



**PRODUKSI BIOETANOL OLEH *Saccharomyces cerevisiae*
STRAIN FNCC 3210 DAN ATCC 9763
PADA MEDIA MOLASES**

SKRIPSI

oleh

**Anis Suhariati
NIM 101710101011**

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

2015



**PRODUKSI BIOETANOL OLEH *Saccharomyces cerevisiae*
STRAIN FNCC 3210 DAN ATCC 9763
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

**Anis Suhariati
NIM 101710101011**

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Seneti dan Ayahanda Wagiman (alm) tercinta, serta keluarga dan kerabat yang telah mendoakan, memotivasi, memberi kasih sayang serta pengorbanan selama ini;
2. Bapak Suragil yang senantiasa memberikan motivasi;
3. Kakak- kakakku Suliswanto dan Eny Sundari yang telah memberikan banyak dukungan, inspirasi, dan motivasi selama penyelesaian pendidikanku;
4. Pembimbing dan penyalur ilmuku, guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember,

MOTTO

Tidak ada kebaikan ibadah yang tidak ada ilmunya dan tidak ada kebaikan ilmu yang tidak difahami dan tidak ada kebaikan bacaan kalau tidak ada perhatian untuknya
(Sayidina Ali Karamallahu Wajhah)

Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah
(Thomas Alfa Edison)

Seseorang yang membaca terlalu banyak dan menggunakan otaknya terlalu sedikit akan menjadi kebiasaan malas untuk berpikir
(Albert Eisntein)

Berhentilah mengkhawatirkan masa depan, syukurilah hari ini, dan hiduplah dengan sebaik-baiknya
(Mario Teguh)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anis Suhariati

NIM : 101710101011

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Produksi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 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, 26 Oktober 2015

Yang menyatakan,

Anis Suhariati
NIM 101710101011

SKRIPSI

**PRODUKSI BIOETANOL OLEH *Saccharomyces cerevisiae*
STRAIN FNCC 3210 DAN ATCC 9763
PADA MEDIA MOLASES**

Oleh

Anis Suhariati

NIM 101710101011

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Jayus

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Produksi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 pada Media Molases” karya Anis Suhariati NIM. 101710101011 telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 6 Juni 2015

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota,

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

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si
NIP 196307011989031004

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Produksi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 pada Media Molases; Anis Suhariati; 10171010111; 2015; 74 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Kebutuhan energi terutama bahan bakar minyak (BBM) di Indonesia cukup tinggi. Kebutuhan BBM nasional hanya sekitar 60% yang dapat dipenuhi dengan produksi nasional, sedangkan sekitar 40% dipenuhi dengan impor. Salah satu sumber energi alternatif BBM yang dapat digunakan adalah bioetanol. Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi substrat mengandung gula dengan batuan mikroorganisme. Salah satu alternatif media produksi bioetanol dengan fermentasi adalah tetes tebu (molases). Tetes tebu (molases) merupakan limbah dari proses pengolahan tebu gula dengan kadar gula sebanyak 50-55%.

Fermentasi bioetanol umumnya menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang dapat memproduksi etanol dari gula. Produksi bioetanol dengan fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* pada media molases selama ini belum optimal karena hasil akhir etanol hanya sekitar 8-9% v/v. Beberapa upaya untuk mengoptimalkan fermentasi bioetanol dengan menggunakan khamir *S. cerevisiae* adalah melalui pemilihan strain unggul, dan kondisi lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan dan produksi etanol seperti konsentrasi (derajat brix) molases dan kecepatan agitasi.

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode deskriptif dengan variasi strain khamir (*S. cerevisiae* FNCC 3210 (A1) dan ATCC 9763 (A2)), dan derajat brix molasses (yaitu Brix 14°Brix (B1) dan Brix 34°Brix (B2)), dan kecepatan agitasi (100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2)). Data hasil pengamatan ditampilkan dalam bentuk grafik dengan menghitung nilai rata-rata dan standar deviasi.

Medium fermentasi bioetanol terdiri dari molases yang telah diatur derajat brix dan ditambah dengan asam fosfat dan urea. Selanjutnya pH medium diatur menjadi 4,5 dan didiamkan selama semalam. Media fermentasi disterilkan dengan

autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1,72 atm. Berikutnya dilakukan pembuatan starter masing-masing khamir yang didahului dengan pengkayaan inokulum dalam media MEB selama 15 jam. Selanjutnya dilakukan pembuatan *starter* masing-masing khamir pada media molases dengan variasi 14°Brix dan 34°Brix. Pembuatan *starter* tersebut dilakukan dalam orbital shaker inkubator dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 30° C selama 12 jam. Setelah itu, media fermentasi diinokulasi dengan *starter S. cerevisiae* sebanyak 10% (v/v). Fermentasi dilanjutkan hingga 24 jam pada suhu 30° C dengan media molases 14°Brix dan 34°Brix untuk kecepatan agitasi 100 rpm dan fermentasi dengan media molases 14°Brix untuk kecepatan agitasi 200 rpm. Parameter yang diamati selama fermentasi adalah populasi khamir, kadar gula reduksi, dan kadar etanol secara periodik tiap 4 jam selama 24 jam.

Hasil penelitian menunjukkan *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 mengalami pertumbuhan dan perkembangbiakan dengan baik hingga fermentasi jam ke 24. Produksi etanol tertinggi oleh kedua strain didapatkan pada kondisi fermentasi kecepatan agitasi 100 rpm dengan media 14°Brix yaitu sebesar 3,908% (v/v) dengan yield (Y_p/s) sebesar 0,490 g/g dan efisiensi fermentasi sebesar 95,843% untuk *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dan 4,211% (v/v) dengan yield (Y_p/s) sebesar 0,505 g/g dan efisiensi fermentasi sebesar 98,560% untuk strain ATCC 9763 .

SUMMARY

Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 and ATCC 9763 in Molasses; Anis Suhariati; 101710101011; 2014; 74 pages; Department of Agricultural Technology Faculty of Agriculture, University of Jember.

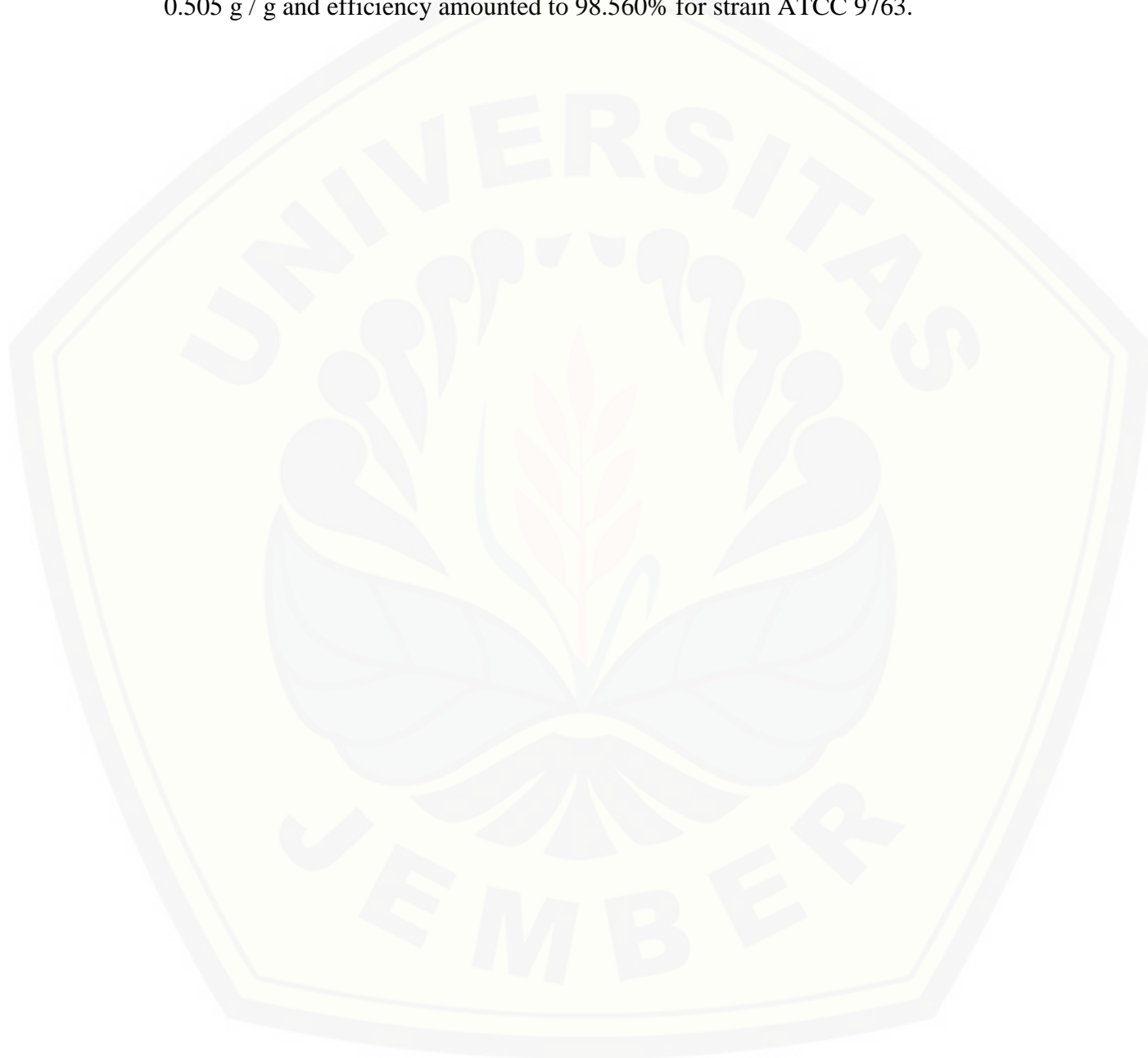
Energy needs especially fuel oil (BBM) in Indonesia is quite high. Only 60% national fuel needs about that can be met by national production, while about 40% filled by imports. One of the alternative energy sources that can be used are bioethanol. Bioethanol is ethanol from biomass fermentation process with microorganisms. One alternative media bioethanol production by fermentation of *S. cerevisiae* is molasses (molasses). Molasses (molasses) is a waste of processing of sugar cane with sugar as much as 50-55%.

Bioethanol fermentation generally use yeast *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol from sugar, but bioethanol production by fermentation using *S. cerevisiae* in molasses medium has not been optimal because the end result of ethanol is only about 8-9% v/v. Several attempts to optimize the bioethanol fermentation using yeast *S. cerevisiae* is the selection of superior strains, and optimum environmental conditions for growth and ethanol production such as media concentration (brix levels) and agitation speed.

This research was conducted using descriptive method with yeast strain variation, there are FNCC 3210 and strain ATCC 9763 strains, molasses media brix levels, in this research using 14°Brix and 34°Brix brix levels, and the speed of agitation, 100 rpm and 200 rpm agitation speed. The data were presented in graphical form by calculating the mean value and standard deviation.

Bioethanol fermentation medium composed of molasses which set brix levels and coupled with phosphoric acid and urea. Furthermore, the pH of the medium is set to 4.5 and allowed to stand overnight. Fermentation media sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes at a pressure of 1.72 atm. Next do the manufacture of each yeast starter preceded by enrichment inoculum in MEB medium for 15 hours. Furthermore, the manufacture of each yeast starter on molasses medium with variation 14°Brix and 34°Brix brix content. Making the starter is carried out in an orbital shaker incubator at a speed of 200 rpm at a temperature of 30 ° C for 12 hours. After that, the fermentation medium was inoculated with *S. cerevisiae* starter as much as 10% (v /v). Fermentation was continued up to 24 hours with temperature 30 ° C and variation of agitation speed 100 rpm and 200 rpm. Several parameters were observed during fermentation is yeast population, reduction sugar, and ethanol levels periodically every 4 hours for 24 hours.

The results showed FNCC *S. cerevisiae* strain ATCC 3210 and 9763 experienced good growth and proliferation by up to 24 hours of fermentation ethanol production is highest by both strains obtained in the fermentation conditions of agitation speed of 100 rpm with a brix level of 14 ° Brix media that is equal to 3.908% (v/v) to yield (Y_p / s) of 0.490 g / g and an efficiency of 95.843% for *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 and 4.211% (v/v) to yield (Y_p / s) of 0.505 g / g and efficiency amounted to 98.560% for strain ATCC 9763.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Produksi Bioetanol Oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 Dan ATCC 9763 pada Media Molases”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

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

1. Dr. Yuli Witono, S.TP., MP., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
3. Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Ir. Jayus selaku Dosen Pembimbing Anggota sekaligus sebagai pemilik proyek penelitian yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk dapat melaksanakan penelitian ini serta segala bantuan dan pengarahan selama penelitian dan penulisan skripsi ini;
4. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. dan Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si. selaku tim penguji, atas saran dan evaluasi demi perbaikan penulisan skripsi;
5. Seluruh staff dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
6. Ibunda dan Ayahanda, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa dan dorongan demi terselesaikannya skripsi ini;
7. Sahabat dan teman-temanku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan dukungan dan semangat;
8. Teman seperjuangan dalam suka maupun duka, Sabrina Arindhani, Dyah ayu, Iga, Ayu, Rika, Frida, Fia, Rini, Leny, Adit, terimakasih untuk segalanya teman;

9. Teman-teman kos Jalan Kalimantan IV yang selalu memberi semangat;ivasi;
10. Sahabatku Lailatul Mubarakah, Ika Rizqi, dan Maria Ulfah yang selalu menyemangati;
11. Mas Wahyu Prasetyo yang selalu senantiasa memberikan mot
12. Keluarga besar THP 2010 Mantap Jaya yang telah memberikan inspirasi, motivasi, dan persahabatan.
13. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung.

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

Jember, 26 Oktober 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
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sifat- Sifat dan Kegunaan Etanol	4
2.2 Mekanisme Fermentasi Bioetanol oleh <i>S. cerevisiae</i>	5
2.3 Karakteristik Molases	9
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	12
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	12
3.3 Metode Penelitian	12
3.3.1 Rancangan Percobaan	12

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	13
3.3.5 Skema Kerja	15
3.4 Parameter Pengamatan	17
3.6 Prosedur Analisis	17
3.6.1 Populasi Mikroba	17
3.6.2 Kadar Gula Reduksi	17
3.5.3 Kadar Etanol	19
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Pengaruh Kecepatan Agitasi Terhadap Kadar Etanol Pada Molases 14^oBrix	22
4.1.1 Produksi Etanol oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Strain FNCC 3210	23
4.1.2 Produksi Etanol oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Strain ATCC 9763	24
4.2 Kinetika Fermentasi oleh Yeast A1 dan A2 dengan Kecepatan Agitasi 100 dan 200 rpm pada Media Molases 14^oBrix	26
4.2.1 Laju Konsumsi	26
4.2.2 <i>Growth Rate</i>	27
4.2.3 <i>Growth Yield (x/s)</i>	28
4.2.4 Produktivitas	29
4.2.5 <i>Yield (p/s)</i>	30
4.2.6 Efisiensi Fermentasi	31
4.3 Pengaruh Derajat Brix Agitasi Terhadap Kadar Etanol Pada Fermentasi Etanol dengan Kecepatan Agitasi 100 rpm	32
4.3.1 Produksi Etanol oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Strain FNCC 3210	32
4.3.2 Produksi Etanol oleh <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Strain ATCC 9763	34
4.4 Kinetika Fermentasi oleh Yeast A1 dan A2 dengan Kecepatan Agitasi 100 dan 200 rpm pada Media Molases 14^oBrix	36
4.4.1 Laju Konsumsi	36

4.4.2 <i>Growth Rate</i>	37
4.4.3 <i>Growth Yield (x/s)</i>	38
4.4.4 Produktivitas	39
4.4.5 <i>Yield (p/s)</i>	40
4.4.6 Efisiensi Fermentasi	41
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN DATA	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Sifat fisika dan kimia etanol absolut dan etanol teknis	4
2.2 Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan tetes menjadi bioetanol	9
2.3 Karakteristik molases	10
3.1 Seri konsentrasi pengambilan larutan standart glukosa dan nilai pengukuran absorbansi	18
3.2 Seri konsentrasi pengambilan larutan standart etanol dan nilai pengukuran absorbansi	20
4.1 Laju konsumsi gula reduksi oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	27
4.2 <i>Growth Rate</i> oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	28
4.3 <i>Growth Yield</i> (x/s) oleh <i>yeast</i> A1 dan A2.....	29
4.4 Produktivitas oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	30
4.5 <i>Yield</i> (p/s) oleh <i>yeast</i> A1 dan A2.....	31
4.6 Efisiensi Fermentasi oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	32
4.7 Laju konsumsi gula reduksi oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	37
4.8 <i>Growth Rate</i> oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	38
4.9 <i>Growth Yield</i> (x/s) oleh <i>yeast</i> A1 dan A2.....	39
4.10 Produktivitas oleh <i>yeast</i> A1 dan A2	40
4.11 <i>Yield</i> (p/s) oleh <i>yeast</i> A1 dan A2.....	41
4.12 Efisiensi Fermentasi oleh <i>yeast</i> A1 dan A2.....	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
3.1 Diagram alir pembuatan <i>starter</i>	15
3.2 Diagram alir tahap produksi bioetanol.....	16
4.1 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A1B1C1 (▲) dan A1B1C2 (■)	24
4.2 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A2B1C1 (▲) dan A2B1C2 (■)	25
4.3 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A1B1C1 (▲) dan A1B2C1 (■)	34
4.4 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A2B1C1 (▲) dan A2B2C1 (■)	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Populasi khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
A.1. Populasi khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
A.2. Data Perhitungan <i>Growth Rate</i>	49
A.3. Data Perhitungan <i>Growth Yield</i>	52
B. Kadar Gula Reduksi	54
B.1. Nilai Absorbansi dan kadar gula reduksi sampel	54
C. Kadar Etanol	56
C.1. Nilai Absorbansi dan Kadar Etanol Sampel	56
D. Pengukuran pH	58
E. Kinetika Fermentasi	60
E. Uji Beda T	63
E.1. Uji T sampel.....	63

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan energi terutama bahan bakar minyak (BBM) di Indonesia cukup tinggi. Sebagian besar sektor dan kegiatan di Indonesia mengandalkan BBM sebagai sumber energi dalam beraktivitas. Penggunaan BBM dilakukan pada kegiatan yang dilakukan oleh rumah tangga hingga perusahaan. Dengan tingginya kebutuhan terhadap BBM Indonesia telah melakukan impor minyak mentah terkait dengan penurunan produksi minyak dalam negeri. Berdasarkan data Ditjen Migas Tahun 2011 konsumsi BBM dalam negeri pada tahun 2011 mencapai 394.052 ribu barel, sedangkan produksi BBM nasional hanya sebesar 238.957 ribu barel. Dari data tersebut hanya sekitar 60% kebutuhan BBM nasional yang dapat dipenuhi dengan produksi nasional, sedangkan sekitar 40% dipenuhi dengan impor.

Dengan adanya permasalahan tersebut berbagai upaya pencarian energi alternatif dilakukan. Hal tersebut juga disebutkan dalam Peraturan Presiden Nomor 5 Tahun 2006 tentang Kebijakan Energi Nasional untuk mengembangkan sumber energi alternatif sebagai pengganti Bahan Bakar Minyak. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan adalah bioetanol. Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi biomassa dengan bantuan mikroorganisme (Firdausi *et al.*, 2013). Mikroorganisme yang biasanya digunakan adalah khamir *S. cerevisiae*. Bioetanol memiliki keunggulan diantaranya sifat etanol yang dapat diperbarui dan ramah lingkungan dikarenakan emisi karbondioksida yang rendah. Etanol dapat digunakan sebagai bahan campuran bensin (gasolin) yang kemudian dinamakan gasohol, dan juga dapat digunakan secara langsung sebagai bahan bakar (Campbell, 1983).

Dalam produksi bioetanol menggunakan mikroorganisme memerlukan biomassa sebagai substrat berupa gula baik glukosa maupun sukrosa. Dengan adanya hal tersebut produksi bioetanol mengalami permasalahan keterbatasan substrat glukosa dan sukrosa. Selain itu, harga glukosa dan sukrosa di pasaran

relatif mahal. Oleh karena itu perlu adanya alternatif media untuk produksi bioetanol. Salah satu alternatif media produksi bioetanol dengan fermentasi *S. cerevisiae* adalah tetes tebu (molases). Tetes tebu (molases) merupakan limbah dari proses pengolahan tebu gula dengan kadar gula sebanyak 50-55%. Dengan adanya kandungan gula yang tinggi, maka molases dapat dijadikan sebagai media fermentasi bioetanol. Ketersediaan molases sebagai bahan baku bioetanol di Indonesia cukup banyak. Diperkirakan untuk setiap ton tebu akan menghasilkan sekitar 2,7 % tetes tebu. Selain itu harga molases relatif lebih murah jika dibandingkan sukrosa dan glukosa yang dijual di pasaran.

