barel per hari menjadi 1.186,2 juta barel per hari. Konsumsi bahan bakar fosil pada tahun 2011 mencapai hampir 82% dari total konsumsi energi dunia yang merupakan kebutuhan energi primer dunia yang sudah berlangsung selama 25 tahun dan diperkirakan masih akan tetap dominan hingga tahun 2035 (*World Data Bank* dan Dewan Energi Nasional, 2014). Hal ini pun sebanding dengan yang terjadi di Indonesia, pada tahun 2013 tercatat kebutuhan bahan bakar fosil berupa bahan bakar minyak (BBM) di Indonesia sebesar 77,72 juta kilo liter, namun hanya sekitar setengah saja yang dapat terpenuhi, sehingga kekurangan harus dipenuhi dengan melakukan impor sebanyak 31,68 juta kilo liter (Nurrohim, 2014). Bahan bakar fosil merupakan bahan bakar yang tidak terbarukan, sumber daya yang terbatas dan dapat memberikan dampak negatif bagi lingkungan karena emisi gas yang dihasilkan. Oleh karena itu, untuk mengurangi ketergantungan akan bahan bakar fosil dan memenuhi kebutuhan dalam maupun luar negeri yang semakin meningkat, penelitian dan pengembangan dalam mencari dan meningkatkan produksi energi alternatif terus dilakukan. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat diproduksi adalah bioetanol.

Bioetanol diproduksi melalui fermentasi anaerob dari bahan baku yang mengandung gula dalam cairan dengan bantuan khamir dan dapat menghasilkan alkohol *food grade* dengan konsentrasi etanol hingga 14% (Gandia *et.al*, 2013). Bioetanol dapat digunakan untuk kebutuhan dalam bidang pangan maupun industri, namun saat ini lebih diutamakan untuk dimanfaatkan sebagai bahan bakar alternatif, dimana sekitar tiga perempat dari bioetanol yang diproduksi di dunia dimanfaatkan sebagai bahan bakar (Doppbenberg dan Aar, 2007).

Berdasarkan data dari *World Fuel Ethanol Outlook to 2020*, dinyatakan bahwa produksi etanol dunia pada tahun 2011 mencapai 83.417 juta liter, sedangkan untuk konsumsi etanol dunia masih lebih rendah, yaitu pada 80.780 juta liter (*International Sugar Organization*, 2012). Kelebihan utama dari menggunakan bioetanol sebagai bahan bakar adalah karena kandungan bilangan oktannya yang tinggi sehingga dapat menghasilkan efisiensi tinggi terhadap waktu dan mesin bakar. Begitu pula dengan kemampuan bioetanol yang dapat mengurangi emisi gas karbondioksida, hidrokarbon, dan karbonmonoksida, serta sifat bioetanol yang ramah lingkungan. Beberapa hal penting masih harus diperhatikan agar dapat dihasilkan bioetanol dengan kualitas serta kuantitas yang tinggi, meliputi pemilihan jenis substrat dan mikroorganisme, serta kondisi fermentasi yang digunakan.

Pada umumnya, substrat yang digunakan dalam produksi bioetanol berasal dari pati, gula, alga, dan lain-lain. Substrat yang paling sering digunakan untuk produksi bioetanol tidak lain yang berasal dari pati atau gula, tetapi substrat yang sudah dalam bentuk gula sederhana merupakan substrat yang paling baik digunakan karena telah siap untuk difermentasi. Molases merupakan salah satu substrat yang mengandung gula dan umum digunakan dalam produksi bioetanol sebab harganya yang terjangkau dan lebih murah jika dibandingkan dengan substrat lainnya. Molases merupakan residu dari pengolahan gula tebu yang memiliki kandungan gula yang tinggi, terutama sukrosa (32%), fruktosa (16%), dan glukosa (14%). Molases biasanya digunakan sebagai bahan baku untuk produksi asam sitrat, dekstran dan alkohol (Olbrich, 1963).

Mikroorganisme memiliki peran penting dalam produksi bioetanol karena mikroorganisme yang akan mengubah gula pada substrat menjadi etanol. Beberapa mikroorganisme yang digunakan dalam produksi bioetanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces fragilis*. Mikroorganisme yang paling banyak digunakan dalam produksi bioetanol berasal dari khamir, yaitu *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan etanol dengan kadar yang tinggi hingga 18%, selain itu mikroba ini dapat tumbuh baik pada jenis gula sederhana

maupun disakarida. *Saccharomyces cerevisiae* juga telah masuk ke dalam daftar *Generally Recognized as Safe* (GRAS) sebagai bahan tambahan pangan untuk konsumsi manusia (Lin dan Tanaka., 2006). Saat ini, telah banyak ragi yang dijual di pasaran dan dapat dikategorikan dalam beberapa kelompok seperti, berdasarkan tipenya (ragi roti, wine, bir, bioetanol), berdasarkan aplikasinya (untuk roti, minuman beralkohol, minuman non-alkohol), dan berdasarkan bentuknya (instan, kering, alami). Masing-masing jenis ragi yang digunakan nantinya akan memberikan hasil yang berbeda karena memiliki komposisi yang berbeda meskipun jenis strain yeast yang digunakan sama. Begitu pula dengan kondisi saat fermentasi, ada tidaknya aerasi serta agitasi dapat memberikan pengaruh pada lama waktu fermentasi yang dibutuhkan serta konsentrasi etanol yang dihasilkan.

Berdasarkan fenomena tersebut, penelitian mengenai produksi bioetanol dari molases dengan menggunakan ragi roti instan dalam kondisi fermentasi yang berbeda dilakukan sebagai upaya oprtimasi produksi bioetanol agar dapat dihasilkan konsentrasi etanol yang lebih optimal. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dan prospek ke depannya sangat baik, serta dapat lebih dikembangkan mengingat produksi gula di Indonesia juga akan selalu berkembang, sehingga produksi bioetanol akan terus berjalan.

1.2 Rumusan Masalah

Produksi bioetanol dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada media molases telah banyak dilakukan namun hasil yang didapatkan masih belum optimal. Salah satu upaya optimasi produksi bioetanol dapat dilakukan melalui pemilihan strain unggul yang toleran terhadap konsentrasi gula, asam, serta etanol yang tinggi (Sheela *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2008; Elena *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Mukhtar *et al.*, 2010; Thammasittirong *et al.*, 2013). Mukhtar *et al.* (2010) dalam penelitiaannya melaporkan bahwa produksi bioetanol pada media molases dengan menggunakan ragi roti komersial (Saf-Instan) menghasilkan konsentrasi etanol maksimum sebesar 8,8% (v/v) dengan hasil samping yang lebih rendah jika dibandingkan dengan ragi alkohol komersial Etanol red (mutan) yang

hanya mencapai 8%(v/v). Selain pemilihan strain, kondisi selama proses fermentasi pun juga dapat berpengaruh terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan.

Salah satu kondisi fermentasi yang dapat berpengaruh terhadap produksi bioetanol adalah penggunaan aerasi dan agitasi. Penelitian mengenai optimasi penggunaan aerasi dan agitasi pun sudah banyak dilakukan (Yan *et al.*, 2009; Shah, 2010; Khongsay *et al.*, 2012). Shah (2010) dalam penelitiannya melaporkan bahwa penggunaan aerasi yang optimum pada produksi bioetanol dapat berkisar antara 0,1-0,3 vvm dengan konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan sebesar 9,68%. Menurut Khongsay *et al.*, (2012), produktivitas bioetanol yang optimum dapat tercapai dengan menggunakan kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm karena dengan penggunaan kecepatan agitasi 300 rpm terjadi penurunan produktivitas bioetanol. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dikaji pengaruh dari penggunaan ragi roti instan dan kondisi fermentasi yang berbeda (dengan dan tanpa pemberian aerasi yang diikuti oleh pemberian agitasi terkontrol) terhadap aktivitas masing-masing ragi roti instan dan konsentrasi etanol yang dihasilkan selama fermentasi pada media molases.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian aerasi 0,3 vvm selama fermentasi terhadap produksi bioetanol oleh ragi roti instan *Forise Instant Yeast* dan *New Aule Instant Dry Yeast* pada media molases.

1.4 Manfaat Penelitian

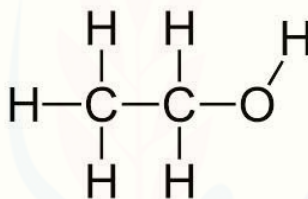
Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat diantaranya, yaitu :

1. Meningkatkan nilai tambah molases sebagai residu dari proses pengolahan gula tebu.
2. Meningkatkan penggunaan ragi roti instan sebagai starter alternatif dalam produksi bioetanol.
3. Menambah teknik/metode alternatif bagi industri dalam memproduksi bioetanol.
4. Meningkatkan produksi bioetanol sebagai salah satu sumber energi alternatif.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat-sifat dan Kegunaan Bioetanol

Etanol (etil alkohol) adalah anggota dari senyawa organik yang secara umum diberi nama alkohol. Etanol memiliki rumus molekul C_2H_5OH seperti yang tertera pada Gambar 2.1. Etanol adalah cairan yang bening, tidak berwarna, serta memiliki aroma yang khas. Etanol dalam larutan yang encer (konsentrasi rendah) seperti memiliki rasa yang manis, tetapi jika berada dalam larutan pekat memiliki rasa terbakar. Etanol mencair pada suhu $-114,1^{\circ}C$; mendidih pada suhu $78,5^{\circ}C$; dan memiliki densitas $0,789 \text{ g/mL}$ pada suhu $20^{\circ}C$. Titik beku etanol yang rendah membuatnya berguna sebagai cairan dalam termometer dengan suhu dibawah $-40^{\circ}C$, titik beku dari merkuri, dan untuk hal-hal yang memiliki suhu rendah, seperti antibeku pada radiator mobil (*automobile*) (Shakhashiri, 2009).



Gambar 2.1 Struktur molekul etanol (Walker, 2010).

Sifat-sifat fisika dan kimia yang dimiliki etanol berhubungan dengan gugus hidroksil (-OH) dan alkil (-R) yang terdapat pada etanol. Adanya gugus hidroksil dapat mempengaruhi kelarutan dan titik didih etanol di dalam air. Etanol memiliki gugus alkil yang pendek, maka kelarutannya di dalam air akan semakin tinggi dan berdampak pada titik didihnya yang semakin rendah, jika dibandingkan dengan butanol, propanol, dan alkohol lain dengan gugus alkil yang lebih banyak (Amarasekara, 2013). Sedangkan reaksi kimia yang dapat terjadi pada etanol meliputi dehidrasi, dehidrogenasi, oksidasi, dan esterifikasi (Setiadji, 2009).

Etanol dapat dibagi menjadi dua golongan berdasarkan pada cara produksi dan komposisinya. Etanol yang digolongkan berdasarkan cara produksi adalah etanol yang diproduksi baik dengan menggunakan proses fermentasi atau sintetis. Produksi etanol dengan menggunakan bahan baku yang terdiri atas pati, gula, dan

selulosa merupakan *renewable ethanol* atau etanol yang dapat diperbaharui. Produksi etanol melalui proses sintesis adalah etanol yang diproduksi secara sintesis dari etilen. Etilen merupakan turunan dari batubara, gas atau minyak yang diproduksi dari skala industri. Produksi dengan proses sintesis dapat menghasilkan etanol dengan kadar 190 proof atau 95% etil alkohol murni dan dikategorikan sebagai *non-renewable ethanol* atau etanol yang tidak dapat diperbaharui. Berdasarkan komposisinya, etanol dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu etanol anhidrat yang memiliki kemurnian 99° dan dapat digunakan dalam campuran bahan bakar, sedangkan etanol hidrat memiliki kemurnian 96° dan dapat digunakan 100% sebagai pengganti bahan bakar (Berg, 2013).

Bioetanol digolongkan sebagai bahan bakar ramah lingkungan untuk kendaraan yang biasanya menggunakan bensin sebagai bahan bakarnya. Etanol sebagai sumber energi terbarukan, mengurangi kebutuhan dalam konsumsi bahan bakar fosil, selain itu membakar mesin lebih bersih dan mengurangi emisi gas karbondioksida. Bioetanol sebagai sumber energi merupakan karbon netral yang dapat mengurangi hingga 70% jumlah gas rumah kaca (CO₂) yang dilepaskan ke atmosfer. Menurut data dari *Agricultural Outlook* (2013), produksi etanol diperkirakan akan meningkat 67% selama sepuluh tahun ke depan (2013-2022) dengan produksi biodiesel yang meningkat lebih cepat, tetapi dari basis yang lebih kecil. Selain itu, Brazil, Argentina, Indonesia, Malaysia, dan Thailand akan menjadi eksportir penting dari etanol atau biodiesel. Berdasarkan data statistik selama tahun 2013-2014, produksi etanol dunia berada pada 113.853,8 dan 124.630,7 juta liter, sedangkan konsumsi etanol dunia berada pada 113.664,4 dan 124.107,3 juta liter.

2.2 Karakteristik dan Pemanfaatan Molases

Molases dikenal sebagai hasil samping dari proses pembuatan gula tebu atau refinasi sukrosa dari tebu. Molases secara spesifik mengacu pada limbah akhir yang diperoleh dari hasil produksi gula sukrosa melalui proses evaporasi berulang, kristalisasi dan sentrifugasi dari nira tebu (Curtin, 1983). Komposisi molases yang tepat sulit untuk diprediksi karena dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti

varietas dan kematangan tebu, iklim dan kondisi tanah, serta kondisi saat proses pengolahan di pabrik. Komposisi molases yang dapat diketahui hanya berupa kisaran angka seperti yang terdapat pada Tabel 2.1. Kandungan bahan kering molases umumnya sebanyak 74-79%, namun pada analisis dibawah ini berdasar pada kandungan bahan kering sebesar 75% (Zabrockis dan Coviello, 2009).

Tabel 2.1 Komposisi rata-rata molases

Komponen	Rentang
Total gula	46-52%
Sukrosa	30-40%
Gula reduksi	15-20%
Gula tak terfermentasi	2-4%
Bahan organik bukan gula	9-12%
Nitrogen sebagai protein (6,25 * N)	2-3%
Abu	8-11%
Sodium (Na)	0,1-0,4%
Potassium (K)	1,5-4,0%
Kalsium (Ca)	0,4-0,8%
Fosfor (P)	0,6-2,0%
Klorid (Cl)	0,7-3,0%

Sumber : Schuumans dan Van Ginneken dalam Zabrockis dan Coviello, 2009.

Selain mengandung bermacam-macam gula dan mineral, molases juga mengandung beberapa vitamin yang diketahui dapat menstimulasi aktivitas mikroba. Adapun kandungan vitamin yang terdapat dalam molases dapat dilihat pada Tabel 2.2. Selain itu, molases juga memiliki pH yang bervariasi karena dipengaruhi oleh proses ekstraksi pengolahan gula yang dilakukan masing-masing pabrik, namun pH molases diketahui berkisar antara 5,5-6,5. Berbagai macam mikroorganisme juga dapat ditemukan di dalam molases, seperti *E. coli*, *Leuconostoc mesenteroids*, *Bacillus sp*, *Pseudomonas*, dan lain-lain. Kehadiran mikroorganisme tersebut akan memberikan efek negatif selama proses fermentasi karena dapat mempengaruhi yield dan produktivitas fermentasi (Kristiansen *et al.*, 2002).

Tabel 2.2 Kandungan vitamin di dalam molases

Vitamin	Kandungan (mg/100 g)
Tiamin	0,16
Riboflavin	0,30
Piridoksin	1,15
Asam nikotinat	2,10
Asam pantetonat	3,60
Asam folat	0,06
Biotin	0,13
Inositol	158,0

Sumber : Smirnow dalam Kristiansen *et al.*, 2002.

Selain itu, molases secara umum dapat dimanfaatkan sebagai sumber pakan ternak atau biomassa untuk fermentasi etanol, asam glutamat, asam laktat, asam sitrat, dan sebagainya. Molases saat ini secara luas telah digunakan sebagai media untuk fermentasi etanol karena harganya yang murah, siap tersedia, dan hanya membutuhkan sedikit *pretreatment* jika dibandingkan dengan bahan-bahan lain. Beberapa negara seperti India, Thailand, Brazil, Indonesia, dan lain-lain, banyak dijumpai pabrik-pabrik produksi gula, sehingga hasil samping seperti molases juga banyak dihasilkan. Melalui pemanfaatan molases sebagai media fermentasi pada akhirnya dapat meningkatkan nilai tambah dari molases (Takara *et al.*, 2007).

Molases yang diproduksi oleh industri gula terbagi menjadi dua macam, seperti *black strap molasses* merupakan residu dari kristalisasi nira tebu dan memiliki kandungan gula sebesar 50-60% dan *light test molasses* merupakan residu dari evaporasi nira tebu dan memiliki kandungan gula yang lebih rendah. Jenis molases yang biasanya digunakan sebagai media fermentasi adalah *black strap molasses* karena masih memiliki kandungan gula yang tinggi (Yusma, 1999). Selain itu, menggunakan molases dalam produksi etanol memberikan keuntungan tersendiri sebab keuntungan yang dapat dicapai adalah hingga sebesar 24%; rasio antara molases sebagai bahan baku (media) yang diperlukan dan bioetanol sebagai hasilnya memiliki rasio yang terendah jika dibandingkan dengan bahan lain (Nurdyastuti, 2008). Konversi mengenai bahan baku tanaman yang dapat dikonversi menjadi bioetanol secara rinci dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan tetes menjadi bioetanol

Bahan Baku (/1000kg)	Kandungan Gula dalam Bahan Baku (kg)	Jumlah Hasil Konversi dalam bentuk Bioetanol (l)	Perbandingan Bahan Baku dan Bioetanol
Ubi Kayu	250-300	166,6	6,5 : 1
Ubi Jalar	150-200	125	8 : 1
Jagung	600-700	200	5 : 1
Sagu	120-160	90	12 : 1
Tetes tebu	500	250	4 : 1

Sumber : Nurdyastuti, 2008.

2.3 Karakteristik dan Aplikasi *Saccharomyces cerevisiae* Pada Produksi Bioetanol

Saccharomyces cerevisiae adalah khamir yang dapat hidup dalam bentuk sel tunggal atau sebagai pseudomiselia. Sel-sel berkembang biak melalui pembentukan tunas secara multilateral. *Saccharomyces cerevisiae* dapat dibedakan dengan khamir lainnya berdasarkan pada karakteristik pertumbuhannya dan sifat-sifat fisiologis yang prinsipnya mengarah pada kemampuan dalam memfermentasi gula-gula sederhana. Mikroorganisme jenis ini telah lama dimanfaatkan untuk memfermentasi gula-gula pada beras, gandum, dan jagung untuk memproduksi minuman beralkohol dan pada industri roti untuk mengembangkan adonan. Selain itu, juga sering digunakan sebagai suplemen vitamin karena mengandung 50% protein dan kaya akan sumber vitamin B, niasin dan asam folat (Schneiter, 2004).

Pada skala laboratorium, sel *Saccharomyces cerevisiae* biasanya disimpan dalam bentuk haploid. Sel-sel tersebut toleran akan kondisi dingin dan dapat disimpan beku pada suhu -70°C . Waktu generasi bervariasi bergantung pada media dan suhu, tetapi secara umum berkisar antara 2-4 jam (Forsburg, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* beradaptasi dengan baik untuk tumbuh pada suhu tinggi daripada jenis *Saccharomyces* yang lain, dengan suhu optimum tertinggi $32,3^{\circ}\text{C}$ dan maksimum pada $45,4^{\circ}\text{C}$. Selain itu, *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh lebih cepat dibanding dengan jenis lainnya, tetapi menunjukkan berkurangnya kecepatan pertumbuhan pada suhu rendah, adapun batas suhu terendah yang dapat

digunakan *Saccharomyces cerevisiae* agar tumbuh lebih cepat dari yang lain adalah pada suhu 24°C (Salvadó, 2011). Secara umum, *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme asidofilik, maka dari itu, tumbuh lebih cepat dibawah kondisi asam. Khamir membutuhkan pH optimum agar dapat tumbuh dengan baik, pH yang dapat digunakan juga bervariasi dari pH 4-6, bergantung pada suhu, adanya oksigen dan jenis strain (Narendranath dan Power, 2005). Menurut Thomas *et al.*, (2002), umumnya, sel eukariotik mempertahankan pH intraseluler dalam kisaran yang kecil, namun variasi dapat terjadi pada pH ekstraseluler. Pada kondisi fermentasi, pH intraseluler dari *Saccharomyces cerevisiae* biasanya dipertahankan antara pH 5,5 dan 5,75 ketika pH eksternal adalah pH 3,0 atau antara pH 5,9 dan 6,75 ketika pH eksternal bervariasi antara pH 6,0 dan 10,0. Berdasarkan penelitian tersebut, pH optimum pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah pH 4,5.

