



**KARAKTERISASI FENOTIP DAN PRODUKSI BIOETANOL
OLEH *Saccharomyces cerevisiae* STRAIN ATCC 9763, BATAN,
DAN FNCC 3210 PADA MEDIA MOLASSES TEBU**

SKRIPSI

oleh

**RIZKY QORIATUL WAHIDAH
NIM 091710101080**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**KARAKTERISASI FENOTIP DAN PRODUKSI BIOETANOL
OLEH *Saccharomyces cerevisiae* STRAIN ATCC 9763, BATAN,
DAN FNCC 3210 PADA MEDIA MOLASSES TEBU**

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

**RIZKY QORIALUL WAHIDAH
NIM 091710101080**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, puji syukur atas segala rahmat, hidayah serta Inayah-Nya dan shalawat untuk Rasulullah Muhammad SAW;
2. Ibunda Lilis Yunianingsih dan Ayahanda Saifur Rokhman (Alm) tercinta yang telah mendoakan dan memberi semangat, serta dukungan selama ini;
3. Adikku Isnaini Qoriatul Fadhilah S.ST yang telah memberikan banyak dukungan, semangat, dan motivasi selama penyelesaian pendidikanku;
4. Sahabat-sahabatku Fio, Laily, Indit, Ndayu, Farah, mbak Ummu dan lainnya yang selalu memberi dukungan, nasehat, semangat, dan doa;
5. Teman-teman seperjuangan STARGEN THP 2009, terimakasih atas persahabatan yang terjalin selama ini;
6. Sahabat-sahabat Organisasi (KOSINUSTETA, HMJ HIMAGIHASTA, DPM FTP, FSLDK, KAMMI, FIM, ILC, FLS, GYC, IMMPPG, UKM PELITA UNEJ, FSUKI, dan Genk Titisan Langit) yang tak henti-hentinya mendukung perjuangan panjang ini;
7. Ustadz/Ustadzah dan Murabbi-murabbi tercinta;
8. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan”

(Al-insyirah: 5)

“...Bekerjalah kamu, maka niscaya Allah akan melihat pekerjaanmu, begitu juga RasulNya, dan orang-orang mukmin...”

(QS. At-Taubah : 105)

“...Berangkatlah kamu baik dengan rasa ringan maupun dengan rasa berat...”

(QS. At-Taubah : 41)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Rizky Qoriatul Wahidah

NIM : 091710101042

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Karakterisasi Fenotip dan Produksi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 pada Media Molasses Tebu” 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, 1 April 2016

Yang menyatakan,

Rizky Qoriatul Wahidah

NIM 091710101080

SKRIPSI

**KARAKTERISASI FENOTIP DAN PRODUKSI BIOETANOL
OLEH *Saccharomyces cerevisiae* STRAIN ATCC 9763, BATAN,
DAN FNCC 3210 PADA MEDIA MOLASSES TEBU**

Oleh

Rizky Qoriatul Wahidah
NIM 091710101080

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Jayus
Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto DAggr.Sc.Magr

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Fenotip dan Produksi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 pada Media Molasses Tebu” karya Rizky Qoriatul Wahidah NIM. 091710101080 telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 1 April 2016

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota,

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

Dr. Nurhayati S.TP., M.Si
NIP 196607181993031013

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Karakterisasi Fenotip dan Produksi Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* Strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 pada Media Molasses Tebu; Rizky Qoriatul Wahidah; 091710101080; 2016; 55 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Produksi bioetanol dari molasses tebu selama ini masih menghasilkan rendemen yang rendah. Upaya peningkatan produktivitas etanol oleh *yeast* dapat dilakukan dengan pemilihan atau perbaikan strain yang potensial yaitu yang tahan terhadap pH rendah, memiliki produktivitas tinggi, mampu memfermentasi gula dalam jumlah banyak dengan menghasilkan kadar etanol yang tinggi.

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan perlakuan pH 4,5 dan 5 pada ketiga strain *S. cerevisiae* yaitu ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210. Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi: perhitungan biomassa mikroba berat kering, analisis total gula dengan metode fenol, analisis gula reduksi dengan metode *dinitrosalisilic acid* (DNS), dan perhitungan kadar etanol dengan metode *Chamber Conway*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 memiliki sifat morfologi (bentuk dan ukuran) yang sama dengan *S. cerevisiae* pada umumnya yaitu memiliki bentuk oval, bulat, dan memanjang dengan ukuran sel antara 4–8 μ m, sedangkan untuk karakteristik fisiologi yakni suhu pertumbuhan optimal yang digunakan adalah 30°C dengan pH pertumbuhan optimal yaitu 4,5. Pada media molasses, strain ATCC 9763 mencapai biomassa tertinggi pada pH 4,5 yaitu 1,466 mg/mL dan menghasilkan kadar etanol tertinggi yaitu 17,215 g/L dengan konsumsi total gula mencapai 30,679 g/L setelah fermentasi selama 16 jam, sedangkan strain FNCC 3210 mencapai biomassa tertinggi pada pH 5 yaitu 1,503 mg/mL dan menghasilkan kadar etanol tertinggi yaitu 16,942 g/L dengan konsumsi total gula mencapai 49,937 g/L setelah fermentasi selama 20 jam.

SUMMARY

Phenotypic Characterization and Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Strain ATCC 9763, BATAN, and FNCC 3210 in Sugarcane Molasses Media; Rizky Qoriatul Wahidah; 091710101080; 2016; 55 pages; Agricultural Product of Technology Department, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Bioethanol production from sugarcane molasses still have low yield, so the solution required. The effort to increase productivity did by selection or improvement the potential strain which tolerate in low pH, high productivity, ferment more glucose, and yield more etanol.

The research did experimentally with the variations of pH values are 4,5 and 5, and the strains of *S. cerevisiae* are ATCC 9763, BATAN, and FNCC 3210. The observation parameters are calculation of microba population in dry weight, analysis of total sugar using fenol method, analysis sugar reduction using dinitrosalisilic acid (DNS) method, and calculation of ethanol concentration using Chamber Conway method.

The results indicate that *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, and FNCC 3210 have morphology characteristics (shape and dimation) as same as common *S. cerevisiae*. They have shape in oval, spherical, and elongated, while the dimation is between 4–8 μ m. The physiology characteristics consist of plantation temperature and value of pH are determinable. The physiology characteristics are the optimum plantation temperature of *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, and FNCC 3210 is 30°C while the optimum value of pH is 4,5. In the molasses medium, strain ATCC 9763 reach the maximum biomass in pH 4,5 that is 1,466 mg/mL and produce the maximum ethanol concentration is 17,215 g/L with consume of total sugar as much as 30,679 g/L after 16 hours fermentation. Strain FNCC 3210 reach the maximum biomass in pH 5 that is 1,503 mg/mL and produce the maximum ethanol concentration is 16,942 g/L with consume of total sugar as much as 49,937 g/L after 20 hours fermentation.