1.2 Perumusan Masalah

Produksi etanol pada media molases oleh *Saccharomyces cerevisiae* belum optimal. Produksi etanol pada kultur an-aerob oleh beberapa strain *S. cerevisiae* berkisar antara 2– 13 % (Jayus *et al.*, 2014). Beberapa upaya optimasi fermentasi bioetanol yang dilakukan adalah pemilihan strain unggul dan kondisi lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan dan produksi etanol seperti konsentrasi (derajat brix) media dan kecepatan agitasi. Berdasarkan penelitian Patrascu (2009), produksi bioetanol menggunakan lima *S. cerevisiae* strain yang berbeda yaitu strain Safdistil C- 70, Ethanol RedTM, Fali^R, Tokenhefe, dan Pakmaya menghasilkan etanol yang berbeda. Dari hasil yang didapatkan strain Fali^R memiliki produktivitas etanol yang paling rendah. Produktivitas etanol tertinggi adalah pada strain Safdistil C- 70 dengan produktivitas etanol sebesar 2,33 g/L H pada fermentasi selama 36 jam. Selain itu menurut Kurniawan *et al.* (2011), perbedaan alat pengaduk dan kecepatan pengadukan yang berbeda juga berpengaruh terhadap produksi bioetanol oleh *S. cerevisiae*. Selain itu untuk meningkatkan produksi etanol dapat dilakukan dengan fermentasi dengan media VHG (*very high gravity*). Pada media molases dengan kadar brix 34-35°Brix memiliki produksi etanol yang tinggi (Puligundla *et al.*, 2011). Strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 merupakan strain *Sachharomyces cerevisiae* yang optimal hidup pada suhu 30-37°C dan kisaran pH 4,5 – 5. Pada penelitian ini digunakan dua

strain *Saccharomyces cerevisiae* (FNCC 3210 dan ATCC 9763) pada media molases dengan 14 °Brix dan 34 °Brix dengan kecepatan agitasi yang berbeda yaitu 100 rpm dan 200 rpm.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh derajat brix terhadap produksi bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 pada media molases.
2. Mengetahui pengaruh kecepatan agitasi terhadap produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 dari molases tebu.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat berikut :

1. Meningkatkan nilai ekonomis limbah produksi gula (molases);
2. Memberi alternatif pengganti bahan bakar minyak (BBM) yang ramah lingkungan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat- Sifat dan Kegunaan Etanol

Etanol atau etil alkohol adalah senyawa organik alkohol primer dengan rumus molekul C_2H_5OH . Dalam suhu kamar, etanol berwujud cairan yang tidak berwarna dan tidak berasa, mudah menguap, mudah terbakar, mudah larut dalam air, dan tembus cahaya. Sebanyak 68% etanol di dunia digunakan sebagai bahan bakar. Produksi etanol tersebut banyak dikembangkan dengan komoditi pertanian melalui fermentasi (Murdiyatmo, 2006). Dengan dapat digunakannya etanol sebagai bahan bakar dapat dijadikan alternatif sebagai pengganti bahan bakar minyak (BBM) yang selama ini merupakan salah satu masalah di Indonesia. Bahan bakar minyak (BBM) sekarang mengalami kelangkaan dan harganya semakin mahal.

Etanol memiliki banyak manfaat bagi masyarakat karena memiliki sifat yang tidak beracun. Selain itu etanol juga memiliki banyak sifat-sifat, baik secara fisika maupun kimia. Adapun sifat-sifat fisika dan kimia etanol dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Sifat fisika dan kimia etanol absolut dan etanol teknis

Parameter	Etanol absolut	Etanol teknis
Titik beku ($^{\circ}C$)	-112,4	-
Titik didih ($^{\circ}C$)	78,4	-
<i>Spesific gravity</i>	0,7851	-
Indeks bias n_D^{20}	1,3633	1,3651
Viskositas pada $20^{\circ}C$ (P)	0,0122	0,0141
Tegangan permukaan(dyne/cm)	22,3	22,8
Panas spesifik	0,581	0,618
Panas fusi (kal/gr)	24,9	-
Panas evaporasi (kal/gr)	204	-
Konduktivitas elektrik pada $25^{\circ}C$ (ohm-1/cm)	$1,35 \times 10^{-9}$	-

Sumber : Kirk dan Othmen (1985).

Menurut Murdiyatmo (2006), ada 2 macam etanol yaitu etanol sintetis dan bioetanol. Etanol sintetis sering disebut juga sebagai metanol atau metil alkohol atau alkohol kayu. Etanol sintetis terbuat dari etilen yang merupakan salah satu derivat minyak bumi atau batu bara. Etanol sintetis diperoleh melalui

proses sintesis kimia yang disebut hidrasi. Bioetanol, diperoleh dari rekayasa biomassa (tanaman) melalui proses biologi (enzimatik dan fermentasi). Bahan baku bioetanol diantaranya adalah bahan berpati, bahan berselulosa, dan bahan mengandung gula seperti molases. Bioetanol didapatkan melalui proses fermentasi oleh mikroorganisme.

Keunggulan produksi etanol melalui fermentasi oleh mikroba adalah rendahnya biaya produksi, persentase rendemen yang tinggi, prosesnya relatif lebih cepat, penanganannya sederhana dan produk samping yang relatif lebih sedikit dan aman bagi lingkungan (Narita, 2005). Etanol sintetis diproduksi dari hidrasi batu bara yang merupakan sumber daya alam yang tidak dapat diperbarui, sedangkan bahan baku bioetanol yang berupa biomassa dari tumbuhan terdapat dalam jumlah yang melimpah dan bisa dibudidayakan oleh manusia. Oleh karena itu, produksi bioetanol dari limbah pengolahan hasil pertanian dan sumber substrat tumbuhan lainnya bisa dikembangkan untuk mengatasi kelangkaan BBM.

2.2 Mekanisme Fermentasi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae*

Bahan baku untuk proses fermentasi bioetanol berupa sumber gula seperti bahan mentah dalam bentuk mono/disakarida (gula tebu, tetes tebu), bahan berpati (padi, jagung, umbi) dan bahan selulosa (kayu, limbah pertanian). Ragi yang dapat digunakan dalam proses fermentasi etanol dengan mengkonversi sumber gula tersebut adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* (tadinya *Saccharomyces carlsbergensis*), *Candida utilis*, *Saccharomyces anamensis*, *Schizosaccharomyces pombe*. *S. cerevisiae* adalah pilihan yang lebih baik karena memiliki toleransi terhadap etanol dan produksi etanol yang tinggi (Satyanarayana, 2009).

Proses fermentasi dapat dijalankan secara *batch*, kontinyu maupun *fed-Batch*. Fermentasi secara *batch* membutuhkan waktu sekitar 50 jam, pH awal 4,5 dan suhu 20-30 °C untuk menghasilkan yield etanol 90% dari nilai gula teoritis. Hasil akhir etanol sekitar 10-16% v/v (Bailey, 1986). Fermentasi secara *batch* disebut juga fermentasi secara tertutup. Pada fermentasi secara *batch* tidak

dilakukan penambahan komponen substrat setelah dilakukan inokulasi ke dalam fermentor kecuali penambahan oksigen atau udara steril, anti buih, dan asam atau basa untuk mengatur pH. Fermentasi dengan sistem kontinyu dilakukan dengan membiarkan sel mikroba tumbuh pada medium fermentor secara *batch* hingga dicapai pertumbuhan logaritmik yang dikehendaki, kemudian medium segar dialirkan dan dilakukan pengeluaran cairan kultur secara bersama-sama. Fermentasi secara *fed- batch* dilakukan dengan penambahan medium baru atau segar secara teratur pada kultur tertutup tanpa mengeluarkan cairan kultur yang ada di dalam fermentor (Suwasono, 2012). Untuk mengoptimalkan fermentasi dapat dilakukan secara kontinyu dan *fed-batch*, tetapi untuk melakukan fermentasi secara kontinyu atau *fed-batch* harus diketahui kinetika fermentasi secara *batch* untuk menentukan waktu penambahan substrat segar maupun pengeluaran cairan kultur.

Pada proses fermentasi etanol oleh *S. cerevisiae* terjadi proses konversi glukosa menjadi etanol dan CO₂. Fermentasi etanol adalah perubahan 1 mol glukosa menjadi 2 mol etanol dan 2 mol CO₂. Khamir akan memetabolisme glukosa dan fruktosa membentuk asam piruvat melalui tahapan reaksi pada jalur Embden- Meyerhof- Parnas. Asam piruvat yang dihasilkan akan didekarboksilasi menjadi asetaldehida yang kemudian mengalami dehidrogenasi menjadi etanol (Amerine *et al.*, 1987). Reaksi pembentukan etanol dari glukosa berlangsung sesuai persamaan reaksi berikut ini :



Dalam fermentasi etanol perlu diperhatikan faktor-faktor yang berpengaruh terhadap etanol yang dihasilkan. Faktor-faktor tersebut adalah pH, nutrisi, temperatur, oksigen, konsentrasi inokulum, lama inkubasi dan kondisi lingkungan lain seperti kecepatan agitasi dan aerasi. Hal tersebut dilakukan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan produksi etanol *Saccharomyces cerevisiae*.

Derajat keasaman (pH) media mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Setiap mikroorganisme mempunyai pH minimal, maksimal, dan optimal untuk pertumbuhannya. Untuk yeast, pH pertumbuhan berada pada

kisaran 4,0 – 5,0, sedangkan pH optimal untuk produksi etanol ialah berkisar antara 4,0 sampai 4,5. Pada pH 3,0 atau lebih rendah lagi fermentasi alkohol akan berjalan dengan lambat (Volk, 1993). Selain untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan produksi etanol oleh *S. cerevisiae* perlakuan pH yang rendah juga dapat meminimalkan kontaminasi bakteri.

Dalam pertumbuhannya mikroba memerlukan nutrient yang digolongkan menjadi dua yaitu nutrien makro dan nutrien mikro. Nutrien makro meliputi unsur C, N, P, K. Unsur C didapat dari substrat yang mengandung karbohidrat, unsur N didapat dari penambahan urea, sedang unsur P dan K dari pupuk NPK. Unsur mikro meliputi vitamin dan mineral-mineral lain yang disebut *trace element* seperti Ca, Mg, Na, S, Cl, Fe, Mn, Cu, Co, Bo, Zn, Mo, dan Al (Halimatuddahlia, 2003). Sumber C untuk produksi bioetanol berasal dari karbohidrat terutama dalam bentuk gula yaitu sukrosa dan glukosa. Hal tersebut dikarenakan glukosa atau sukrosa digunakan sebagai substrat yang akan dikonversi menjadi etanol oleh *S. cerevisiae*.

Mikroorganisme memiliki temperatur maksimal, optimal, dan minimal untuk pertumbuhannya. Temperatur optimal untuk yeast berkisar antara 25-30 °C dan temperatur maksimal antara 35-47 °C. Beberapa jenis yeast dapat hidup pada suhu 0 °C. Temperatur selama fermentasi perlu mendapatkan perhatian, karena di samping temperatur mempunyai efek yang langsung terhadap pertumbuhan yeast juga mempengaruhi komposisi produk akhir. Pada temperatur yang terlalu tinggi akan menonaktifkan yeast. Pada temperatur yang terlalu rendah yeast akan menjadi tidak aktif. Selama proses fermentasi akan terjadi pembebasan panas sehingga akan lebih baik apabila pada tangki fermentasi dilengkapi dengan unit pendingin (Fardiaz, 1988).

Berdasarkan kemampuannya untuk mempergunakan oksigen bebas, mikroorganisme dapat diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu: aerob apabila untuk pertumbuhannya mikroorganisme memerlukan oksigen, anaerob apabila mikroorganisme akan tumbuh dengan baik pada keadaan tanpa oksigen, dan fakultatif apabila dapat tumbuh dengan baik pada keadaan ada oksigen bebas maupun tidak ada oksigen bebas. Sebagian besar yeast merupakan

mikroorganisme aerob. Yeast dari kultur yang memakai fakultatif anaerob akan menghasilkan alkohol dalam jumlah yang lebih besar apabila dibandingkan dengan yeast kultur yang tanpa aerasi. Akan tetapi efek ini tergantung yeast yang dipergunakan (Fardiaz, 1988). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerob sehingga pada awal fermentasi etanol dilakukan secara aerob untuk mengoptimalkan pertumbuhannya, sedangkan ketika produksi bioetanol dilakukan secara anaerob agar khamir dapat memproduksi etanol.

Banyaknya inokulum yang ditanam umumnya berkisar antara 3-10% dari volume media fermentasi (Rahman, 1992). Tingkat dosis berkaitan dengan besaran populasi mikroba yang berpeluang menentukan cepat tidaknya perkembangan mikroba dalam menghasilkan enzim untuk merombak substrat yang berpengaruh terhadap produk akhir. Makin tinggi dosis inokulum, maka akan semakin banyak populasi mikroba dan semakin banyak komponen substrat yang dirombak.

Lama inkubasi berkaitan erat dengan waktu yang dapat digunakan oleh mikroba untuk tumbuh dan berkembang biak (Setiyawan, 2007). Semakin lama waktu fermentasi semakin banyak kandungan zat yang dirombak untuk pertumbuhan bakteri sehingga kandungan zat makanan akan semakin sedikit. Pertumbuhan mikroba juga ditandai dengan lamanya waktu yang digunakan, sehingga konsentrasi metabolik semakin meningkat sampai akhirnya laju pertumbuhan kembali menurun (Fardiaz, 1988).

Aerasi dan agitasi bertujuan untuk mensuplai oksigen dan mencampur cairan fermentasi sehingga membentuk suspensi yang seragam. Bejana inokulum yang berisi media cair harus diaduk agar homogen untuk fermentasi aerobik. Pengadukan sangat penting sebab oksigen adalah nutrisi yang kelarutannya rendah. Pemenuhan kebutuhan oksigen untuk pertumbuhannya diberikan melalui agitasi (pengadukan) terhadap medium menggunakan *shaker*. Semakin tinggi kecepatan pengadukan, semakin besar kadar oksigen yang terlarut dalam medium dan nutrisi yang terkandung semakin homogen (Murdiyatmo, 2006).

2.3 Karakteristik Molases

Molases adalah hasil samping yang berasal dari pembuatan gula tebu (*Saccharum officinarum L*). Molases berupa cairan kental dan diperoleh dari tahap pemisahan kristal gula. Molases tidak dapat lagi dibentuk menjadi sukrosa namun masih mengandung gula dengan kadar tinggi 50-60%, asam amino dan mineral. Molases kaya akan biotin, asam pantotenat, tiamin, fosfor, dan sulfur. Selain itu juga mengandung gula yang terdiri dari sukrosa 30-40%, glukosa 4-9%, dan fruktosa 5-12%. Tetes tebu digunakan secara luas sebagai sumber karbon untuk denitrifikasi, fermentasi anaerobik, pengolahan limbah aerobik, dan diaplikasikan pada budidaya perairan. Karbohidrat dalam tetes tebu telah siap digunakan untuk fermentasi tanpa perlakuan pendahuluan seperti sakarifikasi karena sudah berbentuk gula (Hidayat *et al.*, 2006).

Menurut Nurdyastuti (2008), produksi etanol/bioetanol (alkohol) dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air. Konversi glukosa menjadi bioetanol tertinggi pada molases atau tetes tebu. Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan tetes menjadi bioetanol ditunjukkan pada **Tabel 2.2**

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

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

Sumber : Nurdyastuti, 2008.

Komposisi molases bervariasi sesuai dengan lokasi, varietas/jenis tebu, karakter tanah, iklim, dan metode pemrosesannya. Sifat-sifat molases meliputi keasaman dan kandungan senyawa-senyawa pengotor akibat dari proses pada pembuatan gula. Secara garis besar komposisi tetes ditunjukkan pada **Tabel 2.3**

Tabel 2.3 Karakteristik molases

Karakteristik	Nilai
pH	7.5
Padatan terlarut (g/l)	76.3
Gula reduksi (g/l)	114.7
Gula total (g/L)	740.6
Nitrogen (g/l)	8.8

Sumber : Nurdyastuti, 2008.

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Jenis khamir yang biasanya dipakai dalam industri fermentasi alkohol adalah jenis *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* adalah jenis khamir utama yang berperan dalam produksi minuman beralkohol seperti bir, anggur, dan juga digunakan untuk fermentasi adonan dalam perusahaan roti dan fermentasi tape. Kultur yang dipilih harus dapat tumbuh dengan baik dan mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol serta mampu menghasilkan alkohol dalam jumlah banyak (Irianto, 2006).

S. cerevisiae memerlukan kondisi lingkungan yang cocok untuk pertumbuhannya, yaitu nutrisi sebagai sumber energi terutama gula, pH optimum 4-5, temperatur optimum 28 °C - 30°C serta kebutuhan akan oksigen terutama pada awal pertumbuhan. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat menggunakan baik sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi dari pemecahan glukosa. *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan alkohol dalam jumlah yang besar. Selain itu juga memiliki toleransi yang tinggi terhadap alkohol, toleransi terhadap alkohol pada variasi strain berbeda (Elevri, 2006).

Berdasarkan penelitian Pereira *et al.* (2010), dari sebelas strain *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan untuk fermentasi bioetanol didapatkan hasil bahwa produksi bioetanol masing- masing strain berbeda-beda. Seperti disebutkan tiga strain diantaranya adalah strain CEN.PK 113-7D menghasilkan 17,5% (v / v) etanol dalam waktu kurang dari 80 jam. Selain itu strain CEN.PK 122 menghasilkan etanol dalam jumlah yang sama, tetapi dengan kecepatan fermentasi menjadi sedikit lebih lambat. Fermentasi dengan strain S288C jauh lebih lambat, yaitu dengan waktu fermentasi 120 jam.

Berdasarkan penelitian Patrascu (2009), dari lima strain *S. cerevisiae* yang digunakan yaitu strain Safdistil C-70, Ethanol RedTM, Fali^R, Trockenhefe, dan Pakmaya menghasilkan etanol yang berbeda-beda. Pada pertumbuhan dari lima strain setelah diinkubasi selama 24 jam didapatkan bahwa strain Safdistil C-70 dan Ethanol RedTM tumbuh lebih optimum daripada yang lainnya. Nilai rata-rata laju pertumbuhan spesifik dari lima strain ragi berurutan adalah sebesar 0,74 sel/jam, 0,76 sel/jam, 0,55 sel/jam, 0,47 sel/jam dan 0,50 sel/jam. Sedangkan untuk produksi etanol maksimum pada fermentasi 36 jam oleh strain Safdistil C-70 dengan produksi etanol sebesar 2,33 g/L. Dari penelitian tersebut dapat dikatakan bahwa produktivitas etanol tidak selalu seiring dengan banyaknya sel mikroba yang tumbuh. Hal tersebut dapat dikarenakan karakteristik masing-masing strain berbeda sehingga tingkat produktivitasnya juga berbeda.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, dan Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Biomaterial CDAST Universitas Jember . Waktu penelitian dimulai pada bulan Maret hingga Juli 2014.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan meliputi bahan baku, bahan kimia dan kultur mikroorganisme. Bahan baku berupa limbah molases diperoleh dari PTPN XI pabrik pengolahan gula Djatiroto. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah pupuk urea, NaOH (PA), H₂SO₄ pekat, K₂Cr₂O₇, asam fosfat 10%, reagen *dinitrosalisilic acid* (DNS), media MEB, dan media MEA. Kultur mikroorganisme yang digunakan adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Alat penelitian yang digunakan yaitu Laminar Air Flow (LAF) CRUMAiR, penghitung koloni (*colony counter*) Stuart Scientific, cawan conway, spektrofotometer Genesys 10 UV, *hand refractometer* ATAGO, oven *Scientific Series* 2000, autoklaf, inkubator Heraeus Instrument, orbital shaker inkubator Wise Cube[®], mikrowafe, dan digital pH meter, dan alat gelas.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan menggunakan metode deskriptif dengan tiga variasi yaitu jenis khamir *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763, derajat brix molases yaitu 14^oBrix dan 34^oBrix serta kecepatan agitasi pada proses fermentasi yaitu pada kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm. Pada fermentasi tahap awal dilakukan fermentasi untuk menentukan kecepatan agitasi yang optimum dengan variasi kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm. Dari

fermentasi tersebut dipilih kecepatan agitasi 100 rpm untuk fermentasi pada 14°Brix dan 34°Brix sehingga didapatkan kombinasi perlakuan sebagai berikut.

A1B1C1	A1B2C1	A2B1C1
A1B1C2	A2B2C1	A2B1C2

Keterangan :

- A = strain mikroba (A1.= strain FNCC 3210 dan A2 = strain ATCC 9763),
- B = derajat brix molases (B1 = molases 14°Brix dan B2 = molases kadar derajat 34°Brix)
- C = kecepatan agitasi (C1 = kecepatan agitasi 100 rpm dan C2 = kecepatan agitasi 200 rpm)

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 ini terdiri dari beberapa tahap yaitu persiapan sampel, pembuatan starter, dan produksi bioetanol.