Saccharomyces cerevisiae memiliki peran penting dalam penelitian terapan karena kemampuannya yang luar biasa dalam memproduksi etanol dan karbondioksida dari gula sederhana dengan produktivitas dan hasil yang tinggi. *Saccharomyces cerevisiae* relatif toleran terhadap pH rendah dan konsentrasi gula dan etanol yang tinggi, dengan karakteristik seperti ini dapat menurunkan resiko kontaminasi selama fermentasi. Terlebih lagi, khamir ini tahan terhadap inhibitor yang ada dalam biomassa dan mampu tumbuh dalam kondisi anaerob. Hal ini telah menjadi alasan utama untuk meningkatkan eksplorasi *Saccharomyces cerevisiae* di industri bioteknologi dengan fokus pada fermentasi dari produksi zat-zat biokimia, misalnya, gliserol, propanediol, asam organik, gula alkohol, L-gliserol-3-fosfat (L-G3P), steroid, dan isoprenoid (Nevoigt, 2008).

Saccharomyces cerevisiae merupakan salah satu “produsen” etanol yang terkenal (Yingling *et al.*, 2010; Laopaiboon dan Laopaiboon, 2011; Izmirlioglu dan Demirci, 2012). Telah banyak penelitian mengenai seleksi strain dari *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi bioetanol dengan molases sebagai substratnya dengan tujuan untuk memperoleh strain terbaik yang toleran terhadap konsentrasi etanol, gula, asam, dan tekanan osmotik yang tinggi namun tetap memiliki produktivitas etanol yang tinggi pula. Basso *et al.*, (2008) menyatakan

hanya tiga dari 24 strain yang menunjukkan kemampuan yang luar biasa dalam bersaing dengan khamir indigenous selama fermentasi dalam skala industri. Tiga strain tersebut adalah *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, CAT-1 dan BG-1, strain-strain terpilih ini dapat mengurangi biaya produksi etanol tidak hanya dengan meningkatkan yield etanol atau memudahkan proses fermentasi, tetapi juga dengan mengurangi penggunaan antifoam. Namun, pada konsentrasi 40%, tidak ada strain yang dapat digunakan dalam skala ini karena strain tersebut tidak dapat bertahan selama fermentasi akibat adanya kombinasi dari flokulasi, pembentukan buih, pembentukan gliserol, dan residu gula yang tinggi, sehingga dibutuhkan lebih banyak biaya untuk mengatasi masalah tersebut.

Penelitian lain oleh Elena *et al.*, (2009), bertujuan untuk mengevaluasi beberapa strain berbeda yang digunakan dalam produksi bioetanol dengan menggunakan molases menunjukkan bahwa lima strain yang digunakan, yaitu strain Safdistil C-70, Ethanol RedTM, Fali^R, Trockenhefe, dan Pakmaya masih memungkinkan dalam memproduksi bioetanol secara efisien. Produktivitas etanol yang paling maksimum diperoleh dengan menggunakan strain Safdistil C-70 setelah 36 jam fermentasi dengan etanol sebesar 2,33 g/L jam. Pada penelitian lain dengan menggunakan metode *very high gravity* (VHG) yang teroptimasi dengan media yang mengandung 280–350 g glukosa/L dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan fermentasi dari tiga strain yang berasal dari laboratorium dan delapan industrial strain yang berada di Brazil. Hasil yang didapat yaitu hanya tiga strain yang mampu menunjukkan kemampuan fermentasi terbaik. Adapun tiga strain tersebut adalah strain PE-2 dan CA 1185 yang merupakan industrial strain dan strain CEN.PK 113-7D yang merupakan strain yang berasal dari laboratorium. Strain PE-2 dan CA 1185 memproduksi etanol dengan kadar lebih dari 19% (v/v) dengan produktivitas mencapai 2,5 g/L jam, sedangkan strain CEN.PK 113-7D9 memproduksi etanol dengan kadar lebih dari 17,5% (v/v), dengan produktivitas mencapai 1,7 g/L jam (Pereira *et al.*, 2010).

Semenjak penemuan Pasteur pada tahun 1859 mengenai *wild yeast*, perkembangan mengenai pembuatan ragi roti komersial semakin berkembang. Saat ini ragi roti komersial yang berada di pasaran tersedia dalam tiga macam

bentuk, yaitu *fresh yeast*, *active dry yeast*, dan *instant yeast*. *Fresh yeast* merupakan yeast yang terdiri dari sekitar 70% air dan dijual dalam bentuk *yeast cream* atau blok, serta berwarna sedikit lebih gelap dari jenis ragi komersial lainnya. Ragi segar memiliki umur simpan yang paling pendek dibanding ragi lainnya, sekitar dua minggu pada penyimpanan suhu refrigerasi (Calvel *et al.*, 2001; Mushet *et al.*, 2008).

Active dry yeast atau ragi kering aktif merupakan jenis ragi yang diperoleh dari proses pengeringan ragi segar pada suhu rendah. Ragi jenis ini berbentuk butiran kecil dengan kadar kelembaban hanya 7%, sehingga memiliki umur simpan yang lebih lama sekitar dua tahun. Sebelum digunakan, ragi ini harus diaktifkan terlebih dahulu dengan cara direhidrasi atau dilarutkan dengan menggunakan air hangat sekitar 38°C bersama dengan tambahan sedikit gula dan didiamkan selama 15-20 menit sebelum siap untuk digunakan. *Instant yeast* atau ragi instan dengan kadar kelembaban 4% dapat secara langsung digunakan tanpa perlu direhidrasi terlebih dahulu. Adapun saran mengenai dosis pemakaian yang dianjurkan adalah setiap 100% *fresh yeast* (10 ons/284 gram) setara dengan 40% *active dry yeast* (4 ons/113 gram) dan 33% *instant yeast* (3,5 ons/94 gram) (Calvel *et al.*, 2001 dan Charles dan Kastel, 2010). Macam-macam bentuk dari tiap jenis ragi dapat dilihat pada Gambar 2.2.

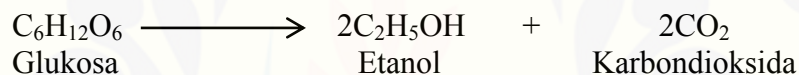


Gambar 2.2 *Fresh yeast*, *active dry yeast* dan *instant yeast* (dari kiri ke kanan) (Gisslen, 2012).

2.4 Mekanisme Fermentasi Bioetanol dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhinya

Fermentasi secara luas didefinisikan sebagai sebuah proses dimana mikroorganisme menghasilkan perubahan kimia dalam substrat yang digunakan melalui kemampuan dari enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut.

Mikroorganisme yang diinginkan akan memecah gula-gula yang ada dan membentuk senyawa-senyawa kimia seperti asam laktat dan asetat serta etanol (Hui *et al.*, 2004). Proses fermentasi yang sedang banyak dilakukan saat ini adalah fermentasi etanol. Fermentasi etanol akan menghasilkan etanol sebagai produk akhir dari proses fermentasi yang banyak dikenal sebagai sumber baru dari *biofuel*. Menurut Amerine *et al.*, (dalam Xueying, 2011), fermentasi etanol merupakan perubahan satu mol glukosa menjadi dua mol etanol dan dua mol karbondioksida. Khamir yang digunakan dalam fermentasi akan mengubah glukosa dan fruktosa menjadi asam piruvat melalui tahapan reaksi dari jalur Embden-Meyerhof-Parnas, dengan demikian asam piruvat yang terbentuk akan didekarboksilasi menjadi asetaldehid yang kemudian didehidrogenasi menjadi etanol. Reaksi pembentukan etanol dari glukosa berlangsung sesuai persamaan berikut :



Bermacam-macam bahan baku yang digunakan dalam produksi bioetanol dapat diklasifikasikan dalam tiga jenis, yaitu bahan baku yang mengandung gula, bahan berpati, dan selulosa. Bahan baku yang mengandung gula (gula tebu, gula bit, molases) dapat secara langsung dikonversi menjadi etanol. Bahan berpati (jagung, singkong, dan kentang) masih harus dihidrolisis menjadi gula sederhana melalui bantuan enzim dari kapang. Bahan berselulosa (kayu, residu pertanian, dan limbah sulfat cair) juga harus diubah terlebih dahulu menjadi gula sederhana melalui bantuan asam-asam mineral. Setelah gula-gula sederhana telah terbentuk, maka fermentasi baru dapat dilakukan dan akan dihasilkan etanol sebagai produk akhir (Lin dan Tanaka, 2006).

Sementara itu, mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi bioetanol bervariasi pula, contohnya *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichoderma reesei*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces fragilis*, dan lain-lain (Dien *et al.*, 2003). Mikroorganisme yang sering digunakan dalam fermentasi bioetanol adalah *Saccharomyces cerevisiae* karena memiliki produktivitas yang tinggi, toleransi yang tinggi terhadap alkohol

(12-18% v/v), dan resisten terhadap konsentrasi gula yang tinggi serta masih tetap aktif selama fermentasi pada temperatur 4-32°C (Amerine *et al.*, dalam Xueying, 2011).

Beberapa faktor harus diperhatikan selama fermentasi bioetanol karena dapat mempengaruhi efektifitas dan efisiensi dari produksi bioetanol. Beberapa faktor tersebut adalah temperatur, pH, konsentrasi media, konsentrasi inokulum, nutrisi, ketersediaan oksigen, lama fermentasi serta kondisi lain, seperti pemberian agitasi dan aerasi. Temperatur yang cocok dalam fermentasi merupakan kondisi yang baik untuk pertumbuhan khamir dalam menghasilkan etanol. Secara umum, fermentasi etanol dilakukan pada kisaran temperatur 30-35°C, dimana etanol yang dihasilkan akan memiliki konsentrasi tertinggi (Fauzi, 2009). Produksi bioetanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan temperatur optimum pada suhu 32°C±2 karena pada temperatur yang lebih tinggi, efisiensi dari proses produksi alkohol dapat menurun (Mukhtar, 2010).

Derajat keasaman (pH) merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel mikroba dan produksi etanol. Adapun pH awal pada saat fermentasi diatur antara pH 4,0-4,5. Penggunaan pH di bawah 3 dan di atas 5 akan mengakibatkan pada menurunnya aktivitas fermentasi dan yield etanol. Pengaturan dan pengontrolan pH selama fermentasi ini juga bertujuan untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kontaminasi selama fermentasi berlangsung (Smith, 2007).

Konsentrasi substrat, dalam hal ini yaitu kandungan gula pada media fermentasi berperan sebagai sumber nutrisi bagi khamir. Pada umumnya, industri menggunakan konsentrasi substrat antara 12-20% dengan beberapa alasan, yaitu mengurangi kebutuhan air, menghambat kontaminasi dari mikroorganisme yang rentan terhadap tekanan osmotik tinggi, dan mengurangi biaya destilasi (Satyanarayana *et al.*, 2012). Qureshi *et. al* (2014) menyatakan bahwa dengan menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi akan mengakibatkan plasmolisis dari sel khamir. Pada konsentrasi lebih dari 500 g/L akan menciptakan kondisi toksik bagi pertumbuhan mikroba, sedangkan dengan konsentrasi yang rendah (kurang

dari 3 g/L) akan berpengaruh pada menurunnya produktivitas etanol akibat dari keterbatasan sumber nutrisi.

Konsentrasi inokulum yang digunakan dalam fermentasi dapat mempengaruhi produktivitas produk akhir. Penggunaan konsentrasi inokulum yang tinggi akan meningkatkan produktivitas etanol dan mempersingkat waktu fermentasi, namun dapat mengakibatkan stres pada sel khamir karena adanya persaingan konsumsi substrat (Liu, 2011). Semakin tinggi penambahan konsentrasi inokulum belum tentu akan menghasilkan kadar alkohol yang tinggi. Adapun konsentrasi inokulum yang digunakan umumnya berkisar antara 3-10% dari volume media fermentasi (Satyanarayana *et al.*, 2012).

Mikroba memerlukan asupan nutrisi selama fermentasi, adapun nutrisi yang dibutuhkan terbagi atas nutrisi makro dan mikro. Menurut Bisson (2001), nutrisi makro berperan sebagai suplai dalam pembentukan sel-sel khamir selama pertumbuhan, penyediaan energi utama selama fermentasi, serta menjaga kestabilan sel khamir pada saat fase stasioner. Sedangkan nutrisi mikro dibutuhkan karena berperan sebagai katalis pada reaksi biokimia selama fermentasi. Nutrisi makro yang dibutuhkan terdiri atas unsur C, N, P, dan K. Unsur C (karbon) dapat diperoleh dari substrat yang mengandung gula, seperti sukrosa dan glukosa karena akan digunakan sebagai substrat yang akan dikonversi menjadi etanol oleh khamir. Sedangkan unsur N (nitrogen) dapat diperoleh melalui penambahan urea, dan unsur P (phospor) dan K (kalium) dapat diperoleh melalui penambahan pupuk NPK. Nutrisi mikro meliputi vitamin (tiamin, riboflavin, dan biotin) dan mineral (Mg, Ca, Mn, Zn, Fe, dan Cu).

Lama waktu yang dibutuhkan dalam fermentasi bioetanol sangatlah bervariasi karena bergantung pada jenis substrat, yeast, dan kondisi fermentasi yang digunakan. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa lama waktu fermentasi bioetanol yang optimum adalah sekitar 48-72 jam (Dake *et al.*, (2010); Rubio-Arroyo *et al.*, (2011); Sadik dan Halema (2014). Menurut Satyanarayana *et al.*, (2012), pada saat sel khamir mulai memasuki fase eksponensial, maka akan dihasilkan etanol sebagai metabolit primer. Tahap selanjutnya, yaitu sel khamir mulai memasuki fase stasioner dan kematian, sehingga alkohol yang dihasilkan

menurun. Selain itu, semakin lama fermentasi maka dapat terjadi kemungkinan etanol yang dihasilkan dikonsumsi oleh sel khamir untuk memproduksi asam-asam organik, seperti asam laktat.

Khamir merupakan mikroorganisme yang bersifat anaerob fakultatif. Khamir membutuhkan sedikit oksigen yang nantinya akan digunakan selama fase pertumbuhan, sedangkan dalam keadaan anaerob, khamir akan melakukan fermentasi dengan mengkonversi gula menjadi etanol. Pemberian aerasi selama fermentasi berfungsi untuk mempercepat khamir dalam mengkonsumsi gula dan juga untuk sintesis sterol dan asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting dalam menjaga ketahanan membran sel (Escalante *et.al*, 2012). Selain itu, pemberian aerasi dapat meningkatkan sintesis biomassa saat fase pertumbuhan dan meningkatkan kecepatan fermentasi saat fase stasioner (Rosenfeld, *et.al*, 2002). Adapun ketersediaan oksigen yang dibutuhkan oleh khamir untuk tumbuh yaitu 0,05-0,10 mmHg tekanan oksigen. Namun, ketersediaan oksigen yang berlebihan akan mengakibatkan pada menurunnya produksi etanol (Trust, 2008).

Pemberian agitasi selama fermentasi bertujuan untuk 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 nutrisi yang memiliki kelarutan rendah. Semakin tinggi kecepatan pengadukan, semakin besar kadar oksigen yang terlarut dalam medium dan nutrisi yang terkandung semakin homogen (Machfud, 1988).

Beberapa penelitian mengenai strategi pemberian aerasi dan agitasi dalam produksi bioetanol telah banyak dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan konsentrasi bioetanol yang maksimum. Alfenore *et.al* (2004) dalam penelitiannya menyatakan bahwa produksi bioetanol selama 45 jam dengan penggunaan aerasi 0,2 vvm dan agitasi 400 rpm dapat menghasilkan etanol lebih tinggi (147 g/L) jika dibandingkan dengan produksi bioetanol dalam kondisi mikro-aerasi, yaitu hanya dengan pemberian agitasi 300 rpm (131 g/L). Kemudian, Sang-Eun *et.al* (2010) dalam penelitiannya juga menyatakan bahwa dengan adanya pemberian aerasi dapat meningkatkan produksi bioetanol. Penelitian dilakukan dengan

menggunakan media glukosa sebanyak 100 g/L dengan sistem *fed-batch* dengan kondisi tanpa aerasi dan menggunakan aerasi sebesar 0,33 vvm dan agitasi 200 rpm. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa produksi bioetanol tanpa pemberian aerasi hanya mampu menghasilkan etanol dengan konsentrasi sebesar 120 g/L. Namun, produksi bioetanol dengan pemberian aerasi 0,33 vvm dan agitasi 200 rpm mampu menghasilkan etanol yang lebih tinggi dengan konsentrasi sebesar 143 g/L. Yan *et al.* (2009), dalam penelitiannya menyatakan bahwa dengan pemberian aerasi 4-9 mg/L diikuti dengan agitasi 200 rpm dapat meningkatkan produksi bioetanol selama fermentasi. Konsentrasi etanol dalam kondisi fermentasi statis (tanpa pemberian aerasi dan agitasi) hanya sebesar 75,8 g/L dan dengan pemberian aerasi dan agitasi, meningkat menjadi 143,8 g/L yang tercapai saat fermentasi 54 jam.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

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

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

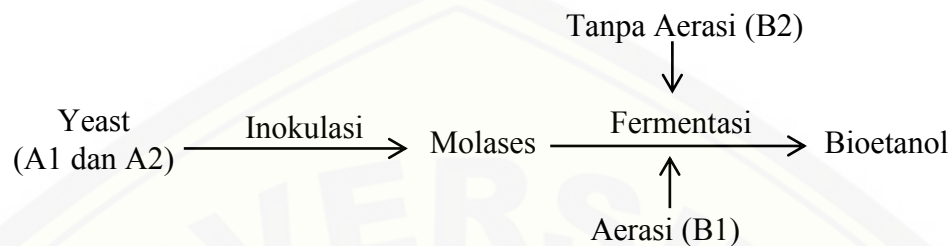
Bahan penelitian yang digunakan meliputi bahan baku, bahan kimia, dan kultur mikroorganisme. Bahan baku berupa molases yang diperoleh dari salah satu pabrik pengolahan gula lokal dari PG. Djatiroto-Lumajang. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah Diammonium Phospat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), asam sitrat, NaOH (PA), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, K-Na Tartarat, larutan Na_2CO_3 , larutan H_2SO_4 (PA), dan reagen *dinitrosalisilic acid* (DNS). Kultur mikroorganisme yang digunakan adalah jenis ragi roti instan yaitu merek *Forise Instant Yeast* dari Guangxi Forise Yeast, Co., Ltd dan *New Aule Instant Dry Yeast* dari Xinjiang Shengli Biotechnology Co., Ltd.

Alat Penelitian yang digunakan yaitu satu set fermentor tipe CSTR (*Continous Stirred Tank Reactor*) *applikon dependable instrument 2L (marine impeller 3 blades)*, *Laminary Air Flow* (LAF) CRUMAiR dan Microtech Model V3, *colony counter* Funke Gerber dan Stuart Scientific, inkubator Heraeus instrument dan Scientific Series 2000, refraktometer ATAGO, oven Scientific Series 2000, spektrofotometer Genesys 10 UV, digital pH meter, dan alat gelas.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan dengan menggunakan variasi penggunaan jenis ragi dan kondisi fermentasi yang dapat dilihat pada Gambar 3.1:



Gambar 3.1 Rancangan percobaan produksi bioetanol

Keterangan :

A1 : *Forise Instant Yeast*

A2 : *New Aule Instant Dry Yeast*

B1 : kondisi fermentasi tanpa pemberian aerasi (non aerasi dan non agitasi)

B2 : kondisi fermentasi dengan pemberian aerasi 0,3 vvm (0,3L/menit) dan diikuti pemberian agitasi 100 rpm.

vvm : volume udara yang dialirkan (L)/volume medium fermentasi (L)/satuan unit waktu (menit)

rpm : kecepatan *impeller* yang digunakan (putaran/menit)

Masing masing perlakuan tersebut diulang sebanyak dua kali. Data hasil 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 (i) persiapan media fermentasi dan starter, dan (ii) produksi bioetanol.