PRAKATA

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

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

1. Dr. Yuli Witono, S.TP., MP., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember sekaligus dosen pembimbing akademik, dan anggota tim penguji yang telah meluangkan waktu, perhatian, dan pikiran dalam bentuk nasihat dan teguran yang sangat berarti baik selama kegiatan bimbingan akademik maupun bimbingan dan pengarahan demi kemajuan penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi;
3. Dr. Ir. Jayus, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto DAggr.Sc.Magr. selaku Dosen Pembimbing Anggota sekaligus sebagai penyandang dana penelitian yang telah mendanai penelitian ini, dan memberikan pengarahan selama penelitian dan penulisan skripsi ini;
4. Dr. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku ketua tim penguji dan Dr. Nurhayati S.TP., M.Si. selaku anggota tim penguji, atas saran dan evaluasi demi perbaikan penulisan skripsi;
5. Seluruh staff dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, serta Laboratorium *Center of Development Advisory Science And Technology*, Universitas Jember;

6. Ibunda dan Ayahanda, serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa dan dorongan demi terselesaikannya skripsi ini;
7. Teman sekaligus sahabat hidupku Eriek Mustaqim S.TP yang terus memberikan motivasi di akhir perjuangan ini;
8. Sahabat dan teman-temanku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan dukungan dan semangat;
9. Teman-teman Jurusan Teknologi Hasil Pertanian STAR GENERATION angkatan 2009 yang telah memberikan dukungan dan semangat.
10. 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, 3 Februari 2016

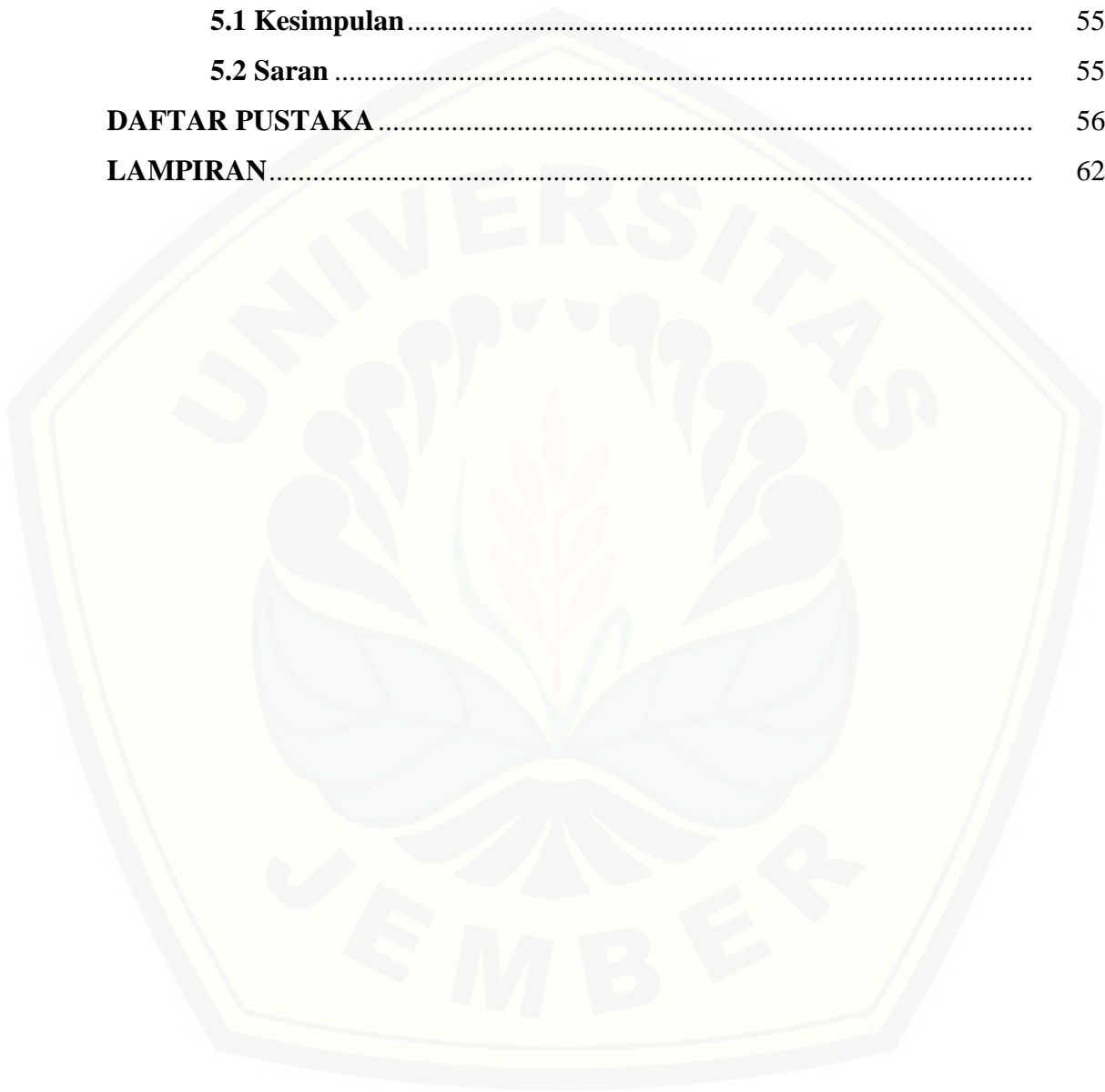
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Karakteristik Fisiologi dan Morfologi <i>S. cerevisiae</i>	5
2.2 Kemampuan Produksi Bioetanol oleh <i>S. cerevisiae</i>	8
2.3 Molasses dan Pemanfaatannya	12
2.4 Mekanisme Fermentasi Bioetanol dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi Bioetanol	14
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	20
3.3 Rancangan Percobaan	20

3.4 Pelaksanaan Penelitian	21
3.4.1 Preparasi Media Fermentasi dan Starter	21
3.4.2 Penelitian Utama	24
3.5 Parameter Pengamatan	26
3.6 Prosedur Analisis	26
3.6.1 Pengukuran Sel Bakteri (Panjang dan Diameter) dengan Pe- warnaan Gram	26
3.6.2 Pengukuran dan Perhitungan Total Biomassa	28
3.6.3 Penentuan Kadar Gula Reduksi Menggunakan Metode <i>Dini-</i> <i>trosalisilic acid</i> DNS	30
3.6.4 Analisis Kadar Etanol	32
3.6.5 Penentuan Kadar Total Gula	35
3.6.6 Perhitungan Kinetika Fermentasi	36
3.6.7 Analisis Data	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Karakteristik Morfologi <i>S. cerevisiae</i> Strain BATAN, ATCC 9763, dan FNCC 3210	37
4.2 Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763, BATAN dan FNCC 3210	41
4.2.1 Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> pada Berbagai Variasi Suhu	41
4.2.2 Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Glukosa dengan Berbagai Variasi pH	42
4.2.3 Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses pada pH Optimal	44
4.3 Kadar Total Gula	45
4.4 Kadar Gula Reduksi	46
4.5 Kinetika Fermentasi Bioetanol oleh Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	47
4.5.1 Laju Konsumsi Total Gula	47
4.5.2 <i>Growth Rate</i>	50
4.5.3 <i>Growth Yield</i>	51

4.5.4 <i>Yield</i> Etanol	51
4.5.5 Efisiensi Fermentasi	51
4.5.6 Produktivitas Etanol	52
BAB 5. PENUTUP	55
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	62



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Morfologi Khamir	5
2.2 Konversi Bahan Baku Tanaman yang Mengandung Pati atau Karbohidrat Dan Tetes Menjadi Etanol	13
2.3 Karakteristik Molasses	13
2.4 Komposisi Molasses	14
3.1 Komposisi Media MEB untuk <i>S.cerevisiae</i>	22
3.2 Seri Konsentrasi Pengambilan Larutan Standart Glukosa dan Nilai Peng- ukuran Absorbansi	31
3.3 Seri Konsentrasi Pengambilan Larutan Standart Etanol dan Nilai Pengu- ukuran Absorbansi	33
3.4 Data Nilai Absorbansi Glukosa pada Konsentrasi Berbeda	35
4.1 Pengamatan Bentuk Morfologi Tiga Strain <i>S. cerevisiae</i>	39
4.2 Indikator Pertumbuhan Ketiga Strain <i>S. cerevisiae</i> pada Media MEB	41
4.3 Laju Konsumsi Total Gula /jam oleh <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 dengan pH 4,5 dan pH 5 pada Media Molasses	48
4.4 Laju Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 setelah Difermentasi selama 12 Jam pada Media Molasses dengan pH 4,5 dan pH 5 pH 4,5 dan pH 5.....	50
4.5 Nilai <i>Growth Yield</i> <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 per Jam pada Media Molasses dengan pH 4,5 dan pH 5	50
4.6 Nilai <i>Yield Etanol</i> <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 per Jam pada Media Molasses dengan pH 4,5 dan pH 5	51
4.7 Nilai Efisiensi Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 per Jam pada Media Molasses dengan pH 4,5 dan pH 5	52
4.8 Produktivitas Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 per Jam pada Media Molasses dengan pH 4,5 dan pH 5	54