- a. Persiapan sampel molases
- b. Molases yang digunakan diperoleh dari limbah industri pengolahan gula tebu. Molases murni tersebut memiliki derajat brix yang tinggi yaitu 80°Brix. Untuk media fermentasi molases murni diencerkan hingga 14°Brix dan 34°Brix. Molases dengan pH awal 5,2 diturunkan hingga pH 4,5 dengan larutan H₂SO₄ pekat konsentrasi 98%. Molases dipanaskan hingga suhu 90°C dan didiamkan selama 24 jam untuk memisahkan padatan yang tidak terlarut. Untuk memperkaya nutrisi molases dilakukan penambahan dengan urea 0,429 g/L dan asam fosfat konsentrasi 10% (v/v) sebanyak 0,07 ml/L. Untuk selanjutnya dilakukan sterilisasi molases dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,72 atm.

c. Pembuatan starter

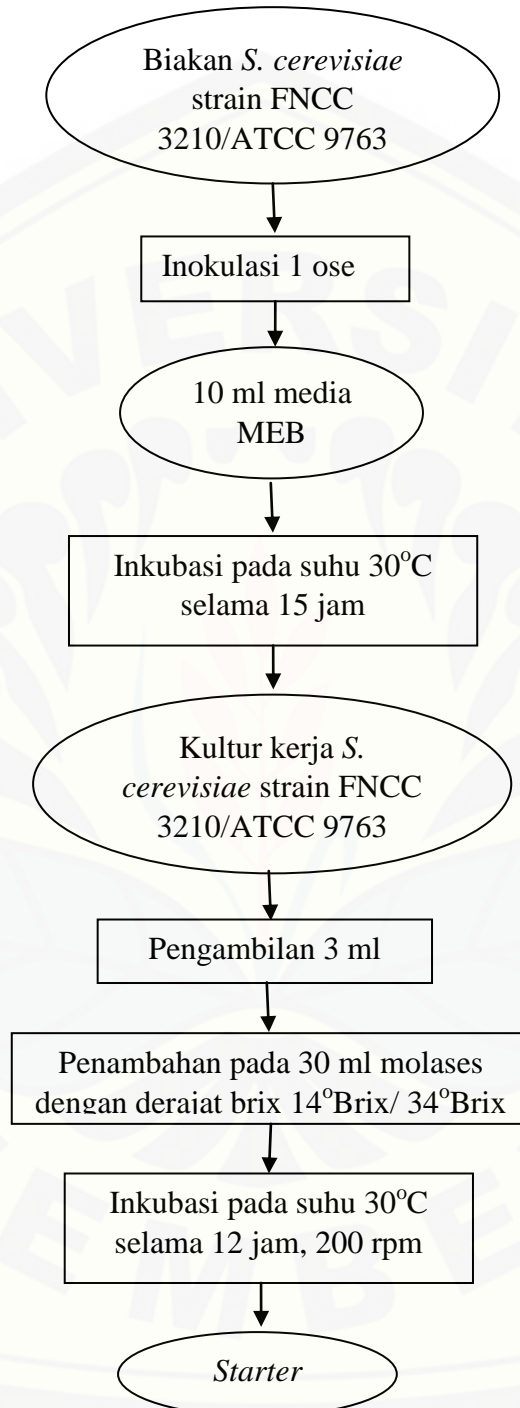
Pembuatan starter dilakukan dengan meremajakan dua strain *Saccharomyces cerevisiae* (FNCC 3210 dan ATCC 9763) pada media agar miring MEA (*Malt Extract Agar*) selama 48 jam pada suhu 30° C. Media MEA dibuat dengan cara melarutkan 15 g MEB dan 15 g NA pada 1 L aquades, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dan didinginkan pada kondisi miring. Kultur pada media agar miring diambil sebanyak 1 ose kultur dan diinokulasikan pada 10 ml media MEB untuk diinkubasi selama 15 jam pada suhu 30° C sebagai kultur kerja.

Masing- masing sebanyak 1 ml inokulum *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 ditambahkan pada 30 ml molases dengan 14°Brix dan 34°Brix yang telah dipreparasi dan disterilkan, kemudian diinkubasi selama 12 jam pada suhu 30° C pada kecepatan agitasi 200 rpm. Diagram alir pembuatan starter bioetanol dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.

c. Produksi Bioetanol

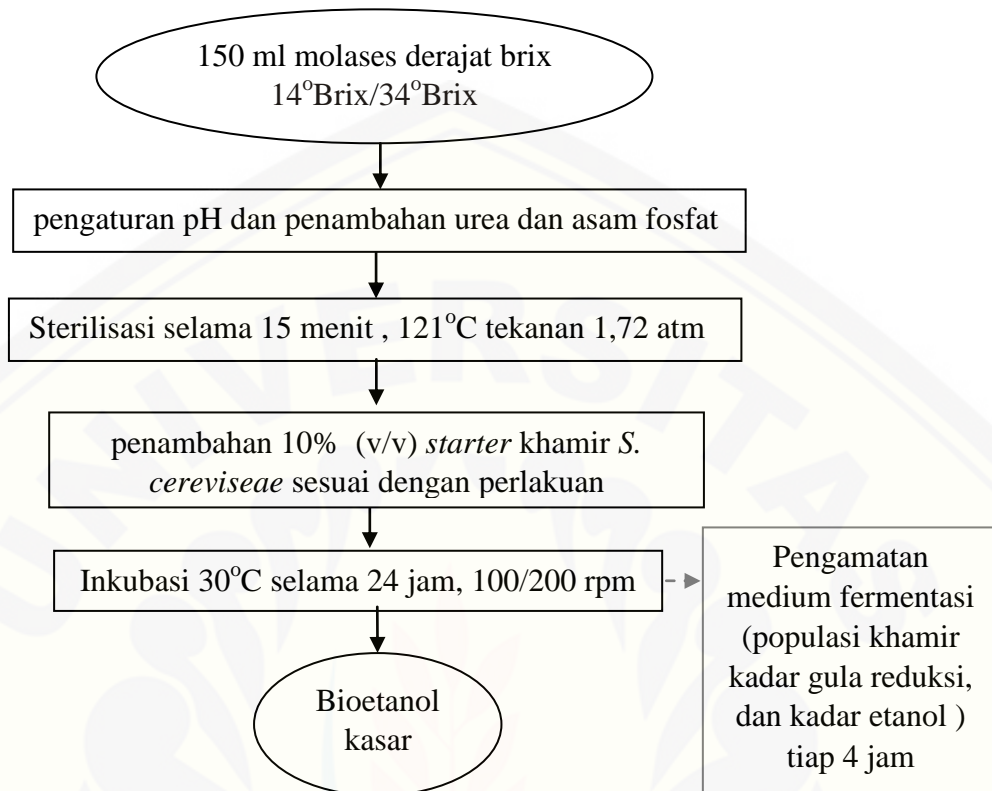
Proses produksi bioetanol dilakukan dengan menggunakan media yang terdiri dari 150 ml molases dengan 14°Brix dan 34°Brix yang telah dipreparasi dan disterilkan. Masing- masing sampel ditambahkan starter sebanyak 10% (v/v) dan diinkubasi dalam orbital shaker inkubator dengan variasi kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm pada suhu 30° C selama 24 jam. Selama fermentasi dilakukan pengamatan total mikroba, kadar gula reduksi, dan kadar etanol selama selang waktu 4 jam. Diagram alir produksi bioetanol dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.

3.3. Skema Kerja
a. Pembuatan *Starter*



Gambar 3.1 Diagram alir pembuatan *starter*

b. Produksi Bioetanol

**Gambar 3.2** Diagram alir tahap produksi bioetanol

1.1 Parameter Pengamatan

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

1.2 Prosedur Analisis

1.2.1 Populasi Mikroba Menggunakan Metode Lempeng Agar (Ristiati, 2000)

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

- 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung pertama, hingga konsentrasi larutan di dalam tabung pertama menjadi 10^{-1} .
- 1 ml di tabung pertama diambil dan dimasukkan ke tabung kedua, hingga konsentrasi di tabung kedua menjadi 10^{-2} , demikian seterusnya hingga didapat larutan dengan konsentrasi terendah yaitu 10^{-8} .

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

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

Pembuatan reagen DNS

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

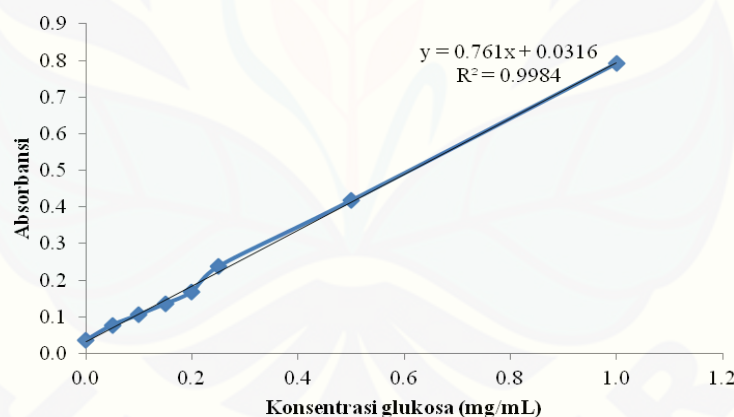
Pembuatan kurva standar

Kurva standar diperoleh dengan cara membuat seri konsentrasi glukosa dari larutan glukosa standar 0,1% (w/v) 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. Seri pengambilan konsentrasi larutan standart glukosa dan nilai pengukuran absorbansi dapat dilihat pada **Tabel 3.1** serta kurva standart gula reduksi dapat dilihat pada **Gambar 3.3**.

Tabel 3.1 Seri konsentrasi pengambilan larutan standart glukosa dan nilai pengukuran absorbansi

Konsentrasi glukosa (mg/ml)	Absorbansi
0,0000	0,035
0,0500	0,077
0,1000	0,105
0,1500	0,135
0,2000	0,168
0,2500	0,237
0,5000	0,417
1,0000	0,791



Gambar 3.3 Kurva standart gula reduksi

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. Jumlah gula reduksi sampel dihitung dari perbandingan persamaan linear yang diperoleh dari kurva

standart dengan volume pengambilan sampel. Persamaan Linier yang diperoleh adalah $y = 0,761x + 0,0316$

Konsentrasi gula Pereduksi (mg/ml) = x ; dimana $x = \frac{y - 0,0316}{0,761}$

Keterangan :

y = Absorbansi sampel; Volume pengambilan sampel = 0,5 ml

1.2.3 Penentuan Kadar etanol metode *Chamber Conway* (Kartika *et al.*, 1992).

Analisis etanol menggunakan metode *Chamber Conway* membutuhkan 3 larutan, yaitu larutan A, larutan B, dan larutan C. Larutan A merupakan 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 magnetik stirer. Larutan B diencerkan hingga 100 ml. Larutan C merupakan larutan stok yang dibuat dari 1 ml etanol 96% yang ditera akuades hingga 100 ml.

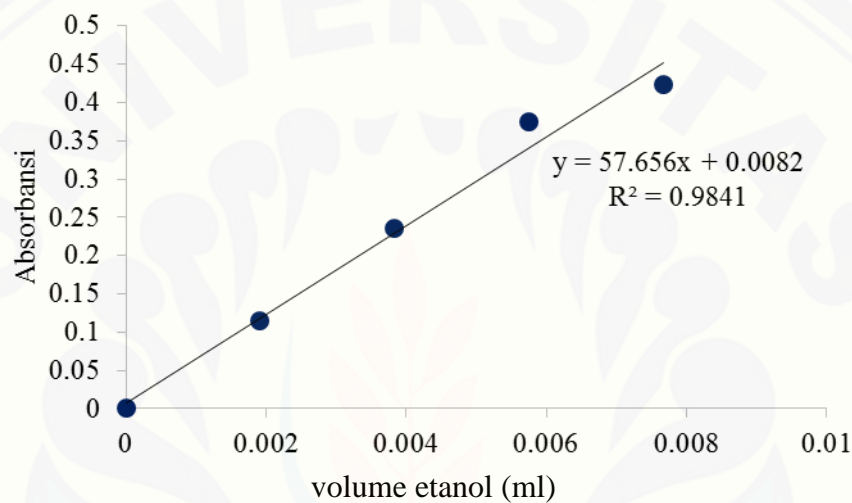
Pembuatan kurva standart dibuat dengan cara menambahkan campuran berikut ke dalam cawan conway :

- 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

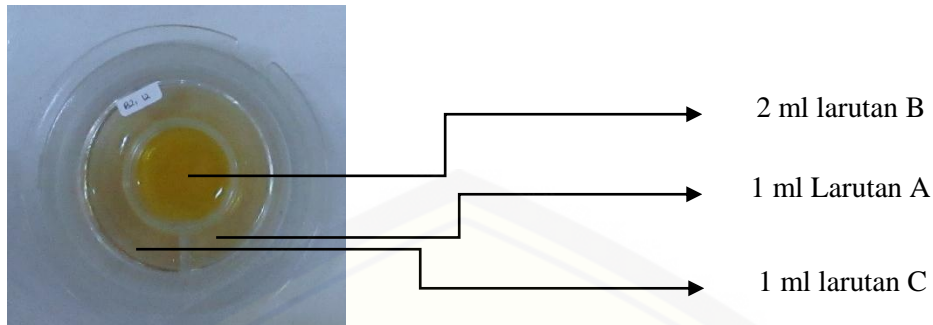
Sebelum cawan conway ditutup, ditambahkan 1 ml larutan A dan digoyangkan untuk mencampurkan larutan A dan C. Cawan conway didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam, 2 ml akuades ditambahkan dalam larutan B dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 605 nm. Nilai dari hasil pengukuran absorbansi larutan standart etanol dan kurva standart etanol dapat dilihat pada **Tabel 3.2** dan **Gambar 3.4**.

Tabel 3.2 Seri konsentrasi pengambilan larutan standart etanol dan nilai pengukuran absorbansi

vol. pengambilan	C ₂ H ₅ OH (ml)	Abs
0	0	0
0,2	0,00192	0,115
0,4	0,00384	0,235
0,6	0,00576	0,374
0,8	0,00768	0,424

**Gambar 3.4** Kurva standart etanol

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



Gambar 3.5 Prosedur penggunaan cawan conway dalam analisa jumlah etanol

Jumlah etanol sampel dihitung dengan persamaan:

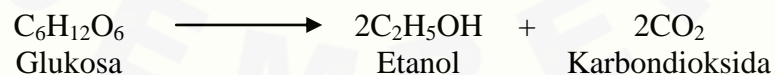
- Konsentrasi C_2H_5OH (ml/ml) $x = \frac{y-0,0082}{57,656}$
- Konsentrasi C_2H_5OH (ml/L) $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{1000 \text{ ml}}{L}$
- Konsentrasi C_2H_5OH (g/ml) $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{0,789 \text{ g}}{\text{ml}}$
- Yield (Y_p/s) = $\frac{\text{jumlah etanol yang dihasilkan}}{\text{gula reduksi yang dikonsumsi}}$ (g/g)
- Produktivitas etanol = $\frac{\text{etanol yang dihasilkan}}{\text{waktu fermentasi}}$ (g/L/jam)
- Efisiensi fermentasi = $\frac{\text{etanol yang dihasilkan}}{\text{etanol teoritis}} \times 100\%$ (%)

Keterangan :

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

Perhitungan jumlah etanol teoritis :

1 mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol :



$$\text{mol} = \frac{\text{gram}}{\text{MR}} ;$$

- MR $C_6H_{12}O_6$ = 180; MR C_2H_5OH = 46, sehingga 1 gram glukosa mampu menghasilkan 0,5111 gram etanol.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan produksi bioetanol menggunakan dua strain khamir *Saccharomyces cerevisiae* yaitu strain FNCC 3210 (A1) dan ATCC 9763 (A2). Produksi bioetanol dilakukan pada media molases dimana untuk tahap pertama dilakukan pada dua kecepatan agitasi yaitu 100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases 14°Brix (B1). Hal tersebut dilakukan untuk mencari kecepatan agitasi yang optimal untuk produksi etanol. Setelah didapatkan kecepatan agitasi optimal untuk produksi etanol dilakukan produksi etanol pada kecepatan agitasi terpilih dengan menggunakan dua derajat brix media molases yaitu 14°Brix (B1) dan 34°Brix (B2). Fermentasi dilakukan selama 24 jam secara *batch*. Kadar etanol yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebesar 2-4% (v/v). Perolehan etanol yang rendah disebabkan ketersediaan kadar gula reduksi pada media 14°Brix hanya sekitar 8%. Menurut Utama, A.W *et al* (2013) etanol yang dihasilkan pada suatu fermentasi sejumlah setengah dari kadar gula yang terkandung pada media fermentasi. Pada penelitian O'leary *et al* (2004) dengan media susu rusak yang mengandung gula sebesar 4,8% (v/v) hanya dapat menghasilkan etanol sebesar 2,2% (v/v). Sedangkan pada kondisi media B2, produksi etanol rendah dikarenakan khamir kurang bisa beradaptasi pada kondisi media kadar gula tinggi. Gaur (2006) menyatakan bahwa pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi gula hingga 20% dalam medium, tetapi peningkatan konsentrasi gula lebih dari 20% mengakibatkan terganggunya metabolisme sel dan efisiensi proses fermentasi. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan pada populasi khamir, kadar gula reduksi, dan kadar etanol. Hasil pengamatan masing- masing parameter dan pembahasan diuraikan dalam sub-sub bab berikut.

4.1 Pengaruh Kecepatan Agitasi Terhadap Kadar Etanol Pada Fermentasi dengan Media Molases 14°Brix

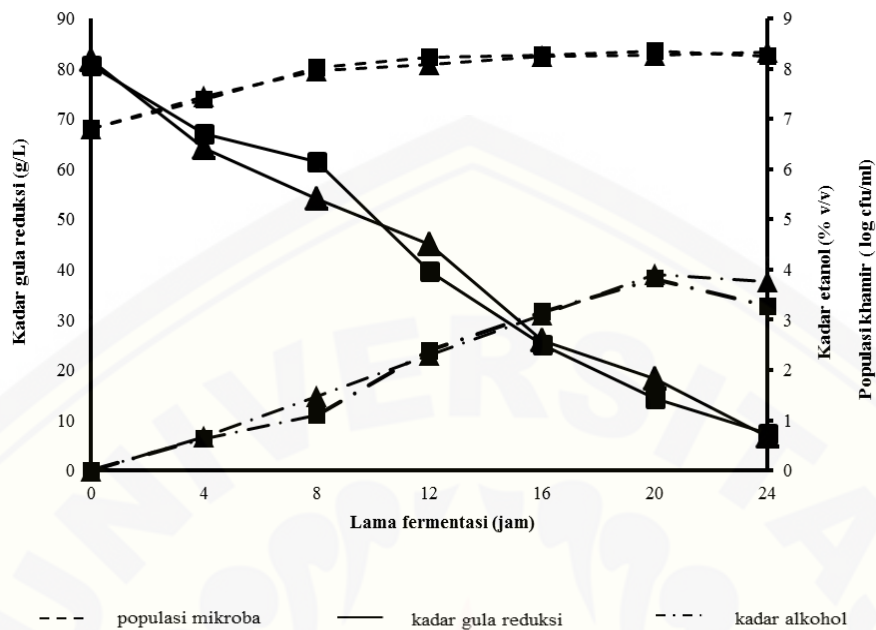
Produksi bioetanol pada media molases oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 dan strain ATCC 9763 pada tahap pertama dilakukan dengan dua variasi

kecepatan agitasi yaitu 100 rpm dan 200 rpm dengan media molases 14^oBrix. Hal tersebut dilakukan untuk memperoleh kecepatan agitasi yang dapat menghasilkan etanol lebih optimal. Hasil pengamatan masing- masing parameter dan pembahasan diuraikan dalam sub-sub bab berikut.

4.1.1 Produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210

Agitasi pada fermentasi bioethanol memiliki tujuan untuk menghomogenkan media fermentasi (Stanburry dan Whitaker, 1990). Fermentasi bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 pada media molases 14^oBrix dilakukan dengan variasi kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm. Populasi yeast pada masing-masing perlakuan tersebut mengalami pertumbuhan dan berkembang biak hingga 20 jam fermentasi. Populasi awal khamir pada kedua perlakuan memiliki perbedaan yaitu pada waktu fermentasi 0 jam hingga 12 jam, tetapi populasi optimum kedua perlakuan tidak berbeda secara nyata. Pada perlakuan A1B1C1, khamir mengalami fase logaritmik pada jam pengamatan ke-24 dengan jumlah populasi khamir maksimum $8,34 \pm 0,020 \log$ cfu/ml, sedangkan pada perlakuan A1B1C2 fase logaritmik terjadi pada jam pengamatan ke-20 dengan jumlah populasi khamir sebesar $8,35 \pm 0,115 \log$ cfu/ml. Pada kecepatan agitasi 200 rpm populasi khamir memiliki populasi khamir tinggi dapat dikarenakan khamir cenderung melakukan respirasi dibandingkan menghasilkan etanol. Hubungan populasi mikroba dengan kemampuan khamir untuk mengkonsumsi substrat gula dan produksi etanol dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.