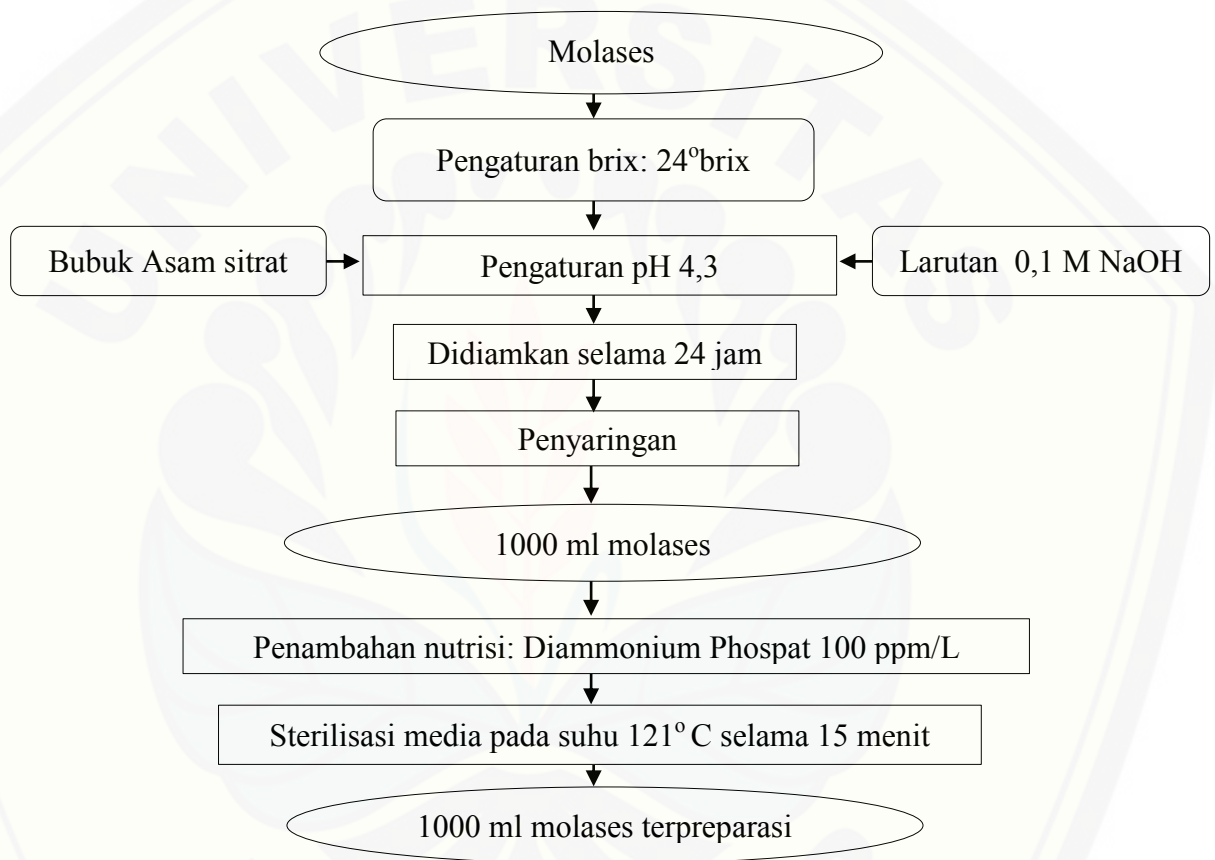
i. Persiapan Media Fermentasi Dan Starter

Media fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah molases. Mikroorganisme yang digunakan adalah ragi roti instan yaitu *Forise Instant Yeast* dan *New Aule Instant Dry Yeast*.

a. Persiapan Media Fermentasi

Molases diperoleh dari limbah industri pengolahan gula tebu di PG. Djatiroto. Molases yang digunakan sebagai medium fermentasi diencerkan hingga kadar brix 24% dan pH molases diatur hingga 4,3 dengan

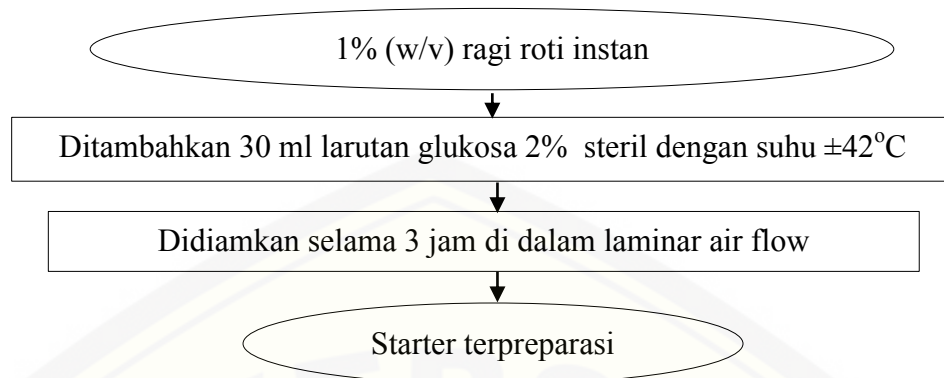
menambahkan bubuk asam sitrat. Selanjutnya, molases didiamkan selama 24 jam untuk menstabilkan pH media yang kemudian dilakukan penyaringan dengan tujuan untuk memisahkan padatan tidak terlarut pada molases. Nutrisi media fermentasi molases diperkaya dengan menambahkan Diammonium Phospat sebanyak 100 ppm/L. Molases yang telah dipreparasi, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. Diagram alir persiapan media fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Diagram alir persiapan media fermentasi

b. Pembuatan starter

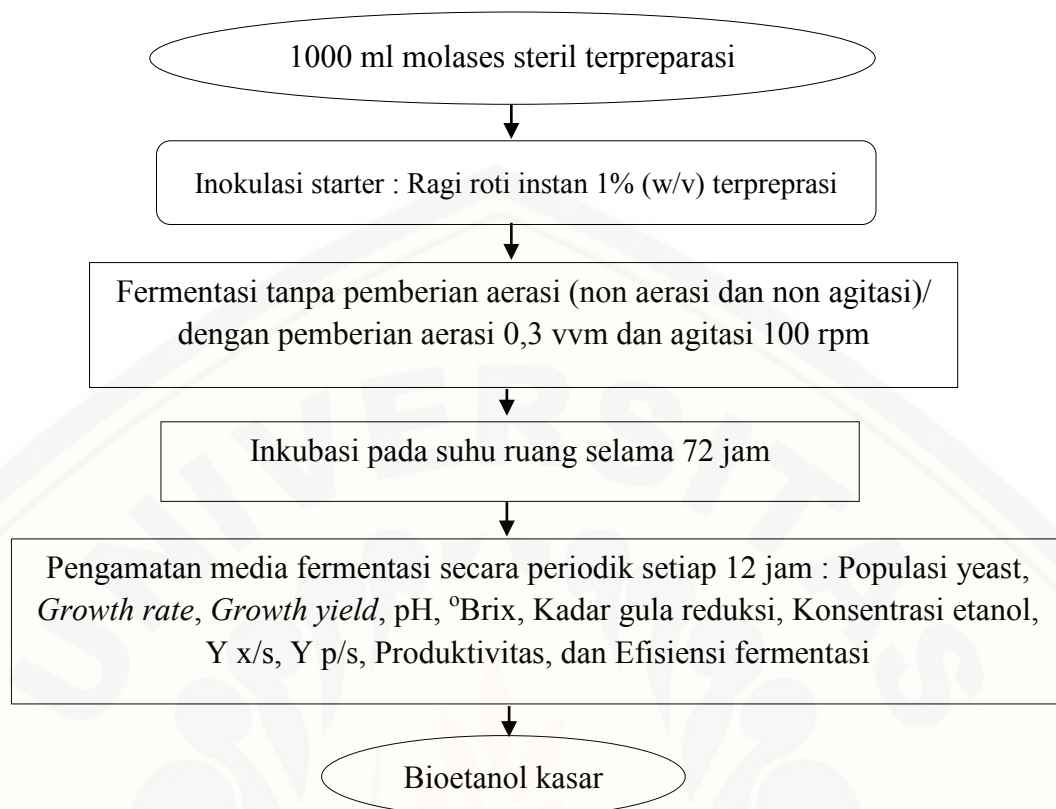
Starter dari ragi roti instan dibuat dengan cara menimbang yeast sebanyak 1% (w/v) dari jumlah media yang digunakan dalam fermentasi, kemudian yeast dicampur dengan 2% larutan glukosa steril pada suhu $\pm 42^{\circ}\text{C}$ dan didiamkan selama 3 jam di dalam *laminar air flow* sebelum digunakan. Diagram alir pembuatan starter dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Diagram alir pembuatan starter

ii. Produksi Bioetanol

Penelitian utama adalah produksi bioetanol dengan fermentasi yang dilakukan secara *batch*. Medium fermentasi terdiri dari 1000 ml molases yang telah dipreparasi dan disterilisasi pada suhu 121° C selama 15 menit. Media fermentasi molases ditempatkan dalam botol sampling 1000 ml dan pada fermentor kapasitas 2L. Setelah dingin media fermentasi diinokulasi dengan ragi roti komersial sebanyak 1% (w/v). Fermentasi dilakukan selama 72 jam pada suhu ruang. Fermentasi yang dilakukan tanpa pemberian aerasi dan agitasi, botol sampling diletakkan di dalam *laminar air flow* selama fermentasi berlangsung. Fermentasi yang dilakukan dengan menggunakan fermentor diberi kecepatan aerasi 0,3 vvm dan diikuti oleh pemberian agitasi terkontrol sebesar 100 rpm. Selama fermentasi, dilakukan pengamatan secara periodik setiap 12 jam. Parameter yang diamati adalah pertumbuhan populasi mikroba, kadar gula reduksi, derajat brix, konsentrasi etanol, dan pH. Diagram alir produksi bioetanol dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Diagram alir produksi bioetanol

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi: parameter mikrobiologi dan kimia. Parameter mikrobiologi berupa perhitungan populasi mikroba metode lempeng agar (Ristiati, 2000). Parameter kimia berupa analisis gula reduksi menggunakan metode DNS (Miller, 1959), konsentrasi etanol dengan menggunakan metode *Chamber Conway* (Kartika *et al.*, 1992), dan derajat keasaman/pH.

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Populasi Mikroba Menggunakan Metode Lempeng Agar

Analisa mengenai populasi mikroba dilakukan dengan menyiapkan beberapa tabung reaksi yang berisi larutan *pepton water* 1% steril sebanyak 9 ml. Kemudian, masing- masing tabung ditambah 1 ml sampel yang akan diperiksa secara bertahap yaitu, satu ml sampel dimasukkan ke dalam tabung pertama, hingga konsentrasi larutan di dalam tabung pertama menjadi 10^{-1} . Kemudian, satu

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 tumbuh pada tiap-tiap cawan dihitung menggunakan alat penghitung koloni (*Colony Counter*) (Ristiati, 2000).

3.5.2 Penentuan Kadar Gula Reduksi Menggunakan Metode DNS

Pembuatan reagen dinitrosalisilic acid (DNS)

Sebanyak 1,76 g NaOH (PA), 2 g DNS, dan 60 g K-Na Tartarat ditambahkan 100 ml akuades dan distirer 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 larutan glukosa dari 0-1 mg/ml dari larutan glukosa standar 0,1% (w/v) = 1 mg/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 standar diperoleh dengan memplotkan absorbansi dan konsentrasi glukosa.

Penentuan kadar gula reduksi sampel

Sebanyak 0,5 ml sampel 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. Kadar gula reduksi yang terdapat di dalam sampel dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi pada persamaan regresi linier $y = bx + a$ (Miller, 1959).

3.5.3 Derajat Keasaman/ pH

Nilai derajat keasaman sampel ditentukan menggunakan pH meter digital. Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi dengan menggunakan larutan buffer pH

4 dan pH 7. Setelah dikalibrasi, pH sampel diukur dengan membaca angka pada layar pH meter.

3.5.4 Penentuan Konsentrasi etanol

Analisis etanol menggunakan metode *Chamber Conway* membutuhkan 3 larutan, yaitu larutan A, larutan B, dan larutan C/sampel yang dilakukan berdasarkan pada modifikasi yang dikembangkan oleh Kartika *et al.*, (1992). Larutan A merupakan Na_2CO_3 jenuh yang diperoleh dengan menimbang 10 g Na_2CO_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 H_2SO_4 pekat secara perlahan lahan dan diaduk dengan stirer magnetik. Larutan B diencerkan hingga 100 ml. Larutan C/ sampel merupakan larutan stok yang dibuat dari 1 ml alkohol proksimat yang ditera akuades hingga 250 ml.

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

- a. 2 ml Larutan B + 1 ml akuades (blanko)
- b. 2 ml Larutan B + 0,2 ml larutan C + 0,8 ml akuades
- c. 2 ml Larutan B + 0,4 ml larutan C + 0,6 ml akuades
- d. 2 ml Larutan B + 0,6 ml larutan C + 0,4 ml akuades
- e. 2 ml Larutan B + 0,8 ml larutan C + 0,2 ml akuades
- f. 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. Selanjutnya konsentrasi etanol yang terdapat di dalam sampel dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi pada persamaan regresi linier $y = bx + a$ (Kartika *et al.*, 1992). Setelah konsentrasi etanol sampel diketahui, dilakukan beberapa perhitungan lanjutan, seperti berikut:

a. Yield Etanol (g/g) = $\frac{\text{Etanol yang dihasilkan}}{\text{Gula yang dikonsumsi}}$

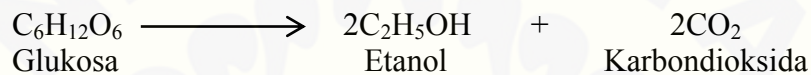
$$b. \text{ Produktivitas Etanol (g/L/jam)} = \frac{\text{Etanol yang dihasilkan}}{\text{Lama fermentasi}}$$

$$c. \text{ Efisiensi Fermentasi (\%)} = \frac{\text{Etanol yang dihasilkan}}{\text{Etanol teoritis}} \times 100$$

$$d. \text{ Growth rate (/jam)} = \frac{\text{Ln populasi yeast saat fase log } X_2 - \text{Ln populasi yeast jam ke } X_0}{\text{Lama fase log (jam ke } T_2 - \text{jam ke } T_0)(\Delta t)}$$

$$e. \text{ Growth yield } \left(\frac{\text{log cfu/ml}}{\text{g/L}} \right) = \frac{\text{populasi yeast jam ke } T_2 - \text{populasi yeast jam ke } T_0 (\Delta x)}{\text{gula reduksi jam ke } T_0 - \text{gula reduksi jam ke } T_2 (\Delta s)}$$

Etanol teoritis diperoleh dengan mengacu pada reaksi stoikiometri fermentasi alkohol dimana 1 mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol, seperti dalam persamaan berikut:



Mol = gram/Mr; 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

Pada penelitian ini dilakukan produksi bioetanol dengan menggunakan dua jenis ragi roti instan yaitu *Forise Instant Yeast* (A1) dan *New Aule Instant Dry Yeast* (A2) pada kondisi fermentasi yang berbeda. Kondisi fermentasi yang digunakan yaitu tanpa dan dengan pemberian aerasi 0,3 vvm (diikuti dengan pemberian agitasi 100 rpm). Fermentasi dilakukan secara *batch* selama 72 jam. Selama fermentasi, aktivitas kedua jenis yeast diamati melalui beberapa parameter pengamatan, yaitu jumlah populasi yeast, kadar gula reduksi, konsentrasi etanol, dan pH secara periodik setiap 12 jam. Hasil pengamatan setiap parameter dan pembahasan diuraikan secara rinci dalam beberapa sub bab berikut.

4.1 Profil Fermentasi Bioetanol oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi pada Media Molases

4.1.1 Profil Fermentasi Bioetanol Tanpa Pemberian Aerasi

Selama fermentasi, yeast A1 dan A2 tumbuh dan berkembang biak dengan baik seperti yang dapat dilihat pada Gambar 4.1. Pada gambar tersebut dapat diketahui bahwa yeast A1 dan A2 mengalami kenaikan jumlah populasi yeast hingga fermentasi 36 jam. Adapun jumlah populasi maksimum yang dicapai oleh yeast A1 dan A2 hingga fermentasi 36 jam, masing-masing sebesar 8,40 log cfu/ml dan 8,13 log cfu/ml. Jumlah populasi maksimum yang dicapai oleh masing-masing yeast menunjukkan bahwa aktivitas yeast A1 dan A2 masih baik pada fermentasi 36 jam karena walaupun sudah mulai memasuki fase stasioner, peningkatan jumlah populasi masih dapat terjadi. Berdasarkan grafik dalam gambar tersebut dapat diketahui bahwa jumlah populasi maksimum yeast A1 lebih tinggi daripada yeast A2. Namun, berdasarkan hasil uji T, jumlah populasi kedua jenis yeast tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Berdasarkan Gambar 4.1 dapat diketahui bahwa setelah fermentasi 36 jam, yeast A1 dan A2 mulai mengalami penurunan

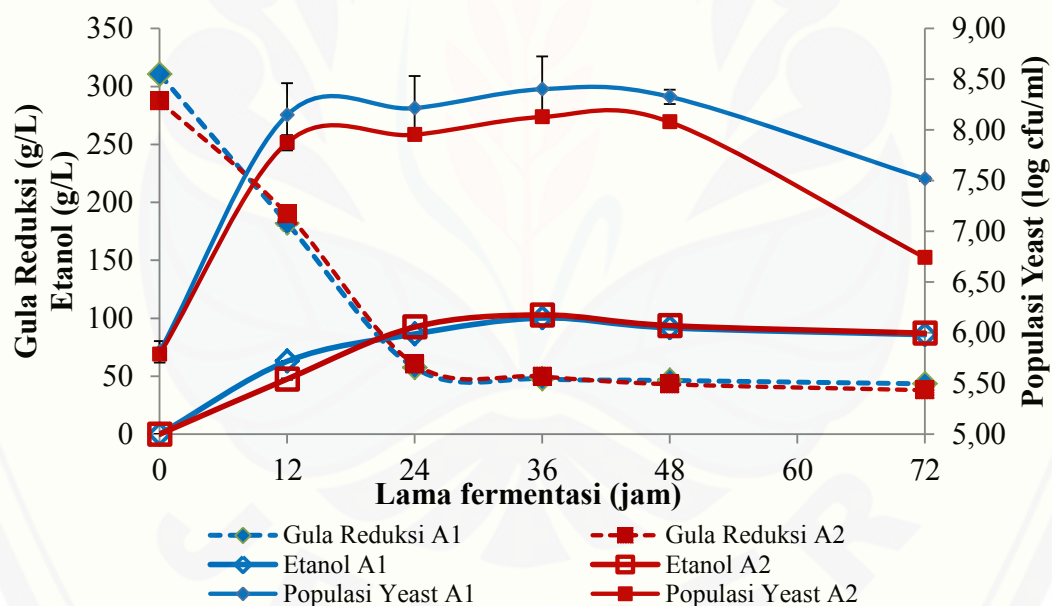
jumlah populasi. Jumlah populasi yeast A1 dan A2 pada 48 hingga 72 jam fermentasi secara berturut-turut masing-masing menurun dari 8,33 log cfu/ml dan 8,08 log cfu/ml hingga mencapai 7,52 dan 6,74 log cfu/ml. Hal ini terjadi karena yeast A1 dan A2 berada pada fase stasioner (fase pertumbuhan sel akan menurun hingga terhenti) dan akhirnya memasuki fase kematian pada 48 hingga 72 jam fermentasi.

Pertumbuhan dan perkembangbiakan yeast dapat terjadi karena adanya substrat pada media molases yang tersedia sebagai nutrisi selama fermentasi berlangsung. Molases digunakan sebagai substrat dalam fermentasi karena memiliki kandungan gula yang cukup tinggi, sehingga dapat memenuhi kebutuhan sumber karbon yang dibutuhkan oleh yeast saat menjalankan metabolisme. Adapun kadar gula reduksi dalam media molases yeast A1 dan A2 pada jam ke-0 secara berturut-turut adalah sebesar 310,618 g/L dan 287,359 g/L. Ketersediaan gula sebagai sumber karbon saat fermentasi digunakan dengan baik oleh masing-masing yeast yang ditandai dengan adanya kenaikan jumlah populasi yeast hingga 36 jam fermentasi dan menurunnya kadar gula reduksi hingga jam tersebut. Kadar gula reduksi yeast A1 menurun hingga 47,806 g/L, sedangkan pada yeast A2 menurun hingga 49,777 g/L pada 36 jam fermentasi. Penjelasan di atas didukung oleh pernyataan Buglass (2011) yang menyatakan bahwa sekitar 50% gula yang tersedia di dalam substrat digunakan selama fase logaritmik. Oleh karena itu, konsumsi gula reduksi oleh masing-masing yeast sangat tinggi saat fase tersebut.

Penurunan kadar gula reduksi masih tetap berlangsung hingga fermentasi 72 jam, namun ternyata tidak diikuti dengan adanya kenaikan jumlah populasi yeast. Hal ini terjadi karena ketersediaan gula yang ada dalam media sudah tidak mencukupi kebutuhan sumber karbon yang dibutuhkan oleh masing-masing yeast untuk tumbuh dan berkembang biak. Kadar gula reduksi pada akhir fermentasi yang dimiliki media molases yeast A1 yaitu sebesar 43,469 g/L, sedangkan pada yeast A2 sebesar 37,950 g/L.