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Bagian-Bagian Khamir	7
3.1 Rancangan Penelitian	21
3.2 Skema Pembuatan Starter	22
3.3 Pengukuran Berat Kering Sel	25
3.4 Tahap <i>Open file</i>	27
3.5 Pengaturan Skala Awal	28
3.6 Hasil Akhir Pengukuran	31
3.7 Kurva Standart Gula Reduksi	33
3.8 Kurva Standart Etanol	33
3.9 Prosedur Penggunaan Cawan Conway dalam Analisa Jumlah Etanol	34
3.10 Kurva Standar Total Gula	35
4.1 Pengamatan morfologi ketiga strain <i>S. cerevisiae</i> (a) ATCC 9763 400 kali (b) BATAN 1000 kali (c) FNCC 3210 400 kali	38
4.2 Bentuk sel <i>S. cerevisiae</i> berbentuk bulat oval dan berwarna bening (a) ATCC 9763, (b) FNCC 3210, dan (c) BATAN	39
4.3 Kurva Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> pada media Glukosa dengan variasi pH : pH 4; pH 4,5; pH 5; pH,5 5. (a) strain ATCC 9863 (b) FNCC 3210	42
4.4 Biomassa Sel <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses setelah Difermentasi Selama 24 Jam pada pH 4,5 dan pH 5	44
4.5 Kadar Total Gula pada Media Molasses setelah Difermentasi Selama 24 Jam oleh <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5	45
4.6 Kadar Gula Reduksi pada Media Molasses setelah Difermentasi Selama 24Jam oleh <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5	47
4.7 Kadar Etanol pada Media Molasses setelah Difermentasi Selama 24 Jam oleh <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5	52

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Data Pengukuran Ketiga Jenis Sel <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210	62
A.1 Data Pengukuran Sel <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763	62
A.2 Data Pengukuran Sel <i>S. cerevisiae</i> Strain BATAN	62
A.3 Data Pengukuran Sel <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210	62
B. Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Glukosa	63
B.1 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	63
B.1.1 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4.....	63
B.1.2 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5.....	63
B.1.3 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5.....	63
B.1.4 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5,5.....	64
B.2 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	64
B.2.1 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4.....	64
B.2.2 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5.....	64
B.2.3 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5.....	65
B.2.4 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5,5.....	65
C. Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Glukosa	66
C.1 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	66
C.2 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	66

D. Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	67
D.1 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	67
D.1.1 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5	67
D.1.2 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5	67
D.2 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> dan FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	67
D.2.1 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5	67
D.2.2 Data Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5	68
E. Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	69
E.1 Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	69
E.1.1 Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5	69
E.1.2 Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5	69
E.2 Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	69
E.2.1 Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5	69
E.2.2 Data Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5	70
E.3 Contoh Perhitungan Kadar Etanol	
F. Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	71
F.1 Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	71
F.1.1 Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5	71
F.1.2 Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5	71
F.2 Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	71

F.2.1 Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5	71
F.2.2 Data Kadar Gula Reduksi <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5	72
F.3 Contoh Perhitungan Kadar Gula Reduksi	73
G. Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	73
G.1 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	73
G.1.1 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5.....	73
G.1.2 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5.....	73
G.2 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	73
G.2.1 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5.....	73
G.2.2 Data Growth Rate Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5.....	73
G.3 Contoh Perhitungan Growth Rate Biomassa.....	73
H. Data Growth Yield Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	74
H.1 Data Growth Yield Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	74
H.1.1 Data Growth Yield Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5.....	74
H.1.2 Data Growth Yield Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5.....	74
H.2 Data Growth Yield Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	74

H.2.1 Data <i>Growth Yield</i> Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5.....	74
H.2.2 Data <i>Growth Yield</i> Biomassa <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5.....	75
H.3 Contoh Perhitungan <i>Growth Yield</i> Biomassa (ATCC 9763)	75
I. Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	76
I.1 Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	76
I.1.1 Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5	76
I.1.2 Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5	76
I.2 Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	77
I.2.1 Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5	77
I.2.2 Data Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5	77
I.3 Contoh Perhitungan Kadar Total Gula	78
J. Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	78
J.1 Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH	78
J.1.1 Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5	79
J.1.2 Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 5	79
J.2 Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH	80

J.2.1 Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5	80
J.2.2 Data Kinetika Fermentasi <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 5	80
J.3 Contoh Perhitungan Kinetika Fermentasi	81
K. Uji T Kurva <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses	82
K.1 Uji T Kurva Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5 dan pH 5	82
K.2 Uji T Kurva Pertumbuhan <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5	82
K.3 Uji T Kurva Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5 dan pH 5	83
K.4 Uji T Kurva Kadar Etanol <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH	83
K.5 Uji T Kurva Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain ATCC 9763 pada pH 4,5 dan pH 5	84
K.6 Uji T Kurva Kadar Total Gula <i>S. cerevisiae</i> Strain FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5	84

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ketergantungan negara di dunia akan minyak bumi, yang disebabkan oleh meningkatnya jumlah kendaraan transportasi dan semakin banyaknya pabrik, mengakibatkan cadangan minyak bumi semakin menipis. Organisasi minyak dunia (OPEC) memperkirakan permintaan minyak global meningkat sebesar 1,14 juta barel per hari pada 2014, yang berarti dunia akan mengkonsumsi 91,1 juta barel per hari. Permintaan ini akan terus meningkat pada tahun 2015 yang diprediksi akan terjadi kenaikan lagi sebesar 1,18 juta barel per hari dari tahun sebelumnya (Marboen, 2014).

Salah satu bahan bakar nabati alternatif yang saat ini menjadi primadona untuk menggantikan minyak bumi yang harganya semakin meningkat adalah bioetanol (C_2H_5OH). Dibanding minyak bumi, bioetanol mempunyai kelebihan lebih ramah lingkungan dan penggunaannya sebagai alternatif pengganti BBM terbukti memiliki emisi karbon monoksida dan polutan asap kendaraan lebih rendah dibandingkan dengan bahan bakar minyak, serta memiliki kandungan oksigen lebih tinggi sehingga terbakar lebih sempurna (Wyman dan Hinman, 1990). Bahan baku yang dapat dijadikan sebagai pembuatan bioetanol salah satunya molasses.

Molasses adalah sejenis sirup yang merupakan sisa dari proses pengkristalan gula pasir. Molasses tidak dapat dikristalkan karena mengandung glukosa dan fruktosa yang sulit untuk dikristalkan (Pramana, 2008). Ketersediaan molasses di Indonesia cukup banyak. Hal ini berkorelasi dengan luas areal perkebunan tebu yang semakin meningkat. Berdasarkan data yang diperoleh dari Dirjen Perkebunan (2011), areal tebu seluas 382,354 hektar dengan produksi gula yang dihasilkan sebanyak 2,240,417 ton, molasses sebanyak 1,5 juta ton, MSG sebanyak 600 ribu ton, serta 900 ribu ton untuk bioetanol 95 %, industri minuman, dan ekspor. Terdapat dua jenis molasses yang dihasilkan dari pengolahan gula tebu yaitu *black strap molasses* merupakan residu dari kristalisasi pengolahan gula dan *light test molasses* merupakan residu dari evaporasi pengolahan gula

yang memiliki kandungan gula rendah. Jenis molasses yang umum digunakan dalam fermentasi untuk produksi bioethanol adalah *black strap molasses* karena masih memiliki kandungan gula yang cukup tinggi (Hidayat dan Suhartini., 2006). Pemilihan molasses sebagai substrat dalam produksi bioethanol memberikan keuntungan hingga 24%. Berdasarkan penelitian Nurdyastuti (2008), konversi glukosa menjadi bioethanol tertinggi berasal dari substrat molasses.