Gambar 4.1 menunjukkan hubungan kadar gula reduksi, populasi mikroba, dan kadar etanol pada fermentasi dengan substrat media molases 14^oBrix pada kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm. Media fermentasi etanol harus memiliki kandungan gula terutama gula reduksi untuk dimanfaatkan khamir dalam pertumbuhan dan menghasilkan etanol. Kadar gula reduksi awal media molases dengan perlakuan A1B1C1 dan A1B1C2 masing- masing adalah $81,59 \pm 2,695 \text{ g/L}$ dan $80,604 \pm 2,230 \text{ g/L}$. Selama fermentasi berlangsung jumlah gula reduksi tersebut mengalami penurunan. Konsumsi gula selama fermentasi pada media dengan perlakuan fermentasi pada kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm masing- masing adalah $74,836 \pm 7,712 \text{ g/L}$ dan $73,193 \pm 0,372 \text{ g/L}$. Berdasarkan data tersebut konsumsi gula reduksi pada fermentasi dengan perlakuan A1B1C2 memiliki jumlah konsumsi gula yang lebih kecil.



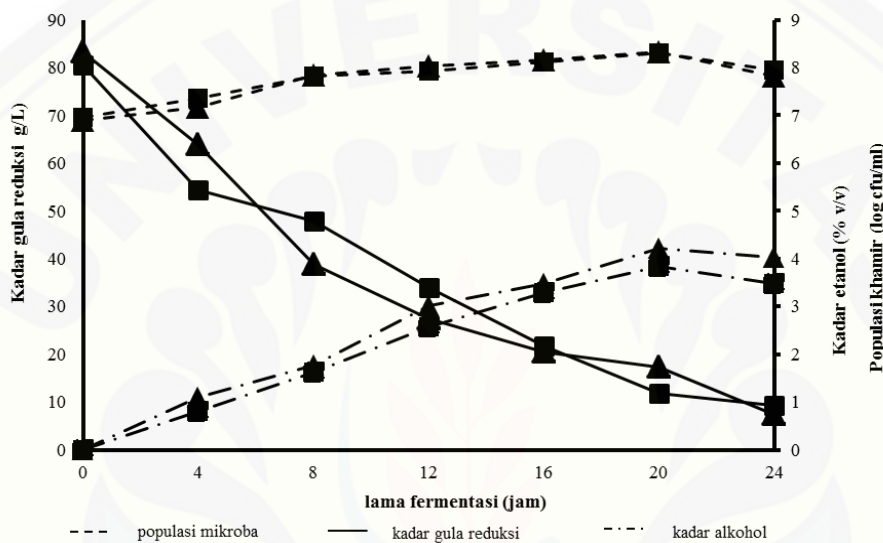
Gambar 4.1 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A1B1C1 (▲) dan A1B1C2 (■)

Konsumsi gula reduksi selama fermentasi pada perlakuan A1B1C2 memiliki jumlah yang lebih kecil dibandingkan konsumsi gula pada perlakuan A1B1C1. Hal tersebut diduga dikarenakan kadar etanol yang dihasilkan pada perlakuan A1B1C2 memiliki jumlah yang lebih kecil dibandingkan etanol yang dihasilkan pada perlakuan A1B1C1. Etanol yang dihasilkan pada perlakuan masing-masing perlakuan adalah $3,908 \pm 0,037\%$ (v/v) dan $3,614 \pm 0,184\%$ (v/v). Hal tersebut terkait dengan kegiatan khamir lebih banyak melakukan respirasi sehingga pertumbuhan populasi lebih tinggi. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Rodmui *et al* (2008) bahwa peningkatan kecepatan agitasi dari 100 rpm ke 200 rpm dapat meningkatkan sel biomasa *yeast* saja, sedangkan peningkatan etanol terjadi pada kecepatan agitasi yang lebih pelan yaitu 50 rpm. Walaupun demikian berdasarkan uji beda T kedua perlakuan menghasilkan etanol yang berbeda tidak nyata.

4.1.2 Produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain ATCC 9763

Variasi kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm juga dilakukan pada fermentasi oleh *S. cerevisiae* strain ATCC 9763 pada media molases dengan 14°Brix. Populasi yeast pada masing-masing perlakuan tersebut mengalami pertumbuhan dan berkembang biak

hingga kurun waktu tertentu. Pada perlakuan A2B1C1, khamir mengalami fase logaritmik pada jam pengamatan ke-20 dengan jumlah populasi khamir maksimum $8,33 \pm 0,343$ log cfu/ml, pada perlakuan A2B1C2 fase logaritmik juga terjadi pada jam pengamatan ke-20 dengan jumlah populasi khamir sebesar $8,32 \pm 0,115$ log cfu/ml. Populasi khamir mengalami penurunan pada jam pengamatan ke-24. Hubungan populasi mikroba dengan kemampuan khamir untuk mengonsumsi substrat gula dan produksi etanol dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A2B1C1 (▲) dan A2B1C2 (■)

Gambar 4.2 menunjukkan bahwa selama fermentasi terjadi peningkatan jumlah populasi khamir diiringi dengan penurunan jumlah gula reduksi. Kadar gula reduksi awal pada perlakuan A2B1C1 dan A2B1C2 masing-masing adalah $83,298 \pm 2,880$ g/L dan $80,539 \pm 0,279$ g/L. Gula reduksi kedua sampel mengalami penurunan hingga fermentasi jam ke-24 dikarenakan dimanfaatkan oleh khamir untuk pertumbuhan dan produksi etanol. Konsumsi gula perlakuan A2B1C1 dan A2B1C2 selama 24 jam masing-masing adalah $75,887 \pm 1,765$ g/L dan $71,222 \pm 1,858$ g/L. Perbedaan konsumsi gula reduksi tersebut dapat dikarenakan perbedaan populasi khamir dan produksi etanol oleh kedua perlakuan.

Penurunan kadar gula reduksi selama fermentasi tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan khamir, tetapi juga digunakan untuk menghasilkan etanol. Etanol yang dihasilkan selama fermentasi oleh *S. cerevisiae* strain ATCC 9763

pada kecepatan agitasi 100 rpm dan 200 rpm dengan media molases 14°Brix masing-masing adalah $4,211 \pm 0,074$ %(v/v) dan $3,838 \pm 0,184$ %(v/v). Perbedaan tersebut diduga karena kecepatan agitasi 200 rpm menyebabkan kondisi fermentasi menjadi aerob karena jumlah oksigen di dalam media yang terlalu tinggi sehingga *yeast* cenderung melakukan respirasi dibandingkan fermentasi bioetanol (Kurniawan, 2011). Kadar etanol menurun pada fermentasi jam ke- 24, hal tersebut diduga dikarenakan *yeast* menghasilkan metabolit lain yaitu berupa asam yang ditandai dengan menurunnya pH media fermentasi. Berdasarkan uji T kedua perlakuan memiliki kadar etanol yang tidak berbeda secara signifikan.

4.2 Kinetika Fermentasi Etanol oleh *Yeast* A1 dan A2 dengan Kecepatan Agitasi 100 rpm dan 200 rpm pada Media Molases 14°Brix

Kecepatan agitasi yang berbeda pada produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 (A1) dan ATCC 9763 (A2) memberikan pengaruh terhadap kinetika fermentasi. Berikut adalah kinetika fermentasi oleh *Yeast* A1 dan A2 dengan kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases 14°Brix (B1).

4.2.1 Laju Konsumsi

Laju konsumsi gula reduksi merupakan besarnya konsumsi gula reduksi selama fermentasi tiap satuan waktu. Laju konsumsi menyatakan kecepatan *yeast* untuk mengkonsumsi gula tiap jam fermentasi. Laju konsumsi gula reduksi *yeast* A1 dan A2 pada kondisi C1 untuk mencapai populasi maksimum, secara berturut-turut sebesar $3,118 \pm 0,321$ g/L/jam dan $3,298 \pm 0,084$ g/L/jam. Sedangkan pada kondisi C2 laju konsumsi oleh *yeast* A1 dan A2 untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar $3,315 \pm 0,116$ g/L/jam dan $3,440 \pm 0,005$ g/L/jam. Laju konsumsi *yeast* A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi C1 dan C2 pada media molases dengan 14°Brix dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 menunjukkan laju konsumsi gula reduksi maksimum *yeast* A1 dan A2 tercapai pada waktu fermentasi antara 4 jam hingga 16 jam fermentasi. Laju konsumsi maksimum *yeast* A1 dan A2 pada kondisi C1 tercapai pada waktu fermentasi 4 jam dan 8 jam dengan nilai laju konsumsi gula reduksi secara berturut-turut sebesar $4,336 \pm 2,276$

g/L/jam dan $5,568 \pm 0,163$ g/L/jam. *Yeast* A1 dan A2 pada kondisi C2 mencapai laju konsumsi gula reduksi maksimum pada lama fermentasi 16 jam dan 4 jam dengan nilai laju konsumsi gula reduksi berturut-turut $3,470 \pm 0,052$ g/L/jam dan $6,554 \pm 1,603$ g/L/jam. Pada fermentasi oleh *yeast* A1 kondisi C2 memiliki laju konsumsi gula reduksi maksimum yang lebih rendah dibandingkan pada kondisi C1. Hal tersebut dapat dikarenakan kadar etanol yang dihasilkan juga berbeda. Pada fermentasi oleh *yeast* A2, kondisi C2 memiliki laju konsumsi yang lebih tinggi dibandingkan pada kondisi C1. Hal tersebut dapat dikarenakan pada awal fermentasi populasi *yeast* pada kondisi C2 lebih tinggi dibandingkan pada kondisi C1. Peningkatan agitasi selama fermentasi secara *batch* (tertutup) bisa meningkatkan laju konsumsi gula selama fermentasi (Rodmui *et al.*, 2008).

Tabel 4.1 Laju Konsumsi Gula Reduksi yeast A1 dan A2

Waktu fermentasi	Laju konsumsi (g/L/jam)			
	A1		A2	
	C1	C2	C1	C2
0	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
4	$4,336 \pm 2,276$	$3,400 \pm 1,510$	$4,829 \pm 0,650$	$6,554 \pm 1,603$
8	$3,433 \pm 1,254$	$2,390 \pm 0,453$	$5,568 \pm 0,163$	$4,082 \pm 0,012$
12	$3,050 \pm 0,240$	$3,411 \pm 0,008$	$4,665 \pm 0,170$	$3,887 \pm 0,217$
16	$3,486 \pm 0,145$	$3,470 \pm 0,052$	$3,930 \pm 0,110$	$3,679 \pm 0,070$
20	$3,164 \pm 0,339$	$3,315 \pm 0,116$	$3,298 \pm 0,084$	$3,440 \pm 0,005$
24	$3,118 \pm 0,321$	$3,050 \pm 0,015$	$3,162 \pm 0,074$	$2,968 \pm 0,077$

Dari data di atas dapat diketahui bahwa secara umum laju konsumsi gula reduksi maksimum masing-masing yeast telah tercapai pada awal fermentasi yaitu pada lama fermentasi 4 hingga 8 jam. Hal ini dapat terjadi karena pada waktu tersebut merupakan fase logaritmik dari masing-masing *yeast*, sehingga konsumsi substrat berupa gula reduksi lebih tinggi pada jam tersebut karena *yeast* melakukan pertumbuhan dan menghasilkan metabolit primer. Peningkatan agitasi pada fermentasi secara *batch* (tertutup) bisa meningkatkan laju konsumsi gula selama fermentasi (Rodmui *et al.*, 2008)

4.2.2 Growth Rate

Growth rate adalah ukuran dari peningkatan biomassa selama fase eksponensial fermentasi. Lama fase eksponensial tergantung pada banyaknya inokulum, tingkat

pertumbuhan dan kondisi media untuk pertumbuhan mikroba. Nilai *growth rate* spesifik untuk setiap mikroorganisme dan medium biakan. Nilai *growth rate* selama fermentasi oleh *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 (A1) dan ATCC 9763 (A2) dengan kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases 14°Brix (B1) dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Growth rate oleh yeast A1 dan A2

Lama Fermentasi (jam)	<i>Growth rate</i>			
	A1		A2	
	C1	C2	C1	C2
12	0,249±0,024	0,281±0,001	0,233±0,005	0,249±0,008

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa peningkatan kecepatan agitasi dapat meningkatkan laju pertumbuhan *yeast* A1 selama fase log. Pada kondisi C1 *growth rate* yang dicapai oleh *yeast* A1 sebesar 0,249±0,024 log cfu/mL/jam, sedangkan pada kondisi C2 nilai *growth rate* yaitu 0,281±0,001 log cfu/mL/ jam. Pada kondisi C1 *growth rate* yang dicapai oleh *yeast* A2 sebesar 0,233±0,005 log cfu/mL/jam, sedangkan pada kondisi C2 nilai *growth rate* yaitu sebesar 0,249±0,008 log cfu/mL/ jam. Dari data tersebut *growth rate yeast* A1 dan A2 selama 12 jam fermentasi berbeda secara signifikan. Hal tersebut dikarenakan peningkatan kecepatan agitasi akan meningkatkan kelarutan oksigen pada media fermentasi yang berpengaruh terhadap peningkatan kecepatan pertumbuhan *yeast*. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Lin *et al* (2011) bahwa jumlah oksigen terlarut di dalam media fermentasi dapat memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhan dan perkembangan *yeast*.

4.2.3 Growth Yield (x/s)

Hubungan antara pertumbuhan sel mikroba dan konsumsi substrat dinyatakan dengan $Y_{x/s}$ atau *growth yield*. Nilai *growth yield yeast* A1 dan A2 dengan kondisi C1 untuk mencapai populasi maksimum, secara berturut-turut sebesar 0,021±0,006 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,022±0,005 (log cfu/ml)/(g/L). Pada kondisi C2, nilai *growth yield yeast* A1 dan A2 untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar 0,023±0,007 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,020±0,002 (log cfu/ml)/(g/L). Perbandingan *growth yield* ($Y_{x/s}$) *yeast* A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi kecepatan agitasi

100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases dengan derajat 14°Brix (B1) dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3 Growth yield oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Growth yield (log cfu/mg)			
	A1		A2	
	C1	C2	C1	C2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
4	0,033±0,012	0,046±0,016	0,015±0,015	0,015±0,005
8	0,042±0,005	0,064±0,003	0,021±0,000	0,027±0,000
12	0,034±0,007	0,035±0,000	0,020±0,003	0,021±0,011
16	0,025±0,003	0,026±0,004	0,020±0,004	0,020±0,000
20	0,023±0,007	0,023±0,007	0,022±0,005	0,020±0,002
24	0,021±0,006	0,020±0,004	0,012±0,004	0,014±0,003

Growth yield maksimum yeast A1 dengan kondisi C1 dan C2 tercapai saat 8 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 0,042±0,005 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,064±0,003 (log cfu/ml)/(g/L). Pada fermentasi oleh A2 dengan kondisi C1 dan C2, nilai *growth yield* maksimum terjadi pada lama fermentasi yang berbeda, masing-masing pada 20 jam dan 8 jam fermentasi. Nilai *growth yield* maksimum yeast A2 dengan kondisi C1 dan C2, secara berturut-turut sebesar 0,022±0,005 (log cfu/ml)/(g/L) dan 0,027±0,000 (log cfu/ml)/(g/L). Dari data tersebut didapatkan bahwa kondisi C2 pada yeast A1 meningkatkan nilai *growth yield*. Hal tersebut dapat dikarenakan peningkatan kecepatan agitasi dapat meningkatkan tingkat pertumbuhan *S.cerevisiae* karena semakin tinggi oksigen terlarut yang terkandung dalam media. Pemberian agitasi dapat meningkatkan kelarutan oksigen di dalam media fermentasi yang dapat meningkatkan pertumbuhan yeast dan produksi etanol, tetapi kelarutan oksigen yang terlalu tinggi dapat menyebabkan yeast cenderung melakukan respirasi (Fardiaz, 1988).

4.2.4. Produktivitas

Produktivitas pada proses fermentasi dinyatakan sebagai besarnya produk yang dihasilkan tiap satuan waktu fermentasi. Produktivitas etanol berbanding lurus dengan konsentrasi etanol karena produktivitas etanol. Semakin besar etanol yang dihasilkan, maka semakin besar pula produktivitas etanol. Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 dengan kondisi C1 saat mencapai populasi maksimum yaitu pada 24 jam fermentasi dan 20 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar 1,239±0,020 g/L/jam dan 1,661±0,029 g/L/jam. Pada kondisi C2, saat mencapai populasi maksimum (20 jam

fermentasi) produktivitas etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar $1,507 \pm 0,073$ g/L/jam dan $1,514 \pm 0,073$ g/L/jam. Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi agitasi 100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases derajat 14° Brix dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

Tabel 4.4 Produktivitas oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Produktivitas (g/L/jam)			
	A1		A2	
	C1	C2	C1	C2
0	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
4	$1,316 \pm 0,102$	$1,248 \pm 0,198$	$2,166 \pm 0,121$	$1,596 \pm 0,085$
8	$1,459 \pm 0,278$	$1,080 \pm 0,042$	$1,750 \pm 0,351$	$1,596 \pm 0,060$
12	$1,509 \pm 0,234$	$1,571 \pm 0,097$	$1,982 \pm 0,339$	$1,685 \pm 0,306$
16	$1,534 \pm 0,151$	$1,559 \pm 0,224$	$1,717 \pm 0,109$	$1,619 \pm 0,151$
20	$1,542 \pm 0,015$	$1,507 \pm 0,073$	$1,661 \pm 0,029$	$1,514 \pm 0,073$
24	$1,239 \pm 0,020$	$1,077 \pm 0,065$	$1,325 \pm 0,125$	$1,145 \pm 0,145$

Tabel 4.4 merupakan produktivitas fermentasi pada perlakuan A1B1C1 dan A1B1C2. Produktivitas etanol maksimum oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi C1 selama fermentasi didapatkan pada waktu 20 jam dan 4 jam fermentasi dengan nilai produktivitas etanol berturut-turut $1,542 \pm 0,015$ g/L/jam dan $2,166 \pm 0,121$ g/L/jam. Sedangkan produktivitas oleh *yeast* A1 dan A2 pada perlakuan C2 produktivitas maksimum pada perlakuan A1B1C1 pada jam ke-20 yaitu didapatkan pada waktu 12 jam fermentasi dengan nilai produktivitas berturut-turut $1,571 \pm 0,097$ g/L/jam dan $1,685 \pm 0,036$ g/L/jam. Pada fermentasi oleh *yeast* A1 mengalami peningkatan produktivitas, sedangkan pada fermentasi oleh *yeast* A2 mengalami penurunan. Berdasarkan uji T kedua *yeast* menghasilkan kadar etanol yang berbeda tidak nyata pada kedua kondisi kecepatan agitasi. Berdasarkan penelitian Khongsay, *et al* (2012), perbedaan agitasi tidak memberikan pengaruh yang signifikan pada produksi etanol, tetapi pemberian kombinasi antara agitasi dan aerasi dapat meningkatkan produksi etanol.

4.2.5 Yield (p/s)

Yield adalah besarnya produk yang terbentuk oleh *yeast* per satuan massa substrat yang dikonsumsi. Perhitungan *yield* dapat memberikan nilai keseimbangan antara hubungan besarnya konsumsi substrat dan pembentukan produk (Hong, 2008). Pada

kondisi C1 pada jam ke-20 nilai yield etanol yang dihasilkan oleh *yeast* A2 lebih tinggi daripada *yeast* A1 yaitu secara berturut-turut sebesar $0,504\pm 0,004$ dan $0,490\pm 0,048$. 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. Pada kondisi C2, nilai yield etanol yang dihasilkan oleh *yeast* A1 lebih tinggi daripada *yeast* A2 yaitu secara berturut-turut sebesar $0,454\pm 0,006$ dan $0,440\pm 0,02$. Nilai yield etanol (Y_p/s) oleh *yeast* A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases 14°Brix dapat dilihat pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Yield (p/s) oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Yield (p/s)			
	A1		A2	
	C1	C2	C1	C2
0	$0,000\pm 0,000$	$0,000\pm 0,000$	$0,000\pm 0,000$	$0,000\pm 0,000$
4	$0,345\pm 0,158$	$0,393\pm 0,116$	$0,451\pm 0,036$	$0,249\pm 0,048$
8	$0,440\pm 0,080$	$0,459\pm 0,069$	$0,313\pm 0,054$	$0,391\pm 0,014$
12	$0,493\pm 0,038$	$0,461\pm 0,029$	$0,426\pm 0,088$	$0,432\pm 0,055$
16	$0,439\pm 0,025$	$0,450\pm 0,071$	$0,437\pm 0,015$	$0,440\pm 0,033$
20	$0,490\pm 0,048$	$0,454\pm 0,006$	$0,504\pm 0,004$	$0,440\pm 0,021$
24	$0,400\pm 0,048$	$0,353\pm 0,006$	$0,419\pm 0,030$	$0,385\pm 0,039$

Tabel 4.5 merupakan yield Y_p/s pada perlakuan A1B1C1 dan A1B1C2. Yield Y_p/s merupakan perbandingan antara etanol yang dihasilkan dengan besarnya gula yang dikonsumsi selama fermentasi. Pada perlakuan C1, *yeast* A1 dan A2 memiliki yield etanol maksimum yang dicapai pada waktu fermentasi 12 jam dan 20 jam dengan nilai yield sebesar $0,493\pm 0,038$ dan $0,504\pm 0,004$. Pada perlakuan C2, *yeast* A1 dan A2 memiliki yield etanol maksimum yang dicapai pada waktu fermentasi 12 jam dan 16 jam dengan nilai yield sebesar $0,461\pm 0,029$ dan $0,440\pm 0,021$. Dari data diatas, pada *yeast* A1 peningkatan agitasi dapat meningkatkan yield. Sedangkan pada *yeast* A2 peningkatan agitasi dapat menurunkan yield produk. Hal tersebut dapat dikarenakan konsumsi gula, produksi etanol dan populasi *yeast* kedua strain pada kedua perlakuan berbeda. Pemberian agitasi yang baik dalam produksi bioetanol yaitu dengan menggunakan kecepatan agitasi sebesar 100-200 rpm. Pemberian agitasi dilakukan untuk menghomogenkan media dan meningkatkan kelarutan oksigen didalam substrat.