Selama fermentasi, kandungan gula dalam media oleh yeast tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan, namun juga untuk

menghasilkan produk berupa etanol. Glukosa yang terkandung di dalam substrat, selama fermentasi akan diubah menjadi asam piruvat melalui glikolisis. Asam piruvat yang terbentuk kemudian diubah menjadi asetaldehida dan CO_2 . Asetaldehida yang telah terbentuk selanjutnya diubah oleh enzim alkohol dehidrogenase menjadi etanol (Buglass, 2011). Seiring dengan meningkatnya jumlah populasi yeast dan menurunnya kadar gula reduksi, maka akan diikuti oleh meningkatnya konsentrasi etanol yang dihasilkan. Hal tersebut didukung dengan hasil pengamatan terhadap hubungan antara peningkatan jumlah populasi yeast dan konsentrasi etanol dengan penurunan kadar gula reduksi selama fermentasi tanpa pemberian aerasi dan agitasi pada media molases yang dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hubungan peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml) dan konsentrasi etanol (g/L) dengan penurunan kadar gula reduksi (g/L) selama fermentasi oleh yeast A1 dan A2 tanpa pemberian aerasi pada media molases

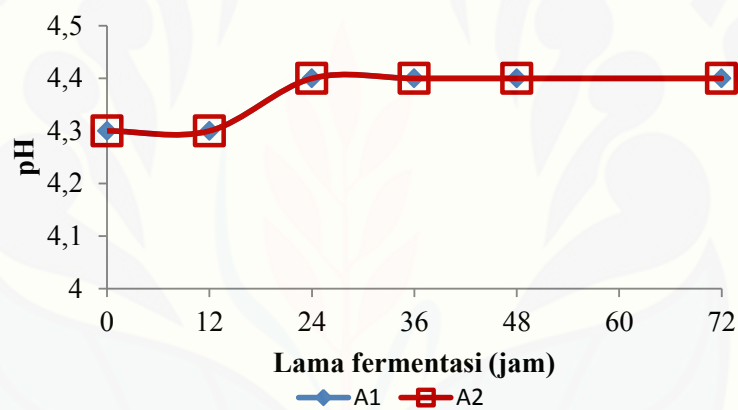
Berdasarkan Gambar 4.1 dapat diketahui bahwa konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan oleh masing-masing yeast dicapai saat 36 jam fermentasi. Adapun konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 yaitu sebesar 100,253 g/L (10,025%), sedangkan untuk yeast A2 menghasilkan konsentrasi etanol sebesar

102,854 g/L (10,285%). Konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh yeast A2 lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi etanol oleh yeast A1. Hal ini terjadi karena pada yeast A2 konsumsi gula reduksi dilakukan agar sel-sel yeast menghasilkan enzim alkohol dehidrogenase yang secara optimal dikonversi menjadi etanol. Berbeda dengan yeast A1, konsumsi gula reduksi yang dilakukan lebih tinggi karena lebih optimal digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel-sel yeast daripada menghasilkan enzim alkohol dehidrogenase, sehingga konversi gula menjadi etanol tidak optimal dan konsentrasi etanol yang dihasilkan lebih rendah daripada yeast A2. Namun, berdasarkan hasil uji T, konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan kedua yeast tersebut memiliki perbedaan yang tidak signifikan.

Berdasarkan Gambar 4.1, dapat diketahui bahwa selama 48 hingga 72 jam fermentasi terjadi penurunan konsentrasi etanol. Konsentrasi etanol akhir yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 pada akhir fermentasi secara berturut-turut yaitu sebesar 85,885 g/L (8,589%) dan 87,116 g/L (8,712%). Penurunan konsentrasi etanol hingga akhir fermentasi pada masing-masing yeast diduga karena adanya penurunan jumlah populasi dan kadar gula reduksi. Hal ini dikarenakan pada 48-72 jam fermentasi, ketersediaan gula reduksi sebagai sumber karbon bagi sel-sel yeast sudah sangat menurun, sehingga tidak dapat mencukupi kebutuhan yeast dalam menjalankan metabolisme. Selain itu, masing-masing sel yeast pada 48-72 jam fermentasi telah memasuki fase stasioner dan kematian, sehingga sel-sel yeast sebagian telah mati dan menurun kemampuannya untuk tumbuh, berkembang biak, dan menghasilkan enzim alkohol dehidrogenase (Buglass, 2011). Kurang optimalnya enzim alkohol dehidrogenase yang dihasilkan oleh masing-masing yeast akan berdampak pada menurunnya konversi gula menjadi etanol, sehingga konsentrasi etanol yang dihasilkan juga berkurang.

Selama fermentasi, metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing sel yeast tidak hanya berupa etanol, namun dapat juga berupa metabolit-metabolit lain. Selain etanol, *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan produk sampingan berupa gliserol, asam-asam organik, dan alkohol lain. Namun, gliserol merupakan produk sampingan

utama. Terbentuknya metabolit-metabolit tersebut akan berdampak pada menurunnya konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh sel-sel yeast. Selain dapat menurunkan konsentrasi etanol, terbentuknya gliserol dapat menyebabkan terjadinya kenaikan pH pada media fermentasi (Elena *et al.*, 2009). Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan terhadap pH pada masing-masing media fermentasi yang mengalami perubahan, pH awal media fermentasi yang semula sebesar 4,3 meningkat menjadi 4,4 seperti yang terlihat pada Gambar 4.2. Namun, dapat dilihat bahwa peningkatan pH pada media molases yang terjadi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.



Gambar 4.2 Perubahan pH media molases oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi tanpa pemberian aerasi

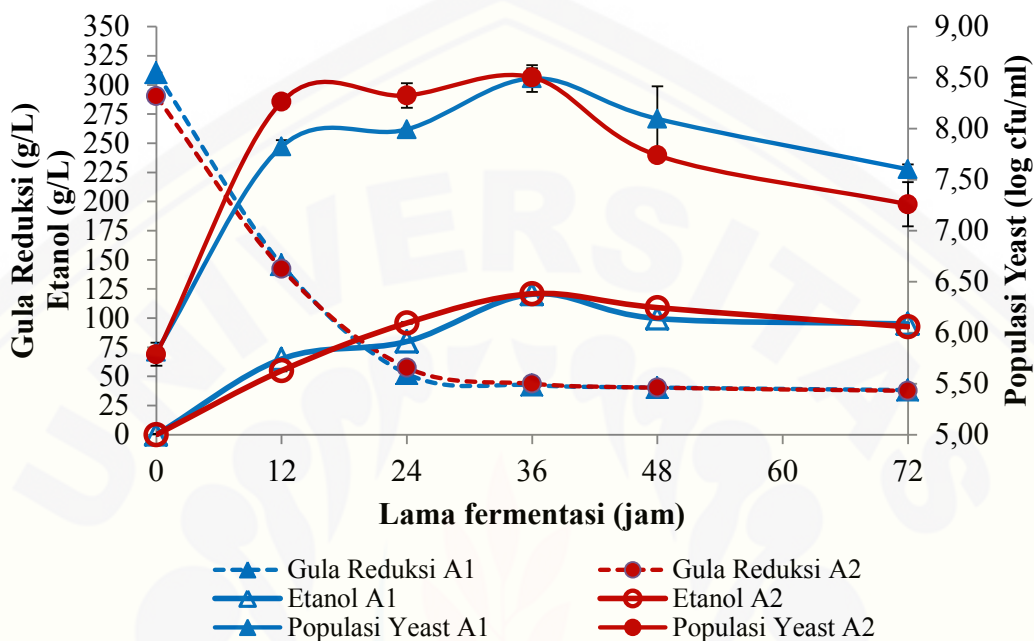
4.1.2 Profil Fermentasi Bioetanol dengan Pemberian Aerasi

Salah satu upaya optimasi produksi bioetanol dapat dilakukan dengan menyediakan kondisi fermentasi yang optimum bagi pertumbuhan dan perkembangbiakan sel-sel yeast. Penyediaan kondisi fermentasi yang optimum dapat dilakukan melalui pemberian aerasi dan agitasi pada media selama fermentasi. Pemberian aerasi bertujuan untuk menyediakan oksigen bagi mikroorganisme dalam kultur tenggelam untuk keperluan metabolisme, sedangkan agitasi bertujuan untuk memastikan bahwa sel mikroba dan nutrisi medium berada dalam keadaan homogen (Suwasono *et al.*, 2002). Berdasarkan hasil pengamatan, dapat diketahui bahwa

terdapat hubungan peningkatan jumlah populasi dan konsentrasi etanol dengan penurunan kadar gula reduksi seperti yang tercantum pada Gambar 4.3.

Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa yeast A1 dan A2 selama fermentasi dengan pemberian aerasi 0,3 vvm masih dapat tumbuh dan berkembang biak. Masing-masing yeast mengalami kenaikan jumlah populasi maksimum hingga fermentasi 36 jam. Adapun jumlah populasi maksimum yang dicapai oleh yeast A1 dan A2 hingga fermentasi 36 jam, masing-masing sebesar 8,49 log cfu/ml dan 8,50 log cfu/ml. Berdasarkan grafik dalam gambar tersebut dapat diketahui bahwa jumlah populasi maksimum yeast A2 lebih tinggi daripada yeast A1. Namun, berdasarkan hasil uji T, jumlah populasi kedua jenis yeast tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui pula bahwa setelah fermentasi 36 jam, yeast A1 dan A2 mulai mengalami penurunan jumlah populasi. Jumlah populasi yeast A1 dan A2 pada 48 hingga 72 jam fermentasi secara berturut-turut masing-masing menurun dari 8,10 log cfu/ml dan 7,74 log cfu/ml hingga mencapai 7,60 log cfu/ml dan 7,26 log cfu/ml.

Pertumbuhan dan perkembangbiakan yeast dapat terjadi karena adanya substrat pada media molases yang tersedia sebagai nutrisi selama fermentasi berlangsung. Molases sebagai substrat dalam fermentasi mengandung gula yang berfungsi sebagai sumber karbon bagi yeast. Selain untuk tumbuh dan berkembang biak, gula juga dikonversi menjadi etanol, sehingga adanya konsumsi gula selama fermentasi mengakibatkan terjadinya penurunan kadar gula reduksi dan peningkatan konsentrasi etanol, seperti yang telah dijelaskan pada sub bab sebelumnya. Adapun kadar gula reduksi dalam media molases yeast A1 dan A2 pada awal fermentasi secara berturut-turut adalah sebesar 310,486 g/L dan 290,381 g/L. Penurunan kadar gula reduksi pada masing-masing media molases berlangsung hingga fermentasi 72 jam. Kadar gula reduksi pada akhir fermentasi yang dimiliki media molases yeast A1 yaitu sebesar 38,344 g/L, sedangkan pada yeast A2 sebesar 37,687 g/L.

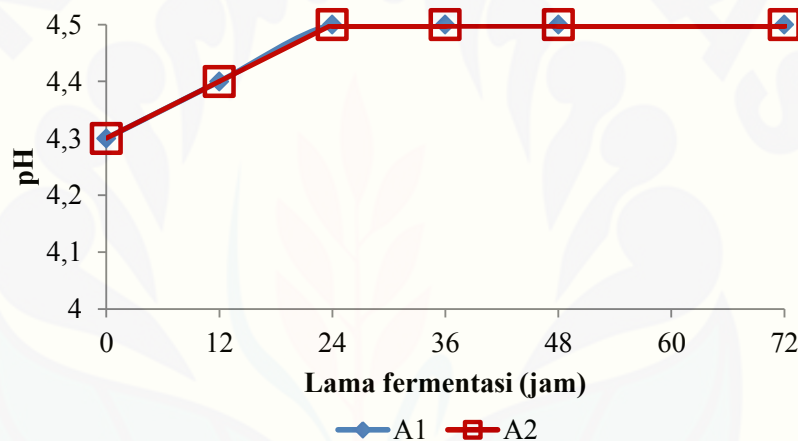


Gambar 4.3 Hubungan peningkatan jumlah populasi (log cfu/ml) dan konsentrasi etanol (g/L) dengan penurunan kadar gula reduksi (g/L) selama fermentasi oleh yeast A1 dan A2 dengan pemberian aerasi pada media molases

Selama fermentasi dengan pemberian aerasi 0,3 vvm, yeast tidak hanya melakukan pertumbuhan dan perkembangbiakan, namun juga menghasilkan metabolit berupa etanol. Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan oleh masing-masing yeast dicapai saat 36 jam fermentasi. Adapun konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 yaitu sebesar 120,507 g/L (12,051%), sedangkan untuk yeast A2 menghasilkan konsentrasi etanol sebesar 120,917 g/L (12,092%). Konsentrasi etanol maksimum dengan pemberian aerasi 0,3 vvm lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi etanol maksimum tanpa pemberian aerasi 0,3 vvm. Berdasarkan hasil uji T, adanya pemberian aerasi 0,3 vvm pada masing-masing yeast menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan.

Konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh yeast A2 lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi etanol oleh yeast A1. Namun, berdasarkan hasil uji T, konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan kedua yeast tersebut memiliki perbedaan yang

tidak signifikan. Selama 48 hingga 72 jam fermentasi terjadi penurunan konsentrasi etanol. Konsentrasi etanol akhir yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 pada akhir fermentasi secara berturut-turut yaitu sebesar 95,053 g/L (9,505%) dan 92,590 g/L (9,259%). Selain terjadi perubahan jumlah populasi, kadar gula reduksi, dan konsentrasi etanol, terjadi perubahan pada pH media molases. pH pada masing-masing media fermentasi mengalami perubahan berupa kenaikan dari pH 4,3 menjadi pH 4,5 seperti yang terlihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Perubahan pH media molases oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi dengan pemberian aerasi

4.2 Kinetika Fermentasi Bioetanol oleh Yeast A1 dan A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi pada Media Molases

4.2.1 Laju Konsumsi Gula Reduksi

Nilai laju konsumsi gula reduksi diperoleh dari perbandingan antara konsumsi gula reduksi selama fermentasi dengan lama fermentasi yang berlangsung. Laju konsumsi gula reduksi yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 untuk mencapai populasi maksimum, secara berturut-turut sebesar 7,300 g/L/jam dan 6,600 g/L/jam. Pada kondisi B2, yeast A1 dan A2 laju konsumsi gula reduksi untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar 7,443 g/L/jam dan 6,851 g/L/jam. Perbandingan laju konsumsi yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa

aerasi (B1) dan dengan aerasi 0,3 vvm (B2) pada media molases dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Laju konsumsi gula reduksi/jam yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm 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
12	10,710	13,721	8,114	12,330
24	10,556	10,759	9,456	9,702
36	7,300	7,443	6,600	6,851
48	5,505	5,626	5,089	5,210
72	3,710	3,780	3,464	3,510

Tabel 4.1 menunjukkan pula bahwa laju konsumsi gula reduksi maksimum yeast A1 dengan kondisi B1 dan B2 tercapai saat 12 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 10,710 g/L/jam dan 13,721 g/L/jam. Yeast A2 dengan kondisi B1 dan B2 mencapai laju konsumsi gula reduksi maksimum pada lama fermentasi yang berbeda. Yeast A2 dengan kondisi B1 membutuhkan 24 jam fermentasi untuk mencapai laju konsumsi gula reduksi maksimum sebesar 9,456 g/L/jam, sedangkan pada kondisi B2 hanya membutuhkan 12 jam fermentasi untuk mencapai laju konsumsi gula reduksi maksimum sebesar 12,330 g/L/jam. Berdasarkan data di atas dapat diketahui bahwa secara umum laju konsumsi gula reduksi maksimum masing-masing yeast telah tercapai saat 12 jam fermentasi. Hal ini dapat terjadi karena pada jam tersebut merupakan fase logaritmik dari masing-masing yeast, sehingga konsumsi substrat berupa gula sangat tinggi pada jam tersebut.

Selain itu, dapat diketahui pula bahwa dengan adanya pemberian aerasi yang diikuti oleh agitasi juga dapat meningkatkan konsumsi gula reduksi masing-masing yeast. Hal ini didukung oleh pernyataan Rodmui *et al.*, (2008) yang menyatakan bahwa dengan adanya pemberian aerasi terkontrol selama fase lag dan fase log, serta dengan adanya pemberian agitasi selama fermentasi dapat meningkatkan konsumsi

gula dalam substrat yang berdampak pada percepatan fase lag dan peningkatan pembentukan biomassa.

4.2.2 *Growth Rate*

Nilai *growth rate* (laju pertumbuhan) menunjukkan perbandingan antara peningkatan biomassa terhadap satuan unit waktu. Nilai *growth rate* merupakan representasi dari rata-rata laju pertumbuhan semua sel mikroba yang ada dalam media, namun tidak menunjukkan laju pertumbuhan maksimum dari masing-masing sel mikroba karena laju pertumbuhan yang ditunjukkan merupakan laju pertumbuhan pada saat mikroba mencapai fase log (Lee, 2006). Nilai *growth rate* yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai *growth rate* yeast A1 pada kondisi B1 lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi B2. Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya pemberian aerasi justru dapat menurunkan laju pertumbuhan yeast A1 selama fase log. Hal ini diduga karena laju pertumbuhan populasi yeast A1 dipengaruhi oleh pemberian aerasi 0,3 vvm dan menunjukkan bahwa yeast A1 rentan terhadap pemberian aerasi. Sedangkan pada yeast A2, melalui pemberian aerasi 0,3 vvm justru dapat meningkatkan laju pertumbuhan yeast A2. Namun, berdasarkan uji T, laju pertumbuhan masing-masing yeast pada kondisi B1 dan B2 secara umum menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa ternyata pemberian aerasi ternyata tidak memberikan pengaruh berarti terhadap laju pertumbuhan masing-masing yeast, walaupun masih dapat meningkatkan jumlah populasi yeast maksimum hingga 36 jam fermentasi. Kebutuhan aerasi dan agitasi selama fermentasi pada masing-masing yeast tidak sama karena dipengaruhi oleh karakteristik masing-masing yeast tersebut. Hal ini sejalan dengan penelitian Sanchez *et al.* (1997) yang menunjukkan bahwa dengan penggunaan aerasi tertentu dapat meningkatkan *growth rate Candida shehatae* selama fermentasi, namun penggunaan aerasi yang berlebih justru dapat menurunkan *growth rate* yeast tersebut. Hasil

penelitian menunjukkan bahwa dengan pemberian aerasi sebesar 0,075 vvm mampu meningkatkan *growth rate* yeast dari 0,329/jam (aerasi 0 vvm) menjadi 0,338/jam, sedangkan dengan penggunaan aerasi yang lebih tinggi yaitu sebesar 0,3 vvm justru menurunkan *growth rate* yeast menjadi 0,242/jam.

Tabel 4.2 *Growth rate* yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases

Lama Fermentasi (jam)	<i>Growth rate</i> (/jam)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
12	0,488	0,386	0,400	0,475

Nilai *growth rate* masing-masing yeast pada setiap kondisi fermentasi ini juga akan mempengaruhi konsentrasi etanol yang dihasilkan saat fermentasi. Semakin tinggi nilai *growth rate*, maka akan semakin cepat dan tinggi pula peningkatan populasi pertumbuhan yeast yang berdampak pada meningkatnya produksi enzim alkohol dehidrogenase dalam menghasilkan etanol. Jika dibandingkan dengan nilai *growth rate* untuk pertumbuhan yeast secara umum, yeast A1 dan A2 memiliki nilai *growth rate* yang lebih tinggi. Secara umum nilai *growth rate* yeast berkisar antara 0,17-0,35/jam, sedangkan nilai *growth rate* yeast A1 dan A2 pada kondisi fermentasi B1 dan B2 berkisar antara 0,386 - 0,475/jam (Deak, 2007).

Berdasarkan penelitian Rodmui *et al.*, (2008), menjelaskan bahwa melalui pemberian agitasi dapat mempersingkat fase lag yeast, sehingga yeast dapat segera memasuki fase log. Sedangkan menurut penelitian Rosenfeld *et al.* (2003), adanya pemberian aerasi saat fermentasi dibutuhkan untuk biosintesis lipid yang penting bagi pertumbuhan yeast, ketahanan membran plasma, serta untuk menjaga laju glikolisis dan produksi etanol. Selama fase log, pemberian aerasi dapat meningkatkan sintesis biomassa, sedangkan pada fase stasioner, melalui pemberian aerasi dengan adanya pembentukan ergosterol dan asam oleat berlebih dapat meningkatkan laju fermentasi, viabilitas sel, dan mempersingkat waktu fermentasi.

4.2.3 Growth Yield

Growth yield merupakan perbandingan antara perubahan jumlah biomassa dengan substrat yang dikonsumsi. Nilai *growth yield* menunjukkan secara jelas kebutuhan nutrisi bagi pertumbuhan sel mikroorganisme secara kuantitatif: berapa banyak satuan massa dari substrat yang harus dikonsumsi agar dapat dihasilkan satu satuan massa dari sel mikroorganisme (Panikov, 2014). Nilai *growth yield* yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 untuk mencapai populasi maksimum, secara berturut-turut sebesar 0,0100 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,0098 (log cfu/ml)/(g/L). Pada kondisi B2, nilai *growth yield* yeast A1 dan A2 untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar 0,0100 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,0110 (log cfu/ml)/(g/L). Perbandingan *growth yield* ($Y \times s$) yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 menunjukkan pula bahwa nilai *growth yield* maksimum yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 tercapai saat 12 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 0,0169 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,0214 (log cfu/ml)/(g/L). Pada kondisi B2, yeast A1 dan A2 juga mencapai nilai *growth yield* maksimum pada lama fermentasi yang sama, yaitu 12 jam fermentasi. Nilai *growth yield* maksimum yeast A1 dan A2 dengan kondisi B2 saat 12 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 0,0122 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,0167 (log cfu/ml)/(g/L).