Dalam produksi bioethanol dari molasses yang cukup melimpah sebagai substrat penyedia glukosa maupun sukrosa. Menurut hasil produksi bioethanol di PG. Djatiroto, Lumajang, Jawa Timur, rendemen bioethanol yang dihasilkan relatif rendah kurang lebih 10%. Menurut Lin dan Tanaka (2005), *S.cerevisiae* mampu mengkonversi media yang memiliki kandungan gula sederhana dan disakarida dengan baik, sehingga mampu menghasilkan jumlah etanol 12-18% v/v pada media fermentasi molases. Selain itu, *S. cerevisiae* memiliki waktu germinasi singkat sehingga dapat meningkatkan efektifitas fermentasi. Rendahnya produktivitas ini ditengarai akibat beberapa hal diantaranya adalah keterbatasan kemampuan strain *yeast* yang digunakan dalam proses produksi dan belum didapatkannya teknologi produksi yang optimal untuk menghasilkan rendemen bioethanol yang tinggi. Selain itu beberapa bahan substrat yang digunakan dalam pembuatan bioethanol juga masih terbilang mahal dan menggunakan bahan baku pangan misalnya saja singkong, ubi, sagu, dan lain sebagainya.

Pemilihan jenis mikroorganismenya juga memiliki peranan penting dalam produksi bioethanol karena berpengaruh terhadap etanol yang dihasilkan. Perbedaan jenis yeast mempengaruhi efektifitas fermentasi dan jumlah etanol yang dihasilkan (Elena *et al.*, 2009). Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya, mikroorganismenya yang umum digunakan dalam produksi bioethanol pada media molases adalah *S. cerevisiae*. Untuk mengatasinya diperlukan solusi untuk memproduksi bioethanol. Salah satu alternatif yang dapat ditawarkan adalah pemilihan serta eksplorasi strain yeast unggul berproduktivitas tinggi. Selain itu memiliki daya tahan yang kuat terhadap kadar etanol tinggi sehingga didapatkan kondisi dan teknologi produksi bioethanol yang optimal serta menguntungkan secara ekonomis.

1.2 Perumusan Masalah

Produksi bioetanol selama ini menggunakan khamir yang dijual di pasar atau biasa disebut dengan ragi pasar. Sementara itu dalam perkembangan sains dan teknologi, banyak ditemukan *S. cerevisiae* dengan berbagai strain dalam bentuk kultur murni, misalnya strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210. Ketersediaan ketiga strain *S. cerevisiae* ini merupakan hasil kultur murni dari beberapa laboratorium yaitu strain *American Type Culture Collection* (ATCC) 9763 merupakan koleksi dari IPB, strain BATAN koleksi dari Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), dan strain *Food and Nutrition Culture Collection* (FNCC) 3210 koleksi dari UGM. Umumnya, setiap strain *Saccharomyces* memiliki kondisi optimum yang berbeda-beda dalam proses fermentasi yang menghasilkan etanol. Kondisi optimum ini sebagian juga dipengaruhi oleh perbedaan morfologi tumbuh selnya. Informasi tentang sifat fenotip yang meliputi morfologi dan fisiologi dari ketiga strain ini masih belum banyak ditemukan dalam referensi manapun. Oleh karena itu, karakterisasi fenotip perlu dilakukan sehingga dapat diketahui perbedaan sifat morfologi dan fisiologi ketiga strain *S. cerevisiae*. Sifat morfologi yang perlu diketahui meliputi bentuk khamir, pewarnaan dinding sel, dan diameter sel, sedangkan sifat fisiologi meliputi pengaruh suhu, pH dan media pada produksi etanol menggunakan ketiga strain *S. cerevisiae*. Informasi tentang sifat fenotip ini selanjutnya dapat digunakan untuk mengetahui tingkat produktivitas dan pertumbuhan dari masing-masing strain *S. cerevisiae* ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 pada media molasses dan glukosa dalam memproduksi etanol.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan teknologi produksi bioetanol dari limbah molasses tebu dalam keadaan fermentasi diam. Tujuan khusus penelitian adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui karakteristik morfologi dan fisiologi (suhu dan pH) pertumbuhan *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210.

2. Mengetahui pengaruh pH pertumbuhan terhadap produksi bioetanol pada media molasses oleh *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat diantaranya yaitu :

1. Meningkatkan nilai ekonomis molasses tebu untuk menjadi bioetanol dengan memaksimalkan penggunaan inokulum *S. cerevisiae* tiga strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210.
2. Memberikan alternatif penggunaan mikroba *S. cerevisiae* pengganti ragi yang tahan terhadap kadar etanol tinggi bagi industri bioetanol sebagai bahan bakar.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karakteristik Fisiologi dan Morfologi *S. cerevisiae*

Karakterisasi terbagi dalam dua tahap yaitu klasifikasi dan identifikasi. Untuk dapat mengidentifikasi dan mengklasifikasi suatu mikroorganisme, maka kita harus mempelajari karakteristik mikroorganisme tersebut terlebih dahulu (Pelczar, 1988). Salah satunya adalah Khamir, merupakan kapang yang tidak membentuk hifa, ragi berkembang biak melalui pertunasan. Pertunasan dapat terjadi melalui satu ujung (pertunasan polar) atau melalui beberapa tunas di sekeliling sel (pertunasan multilateral). Khamir yang bereproduksi melalui pertunasan lateral membentuk sel vegetatif berbentuk oval. Jenis pertunasan merupakan ciri yang banyak digunakan dalam identifikasi khamir. Selain jenis pertunasan dapat digunakan pula bentuk dan jumlah askospora. Identifikasi khamir tingkat genus kadangkala dapat dilakukan dengan pemeriksaan mikroskopik, namun berbagai uji faali seringkali diperlukan untuk identifikasi tingkat spesies. Berikut disajikan tentang morfologi khamir pada Tabel 2.1.

Khamir merupakan mikroorganisme golongan *fungi* yang dibedakan bentuknya dari *mould* (kapang) karena bersel tunggal (*uniseluler*). Reproduksi vegetatif pada khamir terutama dengan cara pertunasan. Sebagai sel tunggal, khamir tumbuh dan berkembang biak lebih cepat dibanding dengan *mould* yang tumbuh dengan pembentukan filamen. Khamir sangat mudah dibedakan dengan mikroorganisme yang lain misalnya dengan bakteri, khamir mempunyai ukuran sel yang lebih besar dan morfologi yang berbeda. Pada protozoa, khamir mempunyai dinding sel yang lebih kuat serta tidak melakukan fotosintesis bila dibandingkan dengan ganggang atau alga.

Tabel 2.1 Morfologi Khamir

Morfologi	Genus
Hanya ada pertunasan	<i>Torulopsis, cryptococcus, rhodotorula</i>
Tunas dan pseudomiselium	<i>Candida</i>
Tunas, pseudomiselium, dan arthospora	<i>Trichospora</i>
Miselium dan arthospora	<i>Geotrichum</i>
Tunas dan askospora	<i>Saccharomyces, hansenula</i>

(Sumber: Fardiaz, 1992)

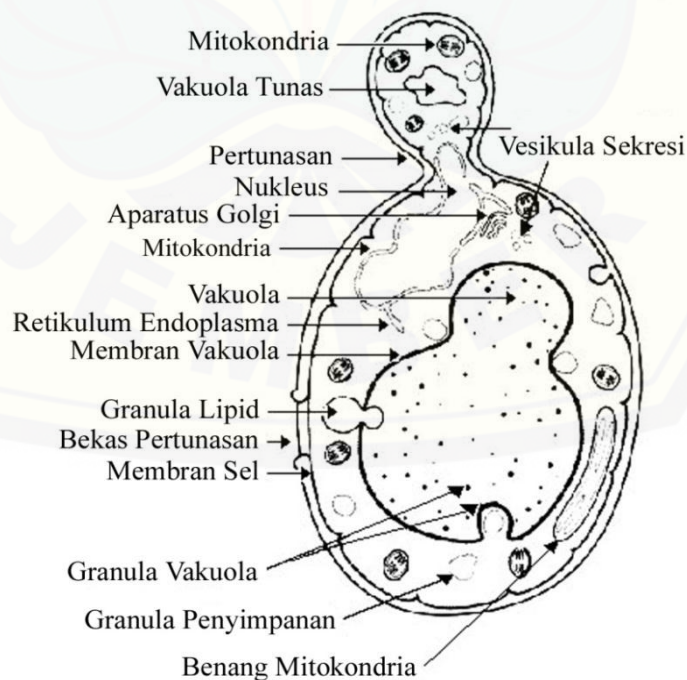
Dibandingkan dengan kapang dalam pemecahan bahan komponen kimia, khamir lebih efektif memecahnya dan lebih luas permukaan serta volume hasilnya lebih banyak. Khamir dapat dibedakan atas dua kelompok berdasarkan sifat metabolismenya yaitu bersifat fermentatif dan oksidatif. Jenis fermentatif dapat melakukan fermentasi etanol yaitu memecah gula (glukosa) menjadi etanol dan gas contohnya pada produk roti. Sedangkan jenis oksidatif (respirasi) akan menghasilkan karbon dioksida dan air. Keduanya bagi khamir dipergunakan untuk energi walaupun energi yang dihasilkan melalui respirasi lebih tinggi dari yang melalui fermentasi (Fardiaz, 1992).