Fungsi fisiologis tersedianya oksigen selama fermentasi yaitu akseptor elektron untuk respirasi sel (Wheusthuis, 2015).

4.2.6. Efisiensi Fermentasi

Efisiensi fermentasi adalah presentase perbandingan antara etanol yang dihasilkan selama fermentasi dengan etanol teoritis. Etanol teoritis adalah etanol yang didapatkan dari hasil perkalian antara konsumsi gula reduksi dengan koefisien reaksi stokiometri pembentukan etanol (0,511). Dalam reaksi pembentukan etanol disebutkan bahwa 1 mol glukosa akan menghasilkan 2 mol etanol (Borzani, 2006). Berdasarkan Tabel 4.6, efisiensi fermentasi yeast A1 dan A2 pada kondisi C1 saat fermentasi 20 jam secara berturut-turut sebesar 95,843±0,094% dan 98,560±0,008, kemudian menurun dengan adanya peningkatan agitasi 200 rpm (C2) menjadi 88,854±0,069% dan 86,132±0,040%. 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 kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dan 200 rpm (C2) pada media molases derajat 14°Brix (B1) dapat dilihat pada **Tabel 4.6**.

Tabel 4.6 Efisiensi fermentasi oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Efisiensi fermentasi (%)			
	A1		A2	
	C1	C2	C1	C2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
4	67,496±0,308	76,861±0,227	88,210±0,070	48,795±0,094
8	86,005±0,074	89,718±0,135	61,334±0,105	76,027±0,027
12	96,502±0,074	90,143±0,058	83,444±0,173	84,533±0,107
16	85,960±0,049	88,022±0,139	85,463±0,030	86,035±0,064
20	95,843±0,094	88,854±0,069	98,560±0,008	86,132±0,040
24	78,226±0,093	69,079±0,045	81,893±0,058	75,388±0,076

Efisiensi fermentasi maksimum pada fermentasi oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi C1 berturut-turut adalah 96,502±0,074% dan 98,560±0,008%. Efisiensi fermentasi pada fermentasi oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi C2 mengalami penurunan dengan nilai efisiensi fermentasi berturut-turut adalah 90,143±0,058% dan 86,132±0,040%. Peningkatan kecepatan agitasi menyebabkan peningkatan kelarutan

oksigen pada media fermentasi sehingga *yeast* cenderung melakukan respirasi (Fardiaz, 1988).

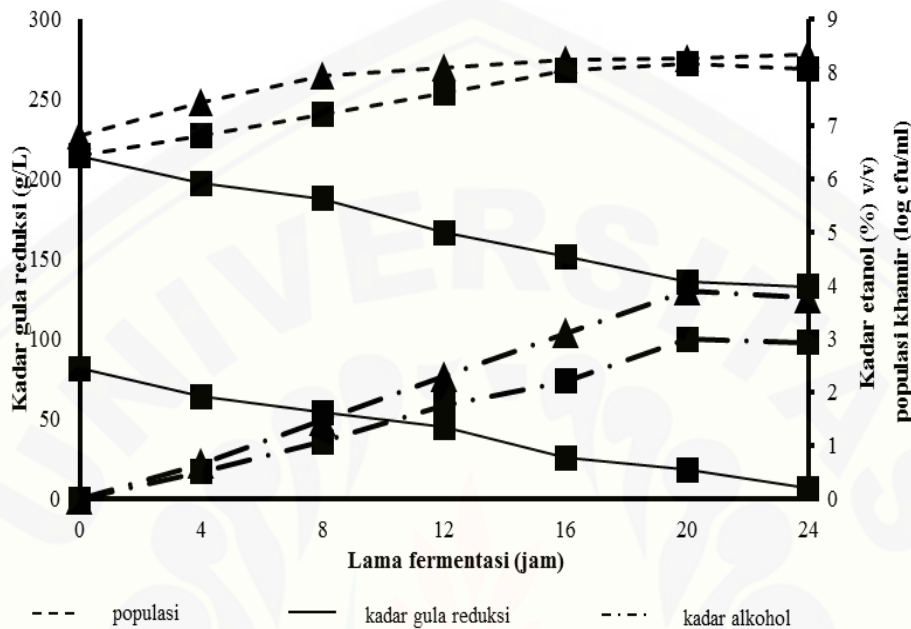
4.3 Pengaruh Derajat Brix Molases Terhadap Kadar Etanol Pada Fermentasi dengan Kecepatan Agitasi 100 rpm

4.3.1 Produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain FNCC 3210 (A1)

Pada produksi etanol tahap awal dipilih kecepatan agitasi yang akan digunakan untuk produksi etanol pada tahap berikutnya yaitu 100 rpm. Fermentasi bioetanol pada media molases oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 pada kecepatan agitasi 100 rpm dilakukan pada media molases dengan 14°brix (B1) dan 34°brix (B2). Populasi yeast pada masing- masing perlakuan tersebut mengalami pertumbuhan dan berkembang biak hingga kurun waktu tertentu. Pada perlakuan A1B1C1, khamir mengalami fase logaritmik pada jam pengamatan ke-24 dengan jumlah populasi khamir maksimum $8,34 \pm 0,020$ log cfu/ml, sedangkan pada perlakuan A1B2C1 fase logaritmik terjadi pada jam pengamatan ke-20 dengan jumlah populasi khamir sebesar $8,15 \pm 0,160$ log cfu/ml. Populasi khamir mengalami penurunan pada jam pengamatan ke-24. Berdasarkan perhitungan uji beda T kedua populasi optimum tersebut tidak berbeda secara signifikan. Penurunan dapat dikarenakan khamir telah mengalami fase kematian yang ditandai dengan populasi khamir yang menurun. Hubungan populasi mikroba dengan kemampuan khamir untuk mengkonsumsi substrat gula dan produksi etanol dapat dilihat pada **Gambar 4.3**.

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa selama terjadi peningkatan jumlah populasi khamir diiringi dengan penurunan jumlah gula reduksi. Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), sumber karbon (C) berupa karbohidrat terutama gula yaitu sukrosa dan glukosa dalam media fermentasi dibutuhkan oleh khamir untuk pertumbuhan, perkembangbiakan, dan pembentukan metabolit. Fermentasi pada media molases 14°Brix memiliki konsumsi kadar gula reduksi yang lebih besar dibandingkan konsumsi gula pada fermentasi pada media molases 34°Brix. Hal tersebut diduga dikarenakan populasi mikroba pada perlakuan A1B1C1 lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan pada A1B2C1. Kadar gula awal perlakuan A1B1C1 dan A1B2C1 masing- masing adalah $81,59 \pm 2,695$ g/L dan $214,652 \pm 3,252$ g/L. Kadar gula reduksi tersebut mengalami

penurunan hingga jam ke-24 untuk dikonsumsi oleh khamir. Konsumsi gula selama fermentasi pada media molases 14°Brix dan 34°Brix masing-masing adalah $74,836 \pm 7,712$ g/L dan $82,786 \pm 1,301$ g/L.

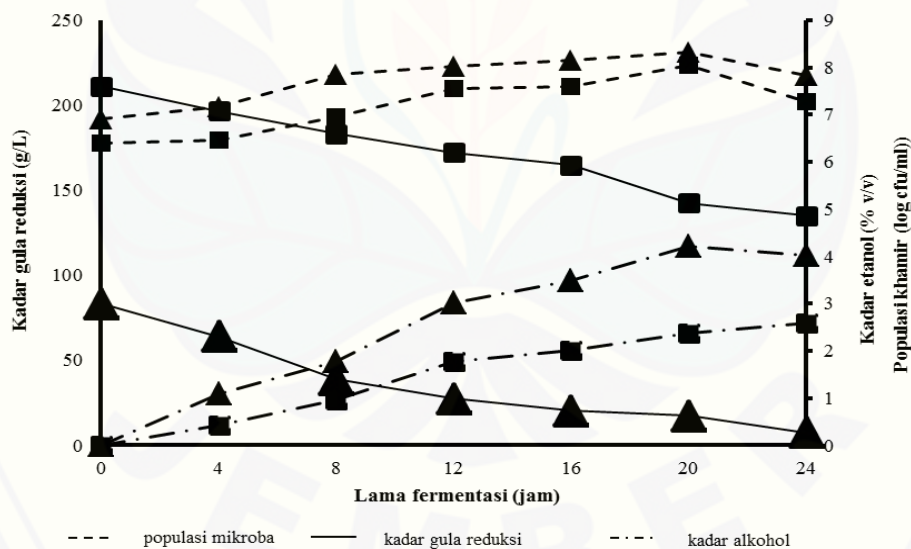


Gambar 4.3 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A1B1C1 (▲) dan A1B2C1 (■)

Gula reduksi selama fermentasi tidak hanya digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan khamir, tetapi juga digunakan untuk menghasilkan etanol. *Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroba yang dapat menghasilkan etanol dari glukosa melalui jalur EMP (*Embden Mayerhof Pathway*). Gula reduksi yang terkandung pada substrat dikonversi oleh khamir menjadi etanol dengan enzim alkohol dehidrogenase. Etanol yang dihasilkan pada perlakuan A1B1C1 dan A1B2C1 masing-masing adalah $3,908 \pm 0,037$ %(v/v) dan $3,006 \pm 0,258$ %(v/v). Berdasarkan uji T yang dilakukan kadar etanol pada kedua perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan. Perbedaan tersebut dikarenakan produksi etanol pada perlakuan A1B2C1 belum maksimal. Menurut Panchal dalam Puligundla *et., al* (2011) pada fermentasi dengan kadar gula tinggi sel ragi dikenakan tekanan osmolaritas yang tinggi pada tahap awal fermentasi sehingga fermentasi berjalan lambat sehingga efisiensi fermentasi produksi etanol menurun.

4.3.2 Produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain ATCC 9763

Fermentasi bioetanol pada kecepatan agitasi 100 rpm menggunakan media molases 14^oBrix dan 34^obrix juga dilakukan menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* strain ATCC 9763. Populasi khamir strain ATCC 9763 cenderung sama seperti populasi khamir FNCC 3210. Pada perlakuan A2B1C1, khamir mengalami fase logaritmik pada jam pengamatan ke-20 dengan jumlah populasi khamir maksimum $8,33 \pm 0,343$ log cfu/ml, sedangkan pada perlakuan A1B2C1 fase logaritmik terjadi pada jam pengamatan ke-16 dengan jumlah populasi khamir sebesar $8,05 \pm 0,016$ log cfu/ml. Berdasarkan uji T populasi khamir pada kedua perlakuan tidak berbeda secara signifikan. Populasi khamir mengalami penurunan pada jam pengamatan ke-24. Penurunan dapat dikarenakan khamir telah mengalami fase kematian yang ditandai dengan kemampuan berkembang biak yang menurun atau substrat telah habis sehingga tidak ada substrat yang bias dimanfaatkan untuk pertumbuhan. Hubungan populasi khamir dan kemampuan khamir untuk mengkonsumsi substrat gula dan produksi etanol dapat dilihat pada **Gambar 4.4**.



Gambar 4.4 Hubungan populasi mikroba, kadar etanol dan kadar gula reduksi (g/L) pada fermentasi bioetanol pada perlakuan A2B1C1 (▲) dan A2B2C1 (■)

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa selama terjadi peningkatan jumlah populasi khamir diiringi dengan penurunan jumlah gula reduksi. Fermentasi pada media molases 14^oBrix memiliki konsumsi kadar gula reduksi yang lebih besar dibandingkan konsumsi gula pada fermentasi pada media molases 34^oBrix. Hal tersebut dapat dikarenakan

populasi khamir pada fermentasi dengan media yang memiliki konsentrasi 34°Brix lebih sedikit dibandingkan populasi khamir pada fermentasi dengan media dengan konsentrasi 34°Brix. Kadar gula reduksi pada awal fermentasi untuk masing-masing sampel adalah $82,289 \pm 2,880$ g/L dan $211,038 \pm 4,181$ g/L. Konsumsi gula selama fermentasi pada media molasses 14°Brix dan 34°Brix masing-masing adalah $75,887 \pm 1,765$ g/L dan $52,300 \pm 2,416$ g/L. Menurut Puligundla *et al.*, 2011, pada kondisi fermentasi dengan kadar gula yang tinggi keadaan fisiologis kurang menguntungkan bagi khamir sehingga dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan etanol yang dihasilkan.

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), semakin lama fermentasi akan meningkatkan jumlah alkohol yang dihasilkan, namun lamanya proses fermentasi memiliki batas maksimum. Fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kadar alkohol, karena substrat telah habis digunakan. Bila substrat dalam media telah habis digunakan, maka untuk mencukupi kebutuhan sel terhadap unsur karbon (C), khamir akan menggunakan alkohol untuk aktivitas metabolismenya. Etanol yang dihasilkan pada perlakuan media 14°Brix dan 34°Brix masing-masing adalah $4,211 \pm 0,074$ %(v/v) dan $2,581 \pm 0,392$ %(v/v). Berdasarkan uji T yang dilakukan kedua perlakuan memiliki perbedaan yang signifikan. Menurut Judoamidjojo (dalam Wignyanto *et al.*, 2001) jika konsentrasi gula terlalu tinggi atau jika konsentrasi media terlalu pekat berakibat mengganggu metabolisme sehingga menghambat pembelahan sel dan berpengaruh terhadap etanol yang dihasilkan.

4.4 Kinetika Fermentasi Etanol oleh *Yeast* A1 dan A2 dengan Kecepatan Agitasi 100 rpm pada Media Molasses 14°Brix dan 34°Brix

4.4.1 Laju Konsumsi

Selama fermentasi bioetanol terjadi penurunan gula reduksi yang diikuti dengan peningkatan kadar etanol dan populasi *yeast*. Konsumsi gula selama fermentasi dapat dipengaruhi oleh strain *yeast*, jenis dan konsentrasi media fermentasi, dan faktor lingkungan fermentasi (Zamora, 2013). Laju konsumsi gula reduksi *yeast* A1 dan A2 pada kondisi B1 untuk mencapai populasi maksimum, secara berturut-turut sebesar $3,118 \pm 0,321$ g/L/jam dan $3,298 \pm 0,084$ g/L/jam. Pada kondisi B2 laju konsumsi gula

reduksi pada fermentasi oleh *yeast* A1 dan A2 untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar $3,154 \pm 0,074$ g/L/jam dan $2,270 \pm 0,251$ g/L/jam. Laju konsumsi *yeast* A1 dan A2 pada media molases 14° Brix (B1) dan 34° Brix (B2) pada kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dapat dilihat pada **Tabel 4.7**

Tabel 4.7 Laju Konsumsi Reduksi oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Laju konsumsi gula (g/L/jam)			
	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
0	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
4	$4,336 \pm 2,276$	$3,482 \pm 0,186$	$4,829 \pm 0,650$	$2,891 \pm 1,208$
8	$3,433 \pm 1,254$	$2,677 \pm 0,070$	$5,568 \pm 0,163$	$2,776 \pm 0,070$
12	$3,050 \pm 0,240$	$3,208 \pm 0,418$	$4,665 \pm 0,170$	$2,595 \pm 0,108$
16	$3,486 \pm 0,145$	$3,154 \pm 0,186$	$3,930 \pm 0,110$	$2,316 \pm 0,163$
20	$3,164 \pm 0,339$	$3,154 \pm 0,074$	$3,298 \pm 0,084$	$2,740 \pm 0,251$
24	$3,118 \pm 0,321$	$2,721 \pm 0,054$	$3,162 \pm 0,074$	$2,535 \pm 0,101$

Tabel 4.7 menunjukkan laju konsumsi gula reduksi maksimum *yeast* A1 dan A2 tercapai pada waktu fermentasi antara 4 jam hingga 8 jam fermentasi. Laju konsumsi maksimum *yeast* A1 dan A2 pada kondisi B1 tercapai pada waktu fermentasi 4 jam dan 8 jam dengan nilai laju konsumsi gula reduksi secara berturut-turut sebesar $4,336 \pm 2,276$ g/L/jam dan $5,568 \pm 0,163$ g/L/jam. *Yeast* A1 dan A2 pada kondisi B2 mencapai laju konsumsi gula reduksi maksimum pada lama fermentasi 4 jam dengan nilai laju konsumsi gula reduksi berturut-turut $3,482 \pm 0,186$ g/L/jam dan $2,891 \pm 1,208$ g/L/jam. Dari data diatas adapat diketahui bahwa laju konsumsi gula maksimum menurun pada kondisi kadar gula yang tinggi (B2). Hal tersebut dapat dikarenakan kadar gula pada kondisi 34° Brix terlalu tinggi untuk kedua strain *yeast* sehingga pertumbuhan kedua strain selama fermentasi kurang optimal yang mengakibatkan konsumsi substrat kurang optimal pula. Hal tersebut juga dapat dikarenakan pemilihan sumber nitrogen yang kurang sesuai. Menurut Bai *et al* (2008) dalam fermentasi VHG (*very high gravity*) glysin dapat membantu *yeast* sebagai osmoprotektan yang dapat meningkatkan viabilitas sel pada kondisi VHG. Dari data di atas dapat diketahui bahwa secara umum laju konsumsi gula reduksi maksimum masing-masing yeast telah tercapai pada awal fermentasi yaitu pada lama frmentasi 4 hingga 8 jam. Hal ini dapat terjadi karena pada jam tersebut merupakan fase logaritmik dari masing-masing yeast, sehingga konsumsi substrat berupa gula reduksi tinggi pada jam-jam tersebut.

4.4.2 Growth Rate

Nilai *growth rate* selama fermentasi bioetanol dapat tergantung pada ketersediaan energi dan substrat yang merupakan sumber karbon. Selain itu nilai *growth rate* juga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti pH, suhu, dan ketersediaan unsur hara (Uttaran, 2013). Nilai *growth rate* selama fermentasi oleh *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 pada media molases 14°Brix (B1) dan 34°Brix (B2) dengan kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dapat dilihat pada **Tabel 4.8**.

Tabel 4.8 *Growth Rate* oleh Yeast A1 dan A2

Lama Fermentasi (jam)	<i>Growth rate</i>			
	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
12	0,249±0,024	0,223±0,009	0,233±0,005	0,170±0,008

Tabel 4.8 menunjukkan nilai *growth rate yeast* A1 dan A2 dalam kondisi B1 dan B2 dengan kecepatan agitasi 100 rpm. Nilai *growth rate* selama fase log pada fermentasi oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi B1 berturut-turut adalah 0,249±0,024 log cfu/ml/jam dan 0,233±0,005 log cfu/ml/jam. Sedangkan pada kondisi media B2 nilai *growth rate* selama fase log berturut-turut adalah 0,223±0,009 log cfu/ml/jam dan 0,170±0,008 log cfu/ml/jam. *Growth rate yeast* A1 dan A2 mengalami peningkatan pada kondisi B2. Hal tersebut dikarenakan adaptasi *yeast* terhadap substrat dengan konsentrasi gula tinggi lebih lama. Sedangkan pada kondisi B1 pertumbuhan *yeast* sudah mengalami penurunan kecepatan pertumbuhan dikarenakan substrat yang tersedia sudah akan habis. Berdasarkan Pereira (2010) pada kondisi fermentasi dengan media VHG (*very high gravity*) akan memerlukan waktu fermentasi yang lebih lama yaitu diatas 24 jam. 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 pada kadar brix tinggi *yeast* A1 dan A2 mengalami penurunan kecepatan pertumbuhan, tetapi tidak memberikan pengaruh berarti terhadap laju pertumbuhan masing-masing *yeast*, walaupun masih dapat meningkatkan jumlah populasi *yeast* maksimum hingga 20 jam fermentasi.