Berdasarkan data di atas dapat diketahui bahwa nilai *growth yield* dengan kondisi B1 lebih besar jika dibandingkan dengan nilai *growth yield* pada kondisi B2, begitu pula jika dibandingkan dengan antar yeast, dimana nilai *growth yield* yeast A2 lebih besar daripada nilai *growth yield* yeast A1. Hal ini dikarenakan nilai *growth yield* berhubungan dengan kenaikan jumlah populasi yeast dan konsumsi gula reduksi masing-masing yeast. Nilai *growth yield* yeast A2 yang lebih tinggi daripada A1 dikarenakan konsumsi gula reduksi A2 meskipun lebih rendah, namun diikuti oleh kenaikan jumlah populasi yeast A2 yang cukup tinggi. Berbeda halnya dengan yeast A1 yang walaupun konsumsi gula reduksi tinggi, namun tidak diikuti oleh kenaikan

jumlah populasi yang tinggi pula, sehingga nilai *growth yield* yang dihasilkan pun lebih rendah daripada yeast A2. Begitu pula hal ini berlaku pada kondisi B1 dan B2, dimana nilai *growth yield* pada kondisi B1 oleh masing-masing yeast lebih rendah jika dibandingkan dengan kondisi B2. Namun, berdasarkan hasil uji T, nilai *growth yield* masing-masing yeast pada tiap kondisi fermentasi secara umum menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Tabel 4.3 *Growth yield* (Y x/s) yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases

Lama Fermentasi (jam)	<i>Growth yield</i> ((log cfu/ml)/(g/L))			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
12	0,0169	0,0122	0,0214	0,0167
24	0,0090	0,0084	0,0095	0,0109
36	0,0100	0,0100	0,0098	0,0110
48	0,0091	0,0084	0,0094	0,0078
72	0,0065	0,0067	0,0037	0,0058

Berdasarkan data di atas dapat diketahui bahwa kebutuhan nutrisi maksimum masing-masing yeast terjadi selama 12 jam fermentasi dan setelah itu kebutuhan nutrisi masing-masing yeast mengalami penurunan. Hal ini terjadi karena pada saat 12 jam fermentasi, masing-masing yeast membutuhkan nutrisi yang digunakan untuk tumbuh dan berkembangbiak karena mikroba berada dalam fase log, sehingga substrat yang dikonsumsi pun jumlahnya semakin besar. Selanjutnya nilai *growth yield* yang menurun menunjukkan bahwa kebutuhan nutrisi mikroba tidak dapat terpenuhi secara optimal karena sebagian besar substrat telah dikonsumsi saat fase log, sehingga mikroba hanya dapat menggunakan sisa substrat yang ada.

4.2.4 Produktivitas Etanol

Produktivitas etanol merupakan perbandingan antara konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan lama waktu fermentasi. Produktivitas etanol menunjukkan laju produksi etanol oleh mikroba yang dihasilkan tiap satuan waktu. Produktivitas etanol

oleh yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 saat mencapai populasi maksimum (36 jam fermentasi), secara berturut-turut sebesar 2,785g/L/jam dan 2,857 g/L/jam. Pada kondisi B2, saat mencapai populasi maksimum (36 jam fermentasi) produktivitas etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 secara berturut-turut sebesar 3,347g/L/jam dan 3,359 g/L/jam. Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm 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
12	5,241	5,412	3,964	4,580
24	3,601	3,333	3,852	3,995
36	2,785	3,347	2,857	3,359
48	1,912	2,077	1,952	2,271
72	1,193	1,320	1,210	1,286

Tabel 4.4 menunjukkan pula bahwa produktivitas etanol maksimum yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 tercapai saat 12 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 5,241 g/L/jam dan 3,964 g/L/jam. Pada kondisi B2, yeast A1 dan A2 juga mencapai produktivitas etanol maksimum pada lama fermentasi yang sama yaitu selama 12 jam. Produktivitas etanol maksimum yeast A1 dan A2 dengan kondisi B2 saat 12 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 5,412 g/L/jam dan 4,580 g/L/jam. Berdasarkan data di atas dapat diketahui bahwa produksi etanol maksimum telah tercapai saat 12 jam fermentasi. Hal ini terjadi karena pembentukan metabolit primer berupa etanol terjadi selama fase log dan stasioner. Rathore (2008) menyatakan bahwa pembentukan etanol terbagi dalam tiga fase yaitu fase lag, fase log, dan fase stasioner. Selama fase lag, hampir tidak ada etanol yang terbentuk karena yeast masih beradaptasi dengan lingkungan, selanjutnya dalam fase log sudah mulai terbentuk etanol secara eksponensial karena yeast telah beradaptasi dengan

lingkungan. Selama fase stasioner, produksi etanol masih dapat terjadi namun tidak secepat saat fase log karena kecepatan produksi etanol sudah mulai menurun.

Penurunan produktivitas etanol setelah 12 jam fermentasi terjadi karena adanya penurunan konsentrasi etanol. Hal ini dikarenakan setelah 12 jam fermentasi, ketersediaan gula dalam substrat telah sangat menurun, sehingga karena rendahnya konsentrasi gula dalam media fermentasi, kebutuhan sel mikroba dalam produksi etanol tidak dapat tercukupi secara optimal. Buglass (2011) menyatakan bahwa ketika konsentrasi gula terlalu rendah dan terdapat oksigen selama fermentasi berlangsung, maka yeast tetap melakukan respirasi yang nantinya akan menghasilkan karbondioksida dan air, bukan etanol, sehingga akan berdampak pada menurunnya kadar etanol yang dihasilkan.

Tabel 4.4 menunjukkan pula bahwa dengan pemberian aerasi 0,3 vvm yang diikuti pemberian agitasi 100 rpm dapat meningkatkan produktivitas etanol. Hal ini terjadi karena dengan adanya pemberian aerasi selama fase log dapat meningkatkan sintesis biomassa, sedangkan pada fase stasioner, melalui pemberian aerasi dengan adanya pembentukan ergosterol dan asam oleat berlebih dapat meningkatkan laju fermentasi, viabilitas sel, dan mempersingkat waktu fermentasi (Rosenfeld *et al.*, 2003).

4.2.5 Yield Etanol

Salah satu faktor yang menentukan efisiensi suatu mikroorganisme dalam mengkonversi substrat menjadi etanol yaitu melalui nilai yield etanol. Yield etanol diperoleh dari hasil perbandingan antara etanol yang dihasilkan dengan jumlah gula yang dikonsumsi. Pada umumnya, nilai yield etanol juga dapat menunjukkan apakah mikroorganisme dapat mengkonversi gula menjadi etanol secara optimal atau tidak (Kent, 2013). Berdasarkan Tabel 4.5, dengan kondisi B1, pada jam ke-36 nilai yield etanol yang dihasilkan oleh yeast A2 lebih tinggi daripada yeast A1 yaitu secara berturut-turut sebesar 0,381 g/g dan 0,433 g/g. Nilai yield etanol yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan masing-masing

yeast. Konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan pada jam ke-36 oleh yeast A2 lebih tinggi daripada yeast A1, maka dari itu Y p/s yang diperoleh yeast A2 pun lebih tinggi daripada yeast A1. Begitu pula dengan kondisi B2, nilai yield etanol yang dihasilkan oleh yeast A2 lebih tinggi daripada yeast A1 yaitu secara berturut-turut sebesar 0,450 g/g dan 0,490 g/g. Nilai yield etanol (Y p/s) oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Yield etanol (Y p/s) oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases

Lama Fermentasi (jam)	Y p/s (g etanol/g glukosa)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000	0,000	0,000	0,000
12	0,489	0,394	0,489	0,372
24	0,341	0,310	0,407	0,412
36	0,381	0,450	0,433	0,490
48	0,347	0,369	0,384	0,436
72	0,321	0,349	0,349	0,366

Berdasarkan data di atas, dapat diketahui bahwa pemberian aerasi dan agitasi dapat meningkatkan nilai yield etanol masing-masing yeast. Menurut Khongsay *et al* (2012) dan Zabed *et al* (2014), pemberian agitasi berperan penting dalam menghasilkan yield etanol yang lebih tinggi selama fermentasi dengan cara meningkatkan permeabilitas nutrisi dalam substrat agar dapat masuk ke dalam sel yeast seiring dengan mengeluarkan etanol yang berada di dalam sel ke media fermentasi. Pemberian agitasi yang baik dalam produksi bioetanol yaitu dengan menggunakan kecepatan agitasi sebesar 100-200 rpm. Pemberian agitasi dapat dilakukan secara kontinyu selama fermentasi berlangsung karena dapat menghomogenkan medium fermentasi. Namun, pemberian agitasi dengan kecepatan yang berlebihan tidak baik untuk produksi bioetanol karena dapat menghambat metabolisme dari aktivitas sel yeast, namun tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar etanol yang dihasilkan.

Pemberian aerasi pada media fermentasi mampu meningkatkan jumlah populasi yeast karena adanya suplai oksigen yang tercukupi bagi yeast untuk melakukan pertumbuhan dan perkembangbiakan. Menurut Khongsay *et al.* (2012), menyatakan bahwa aerasi merupakan hal penting yang harus terpenuhi bagi yeast untuk melakukan metabolisme. Hal ini dikarenakan aerasi dibutuhkan yeast untuk sintesis sterol dan asam-asam lemak tak jenuh yang penting untuk menjaga ketahanan membran sel selama fermentasi. Selain itu, aerasi juga dapat membantu mengeluarkan CO₂ yang dapat menghambat pertumbuhan sel-sel yeast.

Socol *et al.* (2013) menyatakan bahwa pemberian aerasi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan yeast berkisar antara 5-10 mg/L. Hal ini didukung oleh penelitian Yan *et al.* (2009), dimana dengan pemberian aerasi 4-9 mg/L diikuti dengan agitasi 200 rpm dapat meningkatkan produksi yield etanol selama fermentasi. Yield etanol dalam kondisi fermentasi statis (tanpa pemberian aerasi dan agitasi) hanya sebesar 0,249 g/g (konsentrasi etanol maksimum sebesar 75,8 g/L) dan dengan pemberian aerasi dan agitasi, yield etanol meningkat menjadi 0,471 g/g (konsentrasi etanol maksimum sebesar 143,8 g/L) tercapai saat fermentasi 54 jam. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian melalui pemberian aerasi 0,3 vvm diikuti dengan agitasi 100 rpm, yield etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 sebesar 0,450 g/g (konsentrasi etanol maksimum sebesar 120,507 g/L) dan yeast A2 sebesar 0,490 g/L (konsentrasi etanol maksimum sebesar 120,917 g/L) tercapai saat fermentasi 36 jam ternyata yield etanol yang dihasilkan tidak berbeda jauh, namun dengan pemberian aerasi 0,3 vvm lebih baik karena memerlukan lama waktu fermentasi yang lebih singkat.

Lama waktu pemberian aerasi juga perlu diperhatikan karena dapat berdampak pula pada produksi bioetanol. Ketika ketersediaan oksigen yang dibutuhkan bagi yeast tidak terpenuhi akan berdampak pada pertumbuhan yeast yang kurang optimum dan panjangnya waktu fermentasi yang dibutuhkan. Pemberian aerasi yang berlebih pada awal fermentasi tidak akan menimbulkan dampak negatif karena oksigen yang tersedia akan digunakan seluruhnya oleh yeast selama 4-10 jam fermentasi dalam melakukan pertumbuhan. Hal ini dikarenakan diantara kurun waktu tersebut

merupakan fase log dari yeast. Ketika yeast memasuki fase log, maka dibutuhkan oksigen selama fase tersebut karena adanya oksigen akan digunakan oleh yeast untuk respirasi. Saat yeast berespirasi, maka yeast akan mengkonsumsi gula secara cepat, sehingga yeast dapat memperbanyak diri dan menghasilkan etanol dalam waktu yang singkat (Soccol *et al.*, 2013).

Hal ini juga didukung oleh penelitian Yan *et al.* (2009) dimana dengan pemberian aerasi pada awal fermentasi dapat meningkatkan konsumsi glukosa oleh yeast. Konsumsi glukosa meningkat secara perlahan setelah pemberian aerasi selama 4 jam awal fermentasi dan meningkat secara drastis setelah 8 jam fermentasi. Adapun konsumsi glukosa yaitu dari konsentrasi glukosa sebesar 146 g/L menurun hingga 85 g/L dengan rata-rata laju konsumsi glukosa sebesar 7,6 g/L. Selain meningkatkan laju konsumsi glukosa, pemberian aerasi sebesar 4-9 mg/L dapat berdampak pada pertumbuhan yeast yang cepat dan produksi yield dan konsentrasi etanol yang optimal.

4.2.6 Efisiensi Fermentasi

Nilai efisiensi fermentasi diperoleh dari perbandingan antara yield etanol yang dihasilkan dengan yield etanol teoritis yang kemudian dikalikan dengan seratus persen. Yield etanol teoritis diketahui berdasarkan reaksi stoikiometri fermentasi alkohol, dimana 1 mol glukosa akan menghasilkan 2 mol etanol. Pada umumnya, setiap 100 g glukosa yang digunakan dapat menghasilkan etanol sebanyak 45-49 g etanol dengan batas etanol teoritis yang dapat dihasilkan sebanyak 51,1 g (Elena *et.al*, 2009). Berdasarkan Tabel 4.6, efisiensi fermentasi yeast A1 dan A2 pada kondisi B1 saat fermentasi 36 jam secara berturut-turut sebesar 74,63% dan 84,71% yang kemudian meningkat dengan adanya pemberian aerasi dan agitasi (B2) menjadi 88,00% dan 95,92%. Hal ini dapat terjadi karena nilai efisiensi fermentasi berbanding lurus dengan nilai yield etanol yang dihasilkan, sehingga jika nilai yield etanol yang dihasilkan oleh yeast tinggi, maka nilai efisiensi fermentasi pun akan tinggi pula. Perbandingan nilai efisiensi fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 pada kondisi

tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases dapat dilihat pada Tabel 4.6.

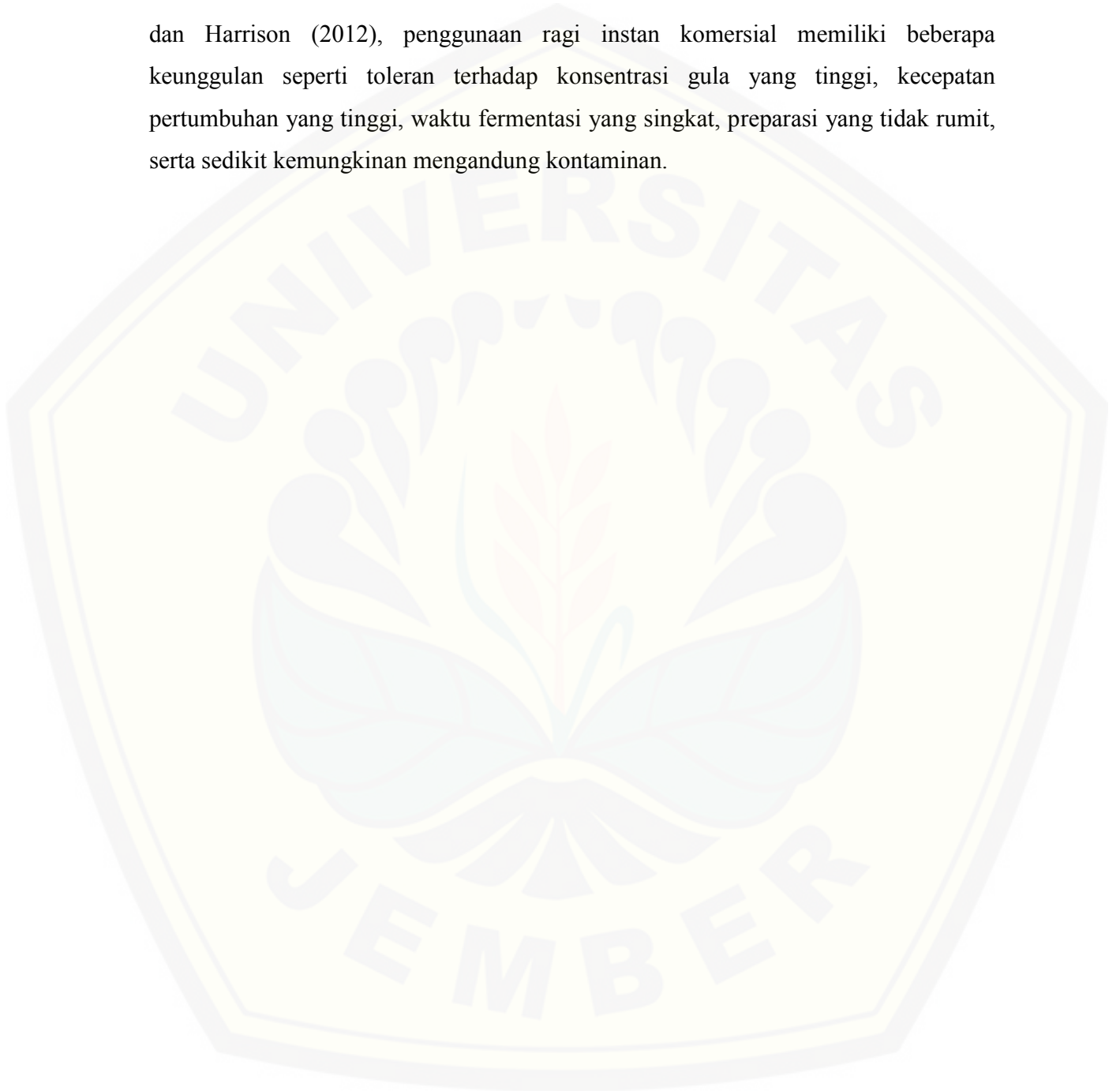
Tabel 4.6 Efisiensi fermentasi oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi tanpa (B1) dan dengan (B2) pemberian aerasi 0,3 vvm pada media molases

Lama Fermentasi (jam)	Efisiensi (%)			
	Yeast A1		Yeast A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,00	0,00	0,00	0,00
12	95,76	77,11	95,70	72,71
24	66,75	60,62	79,67	80,55
36	74,63	88,00	84,71	95,92
48	67,94	72,24	75,04	85,29
72	62,90	68,34	68,35	71,69

Berdasarkan Tabel 4.6 dapat diketahui bahwa nilai efisiensi fermentasi dari keempat jenis perlakuan yang ada menghasilkan nilai yang berkisar antara 60-95%. Hal ini menunjukkan bahwa fermentasi oleh yeast A1 dan A2 dengan kondisi fermentasi B1 dan B2 dilakukan secara optimal karena yeast memiliki kemampuan untuk mengkonversi gula menjadi etanol secara optimal pula, sehingga dihasilkan konsentrasi etanol yang mendekati nilai konsentrasi etanol teoritis. Hal ini dikarenakan kedua jenis yeast yang digunakan merupakan ragi roti instan komersial. Ragi roti instan komersial lebih optimal dalam menghasilkan etanol dikarenakan ragi ini tidak hanya terdiri atas satu jenis strain saja, namun terdiri atas beberapa strain unggul terpilih dari *Saccharomyces cerevisiae* yang masing-masing strain memiliki sifat unggul tersendiri.