Saccharomyces cerevisiae merupakan salah satu “produsen” etanol yang terkenal (Yingling *et al.*, 2010; Laopaiboon dan Laopaiboon, 2011; Izmirlioglu dan Demirci, 2012). Telah banyak penelitian mengenai seleksi strain dari *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi bioetanol dengan molases sebagai substratnya dengan tujuan untuk memperoleh strain terbaik yang toleran terhadap konsentrasi etanol, gula, asam, dan tekanan osmotik yang tinggi namun tetap memiliki produktivitas etanol yang tinggi pula. Basso *et al.*, (2008) menyatakan hanya tiga dari 24 strain yang menunjukkan kemampuan yang luar biasa dalam bersaing dengan khamir indigenous selama fermentasi dalam skala industri. Tiga strain tersebut adalah *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, CAT-1 dan BG-1, strain-strain terpilih ini dapat mengurangi biaya produksi etanol tidak hanya dengan meningkatkan yield etanol atau memudahkan proses fermentasi, tetapi juga dengan mengurangi penggunaan antifoam. Namun, pada konsentrasi 40%, tidak ada strain yang dapat digunakan dalam skala ini karena strain tersebut tidak dapat bertahan selama fermentasi akibat adanya kombinasi dari flokulasi, pembentukan buih, pembentukan gliserol, dan residu gula yang tinggi, sehingga dibutuhkan lebih banyak biaya untuk mengatasi masalah tersebut.

Mikroorganisme ini memiliki beberapa organel sel antara lain nukleus, sitoplasma dan membran sitoplasma, vakuola, mitokondria, globula lipid serta dinding sel yang tebal (25 nm) dengan komponen terbesar glukukan, juga terdapat kitin dan protein. *Saccharomyces cerevisiae* beradaptasi dengan baik untuk tumbuh pada suhu tinggi daripada jenis *Saccharomyces* yang lain, dengan suhu

optimum tertinggi 32,3°C dan maksimum pada 45,4°C. Selain itu, *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh lebih cepat dibanding dengan jenis lainnya, tetapi menunjukkan berkurangnya kecepatan pertumbuhan pada suhu rendah, adapun batas suhu terendah yang dapat digunakan *Saccharomyces cerevisiae* agar tumbuh lebih cepat dari yang lain adalah pada suhu 24°C (Salvadó, 2011). Morfologi khamir secara umum disajikan pada Gambar 2.1.

Identifikasi khamir untuk kepentingan klasifikasi sedikit berbeda dengan kapang. Pada kapang identifikasi biasanya didasarkan atas bentuk morfologinya, sedangkan identifikasi khamir selain didasarkan pada morfologi juga ditentukan oleh sifat-sifat lainnya yaitu sifat kultur, fisiologi dan reproduksi seksual. Berdasarkan sifat-sifat tersebut khamir dapat dibedakan atas tiga kelas, yaitu: Kelas *Ascomycetes* atau khamir *askosporogenous*, merupakan spora yang tumbuh di dalam askus. Kelas *Basidiomycetes* yang membentuk spora pada basidium. Aktivitas khamir pada bahan pangan dikelompokkan menjadi beberapa kelompok meliputi: aktivitas pada glukosa dan aktivitas dalam senyawa nitrogen. Terakhir adalah kelas *Deuteromycetes*, yaitu khamir yang tidak memproduksi spora seksual, disebut juga *fungi imperfecti* dan terdiri dari famili: *Sporobolomyceta-*



Gambar 2.1 Bagian-Bagian Khamir (Anonim, 2004)

ceae yang memproduksi *ballistospora* dan *Cryptococcaceae* yang tidak memproduksi *ballistospora* maupun spora seksual (Gross *et al.*, 1995).

Aktivitas khamir pada bahan pangan dikelompokkan menjadi beberapa kelompok meliputi: 1) aktivitas pada glukosa; 2) aktivitas dalam senyawa nitrogen; 3) aktivitas pada asam-asam organik; 4) aktivitas dalam degradasi protein; 5) aktivitas dalam degradasi lemak; 6) aktivitas dalam degradasi selulosa; 7) pektin dan *xilan*; 8) serta aktivitas dalam degradasi pati. Khusus khamir yang memiliki kemampuan dalam degradasi pati, telah menjadi subyek penelitian-penelitian di seluruh dunia. Penelitian yang dilakukan adalah berkaitan dengan sifat amilolitik khamir pada pati dalam memproduksi etanol dan biomassa khamir untuk memproduksi minuman dan makanan. Enzim amilase sebagai aktivitas amilolitik pada khamir, diproduksi secara ekstraseluler. Secara umum kelompok khamir yang memiliki kemampuan amilolitik jumlahnya relatif sedikit antara lain *Schwaniomyces occidentalis*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Sacch diastiticus*, *Candida* dan *Pichia*, sedangkan jenis-jenis khamir lainnya tidak memproduksi amilase (Roosifta, 2004).

Kebanyakan khamir yang digunakan dalam industri termasuk kelas *Ascomycetes* terutama jenis *Saccharomyces*. Beberapa khamir makanan dideskripsikan sebagai berikut: a) Sel khamir yang termasuk jenis ini mungkin berbentuk bulat, oval, atau memanjang dan mungkin membentuk *pseudomiselium*. b) Reproduksi khamir dilakukan dengan cara pertunasan multipolar, atau melalui pembentukan askospora. c) Spesies yang paling umum digunakan dalam industri makanan adalah *S. cerevisiae*, misalnya dalam pembuatan roti, anggur, brem, gliserol, enzim invertase. d) Koloni *S. cerevisiae* berwarna putih kekuningan, agak berlendir, dan mempunyai aroma khas seperti aroma roti. Untuk pertumbuhannya membutuhkan oksigen, cahaya, dan suhu (Judoamidjojo *et al.*, 1992).

2.2 Kemampuan Produksi Bioetanol oleh *S. cerevisiae*

Bioetanol digolongkan sebagai bahan bakar ramah lingkungan untuk kendaraan yang biasanya menggunakan bensin sebagai bahan bakarnya. Etanol sebagai sumber energi terbarukan, mengurangi kebutuhan dalam konsumsi bahan

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

S. cerevisiae merupakan cendawan berupa khamir sejati tergolong eukariot mempunyai potensi kemampuan yang tinggi sebagai imunostimulan, dan bagian yang bermanfaat tersebut adalah dinding selnya. *S. cerevisiae* secara morfologi hanya membentuk *blastospora* berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Berkembang biak dengan membelah diri melalui “*budding cell*”. Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. *S. cerevisiae* memiliki peran penting dalam penelitian terapan karena kemampuannya yang luar biasa dalam memproduksi etanol dan karbondioksida dari gula sederhana dengan produktivitas dan hasil yang tinggi. *S. cerevisiae* relatif toleran terhadap pH rendah dan konsentrasi gula dan etanol yang tinggi, dengan karakteristik seperti ini dapat menurunkan resiko kontaminasi selama fermentasi. Terlebih lagi, khamir ini tahan terhadap inhibitor yang ada dalam biomassa dan mampu tumbuh dalam kondisi anaerob. Hal ini telah menjadi alasan utama untuk meningkatkan eksplorasi *S. cerevisiae* di industri bioteknologi dengan fokus pada fermentasi dari produksi zat-zat biokimia, misalnya, gliserol, propanediol, asam organik, gula alkohol, L-gliserol-3-fosfat (L-G3P), steroid, dan isoprenoid (Nevoigt, 2008).