4.4.3 Growth Yield

Dalam ekologi dan fisiologi mikroba nilai *growth yield* merupakan salah satu parameter mendasar. Growth yield merupakan perbandingan antara perubahan biomassa dengan substrat. Growth yield merupakan suatu cara menyatakan kebutuhan nutrisi oleh suatu mikroba secara kuantitatif (Suwasono, 2009). Nilai *growth yield* yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 untuk mencapai populasi maksimum, secara berturut-turut sebesar $0,021 \pm 0,006$ (log cfu/ml)/(g/L) dan $0,022 \pm 0,005$ (log cfu/ml)/(g/L). Pada kondisi B2, nilai *growth yield* yeast A1 dan A2 untuk mencapai populasi maksimum secara berturut-turut sebesar $0,022 \pm 0,007$ (log cfu/ml)/(g/L) dan $0,024 \pm 0,002$ (log cfu/ml)/(g/L). Perbandingan *growth yield* ($Y \times/s$) yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi media 14°Brix (B1) dan 34°Brix (B2) dengan kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dapat dilihat pada **Tabel 4.9**.

Tabel 4.9 *Growth Yield* (x/s) oleh Yeast A1 dan A2

Waktu fermentasi	Growth Yield (Log cfu/mg)			
	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
4	0,033±0,012	0,020±0,016	0,015±0,015	0,004±0,001
8	0,042±0,005	0,029±0,003	0,021±0,000	0,020±0,002
12	0,034±0,007	0,024±0,000	0,020±0,003	0,021±0,006
16	0,025±0,003	0,025±0,004	0,020±0,004	0,026±0,003
20	0,023±0,007	0,022±0,007	0,022±0,005	0,024±0,003
24	0,021±0,006	0,020±0,004	0,012±0,004	0,015±0,001

Dari **Tabel 4.9** didapatkan nilai *growth yield* maksimum yeast A1 dan A2 pada kondisi B1 tercapai saat 8 jam dan 20 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar $0,042 \pm 0,005$ (log cfu/ml)/(g/L) dan $0,022 \pm 0,005$ (log cfu/ml)/(g/L). Pada kondisi B2 oleh yeast A1 dan A2 nilai *growth yield* maksimum terjadi pada lama fermentasi 8 jam dan 12 jam fermentasi dengan nilai *growth yield* berturut-turut sebesar $0,029 \pm 0,003$ (log cfu/ml)/(g/L) dan $0,026 \pm 0,006$ (log cfu/ml)/(g/L). Pada fermentasi oleh yeast A1 pada kondisi B2 mengalami penurunan *growth yield*. Berdasarkan uji T yang dilakukan populasi yeast A1 pada jam pengamatan 8 jam memiliki populasi yang berbeda. Hal tersebut dapat dikarenakan sel yeast mendapatkan tekanan osmotik yang tinggi sehingga menyebabkan pertumbuhan yeast tidak optimal. Hal tersebut juga diungkapkan oleh Devantier *et al* (2005) bahwa fermentasi dengan konsentrasi media yang tinggi

mengakibatkan inhibisi substrat pada sel karena tekanan osmotik yang tinggi. Pada fermentasi oleh *yeast* A2 dengan adanya peningkatan kadar gula tidak meningkatkan *growth yield* selama fermentasi. Perbedaan pengaruh konsentrasi media terhadap pertumbuhan kedua strain yang berbeda selama fermentasi dikarenakan karakteristik kedua strain yang berbeda.

4.4.4 Produktivitas

Produktivitas pada proses fermentasi dinyatakan sebagai besarnya produk yang dihasilkan tiap satuan waktu fermentasi. Produktivitas etanol berbanding lurus dengan konsentrasi etanol karena produktivitas etanol. Semakin besar etanol yang dihasilkan, maka semakin besar pula produktivitas etanol. Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 dengan kondisi B1 saat mencapai populasi maksimum yaitu pada 24 jam fermentasi dan 20 jam fermentasi, secara berturut-turut sebesar $1,239 \pm 0,020$ g/L/jam dan $1,661 \pm 0,029$ g/L/jam. Pada kondisi B2, saat mencapai populasi maksimum (20 jam fermentasi) produktivitas etanol yang dihasilkan oleh yeast A1 dan A2 secara berturut-turut sebesar $1,186 \pm 0,102$ g/L/jam dan $0,936 \pm 0,145$ g/L/jam. Produktivitas etanol oleh yeast A1 dan A2 selama fermentasi pada kondisi media 14° Brix (B1) dan 34° Brix (B2) pada kecepatan agitasi 100 rpm (C1) dapat dilihat pada **Tabel 4.10**.

Tabel 4.10 Produktivitas oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Produktivitas (g/L/jam)			
	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
0	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
4	$1,316 \pm 0,102$	$1,021 \pm 0,331$	$2,166 \pm 0,121$	$0,820 \pm 0,145$
8	$1,459 \pm 0,278$	$1,062 \pm 0,186$	$1,750 \pm 0,351$	$0,955 \pm 0,218$
12	$1,509 \pm 0,234$	$1,155 \pm 0,105$	$1,982 \pm 0,339$	$1,172 \pm 0,065$
16	$1,534 \pm 0,151$	$1,089 \pm 0,006$	$1,717 \pm 0,109$	$0,990 \pm 0,000$
20	$1,542 \pm 0,015$	$1,186 \pm 0,102$	$1,661 \pm 0,029$	$0,936 \pm 0,145$
24	$1,239 \pm 0,020$	$0,965 \pm 0,044$	$1,325 \pm 0,125$	$0,848 \pm 0,048$

Dari **Tabel 4.10** didapatkan nilai produktivitas fermentasi maksimum oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi media B1 pada waktu fermentasi 20 jam dan 12 jam dengan nilai produktivitas berturut-turut $1,542 \pm 0,015$ g/L/jam dan $1,982 \pm 0,339$ g/L/jam. Sedangkan pada kondisi media B2 produktivitas maksimum didapatkan pada waktu fermentasi 20 jam dan 12 jam dengan nilai produktivitas berturut-turut $1,186 \pm 0,102$ g/L/jam dan $1,172 \pm 0,065$ g/L/jam. Hal tersebut dapat dikarenakan suhu 30°C kurang

optimum untuk kondisi fermentasi VHG. Berdasarkan penelitian Jones *et al* (1994) fermentasi pada kondisi VHG pada media molasses memiliki produksi etanol yang lebih tinggi pada kisaran suhu 20-25°C.

4.4.5 Yield (p/s)

Yield merupakan ukuran penting untuk menentukan efisiensi proses konversi substrat menjadi produk berupa etanol. Yield didefinisikan dalam industri bahan bakar etanol sebagai unit volume etanol yang diperoleh dari satuan massa substrat melalui fermentasi. Peingkatan nilai yield sebanding dengan peningkatan produksi etanol selama fermentasi. Yield (p/s) oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi B1 pada populasi maksimum berturut-turut adalah 0,490±0,048 g/g dan 0,504±0,004 g/g. Sedangkan pada perlakuan B2 Yield (p/s) oleh *yeast* A1 dan A2 pada populasi maksimum berturut-turut adalah 0,376±0,041 g/g dan 0,341±0,422 g/g.

Tabel 4.11 Yield p/s oleh *Yeast* A1 dan A2

Waktu fermentasi	Yield p/s			
	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
4	0,345±0,158	0,291±0,080	0,451±0,036	0,299±0,075
8	0,440±0,080	0,396±0,059	0,313±0,054	0,343±0,070
12	0,493±0,038	0,365±0,080	0,426±0,088	0,453±0,044
16	0,439±0,025	0,346±0,022	0,437±0,015	0,429±0,030
20	0,490±0,048	0,376±0,041	0,504±0,004	0,341±0,022
24	0,400±0,048	0,355±0,009	0,419±0,030	0,335±0,006

Tabel 4.11 merupakan yield $Y_{p/s}$ pada fermentasi oleh *yeast* A1 dan A2 pada kondisi media 14°Brix (B1) dan 34°Brix (B2) pada kecepatan agitasi 100 rpm (C1). Pada perlakuan B1, *yeast* A1 dan A2 memiliki yield etanol maksimum yang dicapai pada waktu fermentasi 12 jam dan 20 jam dengan nilai yield sebesar 0,493±0,038 g/g dan 0,504±0,004 g/g. Pada perlakuan B2, *yeast* A1 dan A2 memiliki yield etanol maksimum yang dicapai pada waktu fermentasi 8 jam dan 12 jam dengan nilai yield sebesar 0,396±0,059 g/g dan 0,453±0,044 g/g. dari data tersebut didapatkan bahwa kondisi derajat brix yang lebih tinggi yaitu B2 mengalami penurunan nilai yield etanol. Hal tersebut dikarenakan produksi etanol pada kondisi tersebut lebih rendah dibandingkan pada kondisi B1. Berdasarkan penelitian Wardani, *et al* (2013), kandungan sumber gula yang tinggi mengakibatkan viskositas dan tekanan osmotik dalam medium meningkat sehingga sel mengalami stres dan metabolisme terganggu.

4.4.6 Efisiensi Fermentasi

Pada **Tabel 4.12**, efisiensi fermentasi yeast A1 dan A2 pada kondisi B1 saat fermentasi 20 jam secara berturut-turut sebesar $95,843 \pm 0,094\%$ dan $98,560 \pm 0,00874,63\%$. Pada kondisi B2, efisiensi fermentasi oleh yeast A1 dan A2 pada 20 jam fermentasi mengalami penurunan dengan efisiensi berturut-turut $73,659 \pm 0,080\%$ dan $66,649 \pm 0,043\%$. Hal ini dapat dikarenakan produksi etanol dan konsumsi gula selama fermentasi pada kondisi media B2 kurang optimal dikarenakan yeast kurang bisa beradaptasi pada kadar gula tinggi. Perbandingan nilai efisiensi fermentasi bioetanol oleh yeast A1 dan A2 pada kondisi 14°Brix (B1) dan 34°Brix (B2) dengan kondisi kecepatan gaitasi 100 rpm (C1) dapat dilihat pada **Tabel 4.12**.

Tabel 4.12 Efisiensi Fermentasi oleh Yeast A1 dan A2

Waktu fermentasi	Efisiensi fermentasi (%)			
	A1		A2	
	B1	B2	B1	B2
0	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
4	$67,496 \pm 0,308$	$56,924 \pm 0,156$	$88,210 \pm 0,070$	$58,585 \pm 0,147$
8	$86,005 \pm 0,074$	$77,469 \pm 0,116$	$61,334 \pm 0,105$	$67,104 \pm 0,137$
12	$96,502 \pm 0,074$	$71,469 \pm 0,157$	$83,444 \pm 0,173$	$88,559 \pm 0,086$
16	$85,960 \pm 0,049$	$67,676 \pm 0,044$	$85,463 \pm 0,030$	$83,877 \pm 0,059$
20	$95,843 \pm 0,094$	$73,659 \pm 0,080$	$98,560 \pm 0,008$	$66,649 \pm 0,043$
24	$78,226 \pm 0,093$	$69,018 \pm 0,018$	$81,893 \pm 0,058$	$65,461 \pm 0,011$

Efisiensi fermentasi adalah ukuran banyaknya jumlah gram etanol yang terbentuk per 100 gr gula dalam substrat dibandingkan dengan gram etanol yang terbentuk secara teoritis menurut persamaan Gay Lussac. Efisiensi fermentasi maksimum pada fermentasi oleh yeast A1 dan A2 pada kondisi B1 berturut-turut adalah $96,502 \pm 0,074\%$ dan $98,560 \pm 0,008\%$. Efisiensi fermentasi pada fermentasi oleh yeast A1 dan A2 pada kondisi B2 mengalami penurunan dengan nilai efisiensi fermentasi berturut-turut adalah $77,469 \pm 0,116\%$ dan $88,559 \pm 0,086\%$. Dari data tersebut didapatkan bahwa efisiensi fermentasi pada kondisi derjar brix B1 lebih tinggi dibandingkan efisiensi fermentasi pada kondisi B2 pada kedua yeast. Pada hasil penelitian Arrizon (2002) disebutkan bahwa untuk meningkatkan efisiensi fermentasi dengan media kadar gula tinggi dapat dilakukan dengan melakukan penambahan nitrogen selama fermentasi.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan kesimpulan bahwa:

1. Produksi bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 pada media molases menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi pada kondisi media 14°Brix dibandingkan pada konsentrasi media 34°Brix.
2. Pemberian agitasi 100 rpm dan 200 rpm berpengaruh tidak nyata terhadap produksi bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 pada media molases brix 14°Brix; jumlah etanol yang dihasilkan oleh kedua strain masing- masing adalah $3,864 \pm 0,031$ (% v/v) dan $4,025 \pm 0,132$ (v/v) dengan nilai Y_p/s dan efisiensi fermentasi kedua strain masing-masing $0,472 \pm 0,025$ dan $0,472 \pm 0,045$ dan $92,348 \pm 0,049\%$ dan $92,346 \pm 0,088\%$.

5.2 Saran

Produksi etanol dengan variasi kecepatan agitasi dan kondisi fermentasi dengan kadar gula tinggi (VHG) belum mampu meningkatkan produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763. Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan formulasi starter multi strain, optimasi kondisi fermentasi dan produksi bioetanol menggunakan kadar gula yang lebih tinggi yaitu pada kisaran 24-28°Brix (kadar gula reduksi 130 g/L - 160 g/L) untuk memproduksi bioetanol lebih tinggi dalam waktu kurang dari 20 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Amerine, M.A., R.M. Pangborn, E.B. Roessler. 1965. *Principles of Sensory Evaluation of Food*. New York: Academic Press.
- Bailey, James, E. dan David, F. O. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. Singapura : McGraw-Hill Book Co.
- Direktorat Jenderal Minyak dan Gas Bumi. 2011. Statistika Minyak Bumi 2011. <http://prokum.esdm.go.id/Publikasi/Statistik/Statistik%20Minyak%20Bumi.pdf>. [diakses 22 Februari 2014].
- Campbell, I. M. 1983. *Biomass, Catalysts and Liquid Fuel*. Pennsylvania: Technomic Publishing Co. Inc.
- Elevri, P. dan Surya, R.P. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kimia Indonesia* 1(2): 109-110.
- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: PAU IPB.
- Firdausi, Z.N., Samodra, B.N., dan Hargono. 2013. "Pemanfaatan Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Untuk Produksi Bioetanol Fuel Grade Melalui Proses Disrilasi- Dehifrasi Menggunakan Zeolit Alam". E-jurnal [serial online]. <http://www.e-jurnal.com/2013/10/pemanfaatan-pati-singkong-karet-manihot.html>. (diakses 10 Januari 2014).
- Gaur, K. 2006. *Process Optimization for The Production of Ethanol via Fermentation* (Disertasi). Pattiala: Departement Institute of Biotechnologi and Science Thapar institute.
- Hidayat, N.M., dan Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Jakarta: Penerbit Andi.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Menguk Dunia Mikroorganismes Jilid .* Bandung: CV. Yrama Widya.
- Jayus., Bambang. S., Nurhayati., dan Rizqy W. 2014. *Karakterisasi Fenotip Saccharomyces cerevisiae Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 untuk Produksi Bioetanol pada Media Molases Tebu*. Jember : Universitas Jember.
- Jones, A.M., Thomas, K.C., dan Ingledew, W.M. 1994. Ethanolic Fermentation from Sweet Shorgum Juice in Batch and Fed-Batch Fermentations by *Sacchromyces cerevisiae*. *Agricultural Food Chemistry*, 42:1242-1246.

- Judoamidjojo, M., Said, E. G., dan Darwis, A. A. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Press.
- Kartika, B., A.D., Guritno, D., Purwadi, & Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Khongsay, N., Laopaiboon, L., Jaisil, P., dan Laopaiboon, P. 2012. Optimization of Agitation and Aeration for Very High Gravity Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Orthogonal Array Design. *Energies*, 5:570.
- Kurniawan, R., Juhanda, S., Syamsudin, R., Lukman, A. 2011. Pengaruh Jenis dan Kecepatan Pengaduk pada Fermentasi Etanol Secara Sinambung dalam Bioreaktor Tangki Berpengaduk Sel Tertambat. *E-jurnal Unggul*, 7 (3) : 1693 - 1750.
- Kirk, R.E and Othman D.F. 1979. *Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd Ed*. New York: Wiley and sons.
- Murdiyatmo. 2006. *Pengembangan Industri Bioetanol: Prospek Kendala dan Tantangan*. Jakarta : Kadin dan IPB.
- Narita, V. “*Saccharomyces cerevisiae* Superjamur yang Memiliki Sejarah Luar Biasa”, *Harian Kompas*. 21 September 2005. Halaman 31.
- Nurdyastuti, I. 2008. *Teknologi Proses Bio-Etanol*. Jakarta: Balai Besar Teknologi Pati-BPPT.
- O’leary V.S., Green, B., Sullivan, C., dan Holsinger. 2004. Alcohol Production by Selected Yeast Strains in Lactase-Hidrolized Acid Whey. *Bioetanol Bioeng* 19(10) : 19-35.
- Patrascu, E., Rapeanu, G., Bonciu, C., Vicol, C., dan Bahrim, G. 2009. Investigation of Yeast Performances In The Fermentation of Beet and Cane Molasses to Ethanol Production. *Ovidius University Press*, 20 (2):202- 203.
- Pereira, B. F., Pedro, M. R., Guimara., Teixeira, A., dan Domingues, L. 2010. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Efficient Very High Gravity Bio-ethanol Fermentation Processes. *Biotechnol Letters* 10 (32):1655–1661.
- Presiden Republik Indonesia. 2006. Peraturan Presiden Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2006 Tentang Kebijakan Energi Nasional. Jakarta: Batan Pertahanan Nasional.
- Puligundla, P., Smogrovicova, D., Obulam, V., dan Ko, S. 2011. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38 (10) : 1136.

- Rahman, A. S., Fardiaz, W. P., Rahayu, Suliantri dan C. C. Nurwitri. 1992. *Teknologi Fermentasi Susu*. PAU Pangan dan Gizi. Bogor: IPB.
- 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.
- Satyanarayana, T. dan Kunze, G. 2009. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. *Ovidius University Press*, 20 (2): 200.
- Setiyatwan, H. 2007. Peningkatan Kualitas Nutrisi Duckweed Melalui Fermentasi Menggunakan *Trichoderma harzianium*. *Jurnal Ilmu Ternak* 7 (2) :113-116.
- Stanburry, P. F. dan Whitaker, A. 1990. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford : Pergamon Press.
- Suwasono. 2012. *Buku Ajar Teknologi Fermentasi*. Jember : Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.
- Utama A.W., Legowo A.M., dan Al-Baari. 2013. Produksi Alkohol, Nilai pH, dan Produksi Gas pada Bioetanol dari Susu Rusak dengan Campuran Tepung Tapioka. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 2(2): 93-100.
- Volk., Wesley. A., dan Wheeler, M. 1988. *Dasar- dasar Mikrobiologi*. Bogor: Puslitbang Bioteknologi – LIPI.
- Wignyanto., Suharjo., dan Novita. 2001. Pengaruh Konsentrasi Gula Reduksi Sari Hati Nanas dan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* Pada Fermentasi Etanol. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 2 (1)1: 68-77.
- Yan, L., Tiansheng, Q., Naikun, S., Mingzhe, G., Yanling, G., dan Hai, Z. 2009. Improvement of Ethanol Concentration and Yield by Initial Aeration and Agitation Culture in Very High Gravity Fermentation. *Chin J Appl Environ Biol* 4: 563-567.