Menurut Milkessa (2009), produksi ragi roti instan komersial berlangsung dalam kondisi terkontrol, dimana beberapa strain unggul diisolasi dan ditumbuhkan dalam media tertentu (umumnya molases) terlebih dahulu sebelum digunakan dalam fermentasi. Beberapa strain unggul tersebut terpilih karena memiliki karakteristik fisiologis yang stabil, pertumbuhannya yang cepat, menghasilkan yield sel yang tinggi, dan penyimpanan yang mudah. Fermentasi yang dilakukan saat produksi ragi roti ini juga dikontrol, seperti pemberian nutrisi dan kecepatan aerasi. Menurut Rose

dan Harrison (2012), penggunaan ragi instan komersial memiliki beberapa keunggulan seperti toleran terhadap konsentrasi gula yang tinggi, kecepatan pertumbuhan yang tinggi, waktu fermentasi yang singkat, preparasi yang tidak rumit, serta sedikit kemungkinan mengandung kontaminan.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Konsentrasi etanol yang dihasilkan oleh *Forise Instant Yeast* dan *New Aule Instant Dry Yeast* dengan kondisi tanpa pemberian aerasi 0,3 vvm pada 36 jam fermentasi berturut-turut sebesar 100,253 g/L (10,025%) dan 102,854 g/L (10,285%).
2. Pemberian aerasi 0,3 vvm mampu meningkatkan konsentrasi etanol masing-masing yeast dan menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi etanol yang dihasilkan. Konsentrasi etanol maksimum melalui pemberian aerasi 0,3 vvm dihasilkan oleh *New Aule Instant Dry Yeast* dengan konsentrasi etanol sebesar 120,917 g/L (12,092%), serta produktivitas dan yield etanol secara berturut-turut sebesar 3,359 g/L/jam dan 0,669 g/g pada 36 jam fermentasi.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai penggunaan molases dengan konsentrasi yang lebih tinggi sebagai upaya untuk mengurangi biaya produksi bioetanol. Selain itu, penelitian lanjutan mengenai optimasi kondisi fermentasi (pemberian aerasi dan agitasi) pada masing-masing ragi roti instan perlu dilakukan agar diperoleh konsentrasi etanol yang lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Agricultural Outlook. 2013. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2013-2022 : Biofuel*. <http://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?QueryId=481695&vh0000&vf0&l&il&lang=en> [diakses 16 Juli 2014].
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J.L., Goma, G., Molina-Jouve, C., dan Guillouet, S.E. 2004. Aeration Strategy: A Need For Very High Ethanol Performance in *Saccharomyces cerevisiae* Fed-batch Process. *Appl. Microbiol Biotechnol* (2004) 63: 537-542.
- Amarasekara, A.S. 2013. *Handbook of Cellulosic Ethanol*. https://books.google.co.id/books?id=RNriAgAAQBAJ&dq=physical+properties+of+ethanol&source=gbs_navlinks_s [diakses 6 Maret 2015].
- Basso, L.C., Amorim, V. de., Oliveira, A. J. de., dan Lopes, M.L. 2008. Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 8 : 1155-1163.
- Berg, C. 2013. *World Fuel Ethanol : Analysis and Outlook*. <http://www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g30819b40j.pdf> [diakses 16 Juli 2014].
- Bisson, L. 2001. *The Alcoholic Fermentation*. Davis: University of California.
- Buglass, A.J. 2011. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. https://books.google.co.id/books?id=gNc34oNpg0AC&dq=factors+affecting+alcoholic+fermentation&source=gbs_navlinks_s [diakses 20 Maret 2015].
- Calvel, R., Wirtz, R.L., dan MacGuire, J.J. 2001. *The Taste of Bread*. Springer Science and Business Media.
- Charles, C. dan Kastel, E. 2010. *Artisan Bread at Home*. New York: John Wiley&Sons.
- Curtin, L.V. 1983. Molasses-General Consideration. *Molasses in Animal Nutrition*. Iowa : National Feed Ingredients Association.
- Dake, M.S., Amarpurkar, S.V., Salunkha, M.L., dan Kamble, S.R. 2010. Production of Alcohol by *Saccharomyces* sp. Using Natural Carbohydrate Sources. *Advance Biotech Vol. 10 (06): 37-41*.

- Deak, T. 2007. *Handbook of Food Spoilage Yeasts, Second Edition*. https://books.google.co.id/books?id=RR21g8_2OXIC&dq=yeast+growth+rate+calculation&source=gbs_navlinks_s [diakses 23 Mei 2015].
- Dewan Energi Nasional. 2014. *Outlook Energi Indonesia*. <http://energynusantara.com/wp-content/uploads/2011/10/paparan-Outlook-Energi-Nasional-2014-.pdf> [diakses 03 Februari 2015].
- Dien, B.S., Cotta, A., dan Jeffries, T.W. 2003. Bacteria Engineered for fuel Ethanol Production : Current Status. *Appl Microbiol Biotechnol (2003) 63: 258-266*.
- Elena, P., Rapeanu, G., dan Hopulele, T. 2009. Current Approaches to Efficient Biotechnological Production of Ethanol. *Innovative Romanian Food Biotechnology (2009) 4 : 1-11*.
- Elena, P., Rapeanu, G., Bonciu, C., Vicol, C., dan Bahrim. 2009. *Investigation of Yeast Performances in The Fermentation of Beet and Cane Molasses to Ethanol Production*. Ovidius University Press, 20 (2):202-203.
- Escalante, E.W., Rycheta, M., Melzoch, K., dan Sakoda, H.B. 2012. Fermentation on The Fermentative Activity of *Saccharomyces cerevisiae* Cultured in Apple Juice. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica Vol.11, 2(2012) : 211-226*.
- Fadel, M., Keera, A.A., Mouafi, F.E., dan Kahil, T. 2013. High Level Ethanol from Sugar Cane Molasses by a New Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain in Industrial Scale. *Biotechnology Research International Volume 2013*.
- Fauzi, M. 2009. *Production of Bioethanol from Tapioca Starch Using Saccharomyces cerevisiae : Effects of Temperature and Agitation Speed*. Tesis. Pahang : Faculty of chemical and Natural Resources Engineering, University of Pahang Malaysia.
- Forsburg, S. L. 2005. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* : Models for Cell Biology Research. *Gravitational and Space Biology 18 (2)*.
- Gandia, L.M., Arzamedi, G., dan Dieguez, P.M. 2013. *Renewable Hydrogen Technologies : Production, Purification, Storage, Application and Safety*. http://books.google.co.th/books?id=6pMuGXwPi7IC&dq=bioethanol+is&source=gbs_navlinks_s [diakses 15 Juli 2014].
- Gisslen, W. 2012. *Professional Baking*. <https://books.google.co.id/books?id=5qUPmsiTV6cC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> [diakses 25 Maret 2015].

- Hui, Y.H., Goddik, L.M., Josephsen, J., Nip, W.K., dan Stanfield, P., dan Toldra, F. 2004. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*.
- International Annual Energy Outlook. 2013. *World Total Energy Consumption by Region and Fuel*. Online. DOE/EIA-0383(2013).
- International Sugar Organization. 2012. *World Fuel Ethanol Outlook to 2020*. [http://www.ugandasugar.org/pdf/MECAS\(12\)19%20%20World%20Fuel%20Ethanol%20Outlook%20to%202020%20-%20English.pdf](http://www.ugandasugar.org/pdf/MECAS(12)19%20%20World%20Fuel%20Ethanol%20Outlook%20to%202020%20-%20English.pdf) [diakses 15 Juli 2014].
- Izmirliloglu, G. dan Demirci, A. 2012. Ethanol production from Waste Potato Mash by Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Science* 2012 (2): 738-753.
- Kartika, B., A.D., Guritno, D., Purwadi, dan Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Kent, J.A. 2013. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. https://books.google.co.id/books?id=7VxDAAAQBAJ&dq=yield+ethanol+calculation&source=gbs_navlinks_s [diakses 19 Maret 2015].
- 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.
- Kristiansen, B., Linden, J., dan Matthey, M. 2002. *Citric Acid Biotechnology*. London: CRC Press.
- Laopaiboon, L. dan Laopaiboon, P. 2011. Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice in Repeated-Batch Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on Corn cob. *World J Microbial Bioetchnol* (2012) 28:559-566.
- Lee, Y.K. 2006. *Microbial Technology : Principles and Applications*. https://books.google.co.id/books?id=P3enKvasnywC&dq=microbial+growth+rate+is&source=gbs_navlinks_s [diakses 23 Mei 2015].
- Lin, Y. dan Tanaka,S. 2006. Ethanol Fermentation from Biomass Resources : Current States and Prospect. *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 69: 627-642.
- Liu, Z.L. 2011. *Microbial Stress Tolerance for Biofuels: Systems Biology*. https://books.google.co.id/books?id=axa36SwndHkC&source=gbs_navlinks_s [diakses 7 Maret 2015].

- Machfud. 1988. *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*. 31:426-428.
- Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K., dan Zia-ul-Hussain, S. 2010. Comparative Study on Two Commercial Strains of *saccharomyces cerevisiae* for Optimum Ethanol Production on Industrial Scale. *Journal of Biomedicine and Bioechnology Volume 2010*.
- Mushet, C., La Table, S., dan Caruso, M. 2008. *The Art and Soul of Baking*. <https://books.google.co.id/books?id=7O5YpNRnpNoC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false> [diakses 25 Maret 2015].
- Narendranath, N.V. dan Power, R. 2005. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology 2005* : 2239-2243.
- Nevoigt, E. 2008. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 2008*, 72(3):379.
- Nurdyastuti, I. 2008. *Teknologi Proses Produksi Bio-Ethanol*. Jakarta : Balai Besar Teknologi Pati-BPPT.
- Nurrohim, A. 2014. Perlu Terobosan Kebijakan untuk Pencapaian Target Pemakaian Bahan Bakar Nabati. *IPTEK untuk Indonesia Sejahtera, Berdaulat & Bermartabat : Bunga Rampai Pemikiran Anggota Dewan Riset Nasional 2014*. Jakarta: Dewan Riset Nasional.
- Olbrich, H. 1963. *The Molasses*. Berlin : Biotechnologie – Kempe GmbH.
- Panikov, N.S. 2014. *Kinetics, Microbial Growth*. https://www.researchgate.net/profile/Nicolai_Panikov/publication/220042850_Kinetics_Microbial_Growth/links/0fcfd50bfa37eb6dcd000000.pdf [diakses 18 Maret 2015].
- Pereira, F.B., Guimares, P.M.R., Teixeira, J.A., dan Domingues, L. 2010. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Efficient Very High Gravity Bio-Ethanol Fermentation Processes. *Bioetchnol Lett (2010) 32* : 1655-1661.

- Qureshi, N., Hodge, D., dan Vertes, A. 2014. *Biorefineries: Biochemical Processes for Liquid Biofuels*. https://books.google.co.id/books?id=2Uh1AgAAQBAJ&dq=factors+affecting+ethanol+fermentation&source=gbs_navlinks_s [diakses 7 Maret 2015].
- Rathore, S.S.S. 2008. *Decision Making in Dry-Grind Ethanol Industry Using Near-Infrared Spectroscopy*. Disertasi <https://books.google.com/books?id=8uGW3WoH210C&pg=PA63&lpg=PA63&dq=> [diakses 10 Juni 2015].
- Ristiati, N. P. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional.
- Rodmui, A., Kongkiattikajorn, J., dan Dandusitapun, Y. Optimization of Agitation Conditions for Maximum Ethanol Production by Coculture. *Kasetsart Journal (Natural Science) 42: 285-293*.
- Rose, A.H. dan Harrison, J.S. 2012. *The Yeasts: Yeast Technology*. https://books.google.co.id/books?id=VQ9_V3IVcAEC&dq=The+Yeasts&source=gbs_navlinks_s [diakses 20 Maret 2015].
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., dan Salmon, J. 2003. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied and Environmental Microbiology (2003) 69 (1) : 113-121*.
- Rubio-Arroyo, M.F., Vivanco-Loyo, P., Juarez, M., Poisot, M., dan Ramirez-Galicia, G. 2011. Bio-Ethanol Obtained by Fermentation Process with Continuous Feeding of Yeast. *J. Mex. Chem. Soc. 2011, 55(4): 242-245*.
- Sadik, M.W. dan Halema, A.A. 2014. Production of Ethanol from Molasses and Whey Permeate using Yeasts and Bacterial Strains. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences Volume 3 Number 3: 804-818*.
- Salvadó, Z., Lopez, F.N.A., Guillamon, J.M., Salazar, G., Querol, A., dan Barrio, E. 2011. Temperature Adaptation Markedly Determines Evolution within Genus *Saccharomyces*. *Applied and Environmental Microbiology 2011, 77(7): 2292*.
- Sanchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A. J., dan Camacho, F. 1997. The Influence of pH and Aeration Rate on The Fermentation of D-Xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology 21: 355-360*.
- Sang-Eun, L., Hyeon-Beom, S., Min-Cheol, K., Hyeon-Yong, L., dan Kyung-Hwan, J. 2010. Operational Strategy for Increasing Ethanol Production in Repeated Fed-batch Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal (2010) 25: 187-192*.

- Satyanarayana, T., Johri, B.I., dan Prakash, A. 2012. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Science and Business Media.
- Schneiter, R. 2004. *Genetics, Molecular and Cell Biology of Yeast*. University of Friburgensis.
- Setiadji. 2009. *Diktat Kuliah Kimia Organik*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Shah, S.F.A. 2010. *Enhanced Production of Ethanol from Sugar Cane Molasses Through Thermotolerant Saccharomyces cerevisiae Cell*. Tesis. Jamshoro: Mehran University of Engineering and Technology.
- Shakhashiri. 2009. *Ethanol*. [http:// www.scifun.org/chem week/pdf/ethanol](http://www.scifun.org/chem_week/pdf/ethanol) [diakses 05 Juli 2014].
- Sheela, H.S., Ahmed, M.F., dan Gomes, D.J. 2008. Fuel Ethanol Production from Molasses by Some Indigenous Yeast. *Bangladesh J Microbiol Volume 25(2)*: 129-133.
- Smith, P.G. 2007. *Application of Fluidization to Food Processing*. Oxford: Blackwell Publishing Company.
- Socol, C.R., Pandey, A., dan Larroche C. 2013. *Fermentation Processes Engineering in the Food Industry*. https://books.google.co.id/books?id=yE0Rhh6PrukC&dq=factors+affecting+alcoholic+fermentation&source=gbs_navlinks_s [diakses 20 Maret 2015].
- Suwasono, S., Fauzi, M., dan Lindriati, T. 2002. *Teknologi Fermentasi*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.
- Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasakai, H., dan Yamashita, M. 2007. Phenolic Compounds from sugarcane Molasses Possesing Antibacterial Activity against Cariogenic Bacteria. *Journal of Oleo Science 56 (11)*:611-614.
- Thammasittirong, S.N., Thirasaktana, T., Thammasittirong, A., dan Srisoduk, M. 2013. Improvement of Ethanol Production by Ethanol-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* UVNR56. *Springer Plus 2013 (2)*: 583.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., dan Ingleedew, W.M. 2002. Influence of Medium Buffering capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. *Applied and Enviromental Microbiology 2002, 68(4)*: 1616.
- Trust, N. 2008. *Ethanol Fermentation: Batch Reactor Design Basics*. New Jersey: Hackensack.

- Walker, G. M. 2010. *Bioethanol : Science and Technology of Fuel Alcohol*. <http://www.zums.ac.ir/files/research/site/ebooks/petroleum-gas-oil/bioethanol-science-and-technology-of-fuel-alcohol.pdf> [diakses 05 Juli 2014].
- World Data Bank. 2014. *World Development Indicators : Energy production and Use*. <http://wdi.worldbank.org/table/3.6> [diakses 08 Juli 2014].
- Xueying, S. 2011. *Preparation of Ethanol by Fermentation from Mechanical Grinding Washing Waters in Laboratory Scale*. Online. https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/38208/Shang_Xueying.pdf?sequence=1 [diakses 07 Juli 2014].
- Yan, L., Tiansheng, Qi., Naikun, S., Mingzhe, G., Yanling, J., dan Hai, Z. 2009. Improvement of Ethanol Concentration and Yield by Initial Aeration and Agitation Culture in Very High Gravity Fermentation. *ChinJ Appl Environ Biol* 15 (4): 563-567.
- Yingling, B., Zongcheng, Y., Honglin, W., dan Li, C. 2010. Optimization of Bioethanol Production during Simultaneous Saccharification and Fermentation in Very High-Gravity Cassava Mash. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:329-339.
- Yusma. 1999. *Pemanfaatan Limbah Molase dalam Pembuatan Etanol Secara Fermentasi*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Zabrockis, E.A dan Coviello, M.F. 2009. *Design and Feasibility Study of An Ethanol Distillery in Guyana*. Chile : Unite Nations Publication.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J.N., Azirun, M.S., Hashim, R., dan Boyce, A.N. 2014. Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. *The Scientific World Journal* (2014).

LAMPIRAN

Lampiran A. Data Pengukuran pH

Waktu (Jam)	A1B1		Rerata	STDEV	A2B1		Rerata	STDEV
	1	2			1	2		
0	4,30	4,30	4,30	0,00	4,30	4,30	4,30	0,00
12	4,30	4,30	4,30	0,00	4,30	4,30	4,30	0,00
24	4,40	4,40	4,40	0,00	4,40	4,40	4,40	0,00
36	4,40	4,40	4,40	0,00	4,40	4,40	4,40	0,00
48	4,40	4,40	4,40	0,00	4,40	4,40	4,40	0,00
72	4,40	4,40	4,40	0,00	4,40	4,40	4,40	0,00

Waktu (Jam)	A1B2		Rerata	STDEV	A2B2		Rerata	STDEV
	1	2			1	2		
0	4,30	4,30	4,30	0,00	4,30	4,30	4,30	0,00
12	4,40	4,40	4,40	0,00	4,40	4,40	4,40	0,00
24	4,50	4,50	4,50	0,00	4,50	4,50	4,50	0,00
36	4,50	4,50	4,50	0,00	4,50	4,50	4,50	0,00
48	4,50	4,50	4,50	0,00	4,50	4,50	4,50	0,00
72	4,50	4,50	4,50	0,00	4,50	4,50	4,50	0,00

Lampiran B. Data Pengukuran Kadar Brix

Waktu (Jam)	A1B1		Rerata	STDEV	A2B1		Rerata	STDEV
	1	2			1	2		
0	24,00	24,00	24,00	0,00	24,00	24,00	24,00	0,00
12	19,00	19,00	19,00	0,00	19,00	20,00	19,50	0,50
24	16,00	17,00	16,50	0,50	16,00	17,00	16,50	0,50
36	16,00	15,00	15,50	0,50	15,00	16,00	15,50	0,50
48	16,00	15,00	15,50	0,50	15,00	16,00	15,50	0,50
72	16,00	14,00	15,00	1,00	14,00	16,00	15,00	1,00

Waktu (Jam)	A1B2		Rerata	STDEV	A2B2		Rerata	STDEV
	1	2			1	2		
0	24,00	24,00	24,00	0,00	24,00	24,00	24,00	0,00
12	16,00	17,00	16,50	0,50	18,27	19,00	18,64	0,37
24	15,00	15,00	15,00	0,00	15,00	16,00	15,50	0,50
36	15,00	15,00	15,00	0,00	15,00	15,00	15,00	0,00
48	15,00	15,00	15,00	0,00	15,00	15,00	15,00	0,00
72	15,00	15,00	15,00	0,00	15,00	15,00	15,00	0,00

Lampiran C. Data Populasi Pertumbuhan Yeast

Waktu (Jam)	Populasi A1B1 (cfu/ml)		Log (cfu/ml)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$5,1 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$	5,71	5,92	5,81	0,11
12	$6,8 \times 10^7$	$2,9 \times 10^8$	7,83	8,46	8,15	0,31
24	$7,9 \times 10^7$	$3,4 \times 10^8$	7,90	8,53	8,21	0,32
36	$1,2 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	8,08	8,72	8,40	0,32
48	$1,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	8,26	8,40	8,33	0,07
72	$3,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	7,52	7,48	7,50	0,02

Waktu (Jam)	Populasi A2B1 (cfu/ml)		Log (cfu/ml)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$7,0 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	5,85	5,73	5,79	0,06
12	$8,9 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	7,95	7,80	7,87	0,08
24	$9,9 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$	8,00	7,91	7,95	0,04
36	$1,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	8,08	8,18	8,13	0,05
48	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	8,11	8,04	8,08	0,04
72	$5,0 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	6,70	6,74	6,74	0,02

Waktu (Jam)	Populasi A1B2 (cfu/ml)		Log (cfu/ml)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$5,1 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$	5,71	5,92	5,81	0,11
12	$7,7 \times 10^7$	$5,8 \times 10^7$	7,89	7,76	7,82	0,06
24	$1,0 \times 10^8$	$9,7 \times 10^7$	8,00	7,99	7,99	0,01
36	$2,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	8,36	8,62	8,49	0,13
48	$6,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	7,78	8,41	8,10	0,32
72	$4,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	7,60	7,70	7,60	0,05

Waktu (Jam)	Populasi A2B2 (cfu/ml)		Log (cfu/ml)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	$7,0 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	5,85	5,73	5,79	0,06
12	$1,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	8,20	8,32	8,26	0,06
24	$1,6 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	8,20	8,45	8,33	0,12
36	$3,9 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	8,59	8,41	8,50	0,09
48	$6,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	7,78	7,70	7,74	0,04
72	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	7,04	7,48	7,26	0,22

Lampiran D. Data Perhitungan *Growth Rate*

Waktu (Jam)	Ln Populasi A1B1 (cfu/ml)		μ (/jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	13,14	13,63	0,408	0,488	0,448	0,057
12	18,04	19,49				

Waktu (Jam)	Ln Populasi A2B1 (cfu/ml)		μ (/jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	13,46	13,20	0,404	0,397	0,400	0,005
12	18,30	17,96				

Waktu (Jam)	Ln Populasi A1B2 (cfu/ml)		μ (/jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	13,14	13,63	0,418	0,354	0,386	0,045
12	18,16	17,88				

Waktu (Jam)	Ln Populasi A2B2 (cfu/ml)		μ (/jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	13,46	13,20	0,453	0,497	0,475	0,031
12	18,89	19,16				