S. cerevisiae merupakan salah satu spesies khamir yang memiliki daya konversi gula menjadi etanol sangat tinggi. Mikroba ini biasanya dikenal dengan *baker's yeast* dan metabolismenya telah dipelajari dengan baik. Produk metabolik

utama adalah etanol, CO₂ dan air, sedangkan beberapa produk lain dihasilkan dalam jumlah sangat sedikit. Khamir ini bersifat fakultatif anaerobik. *S. cerevisiae* memerlukan suhu 30 °C dan pH 4,0-4,6 agar dapat tumbuh dengan baik. Selama proses fermentasi akan timbul panas, apabila tidak dilakukan pendinginan, suhu akan makin meningkat sehingga proses fermentasi terhambat (Oura di dalam Dellweg, 1983). *S. cerevisiae* tumbuh optimum pada suhu 25–30 °C dan maksimum pada 35–47 °C. Untuk pH pertumbuhan khamir yang baik antara 4–5,5. Perubahan pH dapat mempengaruhi pembentukan hasil samping fermentasi. Pada pH tinggi maka *lag phase* akan berkurang dan aktivitas fermentasi akan naik (Prescott dan Dunn, 1981).

S. cerevisiae merupakan organisme fakultatif anaerob yang dapat menggunakan sistem aerob maupun anaerob untuk memperoleh energi dari pemecahan glukosa. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *S. cerevisiae* dan produksi alkohol yang dihasilkan adalah suhu, pH, oksigen, dan kadar alkohol. Gross *et al.* (1995), menyatakan bahwa sebagian besar khamir umumnya tumbuh baik pada kisaran suhu 25°-46°C dengan nilai pH optimum 2,5-5,5. Selain itu, menurut Elevri (2006), *S. cerevisiae* memiliki toleransi yang tinggi terhadap alkohol, tapi hal ini tergantung pada jenisnya.

Hasil penelitian Pereira *et al.* (2010), dilaporkan bahwa dari sebelas strain *S. cerevisiae* yang digunakan dalam fermentasi bioetanol didapatkan hasil bahwa masing-masing strain *S. cerevisiae* memiliki kemampuan produksi bioetanol berbeda-beda. Pereira *et al.* (2010), dalam penelitiannya melaporkan bahwa tiga strain diantaranya adalah strain CEN.PK 113-7D menghasilkan 17,5% (v/v) etanol dalam waktu kurang dari 80 jam, sedangkan, strain CEN.PK 122 menghasilkan etanol dalam jumlah yang sama, tapi fermentasinya sedikit lebih lambat. Begitu pula strain S288C yang memiliki waktu fermentasi jauh lebih lambat, yaitu 120 jam.

Berdasarkan penelitian Elena *et al.* (2009), melaporkan lima strain *S. cerevisiae* yang digunakan dalam fermentasi bioetanol yaitu strain *Safdistil C-70*, *Ethanol RedTM*, *Fali^R*, *Trockenhefe*, dan *Pakmaya* menghasilkan etanol yang berbeda-beda. Laju pertumbuhan masing-masing strain setelah diinkubasi selama

24 jam berbeda-beda. Hasil menunjukkan bahwa strain Safdistil C-70 dan Ethanol Red™ tumbuh lebih optimum dibandingkan strain lain. 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, strain yang memiliki kemampuan produksi etanol maksimum pada fermentasi 36 jam adalah strain Safdistil C- 70 dengan produksi etanol sebesar 2,33 g/L. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa produktivitas etanol tidak selalu seiring dengan banyaknya sel mikroba yang tumbuh. Hal tersebut dapat dikarenakan karakteristik masing-masing strain berbeda.

Umumnya produksi etanol menggunakan starter ragi yang diawetkan dari yeast *S. cerevisiae* berbentuk padat dan kering. Dalam ragi terdapat berbagai strain yeast yang mempunyai daya sintesis dan perombakan terhadap substrat yang berbeda satu dengan lainnya. Di antara sekian banyak mikroorganisme yang dimanfaatkan untuk produksi bioetanol, *S. cerevisiae* masih tetap menjadi pilihan utama baik pada skala industri maupun laboratorium (Bai *et al.*, 2008). Selain Biomassanya banyak terdapat di alam, kelebihan lain yang dimiliki *S. cerevisiae* adalah kemampuan menghasilkan etanol dalam jumlah yang cukup tinggi, ketahanan hidup yang tinggi untuk produksi skala industri (Jeffries dan Jin, 2000), mampu tumbuh cepat pada substrat organik dan toleransi terhadap perubahan kondisi sekeliling tidak terlalu besar (Kuswanto dan Sudarmaji, 1997). Menurut Siregar (1992), *S. cerevisiae* juga tahan terhadap kadar gula tinggi dan tetap aktif melakukan fermentasi pada suhu 4 °C. Berdasarkan fakta inilah para produsen etanol masih cenderung mencari strain *S. cerevisiae* yang lebih unggul.

Selain populasinya dalam bentuk kultur murni, kelebihan lain yang dimiliki *S. cerevisiae* adalah kemampuan menghasilkan etanol dalam jumlah yang cukup tinggi, mampu tumbuh cepat pada substrat organik, dan toleransi terhadap perubahan kondisi sekeliling tidak terlalu besar (Kuswanto dan Sudarmaji, 1997). *S. cerevisiae* bisa didapatkan dalam bentuk kultur murni maupun dalam bentuk ragi. *S. cerevisiae* bisa diproduksi menjadi ragi, baik untuk pembuatan roti (*baker's yeast*) ataupun pada pembuatan minuman beretanol (*brewing yeast* dan *wine yeast*).

2.3 Molasses dan Pemanfaatannya

Molasses adalah hasil samping yang berasal dari pembuatan gula tebu. Molasses berupa cairan kental dan diperoleh dari tahap pemisahan kristal gula. Molasses tidak dapat lagi dibentuk menjadi sukrosa namun masih mengandung gula dengan kadar tinggi 50-60%, asam amino dan mineral. Molasses 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%. Molasses 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 dan Suhartini, 2006).

Kandungan gula pada molasses ini umumnya terlalu tinggi bagi pertumbuhan *yeast* seperti *S. cerevisiae*. Oleh karena itu konsentrasi gula ini perlu diatur untuk mendapatkan konsentrasi yang optimum bagi pertumbuhannya. Molasses masih mengandung kadar gula yang cukup untuk dapat menghasilkan etanol dengan proses fermentasi, biasanya pH molasses berkisar antara 5,5–6,5. Molasses yang masih mengandung kadar gula sekitar 10-18% telah memberikan hasil yang memuaskan dalam pembuatan etanol (Toharisman, 2010a). Produksi bioetanol dari molasses umumnya melalui beberapa tahapan proses. Diawali dengan persiapan bahan baku pembuatan bioetanol yang terdiri atas molasses (kadar gula 50%), urea, NPK, ragi roti dan air. Kadar gula yang tinggi pada molasses perlu diencerkan terlebih dahulu sampai pada kadar gula yang diinginkan kurang lebih 14%. Penambahan urea dan NPK halus diperlukan sebagai nutrisi bagi ragi, umumnya penambahan masing-masing sebanyak 0,5% dan 0,1% dari larutan fermentasi dengan pengadukan sambil dimasukkan ke dalam fermentor. Ragi atau biokatalis yang digunakan umumnya adalah *S. cerevisiae* yang dapat memfermentasi gula menjadi etanol dengan penambahan ragi sebanyak 0,2 % dari kadar gula dalam larutan molasses. (Toharisman, 2010b).

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 molasses atau tetes tebu. Konversi bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat dan tetes menjadi bioetanol ditunjukkan pada Tabel 2.2.

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

Tabel 2.2 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.