LAMPIRAN

Lampiran A

Parameter: Populasi *Saccharomyces cerevisiae*

A.Data Populasi Khamir

A1B1C1

Jam ke-	Cfu/ml		Log cfu/ml		Rerata	Stdev
	1	2	1	2		
0	$9,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	7,00	6,63	6,81	0,256
4	$1,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	7,26	7,62	7,44	0,258
8	$8,6 \times 10^7$	$9,5 \times 10^7$	7,92	7,98	7,95	0,038
12	$1,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	8,01	8,15	8,08	0,099
16	$1,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	8,25	8,24	8,24	0,007
20	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	8,26	8,26	8,26	0,007
24	$2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	8,32	8,35	8,34	0,020

A1B2C1

Jam ke-	Cfu/ml		Log cfu/ml		Rerata	Stdev
	1	2	1	2		
0	$4,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	6,69	6,20	6,45	0,344
4	$6,9 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	6,84	6,78	6,81	0,043
8	$2,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	7,38	7,05	7,22	0,233
12	$5,3 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	7,72	7,48	7,47	0,171
16	$1,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	8,02	8,05	8,06	0,020
20	$1,1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	8,07	8,27	8,16	0,160
24	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	8,06	8,05	8,07	0,000

A2B1C1

Jam ke-	Cfu/ml		Log cfu/ml		Rerata	Stdev
	1	2	1	2		
0	$7,3 \times 10^6$	$8,7 \times 10^6$	6,86	6,96	6,90	0,054
4	$9,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^7$	7,00	7,39	7,18	0,307
8	$6,0 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	7,82	7,94	7,85	0,096
12	$7,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	7,93	8,17	8,03	0,182
16	$9,4 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	8,00	8,36	8,16	0,265
20	$3,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	8,66	8,14	8,33	0,343
24	$3,6 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	7,57	8,15	7,83	0,385

A2B2C1

Jam ke-	Cfu/ml		Log cfu/ml		Rerata	Stdev
	1	2	1	2		
0	$2,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	6,34	6,45	6,39	0,074
4	$2,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	6,38	6,54	6,46	0,116
8	$7,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	6,85	7,05	6,95	0,147
12	$2,1 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	7,32	7,80	7,56	0,337
16	$2,4 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	7,38	7,83	7,60	0,315
20	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	8,04	8,06	8,05	0,016
24	$1,7 \times 10^7$	$2,1 \times 10^6$	7,23	7,32	7,28	0,065

A1B1C2

Jam ke-	Cfu/ml		Log cfu/ml		Rerata	Stdev
	1	2	1	2		
0	$5,9 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	6,77	6,85	6,81	0,052
4	$2,1 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	7,33	7,42	7,38	0,064
8	$7,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	7,86	8,20	8,03	0,237
12	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	8,22	8,24	8,23	0,009
16	$1,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	8,21	8,31	8,26	0,069
20	$2,7 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	8,43	8,27	8,35	0,115
24	$1,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	8,10	8,41	8,26	0,219

A2B1C2

Jam ke-	Cfu/ml		Log cfu/ml		Rerata	Stdev
	1	2	1	2		
0	$8,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	6,92	7,00	6,96	0,057
4	$1,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	7,17	7,56	7,37	0,278
8	$6,1 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$	7,79	7,88	7,83	0,063
12	$1,7 \times 10^8$	$4,2 \times 10^7$	8,22	7,62	7,92	0,422
16	$1,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	8,05	8,19	8,12	0,102
20	$2,5 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	8,40	8,24	8,32	0,115
24	$1,1 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$	7,03	7,89	7,96	0,101

Lampiran B. Data Perhitungan *Growth Rate*

Waktu (Jam)	$\mu(\text{jam})$ A1B1C1		Rerata	STDEV
	1	2		
12	0,214	0,283	0,249	0,024

Waktu (Jam)	$\mu(\text{jam})$ A1B2C1		Rerata	STDEV
	1	2		
12	0,209	0,237	0,223	0,009

Waktu (Jam)	$\mu(\text{jam})$ A1B1C2		Rerata	STDEV
	1	2		
12	0,281	0,285	0,283	0,001

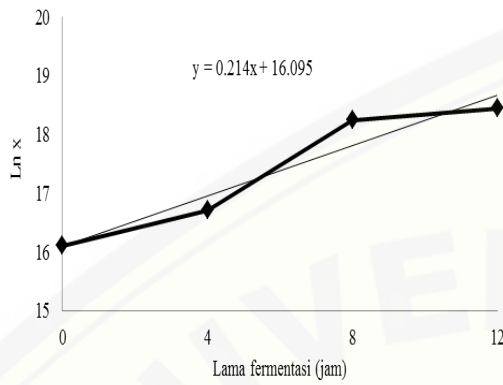
Waktu (Jam)	$\mu(\text{jam})$ A2B1C1		Rerata	STDEV
	1	2		
12	0,226	0,240	0,233	0,005

Waktu (Jam)	$\mu(\text{jam})$ A2B2C1		Rerata	STDEV
	1	2		
12	0,196	0,144	0,170	0,008

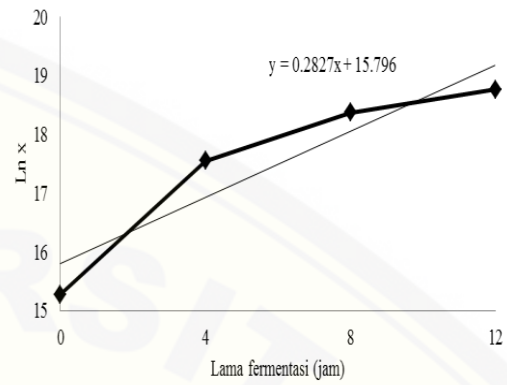
Waktu (Jam)	$\mu(\text{jam})$		Rerata	STDEV
	1	2		
12	0,260	0,237	0,249	0,008

Growth rate selama fase eksponensial (fermentasi 0-12 jam)

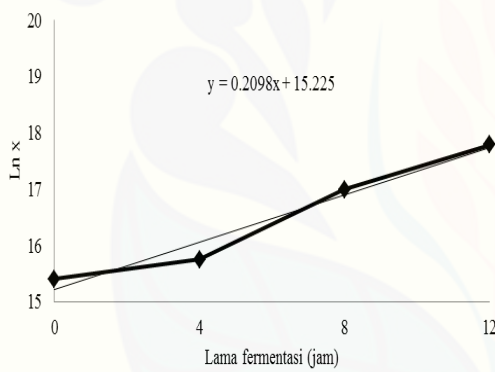
A1B1C1 ulangan 1



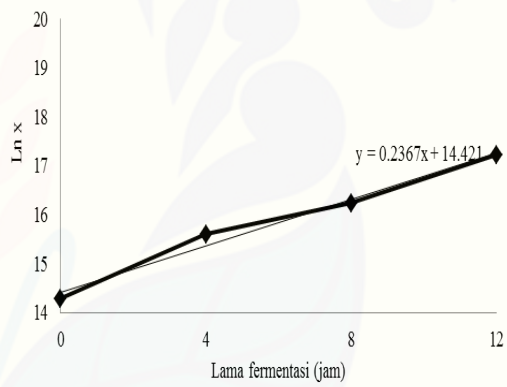
A1B1C1 ulangan 2



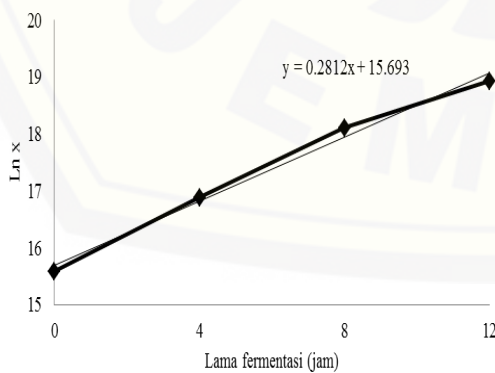
A1B2C1 ulangan 1



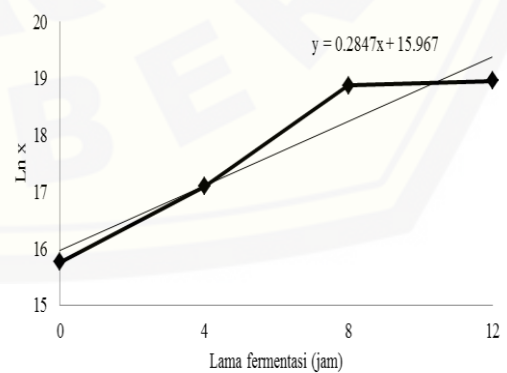
A1B2C1 ulangan 2



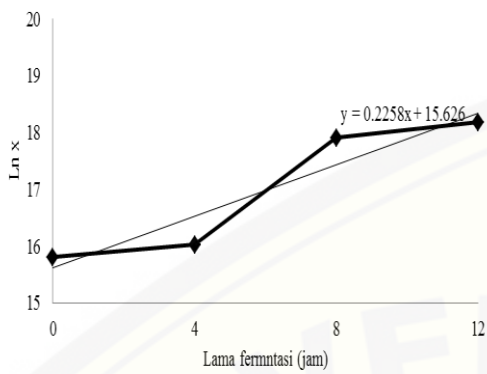
A1B1C2 ulangan 1



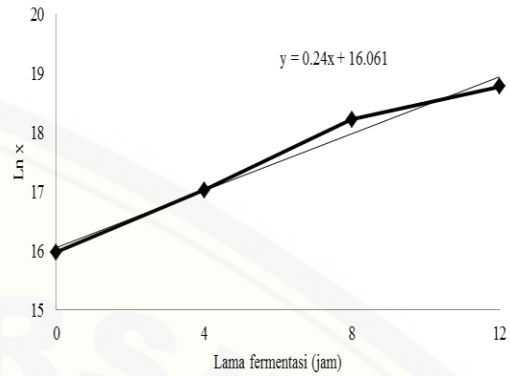
A1B1C2 ulangan 2



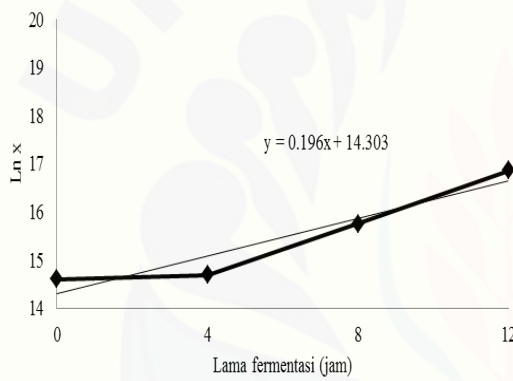
A2B1C1 ulangan 1



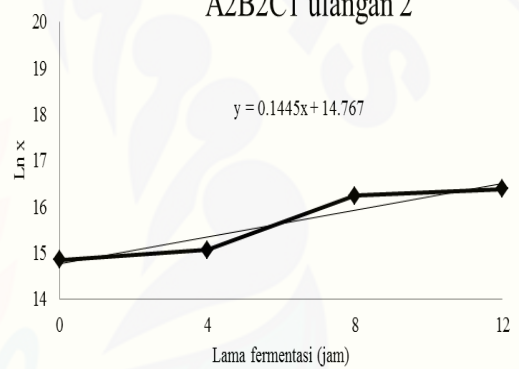
A2B1C1 ulangan 2



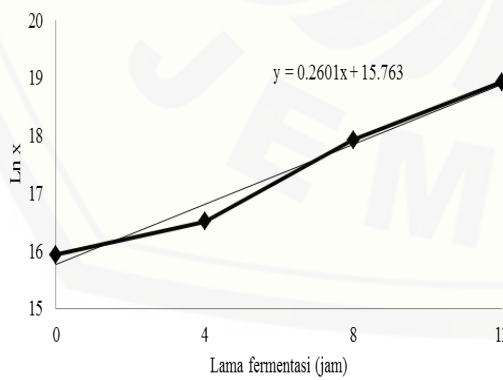
A2B2C1 ulangan 1



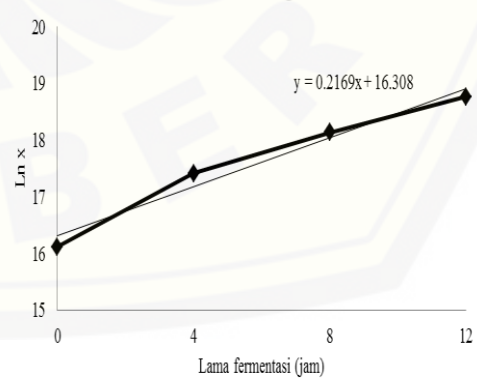
A2B2C1 ulangan 2



A2B1C2 ulangan 1



A2B1C2 ulangan 2



C. Data Perhitungan *Growth Yield***A1B1C1**

Waktu/ jam	ΔX		ΔS		Y (x/s)		Average	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,262	0,990	10,907	23,784	0,024	0,042	0,033	0,012
8	0,929	1,344	20,368	34,560	0,046	0,039	0,042	0,005
12	1,017	1,519	34,560	38,633	0,029	0,039	0,034	0,007
16	1,250	1,602	54,139	57,424	0,023	0,028	0,025	0,003
20	1,264	1,636	68,068	58,476	0,019	0,028	0,023	0,007
24	1,327	1,717	80,289	69,382	0,017	0,025	0,021	0,006

A1B2C1

Waktu/ jam	ΔX		ΔS		Y (x/s)		Average	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,149	0,574	16,754	18,068	0,009	0,032	0,020	0,016
8	0,692	0,849	26,281	27,267	0,026	0,031	0,029	0,003
12	1,034	1,279	43,693	52,562	0,024	0,024	0,024	0,000
16	1,327	1,841	60,447	65,703	0,022	0,028	0,025	0,004
20	1,351	2,063	80,158	84,100	0,017	0,025	0,022	0,007
24	1,367	1,853	80,486	82,786	0,017	0,022	0,020	0,004

A2B1C1

Waktu/ jam	ΔX		ΔS		Y (x/s)		Average	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,096	0,453	21,156	17,477	0,005	0,026	0,015	0,015
8	0,915	0,974	43,627	45,466	0,021	0,021	0,021	0,000
12	1,034	1,216	57,424	54,534	0,018	0,022	0,020	0,003
16	1,110	1,409	64,126	61,629	0,017	0,023	0,020	0,004
20	1,705	1,143	67,148	64,783	0,025	0,018	0,022	0,005
24	0,693	1,161	74,639	77,135	0,009	0,015	0,012	0,004

A2B2C1

Waktu/ jam	ΔX		ΔS		Y (x/s)		Average	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,038	0,097	10,184	18,725	0,004	0,005	0,004	0,001
8	0,503	0,606	27,267	28,252	0,018	0,021	0,020	0,002
12	0,908	1,352	37,779	40,079	0,026	0,034	0,030	0,006
16	1,038	1,379	44,021	48,620	0,024	0,028	0,026	0,003
20	1,699	1,617	64,060	72,930	0,027	0,022	0,024	0,003
24	0,888	0,875	73,916	84,757	0,012	0,010	0,012	0,001

A1B1C2

Waktu/ jam	ΔX		ΔS		Y (x/s)		Average	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,564	0,580	9,330	17,871	0,060	0,032	0,046	0,020
8	1,092	1,354	16,557	21,682	0,066	0,062	0,064	0,003
12	1,452	1,390	40,867	40,999	0,036	0,034	0,035	0,001
16	1,444	1,467	56,110	54,928	0,026	0,027	0,026	0,001
20	1,659	1,422	67,937	64,652	0,024	0,022	0,023	0,002
24	1,330	1,565	73,456	72,930	0,018	0,021	0,020	0,002

A2B1C2

Waktu/ jam	ΔX		ΔS		Y (x/s)		Average	STDEV
	1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,407	1,221	21,682	30,749	0,012	0,018	0,015	0,005
8	0,871	1,533	32,720	32,589	0,026	0,027	0,027	0,000
12	0,962	1,281	44,809	48,489	0,029	0,013	0,021	0,011
16	1,162	1,851	58,081	59,658	0,019	0,020	0,020	0,000
20	1,357	1,893	68,857	68,725	0,021	0,018	0,020	0,002
24	0,998	1,544	69,908	72,536	0,016	0,012	0,014	0,003

Contoh perhitungan *growth yield* :

- Sampel A1B1C1 pada jam ke-4 ulangan 1

$$Yield (x/s) = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{x \text{ jam ke-4} - x \text{ jam ke-0}}{s \text{ jam ke-0} - s \text{ jam ke-4}} = \frac{0,262}{10,907} = 0,033$$

Lampiran B**Parameter : Kadar Gula Pereduksi****B.1 Data Kadar Gula Reduksi Selama Fermentasi****A1B1C1**

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,667	0,638	100	83,495	79,685	81,590	2,695
4	0,584	0,457	100	72,589	55,900	64,244	11,801
8	0,512	0,375	100	63,127	45,125	54,126	12,730
12	0,404	0,344	100	48,936	41,051	44,993	5,575
16	0,255	0,201	100	29,356	22,260	25,808	5,018
20	0,149	0,193	100	15,427	21,209	18,318	4,088
24	0,056	0,11	100	3,206	10,302	6,754	5,018

A1B2C1

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,692	0,678	250	216,951	212,352	214,652	3.252
4	0,641	0,623	250	200,197	194,284	197,240	4.181
8	0,612	0,595	250	190,670	185,085	187,878	3.949
12	0,559	0,518	250	173,259	159,790	166,524	9.524
16	0,508	0,478	250	156,505	146,649	151,577	6.969
20	0,448	0,422	250	136,794	128,252	132,523	1.394
24	0,447	0,426	250	136,465	129,566	133,016	4.878

A2B1C1

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,681	0,65	100	85,335	81,261	83,298	2.880
4	0,52	0,517	100	64,179	63,784	63,982	0.279
8	0,349	0,304	100	41,708	35,795	38,752	4.181
12	0,244	0,235	100	27,911	26,728	27,319	0.836
16	0,193	0,181	100	21,209	19,632	20,420	1.115
20	0,17	0,157	100	18,187	16,478	17,332	1.208
24	0,113	0,063	100	10,696	4,126	7,411	4.646

A2B2C1

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,665	0,683	250	208,081	213,995	211,038	4,181
4	0,634	0,626	250	197,898	195,269	196,583	1,858
8	0,582	0,597	250	180,815	185,742	183,279	3,484
12	0,550	0,561	250	170,302	173,916	172,109	2,555
16	0,531	0,535	250	164,060	165,375	164,717	0,929
20	0,470	0,461	250	144,021	141,064	142,543	2,091
24	0,440	0,445	250	134,166	135,808	134,987	1,161

A1B1C2

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,633	0,657	100	79,028	82,181	80,604	2,230
4	0,562	0,521	100	69,698	64,310	67,004	3,810
8	0,507	0,492	100	62,470	60,499	61,485	1,394
12	0,322	0,345	100	38,160	41,183	39,671	2,137
16	0,206	0,239	100	22,917	27,254	25,085	3,066
20	0,116	0,165	100	11,091	17,530	14,310	4,553
24	0,074	0,102	100	5,572	9,251	7,411	2,602

A2B1C2

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,643	0,646	100	80,342	80,736	80,539	0,279
4	0,478	0,412	100	58,660	49,987	54,323	6,133
8	0,394	0,398	100	47,622	48,147	47,884	0,372
12	0,302	0,277	100	35,532	32,247	33,890	2,323
16	0,201	0,192	100	22,260	21,078	21,669	0,836
20	0,119	0,123	100	11,485	12,011	11,748	0,372
24	0,111	0,094	100	10,434	8,200	9,317	1,580

Lampiran C

Parameter : Kadar etanol

C.1 Kadar etanol sampel

A1B1C1											
Jam ke-	Abs		FP	Volume etanol (ml)		Ethanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,372	0,414	0	6,310	7,038	4,978	5,553	0,631	0,704	0,667	0,052
8	0,082	0,105	10	12,800	16,789	10,099	13,247	1,280	1,679	1,479	0,282
12	0,126	0,155	10	20,432	25,461	16,120	20,089	2,043	2,546	2,295	0,356
16	0,175	0,2	10	28,930	33,266	22,826	26,247	2,893	3,327	3,110	0,307
20	0,235	0,232	10	39,337	38,816	31,037	30,626	3,934	3,882	3,908	0,037
24	0,223	0,228	10	37,255	38,123	29,395	30,079	3,726	3,812	3,769	0,061

A1B2C1											
Jam ke-	Abs		FP	Volume etanol (ml)		Ethanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,238	0,375	0	3,986	6,362	3,145	5,020	0,399	0,636	0,517	0,168
8	0,117	0,078	10	9,435	12,106	7,444	9,552	0,944	1,211	1,077	0,189
12	0,116	0,103	10	18,697	16,442	14,752	12,973	1,870	1,644	1,757	0,159
16	0,136	0,135	10	22,166	21,993	17,489	17,352	2,217	2,199	2,208	0,012
20	0,171	0,192	10	28,236	31,879	22,279	25,152	2,824	3,188	3,006	0,258
24	0,172	0,183	10	28,410	30,318	22,415	23,921	2,841	3,032	2,936	0,135

A2B1C1											
Jam ke-	Abs		FP	Volume etanol (ml)		Ethanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,074	0,069	10	11,413	10,545	9,004	8,320	1,141	1,055	1,098	0,061
8	0,096	0,125	10	15,228	20,258	12,015	15,984	1,523	2,026	1,774	0,356
12	0,161	0,203	10	26,502	33,787	20,910	26,658	2,650	3,379	3,014	0,515
16	0,218	0,2	10	36,388	33,266	28,710	26,247	3,639	3,327	3,483	0,221
20	0,254	0,248	10	42,632	41,592	33,637	32,816	4,263	4,159	4,211	0,074
24	0,225	0,256	10	37,602	42,979	29,668	33,910	3,760	4,298	4,029	0,380

A2B2C1

Jam ke-	Abs		FP	Volume etanol (ml)		Ethanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2	1	2	1	2		
	0	0,000		0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000		
4	0,218	0,278	0	3,639	4,679	2,871	3,692	0,364	0,468	0,416	0,074
8	0,055	0,073	10	8,117	11,239	6,404	8,868	0,812	1,124	0,968	0,221
12	0,115	0,107	10	18,524	17,136	14,615	13,520	1,852	1,714	1,783	0,098
16	0,124	0,124	10	20,085	20,085	15,847	15,847	2,008	2,008	2,008	0,000
20	0,13	0,16	10	21,125	26,329	16,668	20,773	2,113	2,633	2,373	0,368
24	0,151	0,163	10	24,768	26,849	19,542	21,184	2,477	2,685	2,581	0,147