Contoh perhitungan *Growth rate* (A1B1):

$$\begin{aligned} \text{a. Ulangan 1, } \mu_1 &= \frac{\text{Ln populasi yeast jam ke 12} - \text{Ln populasi yeast jam ke 0}}{\text{Lama fase log (jam ke 12 - jam ke 0)}(\Delta t)} \\ &= \frac{18,04 - 13,14}{12} = 0,408/\text{jam} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Ulangan 2, } \mu_2 &= \frac{\text{Ln populasi yeast jam ke 12} - \text{Ln populasi yeast jam ke 0}}{\text{Lama fase log (jam ke 12 - jam ke 0)}(\Delta t)} \\ &= \frac{19,49 - 13,63}{12} = 0,488/\text{jam} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. Rerata } \mu &= \frac{\mu_1 + \mu_2}{2} \\ &= \frac{0,408 + 0,488}{2} = 0,448/\text{jam} \end{aligned}$$

Lampiran E. Data Perhitungan *Growth Yield*

Waktu (Jam)	Δx A1B1		Δs A1B1		Y x/s		Rerata	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
12	2,44	1,90	126,938	130,092	0,0192	0,0146	0,0169	0,0032
24	2,50	2,07	253,877	252,825	0,0099	0,0082	0,0090	0,0012
36	2,69	2,57	262,024	263,600	0,0103	0,0098	0,0100	0,0004
48	2,62	2,18	263,601	264,914	0,0099	0,0082	0,0091	0,0012
72	1,81	1,68	266,492	267,805	0,0068	0,0063	0,0065	0,0004

Waktu (Jam)	Δx A2B1		Δs A2B1		Y x/s		Rerata	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
12	2,10	2,07	94,613	100,132	0,0222	0,0207	0,0214	0,0011
24	2,15	2,18	230,224	223,653	0,0093	0,0097	0,0095	0,0003
36	2,23	2,45	237,845	237,320	0,0094	0,0103	0,0098	0,0007
48	2,26	2,31	243,890	244,678	0,0093	0,0094	0,0094	0,0001
72	0,89	0,97	249,935	248,883	0,0036	0,0039	0,0037	0,0002

Waktu (Jam)	Δx A1B2		Δs A1B2		Y x/s		Rerata	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
12	2,18	1,84	166,360	162,944	0,0131	0,0113	0,0122	0,0013
24	2,29	2,07	257,819	258,608	0,0089	0,0080	0,0084	0,0006
36	2,65	2,70	268,331	267,543	0,0099	0,0101	0,0100	0,0002
48	2,07	2,49	269,908	270,171	0,0077	0,0092	0,0084	0,0011
72	1,89	1,78	272,799	271,485	0,0069	0,0066	0,0067	0,0003

Waktu (Jam)	Δx A2B2		Δs A2B2		Y x/s		Rerata	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
12	2,35	2,59	149,015	146,911	0,0158	0,0176	0,0167	0,0013
24	2,35	2,72	233,377	232,325	0,0101	0,0117	0,0109	0,0011
36	2,74	2,68	246,781	246,517	0,0111	0,0109	0,0110	0,0002
48	1,93	1,97	249,672	250,459	0,0077	0,0079	0,0078	0,0001
72	1,19	1,75	252,826	252,562	0,0047	0,0069	0,0058	0,0016

Contoh perhitungan *Growth yield* (A2B2 pada jam ke-36):

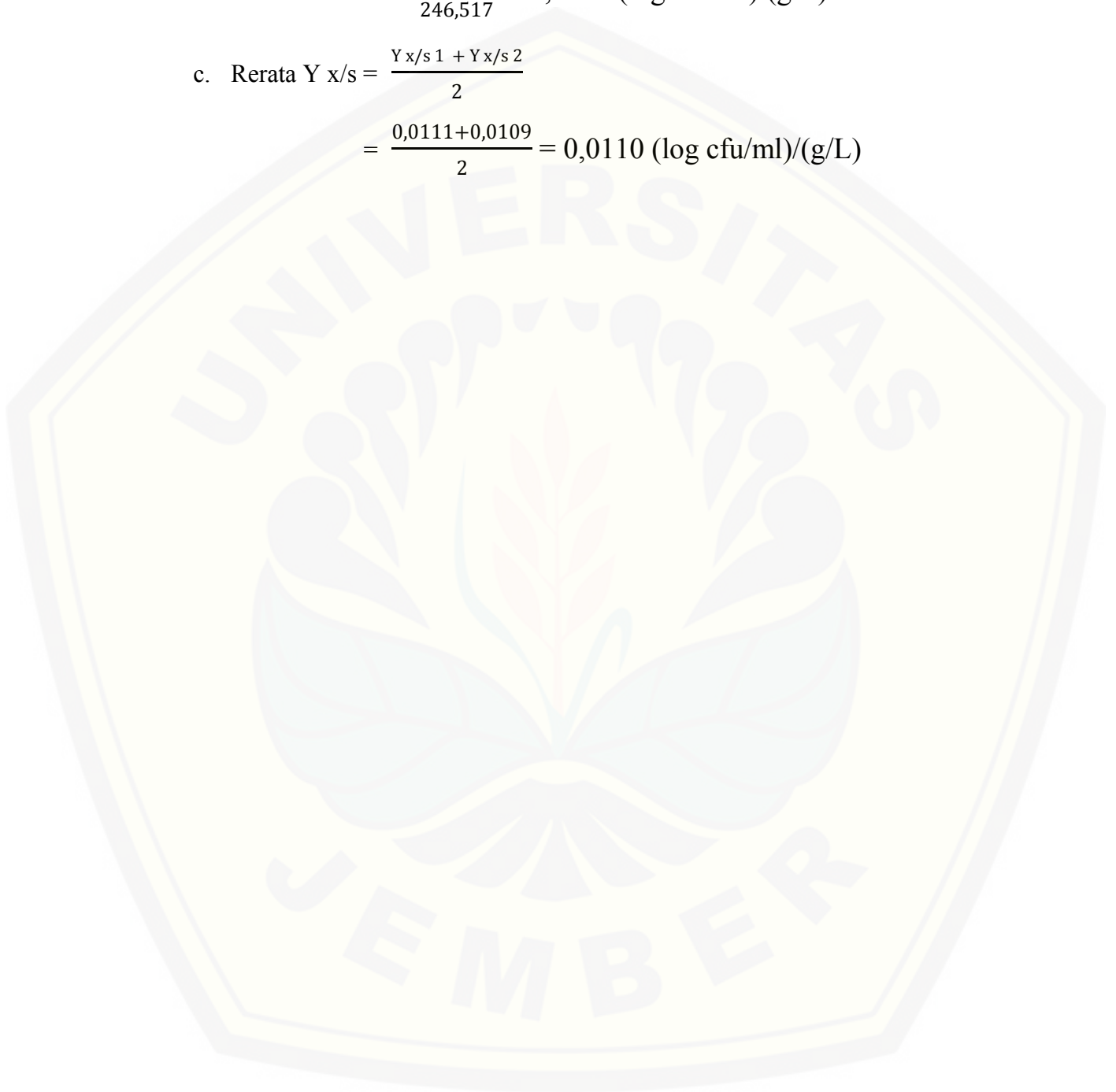
$$\begin{aligned}
 \text{a. Ulangan 1, } Y_{x/s} 1 &= \frac{\text{populasi yeast jam ke 36} - \text{populasi yeast jam ke 0 } (\Delta x)}{\text{gula reduksi jam ke 0} - \text{gula reduksi jam 36 } (\Delta s)} \\
 &= \frac{2,74}{246,781} = 0,0111 \text{ (log cfu/ml)/(g/L)}
 \end{aligned}$$

b. Ulangan 2, $Y_{x/s 2} = \frac{\text{populasi yeast jam ke 36} - \text{populasi yeast jam ke 0 } (\Delta x)}{\text{gula reduksi jam ke 0} - \text{gula reduksi jam 36 } (\Delta s)}$

$$= \frac{2,68}{246,517} = 0,0109 \text{ (log cfu/ml)/(g/L)}$$

c. Rerata $Y_{x/s} = \frac{Y_{x/s 1} + Y_{x/s 2}}{2}$

$$= \frac{0,0111 + 0,0109}{2} = 0,0110 \text{ (log cfu/ml)/(g/L)}$$



Lampiran F. Kadar Gula Reduksi

F.1. Nilai Absorbansi Glukosa dan Kurva Standar

- Larutan gula standar = 0,1% = 0,1 g/100 ml = 1 mg/ml dan dari larutan tersebut dibuat seri konsentrasi larutan glukosa dengan cara:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan :

V1 = volume larutan glukosa standar 1mg/ml yang akan diambil

M1 = konsentrasi larutan glukosa standar (1mg/ml)

V2 = volume akhir larutan dengan konsentrasi yang diinginkan (ditera ke 10 ml)

M2 = konsentrasi larutan glukosa yang diinginkan

- Misalkan konsentrasi larutan glukosa yang diinginkan adalah 0,05 mg/ml, maka V1 yang harus diambil adalah sebagai berikut :

$$V_1 \times 1 \text{ mg/ml} = 10 \text{ ml} \times 0,05 \text{ mg/ml}$$

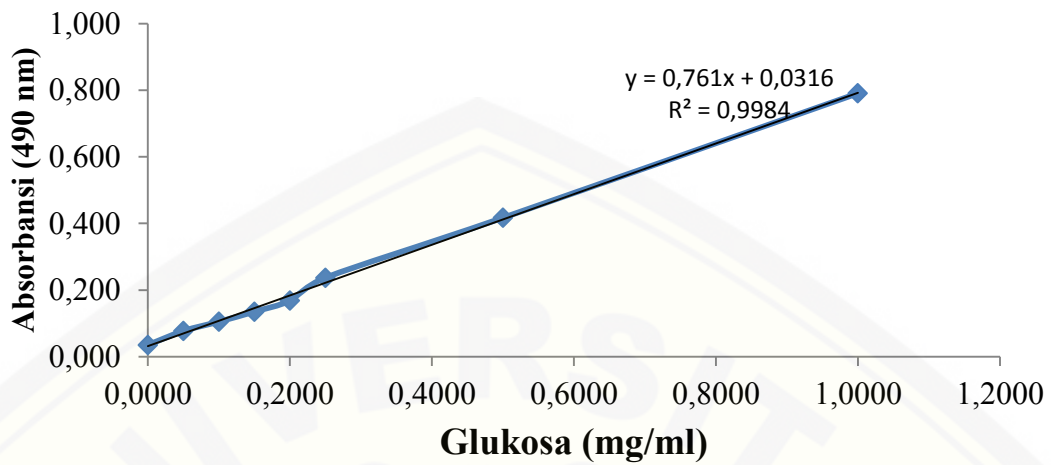
$$V_1 = (10 \text{ ml} \times 0,05 \text{ mg/ml}) / 1 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Setelah diketahui V1, maka diambil sebanyak 0,5 ml V1 dan ditera ke 10 ml yang kemudian dari larutan tersebut diambil 0,5 ml untuk dilakukan analisa sebagai berikut:

Glukosa (mg/ml)	DNS (ml)	Penambahan Aquades setelah dipanaskan (ml)	Absorbansi (540 nm)	Volume total (ml)
0,00	1	5	0,035	6,5
0,05	1	5	0,077	6,5
0,10	1	5	0,105	6,5
0,15	1	5	0,135	6,5
0,20	1	5	0,168	6,5
0,25	1	5	0,237	6,5
0,50	1	5	0,417	6,5
1,00	1	5	0,791	6,5

Kurva Standar Gula Reduksi :



Persamaan Linier yang diperoleh adalah $y = 0,761x + 0,0316$

- Kadar Gula Reduksi (mg/ml) = $x \times \text{FP}$; dimana $x = \frac{y-0,0316}{0,761}$

Keterangan :

y = absorbansi sampel;

FP = faktor pengenceran sampel (0,1 ml sampel ditera dengan aquades hingga 10 ml, sehingga memiliki faktor pengenceran sebesar 100)

- Laju konsumsi gula reduksi = $\frac{\text{Gula Reduksi jam ke 0} - \text{Gula reduksi jam ke } -x (\Delta S)}{\text{Lama fermentasi } (\Delta t)}$

F.2. Data Kadar Gula Reduksi Selama Fermentasi

Waktu (Jam)	A1B1 (Absorbansi)		Kadar gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	1,210	1,217	309,698	311,537	310,618	0,013
12	0,727	0,722	182,760	181,445	182,102	0,009
24	0,244	0,255	55,821	58,712	57,267	0,020
36	0,213	0,214	47,674	47,937	47,806	0,002
48	0,207	0,209	46,097	46,623	46,360	0,004
72	0,196	0,198	43,206	43,732	43,469	0,004

Waktu (Jam)	A2B1 (Absorbansi)		Kadar gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	1,125	1,125	287,359	287,359	287,359	0,000
12	0,765	0,744	192,746	187,227	189,987	0,039
24	0,249	0,274	57,135	63,706	60,420	0,046
36	0,220	0,222	49,514	50,039	49,777	0,004
48	0,197	0,194	43,469	42,681	43,075	0,006
72	0,174	0,178	37,424	38,476	37,950	0,007

Waktu (Jam)	A1B2 (Absorbansi)		Kadar gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	1,215	1,211	311,012	309,961	310,486	0,007
12	0,582	0,591	144,652	147,017	145,834	0,017
24	0,234	0,227	53,193	51,353	52,273	0,013
36	0,194	0,193	42,681	42,418	42,549	0,002
48	0,188	0,183	41,104	39,790	40,447	0,009
72	0,177	0,178	38,213	38,476	38,344	0,002

Waktu (Jam)	A2B2 (Absorbansi)		Kadar gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	1,136	1,137	290,250	290,512	290,381	0,002
12	0,569	0,578	141,235	143,601	142,418	0,017
24	0,248	0,253	56,873	58,187	57,530	0,009
36	0,197	0,199	43,469	43,995	43,732	0,004
48	0,186	0,184	40,578	40,053	40,315	0,004
72	0,174	0,176	37,424	37,950	37,687	0,004

Contoh perhitungan kadar gula reduksi (A1B1 pada jam ke-36):

Volume total pada saat analisa adalah 6,5 ml yang terdiri dari:

Sampel (ml)	Aquades (ml)	DNS (ml)	Penambahan Aquades setelah dipanaskan (ml)	Volume total (ml)
0,25	0,25	1	5	6,5

Sebelum dianalisa sampel diencerkan dengan faktor pengenceran 100, selanjutnya diambil 0,25 ml dan diencerkan kembali dengan aquades sebanyak 0,25 ml, sehingga didapatkan faktor pengenceran 2, maka perhitungan kadar gula reduksi sampel adalah sebagai berikut:

- Kadar gula reduksi ulangan 1 = $((0,213-0,0316)/0,761)) = 0,2384 \text{ mg/ml}$
 $= 0,2384 \times 100 \times 2 = 47,674 \text{ g/L}$
- Kadar gula reduksi ulangan 2 = $((0,214-0,0316)/ 0,761)) = 0,2397 \text{ mg/ml}$
 $= 0,2397 \times 100 \times 2 = 47,937 \text{ g/L}$
- Rerata Gula Reduksi = $\frac{(47,674 + 47,937)}{2} = 47,806 \text{ g/L}$

F.3. Data Laju Konsumsi Gula Reduksi Selama Fermentasi

A1B1								
Lama Fermentasi (jam)	Gula Reduksi (g/L)		Konsumsi Gula Reduksi (ΔS) (g/L)		Laju Konsumsi Gula Reduksi (/jam)			
	1	2	1	2	1	2	Rerata	STDEV
0	309,698	311,537	0,000	0,000	0	0	0,000	0,000
12	182,760	181,445	126,938	130,092	10,578	10,841	10,710	0,186
24	55,821	58,712	253,877	252,825	10,578	10,534	10,556	0,031
36	47,674	47,937	262,024	263,600	7,278	7,322	7,300	0,031
48	46,097	46,623	263,601	264,914	5,492	5,519	5,505	0,019
72	43,206	43,732	266,492	267,805	3,701	3,720	3,710	0,013

A2B1								
Lama Fermentasi (jam)	Gula Reduksi (g/L)		Konsumsi Gula Reduksi (ΔS) (g/L)		Laju Konsumsi Gula Reduksi (/jam)			
	1	2	1	2	1	2	Rerata	STDEV
0	287,359	287,359	0,000	0,000	0	0	0,000	0,000
12	192,746	187,227	94,613	100,132	7,884	8,344	8,114	0,325
24	57,135	63,706	230,224	223,653	9,593	9,319	9,456	0,194
36	49,514	50,039	237,845	237,320	6,607	6,592	6,600	0,010
48	43,469	42,681	243,890	244,678	5,081	5,097	5,089	0,012
72	37,424	38,476	249,935	248,883	3,471	3,457	3,464	0,010

A1B2								
Lama Fermentasi (jam)	Gula Reduksi (g/L)		Konsumsi Gula Reduksi (ΔS) (g/L)		Laju Konsumsi Gula Reduksi (/jam)			
	1	2	1	2	1	2	Rerata	STDEV
0	311,012	309,961	0,000	0,000	0	0	0,000	0,000
12	144,652	147,017	166,360	162,944	13,863	13,579	13,721	0,201
24	53,193	51,353	257,819	258,608	10,742	10,775	10,759	0,023
36	42,681	42,418	268,331	267,543	7,454	7,432	7,443	0,015
48	41,104	39,790	269,908	270,171	5,623	5,629	5,626	0,004
72	38,213	38,476	272,799	271,485	3,789	3,771	3,780	0,013

A2B2								
Lama Fermentasi (jam)	Gula Reduksi (g/L)		Konsumsi Gula Reduksi (ΔS) (g/L)		Laju Konsumsi Gula Reduksi (/jam)			
	1	2	1	2	1	2	Rerata	STDEV
0	290,250	290,512	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	141,235	143,601	149,015	146,911	12,418	12,243	12,330	0,124
24	56,873	58,187	233,377	232,325	9,724	9,680	9,702	0,031
36	43,469	43,995	246,781	246,517	6,855	6,848	6,851	0,005
48	40,578	40,053	249,672	250,459	5,201	5,218	5,210	0,012
72	37,424	37,950	252,826	252,562	3,511	3,508	3,510	0,003

Contoh perhitungan laju konsumsi gula reduksi (A2B2, lama fermentasi 36 jam, ul. 1)

- Laju konsumsi gula reduksi = $\frac{246,781}{36} = 6,855$ g/L/jam

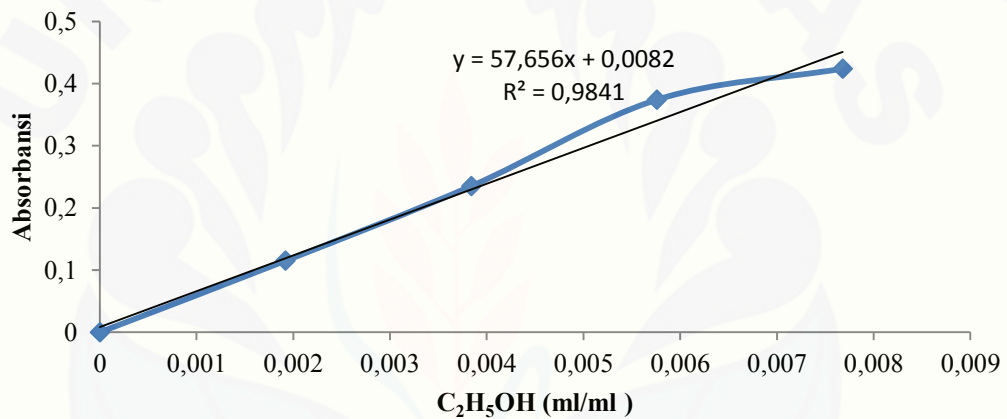
Lampiran G. Konsentrasi etanol

G.1. Nilai Absorbansi Etanol dan Kurva Standar

Sebanyak 1 ml etanol 96% ditera menjadi 100 ml dan diambil:

Etanol 0,96% (ml)	Aquades (ml)	Etanol (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

Kurva Standart Etanol



- Konsentrasi C_2H_5OH (ml/ml) $x = \frac{y-0,0082}{57,656}$
- Konsentrasi C_2H_5OH (g/ml) $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{0,789 \text{ g}}{\text{ml}}$
- Konsentrasi C_2H_5OH (ml/L) $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{1000 \text{ ml}}{\text{L}}$

Keterangan :

- Sebelum dianalisa sampel diencerkan dengan faktor pengenceran 20 \rightarrow 0,5 ml sampel ditera dengan aquades hingga 10 ml.
- y = absorbansi sampel; Berat jenis etanol = 0,789 g/mL

Perhitungan kinetika produksi etanol :

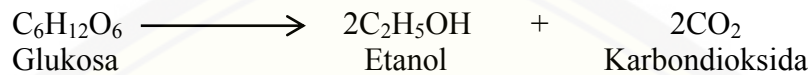
$$a. \text{Yield Etanol (g/g)} = \frac{\text{Etanol yang dihasilkan}}{\text{Gula yang dikonsumsi}}$$

$$\text{b. Produktivitas Etanol (g/L/jam)} = \frac{\text{Etanol yang dihasilkan}}{\text{Waktu fermentasi}}$$

$$\text{c. Efisiensi Fermentasi (\%)} = \frac{\text{Etanol yang dihasilkan}}{\text{Etanol teoritis}} \times 100$$

Perhitungan etanol teoritis :

1 mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol, seperti dalam persamaan berikut:



$\text{mol} = \frac{\text{gram}}{\text{Mr}}$; 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.