Tabel 2.3 Karakteristik Molasses

.Karakteristik	Nilai
pH	7.5
Total Solid (g/l)	76.3
Moisture content (g/l)	133.0
Dry matter (g/l)	867.0
Reducing sugar (g/l)	114.7
Total sugar (g/l)	740.6
Total nitrogen (g/l)	8.8

Sumber : Nurdyastuti, 2008.

Tabel. 2.4 Komposisi Molasses

Komponen	Analisa	%
Air	Gravimetri	20
Senyawa organik		
Gula:		
Sakarosa	Somoghi – Nelson	32
Glukosa	Somoghi – Nelson	14
Fruktosa	Somoghi – Nelson	16
Senyawa nitrogen	Kjeldahl	10
Senyawa anorganik		
SiO ₂	Titrimetri	0,5
K ₂ O	Titrimetri	3,5
CaO	Titrimetri	1,5
MgO	Titrimetri	0,1
P ₂ O ₅	Titrimetri	0,2
Na ₂ O	Titrimetri	-
Fe ₂ O ₃	Titrimetri	0,2
Al ₂ O ₃	Titrimetri	-
Residu soda dan karbonat (sebagai CO ₂)		1,6
Residu sulfat (sebagai SO ₃)		0,4

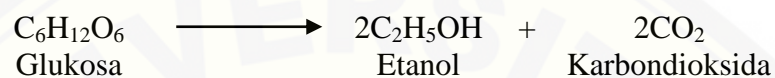
(Sumber: Dellweg, 1983)

Molasses tebu mengandung kurang lebih 39% selulosa dan 27,5% hemiselulosa. Kedua bahan polisakarida ini dapat dihidrolisis oleh asam menjadi gula sederhana yang selanjutnya dapat difermentasi menjadi bioethanol. Jenis gula dalam molasses terdiri dari glukosa 21,7% dan sukrosa 34,19 %. Selain itu juga terkandung 26,46% air dan 17,26% abu (Hidayat dan Suhartini, 2006). Berikut disajikan tentang komposisi dari molasses pada Tabel 2.4.

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

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

Menurut Judoamidjojo *et al.*, (1992), fermentasi etanol dilakukan dengan menggunakan khamir tertentu yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol. Khamir akan memetabolisme glukosa dan fruktosa membentuk asam piruvat melalui tahapan reaksi pada jalur Embden Meyerhof-Parnas. Asam piruvat yang dihasilkan akan mengalami dekarboksilasi menjadi asetaldehida yang kemudian mengalami dehidrogenasi menjadi etanol. Satu molekul glukosa akan membentuk 2 molekul etanol dan 2 molekul CO₂. Reaksi pembentukan etanol dari glukosa berlangsung sesuai persamaan reaksi berikut ini :



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

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

Konsentrasi biomassa mempengaruhi jumlah produk yang dihasilkan. Jumlah sel khamir yang semakin banyak, akan menghasilkan enzim dengan konsentrasi yang semakin tinggi. Hal tersebut akan menyebabkan semakin banyak substrat yang terkonversi menjadi etanol. Namun, konsentrasi biomassa yang terlalu tinggi akan mengurangi kadar etanol yang dihasilkan, jika jumlah substrat yang tersedia tidak mencukupi. Bila substrat dalam media telah habis digunakan, maka untuk mencukupi kebutuhan sel terhadap unsur karbon (C), khamir akan menggunakan etanol untuk aktivitas metabolismenya (Judoamidjojo *et al.*, 1992).

Menurut Hidayat dan Suhartini (2006), konsentrasi biomassa yang ditanam umumnya berkisar antara 3-10% dari volume media fermentasi.

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

Lama inkubasi berkaitan erat dengan waktu yang dapat digunakan oleh mikroba untuk tumbuh dan berkembang biak. Fermentasi yang semakin lama akan meningkatkan jumlah etanol yang dihasilkan. Namun, fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan penurunan kadar etanol, karena substrat telah habis digunakan. Selain itu, kadar etanol yang terlalu tinggi yaitu di atas 12% dapat menyebabkan sel khamir lisis atau rusak (Judoamidjojo *et al.*, 1992).

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

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992), mikroba memerlukan senyawa nutrisi yang digolongkan menjadi dua yaitu senyawa nutrisi makro dan senyawa nutrisi mikro untuk pertumbuhannya. Nutrisi makro meliputi unsur C, N, P, K. Unsur C dalam produksi bioetanol diperoleh dari substrat yang mengandung karbohidrat terutama dalam bentuk sukrosa dan glukosa, karena sukrosa atau glukosa digunakan sebagai substrat yang akan dikonversi menjadi etanol oleh *S. cerevisiae*. Nitrogen (N) dan phosphor (P) merupakan nutrisi yang dibutuhkan yeast untuk optimalisasi pertumbuhan dan efisiensi pembentikan produk dalam fermentasi etanol. Unsur N didapat dari penambahan urea, sedangkan unsur P dan

K didapat dari penambahan pupuk NPK. Sedangkan unsur mikro meliputi vitamin dan mineral-mineral lain yang disebut *trace element* seperti Ca, Mg, Na, S, Cl, Fe, Mn, Cu, Co, Bo, Zn, Mo, dan Al. Selain itu, menurut Vasconcelos *et al.* (2004), sumber phosphor dan nitrogen juga dapat diperoleh dari penambahan DAP (Diammonium Hidrogen Phosphat). Phospor berperan penting pada proses glikolisis yang terjadi dalam sel yeast.

S. cerevisiae merupakan mikroorganisme fakultatif anaerob sehingga pada awal fermentasi etanol dilakukan secara aerob untuk mengoptimalkan pertumbuhannya, sedangkan ketika produksi bioetanol berlangsung dilakukan secara anaerob agar khamir dapat memproduksi etanol (Winarno dan Fardiaz, 1987). Menurut Gross *et al.* (1995), fermentasi etanol dilakukan dalam keadaan anaerob dengan menggunakan khamir tertentu yang dapat mengubah glukosa menjadi etanol. Namun, pertumbuhan khamir akan terhambat jika tidak terdapat oksigen. Pada dasarnya *S. cerevisiae* membutuhkan oksigen untuk proses sintesis lipid (sterol dan asam lemak tak jenuh) yang diperlukan untuk melindungi membran plasma (Zayed dan Foley, 1987).

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

Derajat keasaman (pH) merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel mikroba dan produksi etanol. Adapun pH awal pada saat fermentasi diatur antara pH 4,0-4,5. Penggunaan pH di bawah 3 dan di atas 5 akan mengakibatkan pada menurunnya aktivitas fermentasi dan yield

etanol. Pengaturan dan pengontrolan pH selama fermentasi ini juga bertujuan untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kontaminasi selama fermentasi berlangsung (Smith, 2007).

Konsentrasi substrat, dalam hal ini yaitu kandungan gula pada media fermentasi berperan sebagai sumber nutrisi bagi khamir. Pada umumnya, industri menggunakan konsentrasi substrat antara 12-20% dengan beberapa alasan, yaitu mengurangi kebutuhan air, menghambat kontaminasi dari mikroorganisme yang rentan terhadap tekanan osmotik tinggi, dan mengurangi biaya destilasi (Satyanarayana *et al.*, 2012). Qureshi *et al.* (2014) menyatakan bahwa dengan menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi akan mengakibatkan plasmolisis dari sel khamir. Pada konsentrasi lebih dari 500 g/L akan menciptakan kondisi toksik bagi pertumbuhan mikroba, sedangkan dengan konsentrasi yang rendah (kurang dari 3 g/L) akan berpengaruh pada menurunnya produktivitas etanol akibat dari keterbatasan sumber nutrisi.