A1B1C2

Jam ke-	Abs		FP	Volume etanol (ml)		Ethanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2	1	2	1	2		
	0	0,000		0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000		
4	0,332	0,414	0	5,616	7,038	4,431	5,553	0,562	0,704	0,633	0,101
8	0,131	0,138	5	10,649	11,256	8,402	8,881	1,065	1,126	1,095	0,043
12	0,152	0,14	10	24,941	22,860	19,678	18,036	2,494	2,286	2,390	0,147
16	0,172	0,209	10	28,410	34,827	22,415	27,479	2,841	3,483	3,162	0,454
20	0,246	0,211	10	41,425	35,174	32,542	27,752	3,951	4,124	3,517	0,429
24	0,189	0,205	10	31,358	34,133	24,742	26,931	3,136	3,413	3,275	0,196

A2B1C2

Jam ke-	Abs		FP	Volume etanol (ml)		Ethanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2	1	2	1	2		
	0	0,000		0,000	0	7,788	8,395	0,000	0,000		
4	0,098	0,105	5	16,616	15,749	6,144	6,623	1,662	1,575	1,618	0,061
8	0,104	0,099	10	22,339	28,930	13,110	12,426	2,234	2,893	2,563	0,466
12	0,137	0,175	10	30,665	35,001	17,626	22,826	3,066	3,500	3,283	0,307
16	0,185	0,21	10	39,684	37,082	24,194	27,616	3,968	3,708	3,838	0,184
20	0,237	0,222	10	31,705	37,949	31,310	29,258	3,171	3,795	3,483	0,442
24	0,191	0,227	10	7,788	8,395	25,015	29,942	0,779	0,839	0,809	0,043

Lampiran D**Parameter : pH****D.1 pH sampel**

A1B1C1				
Jam ke-	pH		Rerata	STDEV
	1	2		
0	4,5	4,5	4,5	0
4	4,5	4,5	4,5	0
8	4,5	4,5	4,5	0
12	4,4	4,5	4,45	0,071
16	4,4	4,4	4,4	0
20	4,4	4,3	4,35	0,071
24	4,3	4,3	4,3	0

A1B2C1				
Jam ke-	pH		Rerata	STDEV
	1	2		
0	4,5	4,5	4,5	0
4	4,5	4,5	4,5	0
8	4,5	4,5	4,5	0
12	4,5	4,5	4,5	0
16	4,5	4,5	4,5	0
20	4,5	4,5	4,5	0
24	4,5	4,4	4,45	0,071

A1B1C2				
Jam ke-	pH		Rerata	STDEV
	1	2		
0	4,5	4,5	4,5	0
4	4,5	4,4	4,45	0,071
8	4,4	4,4	4,4	0
12	4,4	4,4	4,4	0
16	4,3	4,3	4,3	0
20	4,3	4,3	4,3	0
24	4,3	4,3	4,3	0

A21B1C1

Jam ke-	pH		Rerata	STDEV
	1	2		
0	4,5	4,5	4,5	0
4	4,5	4,5	4,5	0
8	4,5	4,5	4,5	0
12	4,4	4,4	4,4	0
16	4,4	4,4	4,4	0
20	4,3	4,3	4,3	0
24	4,3	4,3	4,3	0

A2B2C1

Jam ke-	pH		Rerata	STDEV
	1	2		
0	4,5	4,5	4,5	0
4	4,5	4,5	4,5	0
8	4,45	4,5	4,25	0,035
12	4,5	4,5	4,5	0
16	4,5	4,5	4,5	0
20	4,5	4,5	4,5	0
24	4,5	4,5	4,5	0

A2B1C2

Jam ke-	pH		Rerata	STDEV
	1	2		
0	4,5	4,5	4,5	0
4	4,5	4,4	4,45	0,071
8	4,5	4,4	4,45	0,071
12	4,3	4,4	4,35	0,071
16	4,3	4,3	4,3	0
20	4,3	4,3	4,3	0
24	4,3	4,3	4,3	0

E. Kinetika Fermentasi**A1B1C1**

Waktu (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi fermentasi (%)
0	6,81±0,256	0,000±0,000	81,59±2,695	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
4	7,44±0,258	0,050±0,011	64,244±11,801	17,346±9,206	4,336±2,276	8,865±0,047	5,266±0,406	1,316±0,102	0,345±0,158	67,496±0,308
8	7,95±0,038	0,047±0,012	54,126±12,730	27,464±0,929	3,433±1,254	14,037±0,051	11,673±2,226	1,459±0,278	0,440±0,080	86,005±0,074
12	8,08±0,099	0,038±0,002	44,993±5,575	36,597±7,154	3,050±0,240	18,705±0,015	18,105±2,806	1,509±0,234	0,493±0,038	96,502±0,074
16	8,24±0,007	0,027±0,001	25,808±5,018	55,782±0,557	3,486±0,145	28,510±0,012	24,537±2,419	1,534±0,151	0,439±0,025	85,960±0,049
20	8,26±0,007	0,025±0,005	18,318±4,008	63,272±9,106	3,164±0,339	32,338±0,035	30,831±0,290	1,542±0,015	0,490±0,048	95,843±0,094
24	8,34±0,020	0,022±0,004	6,754±5,018	74,836±0,929	3,118±0,321	38,249±0,039	29,737±0,484	1,239±0,020	0,400±0,048	78,226±0,093

A1B2C1

Waktu (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi fermentasi (%)
0	6,45±0,344	0,000±0,000	214,652±3,252	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
4	6,81±0,043	0,027±0,007	197,240±4,181	13,929±0,929	3,482±0,186	7,119±0,004	4,082±1,326	1,021±0,331	0,291±0,080	56,924±0,156
8	7,22±0,233	0,030±0,001	187,878±3,949	21,419±0,232	2,677±0,070	10,947±0,003	8,498±1,490	1,062±0,186	0,396±0,059	77,469±0,116
12	7,60±0,171	0,025±0,002	166,524±9,524	38,502±5,576	3,208±0,418	19,678±0,026	13,863±1,258	1,155±0,105	0,365±0,080	71,469±0,157
16	8,03±0,020	0,027±0,001	151,577±6,969	50,460±2,555	3,154±0,186	25,790±0,015	17,421±0,097	1,089±0,006	0,346±0,022	67,676±0,044
20	8,15±0,160	0,023±0,002	135,808±1,394	63,075±5,575	3,154±0,074	32,238±0,028	23,715±2,032	1,186±0,102	0,376±0,041	73,659±0,080
24	8,06±0,000	0,021±0,002	133,016±4,878	65,309±3,484	2,721±0,054	33,379±0,007	23,168±1,064	0,965±0,044	0,355±0,009	69,018±0,018

A2B1C1

Waktu (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi fermentasi (%)
0	6,90±0,054	0,000±0,000	83,298±2,88	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
4	7,18±0,307	0,019±0,009	63,982±0,279	19,317±6,039	2,781±3,547	9,873±1,330	8,662±0,484	2,166±0,121	0,451±0,036	88,210±0,070
8	7,85±0,096	0,022±0,000	38,752±4,181	44,547±2,412	3,272±3,085	22,768±0,665	13,999±2,806	1,750±0,351	0,313±0,054	61,334±0,105
12	8,03±0,182	0,021±0,002	27,319±0,836	55,979±3,531	3,370±2,002	28,611±1,045	23,784±4,064	1,982±0,339	0,426±0,088	83,444±0,173
16	8,16±0,265	0,021±0,002	20,420±1,115	62,878±0,929	3,457±0,779	32,137±0,902	27,479±1,742	1,717±0,109	0,437±0,015	85,463±0,030
20	8,33±0,343	0,019±0,003	17,332±1,208	65,966±1,487	3,460±0,145	33,715±0,855	33,226±0,581	1,661±0,029	0,504±0,004	98,560±0,008
24	7,83±0,385	0,014±0,002	7,411±4,646	75,887±1,952	5,161±2,900	38,786±0,902	31,789±3,000	1,325±0,125	0,419±0,030	81,893±0,058

A2B2C1

Waktu (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi fermentasi (%)
0	6,39±0,074	0,000±0,000	211,038±4,181	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
4	6,46±0,116	0,006±0,001	196,583±1,858	11,564±2,602	2,891±1,208	5,910±2,470	3,282±0,581	0,820±0,145	0,299±0,075	58,585±0,147
8	6,95±0,147	0,021±0,001	183,279±3,484	22,208±3,903	2,776±0,070	11,350±0,285	7,636±1,742	0,955±0,218	0,343±0,070	67,104±0,137
12	7,56±0,337	0,032±0,002	172,109±2,555	31,143±3,345	2,595±0,108	15,917±0,665	14,068±0,774	1,172±0,065	0,453±0,044	88,559±0,086
16	7,60±0,315	0,028±0,001	164,717±0,929	37,057±0,279	2,316±0,163	18,940±1,330	15,847±0,000	0,990±0,000	0,429±0,030	83,877±0,059
20	8,05±0,016	0,024±0,003	142,543±2,091	54,796±0,092	2,740±0,251	28,006±2,564	18,721±2,903	0,936±0,145	0,341±0,022	66,649±0,043
24	7,28±0,065	0,012±0,001	134,987±1,161	60,841±3,348	2,535±0,101	31,096±1,235	20,363±1,161	0,848±0,048	0,335±0,006	65,461±0,011

A1B1C2

Waktu (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi fermentasi (%)
0	6,81±0,052	0,000±0,000	80,604±2,23	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
4	7,38±0,064	0,047±0,020	67,004±3,81	13,601±6,039	3,400±1,510	6,951±3,087	4,992±0,793	1,248±0,198	0,393±0,116	76,861±0,227
8	8,03±0,237	0,068±0,008	61,485±1,394	19,120±5,342	2,390±0,453	9,772±1,852	8,642±0,339	1,080±0,042	0,459±0,069	89,718±0,135
12	8,23±0,009	0,034±0,001	39,671±2,137	40,933±0,939	3,411±0,008	20,921±0,047	18,857±1,161	1,571±0,097	0,461±0,029	90,143±0,058
16	8,26±0,069	0,026±0,001	25,085±3,066	55,519±1,626	3,470±0,052	28,376±0,427	24,947±3,580	1,559±0,224	0,450±0,071	88,022±0,139
20	8,35±0,115	0,022±0,000	14,310±4,553	66,294±3,019	3,315±0,116	33,883±1,187	30,147±1,451	1,507±0,073	0,455±0,006	88,954±0,012
24	8,26±0,219	0,021±0,001	7,411±2,602	73,193±3,252	3,050±0,015	37,409±0,190	25,837±1,548	1,077±0,065	0,353±0,006	69,076±0,045

A2B1C2

Waktu (Jam)	Populasi Yeast (Log cfu/ml)	Growth yield	Gula Reduksi (g/L)	ΔS (g/L)	Laju Konsumsi (g/L/jam)	Etanol teoritis (g/L)	Etanol (g/L)	Produktivitas (g/L/jam)	Yp/s (g/g)	Efisiensi fermentasi (%)
0	6,96±0,256	0,000±0,000	80,539±0,333	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
4	7,37±0,258	0,029±0,015	54,323±6,133	26,216±6,411	6,554±1,603	13,399±3,277	6,384±0,339	1,596±0,085	0,249±0,048	48,795±0,094
8	7,83±0,038	0,037±0,014	47,884±0,372	32,654±6,504	4,082±0,012	16,690±0,047	12,768±0,484	1,596±0,060	0,391±0,014	76,027±0,027
12	7,92±0,099	0,024±0,003	33,890±2,323	46,649±2,695	3,887±0,217	23,842±1,330	20,226±3,677	1,685±0,306	0,432±0,055	84,533±0,107
16	8,12±0,007	0,026±0,008	21,669±0,836	58,870±1,487	3,679±0,070	30,088±0,570	25,905±2,419	1,619±0,151	0,440±0,033	86,035±0,064
20	8,32±0,007	0,024±0,006	11,748±0,372	68,791±1,208	3,440±0,005	35,159±0,047	30,284±1,451	1,514±0,073	0,440±0,021	86,132±0,040
24	8,96±0,020	0,018±0,005	9,317±1,680	71,222±1,951	2,968±0,077	36,402±0,950	27,479±3,484	1,145±0,145	0,385±0,039	75,388±0,076

F. Uji Beda T

F.1 Uji Beda T Populasi khamir sampel

Uji beda T antara populasi khamir pada sampel dengan perlakuan A1B1C1 (A1) dan A1B2 C1 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	6,81	6,45	0,256	0,344	0,066	0,118	1,801	161,450	0,092	0,303	0,303	1,212	4,303	Tidak beda
4	7,44	6,81	0,258	0,043	0,067	0,002	36,274	161,450	0,034	0,185	0,185	3,411	4,303	Tidak beda
8	7,95	7,22	0,038	0,233	0,001	0,054	37,881	161,450	0,028	0,167	0,167	4,402	4,303	Beda
12	8,08	7,60	0,099	0,171	0,010	0,029	2,997	161,450	0,019	0,139	0,139	3,436	4,303	Tidak beda
16	8,24	8,03	0,007	0,020	0,000	0,000	8,028	161,450	0,000	0,015	0,015	13,956	4,303	Beda
20	8,26	8,15	0,007	0,160	0,000	0,025	71,847	161,450	0,013	0,113	0,113	0,978	4,303	Tidak beda
24	8,34	8,06	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	161,450	0,000	0,014	0,014	19,932	4,303	Beda

Uji beda T antara populasi khamir pada sampel dengan perlakuan A2B1C1 (A1) dan A2B2 C1 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	6,90	6,39	0,054	0,074	0,003	0,005	1,889	161,450	0,004	0,065	0,065	7,823	4,303	Tidak beda
4	7,18	6,46	0,307	0,116	0,094	0,013	7,004	161,450	0,054	0,232	0,232	3,079	4,303	Tidak beda
8	7,85	6,95	0,096	0,147	0,009	0,022	2,350	161,450	0,015	0,124	0,124	7,224	4,303	Beda
12	8,03	7,56	0,182	0,337	0,033	0,114	3,428	161,450	0,074	0,271	0,271	1,718	4,303	Tidak beda
16	8,16	7,60	0,265	0,315	0,070	0,099	1,412	161,450	0,085	0,291	0,291	1,914	4,303	Tidak beda
20	8,33	8,05	0,343	0,016	0,118	0,000	42,905	161,450	0,059	0,243	0,243	1,122	4,303	Tidak beda
24	7,83	7,28	0,385	0,065	0,148	0,004	35,148	161,450	0,076	0,276	0,276	2,001	4,303	Tidak beda

Uji beda T antara populasi khamir pada sampel dengan perlakuan A1B1C1 (A1) dan A1B1 C2 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	6,81	6,81	0,256	0,052	0,066	0,003	23,794	161,450	0,034	0,185	0,185	0,036	4,303	Tidak beda
4	7,44	7,38	0,258	0,064	0,067	0,004	16,343	161,450	0,035	0,188	0,188	0,323	4,303	Tidak beda
8	7,95	8,03	0,038	0,237	0,001	0,056	39,369	161,450	0,029	0,170	0,170	-0,471	4,303	Tidak beda
12	8,08	8,23	0,099	0,009	0,010	0,000	118,471	161,450	0,005	0,070	0,070	-2,093	4,303	Tidak beda
16	8,24	8,26	0,007	0,069	0,000	0,005	94,213	161,450	0,002	0,049	0,049	-0,468	4,303	Tidak beda
20	8,26	8,35	0,007	0,115	0,000	0,013	96,047	161,450	0,007	0,081	0,081	-1,028	4,303	Tidak beda
24	8,34	8,26	0,020	0,219	0,000	0,048	121,980	161,450	0,024	0,155	0,155	0,522	4,303	Tidak beda

Uji beda T antara populasi khamir pada sampel dengan perlakuan A2B1C1 (A1) dan A2B1 C2 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	6,90	6,96	0,054	0,057	0,003	0,003	1,128	161,450	0,003	0,056	0,056	-1,046	4,303	Tidak beda
4	7,18	7,37	0,307	0,278	0,094	0,077	1,216	161,450	0,086	0,293	0,293	-0,653	4,303	Tidak beda
8	7,85	7,83	0,096	0,063	0,009	0,004	2,286	161,450	0,007	0,081	0,081	0,194	4,303	Tidak beda
12	8,03	7,92	0,182	0,422	0,033	0,178	5,364	161,450	0,106	0,325	0,325	0,322	4,303	Tidak beda
16	8,16	8,12	0,265	0,102	0,070	0,010	6,797	161,450	0,040	0,201	0,201	0,197	4,303	Tidak beda
20	8,33	8,32	0,343	0,115	0,118	0,013	8,933	161,450	0,066	0,256	0,256	0,034	4,303	Tidak beda
24	7,83	7,96	0,385	0,101	0,148	0,010	14,497	161,450	0,079	0,281	0,281	-0,461	4,303	Tidak beda

G,1 Uji Beda T kadar etanol sampel

Uji beda T antara kadar etanol pada sampel dengan perlakuan A1B1C1 (A1) dan A1B2 C1 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	161,450	0,000	0,000	0,000	0,000	4,303	Tidak beda
4	0,667	0,517	0,052	0,168	0,003	0,028	10,640	161,450	0,015	0,124	0,124	-1,207	4,303	Tidak beda
8	1,479	1,077	0,282	0,189	0,080	0,036	2,231	161,450	0,058	0,240	0,240	1,676	4,303	Tidak beda
12	2,295	1,757	0,356	0,159	0,126	0,025	4,976	161,450	0,076	0,276	0,276	1,951	4,303	Tidak beda
16	3,110	2,208	0,307	0,012	0,094	0,000	98,999	161,450	0,047	0,217	0,217	4,157	4,303	Tidak beda
20	3,908	3,006	0,037	0,258	0,001	0,066	49,000	161,450	0,034	0,184	0,184	4,903	4,303	Beda
24	3,769	2,936	0,061	0,135	0,004	0,018	4,840	161,450	0,011	0,105	0,105	7,945	4,303	Beda

U Uji beda T antara kadar etanol pada sampel dengan perlakuan A2B1C1 (A1) dan A2B2C1 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	161,450	0,000	0,000	0,000	0,000	4,303	Tidak beda
4	1,098	0,416	0,061	0,074	0,004	0,005	1,440	161,450	0,005	0,068	0,068	10,069	4,303	Beda
8	1,774	0,968	0,356	0,221	0,126	0,049	2,596	161,450	0,088	0,296	0,296	2,725	4,303	Tidak beda
12	3,014	1,783	0,515	0,098	0,265	0,010	27,562	161,450	0,137	0,371	0,371	3,321	4,303	Tidak beda
16	3,483	2,008	0,221	0,000	0,049	0,000	0,000	161,450	0,024	0,156	0,156	9,444	4,303	Beda
20	4,211	2,373	0,074	0,368	0,005	0,135	25,000	161,450	0,070	0,265	0,265	6,929	4,303	Beda
24	4,029	2,581	0,380	0,147	0,145	0,022	1,05	161,450	0,083	0,288	0,288	5,024	4,303	Beda

Uji beda T antara kadar etanol pada sampel dengan perlakuan A1B1C1 (A1) dan A1B1 C2 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	161,450	0,000	0,000	0,000	0,000	4,303	Tidak beda
4	0,667	0,633	0,052	0,061	0,003	0,004	1,417	161,450	0,003	0,057	0,057	0,613	4,303	Tidak beda
8	1,479	1,095	0,282	0,356	0,080	0,126	1,590	161,450	0,103	0,321	0,321	1,197	4,303	Tidak beda
12	2,295	2,390	0,356	0,515	0,126	0,265	2,098	161,450	0,196	0,443	0,443	-0,216	4,303	Tidak beda
16	3,110	3,162	0,307	0,221	0,094	0,049	1,929	161,450	0,071	0,267	0,267	-0,195	4,303	Tidak beda
20	3,908	3,821	0,037	0,074	0,001	0,005	4,000	161,450	0,003	0,058	0,058	1,491	4,303	Tidak beda
24	3,769	3,275	0,061	0,380	0,004	0,145	3,844	161,450	0,074	0,272	0,272	1,815	4,303	Tidak beda

Uji beda T antara kadar etanol pada sampel dengan perlakuan A2B1C1 (A1) dan A2B1 C2 (A2)

Waktu	Rerata A1	Rerata A2	STDEV A1	STDEV A2	STDEV ² A1	STDEV ² A2	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S _{x₁,x₂}	T _{hitung}	T _{tabel}	Kesimpulan
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	161,450	0,000	0,000	0,000	0,000	4,303	Tidak beda
4	1,098	0,809	0,168	0,043	0,028	0,002	15,322	161,450	0,015	0,123	0,123	2,355	4,303	Tidak beda
8	1,774	1,618	0,189	0,061	0,036	0,004	9,486	161,450	0,020	0,140	0,140	1,112	4,303	Tidak beda
12	3,014	2,563	0,159	0,466	0,025	0,217	8,544	161,450	0,121	0,348	0,348	1,295	4,303	Tidak beda
16	3,483	3,283	0,012	0,307	0,000	0,094	65,000	161,450	0,047	0,217	0,217	0,919	4,303	Tidak beda
20	4,211	3,838	0,258	0,184	0,066	0,034	1,960	161,450	0,050	0,224	0,224	1,666	4,303	Tidak beda
24	4,029	3,483	0,135	0,442	0,018	0,195	10,711	161,450	0,107	0,326	0,326	1,674	4,303	Tidak beda