G.2 Data Konsentrasi etanol dan Produktivitas Etanol

Waktu (jam)	A1B1		Kons. Etanol (ml/l)		Etanol (%)		Etanol (g/L)		Rerata		Rerata		STDEV (g/L/jam)		Rerata		STDEV		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
12	0,237	0,239	3,968	4,003	6,262	6,317	62,621	63,168	6,289	62,894	0,049	5,218	5,264	5,241	0,032				
24	0,32	0,328	5,408	5,547	8,534	8,753	85,337	87,527	8,643	86,432	0,196	3,556	3,647	3,601	0,065				
36	0,37	0,379	6,275	6,431	9,902	10,149	99,022	101,485	10,025	100,253	0,221	2,751	2,819	2,785	0,048				
48	0,337	0,35	5,703	5,928	8,999	9,355	89,990	93,548	9,177	91,769	0,319	1,875	1,949	1,912	0,052				
72	0,317	0,327	5,356	5,529	8,452	8,725	84,516	87,253	8,588	85,885	0,245	1,174	1,212	1,193	0,027				
Waktu (jam)	A2B1		Kons. Etanol (ml/l)		Etanol (%)		Etanol (g/L)		Rerata		Rerata		STDEV (g/L/jam)		Rerata		STDEV		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
12	0,185	0,179	3,066	2,962	4,839	4,675	48,389	46,747	4,757	47,568	0,116	4,032	3,896	3,964	0,097				
24	0,362	0,33	6,136	5,581	9,683	8,807	96,832	88,074	9,245	92,453	0,619	4,035	3,670	3,852	0,258				
36	0,369	0,399	6,258	6,778	9,875	10,696	98,748	106,959	10,285	102,854	0,581	2,743	2,971	2,857	0,161				
48	0,356	0,345	6,032	5,842	9,519	9,218	95,190	92,180	9,368	93,685	0,213	1,983	1,920	1,952	0,044				
72	0,318	0,335	5,373	5,668	8,479	8,944	84,790	89,443	8,712	87,116	0,329	1,178	1,242	1,210	0,046				
Waktu (jam)	A1B2		Kons. Etanol (ml/l)		Etanol (%)		Etanol (g/L)		Rerata		Rerata		STDEV (g/L/jam)		Rerata		STDEV		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
12	0,268	0,223	4,506	3,726	7,111	5,879	71,105	58,789	6,495	64,947	0,871	5,925	4,899	5,412	0,726				
24	0,296	0,305	4,992	5,148	7,877	8,123	78,769	81,232	8,000	80,000	0,174	3,282	3,385	3,333	0,073				
36	0,428	0,469	7,281	7,992	11,490	12,612	114,896	126,117	12,051	120,507	0,793	3,192	3,503	3,347	0,220				
48	0,378	0,367	6,414	6,223	10,121	9,820	101,211	98,201	9,971	99,706	0,213	2,109	2,046	2,077	0,044				
72	0,357	0,354	6,050	5,998	9,546	9,464	95,464	94,643	9,505	95,053	0,058	1,326	1,314	1,320	0,008				

Waktu (jam)	A2B2		Kons. Etanol (ml/l)		Etanol (%)		Etanol (g/L)		Rerata		Rerata		STDEV (g/L/jam)		Rerata		STDEV		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
12	0,194	0,224	3,223	3,743	5,085	5,906	50,852	59,063	5,496	54,957	0,581	4,238	4,922	4,580	0,484				
24	0,374	0,343	6,345	5,807	10,012	9,163	100,117	91,632	9,587	95,874	0,600	4,172	3,818	3,995	0,250				
36	0,432	0,468	7,350	7,975	11,599	12,584	115,991	125,844	12,092	120,917	0,697	3,222	3,496	3,359	0,194				
48	0,401	0,412	6,813	7,004	10,751	11,052	107,506	110,517	10,901	109,012	0,213	2,240	2,302	2,271	0,044				
72	0,37	0,323	6,275	5,460	9,902	8,616	99,022	86,158	9,259	92,590	0,910	1,375	1,197	1,286	0,126				

Contoh perhitungan konsentrasi etanol dan produktivitas (A2B2 pada jam ke-12, Ulangan 1):

a. $\text{Konsentrasi etanol sampel (ml/ml)} = \frac{0,194 - 0,0082}{57,656} = 0,0032 \text{ ml}$

b. $\text{Konsentrasi etanol sampel (ml/l)} = \frac{0,0032 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 3,223 \text{ ml/L}$

c. $\text{Konsentrasi etanol sampel (g/l)} = 3,223 \times 0,789 \times 20 = 50,852 \text{ g/L}$

a. $\text{Produktivitas} = 50,852/12 = 4,238 \text{ g/L/jam}$

G.3 Data Perhitungan Yield Etanol dan Efisiensi Fermentasi

Waktu (jam)	AIBI As		Y p/s (g/g)		Rerata		STDEV		Efisiensi		Rerata		Efisiensi (%)		STDEV	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	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	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12	126,938	130,092	0,493	0,486	0,489	0,005	0,965	0,950	0,95762	95,76	0,011					
24	253,877	252,825	0,336	0,346	0,341	0,007	0,658	0,677	0,66751	66,75	0,014					
36	262,024	263,600	0,378	0,385	0,381	0,005	0,739	0,753	0,74634	74,63	0,010					
48	263,601	264,914	0,341	0,353	0,347	0,008	0,668	0,691	0,67943	67,94	0,016					
72	266,492	267,805	0,317	0,326	0,321	0,006	0,621	0,637	0,62899	62,90	0,012					

Waktu (jam)	A2B1 Δs		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi		Rerata	Efisiensi (%)	STDEV
	1	2	1	2			1	2			
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000	0,00	0,000
12	94,613	100,132	0,511	0,467	0,489	0,032	1,001	0,913	0,95705	95,70	0,062
24	230,224	223,653	0,421	0,394	0,407	0,019	0,823	0,770	0,79671	79,67	0,037
36	237,845	237,320	0,415	0,451	0,433	0,025	0,812	0,882	0,84707	84,71	0,049
48	243,890	244,678	0,390	0,377	0,384	0,010	0,764	0,737	0,75038	75,04	0,019
72	249,935	248,883	0,339	0,359	0,349	0,014	0,664	0,703	0,68345	68,35	0,028

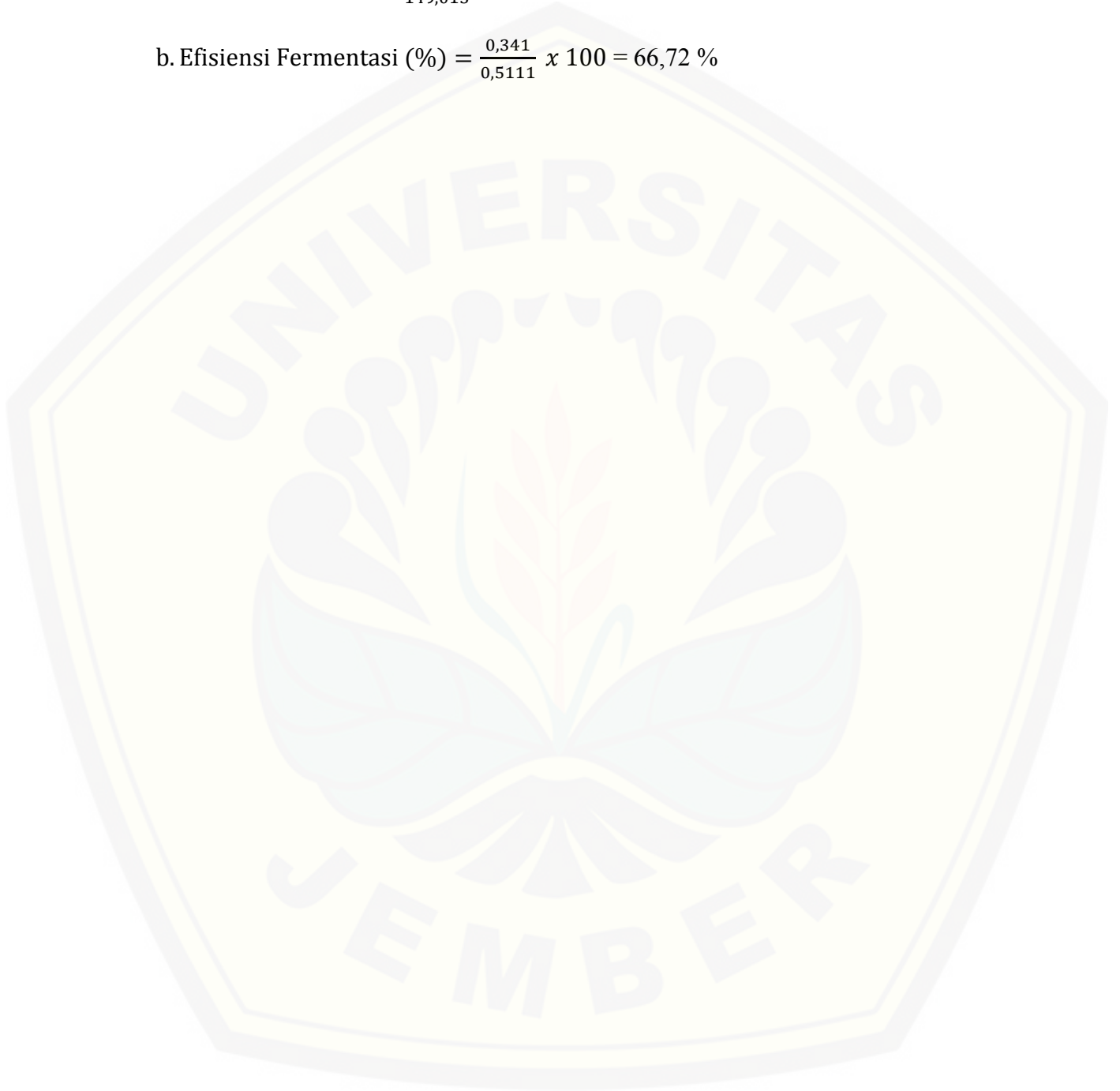
Waktu (jam)	A1B2 Δs		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi		Rerata	Efisiensi (%)	STDEV
	1	2	1	2			1	2			
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000	0,00	0,000
12	166,360	162,944	0,427	0,361	0,394	0,047	0,836	0,706	0,77109	77,11	0,092
24	257,819	258,608	0,306	0,314	0,310	0,006	0,598	0,615	0,60617	60,62	0,012
36	268,331	267,543	0,428	0,471	0,450	0,031	0,838	0,922	0,88004	88,00	0,060
48	269,908	270,171	0,375	0,363	0,369	0,008	0,734	0,711	0,72242	72,24	0,016
72	272,799	271,485	0,350	0,349	0,349	0,001	0,685	0,682	0,68338	68,34	0,002

Waktu (jam)	A2B2 Δs		Y p/s (g/g)		Rerata	STDEV	Efisiensi		Rerata	Efisiensi (%)	STDEV
	1	2	1	2			1	2			
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000	0,00	0,000
12	149,015	146,911	0,341	0,402	0,372	0,043	0,668	0,787	0,72714	72,71	0,084
24	233,377	232,325	0,429	0,394	0,412	0,024	0,839	0,772	0,80552	80,55	0,048
36	246,781	246,517	0,470	0,510	0,490	0,029	0,920	0,999	0,95921	95,92	0,056
48	249,672	250,459	0,431	0,441	0,436	0,008	0,842	0,863	0,85291	85,29	0,015
72	252,826	252,562	0,392	0,341	0,366	0,036	0,766	0,667	0,71688	71,69	0,070

Contoh perhitungan Yield etanol dan Efisiensi fermentasi (A2B2 jam ke-12, Ulangan 1) :

a. Yield Etanol (g/g) = $\frac{50,852}{149,015} = 0,341$ g etanol/g glukosa

b. Efisiensi Fermentasi (%) = $\frac{0,341}{0,5111} \times 100 = 66,72$ %



Lampiran H. Data Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast

H.1 Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A1 dan A2 Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A1	A2	STDEV A1	STDEV A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	5,81	5,79	0,106	0,056	0,0112	0,0032	3,5219	161,45	0,007179732	0,084733297	0,084733297	0,290065831	4,303	Tdk beda
12	8,15	7,87	0,315	0,075	0,0992	0,0056	17,6222	161,45	0,052409387	0,228930966	0,228930966	1,192884394	4,303	Tdk beda
24	8,21	7,95	0,317	0,044	0,1004	0,0019	52,8980	161,45	0,051170411	0,226208778	0,226208778	1,160401023	4,303	Tdk beda
36	8,40	8,13	0,323	0,048	0,1040	0,0023	44,3108	161,45	0,053192328	0,223063462	0,23063462	1,188426547	4,303	Tdk beda
48	8,33	8,08	0,071	0,036	0,0051	0,0013	3,8669	161,45	0,003202202	0,056588002	0,056588002	4,399134601	4,303	Beda
72	7,52	6,74	0,021	0,021	0,0004	0,0004	1,0000	161,45	0,000428339	0,020696343	0,020696343	37,59849101	4,303	Beda

H.2 Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A1 dan A2 dengan Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A1	A2	STDEV A1	STDEV A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	5,81	5,79	0,106	0,056	0,0112	0,0032	3,5219	161,45	0,007179732	0,084733297	0,084733297	0,290065831	4,303	Tdk beda
12	7,82	8,26	0,062	0,059	0,0038	0,0035	1,0858	161,45	0,003636485	0,060303279	0,060303279	-7,266773688	4,303	Beda
24	7,99	8,33	0,007	0,122	0,0000	0,0148	0,0000	161,45	0,00740531	0,086054111	0,086054111	-3,860979285	4,303	Tdk beda
36	8,49	8,50	0,131	0,088	0,0171	0,0078	2,2057	161,45	0,0124252	0,111468383	0,111468383	-0,094469966	4,303	Tdk beda
48	8,10	7,74	0,318	0,040	0,1014	0,0016	64,6832	161,45	0,051476507	0,226884347	0,226884347	1,577903797	4,303	Tdk beda
72	7,60	7,26	0,048	0,218	0,0023	0,0475	20,2160	161,45	0,024906367	0,157817512	0,157817512	2,172148178	4,303	Tdk beda

H.3 Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A1 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A1	Ae1*	STDEV A1	STDEV Ae1	S2 A1	S2 Ae1	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	5,81	5,81	0,106	0,106	0,0112	0,0112	1,0000	161,45	0,0111839	0,105753958	0,105753958	0	4,303	Tdk beda
12	8,15	7,82	0,315	0,062	0,0992	0,0038	26,1984	161,45	0,051488087	0,226909865	0,226909865	1,421243169	4,303	Tdk beda
24	8,21	7,99	0,317	0,007	0,1004	0,0000	0,0000	161,45	0,050242891	0,224149259	0,224149259	0,986695819	4,303	Tdk beda
36	8,40	8,49	0,323	0,131	0,1040	0,0171	6,0846	161,45	0,060567568	0,246104791	0,246104791	-0,368786016	4,303	Tdk beda
48	8,33	8,10	0,071	0,318	0,0051	0,1014	19,9244	161,45	0,05323705	0,230731554	0,230731554	0,997019929	4,303	Tdk beda
72	7,52	7,60	0,021	0,048	0,0004	0,0023	5,4814	161,45	0,001388113	0,03725739	0,03725739	-2,242402137	4,303	Tdk beda

H.4 Uji T Populasi Pertumbuhan Yeast A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A2	Ae2*	STDEV A2	STDEV Ae2	S2 A2	S2 Ae2	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	5,79	5,79	0,056	0,056	0,0032	0,0032	1,0000	161,45	0,003175564	0,05635214	0,05635214	0	4,303	Tdk beda
12	7,87	8,26	0,075	0,059	0,0056	0,0035	1,6143	161,45	0,004557786	0,067511376	0,067511376	-5,759094003	4,303	Beda
24	7,95	8,33	0,044	0,122	0,0019	0,0148	7,7770	161,45	0,008332831	0,09128434	0,09128434	-4,092475217	4,303	Tdk beda
36	8,13	8,50	0,048	0,088	0,0023	0,0078	3,3017	161,45	0,00504996	0,071063072	0,071063072	-5,282388053	4,303	Beda
48	8,08	7,74	0,036	0,040	0,0013	0,0016	1,1911	161,45	0,001441659	0,03796918	0,03796918	8,931122334	4,303	Beda
72	6,74	7,26	0,021	0,218	0,0004	0,0475	110,8115	161,45	0,023946593	0,154746866	0,154746866	-3,353181187	4,303	Tdk beda

Keterangan : *) Ae merupakan yeast dengan pemberian aerasi

Lampiran I. Data Uji T Konsentrasi etanol

I.1 Uji T Konsentrasi etanol Yeast A1 dan A2 Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A1	A2	STDEV A1	STDEV A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	161,45	0	0	0	0	4,303	Tdk beda
12	62,89	47,57	0,387	1,161	0,1498	1,3483	9,0000	161,45	0,749074	0,865491	0,865491	17,70875	4,303	Beda
24	86,43	92,45	1,548	6,193	2,3970	38,3526	16,0000	161,45	20,37482	4,513848	4,513848	-1,33395	4,303	Tdk beda
36	100,25	102,85	1,742	5,806	3,0338	33,7083	11,1111	161,45	18,37105	4,286146	4,286146	-0,60662	4,303	Tdk beda
48	91,77	93,68	2,516	2,129	6,3297	4,5319	1,3967	161,45	5,43079	2,330405	2,330405	-0,82211	4,303	Tdk beda
72	85,88	87,12	1,935	3,290	3,7454	10,8241	2,8900	161,45	7,284749	2,699027	2,699027	-0,45632	4,303	Tdk beda

I.2 Uji T Konsentrasi etanol Yeast A1 dan A2 dengan Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A1	A2	STDEV A1	STDEV A2	S2 A1	S2 A2	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	161,45	0	0	0	0	4,303	Tdk beda
12	64,95	54,96	8,709	5,806	75,8438	33,7083	2,2500	161,45	54,77607	7,401086	7,401086	1,34977	4,303	Tdk beda
24	80,00	95,87	1,742	5,999	3,0338	35,9930	11,8642	161,45	19,51339	4,417396	4,417396	-3,59355	4,303	Tdk beda
36	120,51	120,92	7,935	6,967	62,9597	48,5400	1,2971	161,45	55,74987	7,466583	7,466583	-0,05498	4,303	Tdk beda
48	99,71	109,01	2,129	2,129	4,5319	4,5319	1,0000	161,45	4,5319	2,128826	2,128826	-4,37121	4,303	Beda

I.3 Uji T Konsentrasi etanol Yeast A1 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A1	Ae1*	STDEV A1	STDEV Ae1	S2 A1	S2 Ae1	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	161,45	0	0	0	0	4,303	Tdk beda
24	86,43	80,00	1,548	1,742	2,3970	3,0338	1,2656	161,45	2,715395	1,647846	1,647846	3,90313	4,303	Tdk beda
36	100,25	120,51	1,742	7,935	3,0338	62,9597	20,7531	161,45	32,99673	5,744278	5,744278	-6,10688	4,303	Beda
48	91,77	99,71	2,516	2,129	6,3297	4,5319	1,3967	161,45	5,43079	2,330405	2,330405	-3,40588	4,303	Tdk beda
72	85,88	95,05	1,935	0,581	3,7454	0,3371	11,1111	161,45	2,041228	1,428715	1,428715	-6,41744	4,303	Beda

I.4 Uji T Konsentrasi etanol Yeast A2 dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi Pada Media Molases

Waktu (jam)	A2	Ae2*	STDEV A2	STDEV Ae2	S2 A2	S2 Ae2	F hitung	f tabel	S ²	S	S x1.x2	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,00	0,00	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000	161,45	0	0	0	0	4,303	Tdk beda
12	47,57	54,96	1,161	5,806	1,3483	33,7083	25,0000	161,45	17,52834	4,186686	4,186686	-1,76505	4,303	Tdk beda
24	92,45	95,87	6,193	5,999	38,3526	35,9930	1,0656	161,45	37,17282	6,096952	6,096952	-0,56113	4,303	Tdk beda
36	102,85	120,92	5,806	6,967	33,7083	48,5400	1,4400	161,45	41,12419	6,412814	6,412814	-4,87886	4,303	Beda
48	93,68	109,01	2,129	2,129	4,5319	4,5319	1,0000	161,45	4,5319	2,128826	2,128826	-7,19963	4,303	Beda
72	87,12	92,59	3,290	9,096	10,8241	82,7353	7,6436	161,45	46,7797	6,839569	6,839569	-0,80032	4,303	Tdk beda

Keterangan : *) Ae merupakan yeast dengan pemberian aerasi