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

Mikroba memerlukan asupan nutrisi selama fermentasi, adapun nutrisi yang dibutuhkan terbagi atas nutrisi makro dan mikro. Menurut Bisson (2001), nutrisi makro berperan sebagai suplai dalam pembentukan sel-sel khamir selama pertumbuhan, penyediaan energi utama selama fermentasi, serta menjaga kestabilan sel khamir pada saat fase stasioner. Sedangkan nutrisi mikro dibutuhkan karena berperan sebagai katalis pada reaksi biokimia selama fermentasi. Nutrisi makro yang dibutuhkan terdiri atas unsur C, N, P, dan K. Unsur C (karbon) dapat diperoleh dari substrat yang mengandung gula, seperti sukrosa dan glukosa karena akan digunakan sebagai substrat yang akan dikonversi

menjadi etanol oleh khamir. Sedangkan unsur N (nitrogen) dapat diperoleh melalui penambahan urea, dan unsur P (phospor) dan K (kalium) dapat diperoleh melalui penambahan pupuk NPK. Nutrisi mikro meliputi vitamin (tiamin, riboflavin, dan biotin) dan mineral (Mg, Ca, Mn, Zn, Fe, dan Cu).

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

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Laboratorium *Center of Development Advisory Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember, dan Orimaru toko herbal untuk cek sel secara mikroskopis. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2013–Agustus 2014.

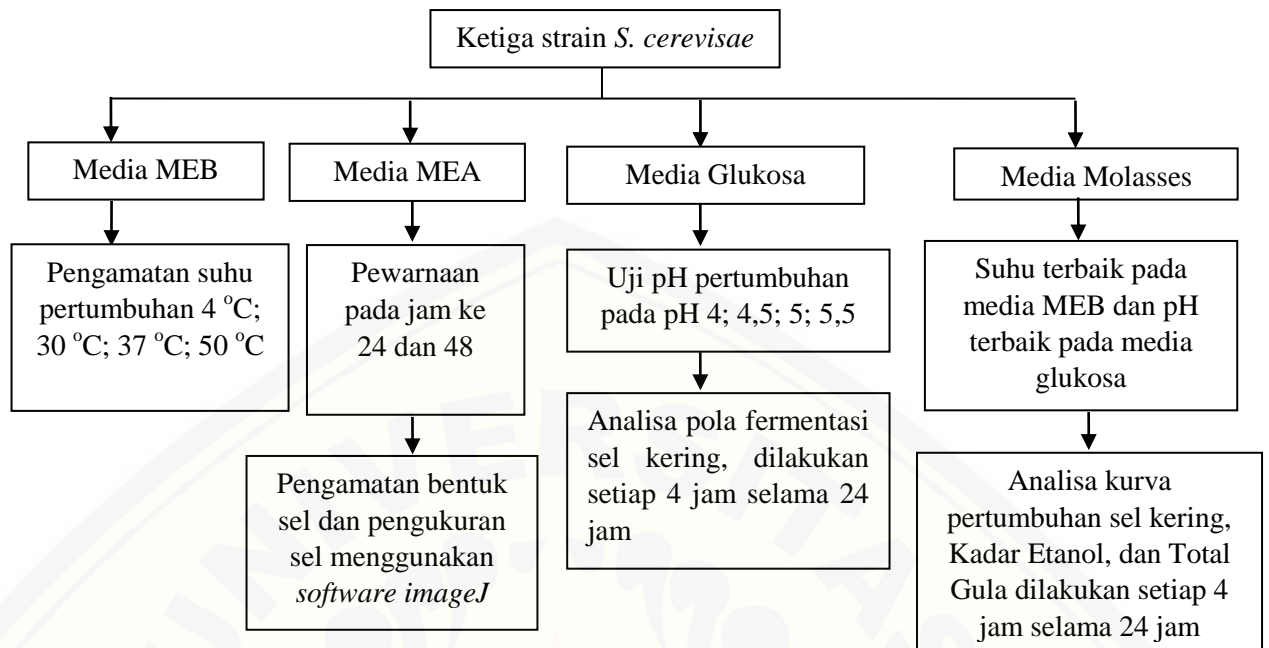
3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan meliputi MEA (*Malt Extract Agar*), H₂SO₄ 0,2%, MEB (*Malt Extract Broth*), NPK 15%, Urea 46%, Molasses Tebu yang didapat dari PTPN XI PG. Djatiroto dan Glukosa. Bahan kimia yang digunakan adalah pupuk NPK Mutiara produksi PT. Meroke Tetap Jaya (mengandung: N 16%; P₂O₅ 16%; K₂O 46%; MgO 1,5%; CaO 5%), pupuk ZA produksi Petrokimia Gresik (mengandung unsur Nitrogen 21% dan Sulfur 24%), NaOH (PA), HCl (Teknis), K₂Cr₂O₇, larutan Na₂CO₃, dan DNS.

Alat Penelitian yang digunakan antara lain adalah mikroskop cahaya *Heraeus b6200* perbesaran 1000 kali, foto digital mikroskopik canon 12 mega pixel, gelas preparat, *microwave* SHARP, kulkas (Polytron), oven *Memert*, pH meter (Jen Way 3320 Jerman), Spektrofotometer (Prim Advanced) dan kuvet, *ependorfs*, kertas *Whatman GF/C* (1,2 µm), inkubator (Heraeus Instrument), Laminar Air Flow (Crumair 9005-FL), hand refractometer ATAGO, dan alat gelas.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan perlakuan variasi media, pH dan ketiga strain *S. cerevisiae* dapat dilihat pada Gambar 3.1. Masing-masing perlakuan tersebut diulang sebanyak tiga kali. Analisis kadar etanol yang akan dihasilkan oleh masing-masing strain *S. cerevisiae* dengan menggunakan media molasses dan glukosa dengan kadar brix 14%. Setelah itu diamati kandungan eta-



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

nol yang dihasilkan, pengukuran sel dan berat kering dari biomassa yang tumbuh, serta sisa gula yang tidak digunakan.

Untuk analisa kadar etanol menggunakan metode *Conway chamber*, setelah diketahui kandungan etanol yang diproduksi maka akan dihitung sisa total gula yang tidak digunakan. Data hasil penelitian diolah dengan menggunakan uji T dan data yang diperoleh disajikan dalam bentuk grafik.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

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

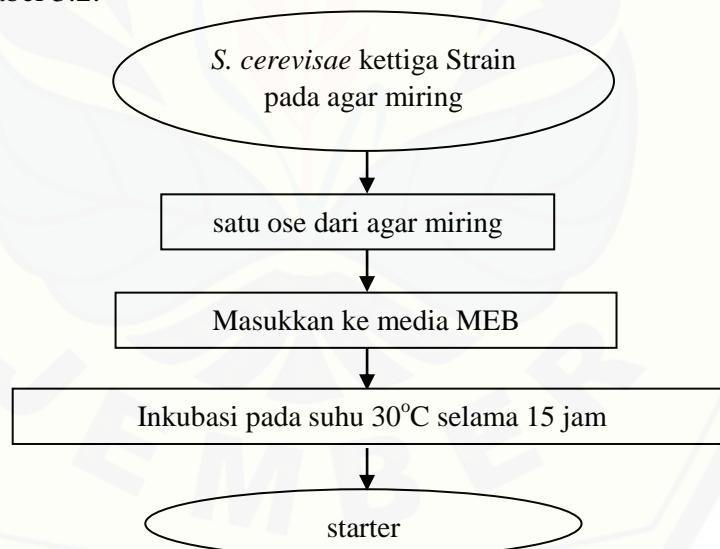
3.4.1 Preparasi Media Fermentasi dan Starter

Media fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah molasses. Sedangkan mikroorganisme yang digunakan adalah starter organisme yang digunakan adalah khamir strain *S.cerevisiae* ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 yang didapatkan dari PTPN XI PG. Djatiroto. Sebelum digunakan kultur stok diremajakan dengan cara ditumbuhkan pada agar miring. Starter dibuat

dengan cara stok kultur yang telah diremajakan diambil satu ose. Kemudian dimasukkan dalam MEB steril lalu diinkubasi selama 8 jam pada suhu 30 °C.

a) Preparasi *Malt Extract Broth* (MEB)

Starter dibuat dari kultur stok yang telah diremajakan dan ditumbuhkan dalam media MEB (*Malt Extract Broth*), adapun komposisi media pertumbuhan MEB serta skema pembuatan starter dapat dilihat dalam Tabel 3.2. Media MEB dibuat dengan cara melarutkan 15 gram MEB dengan 1 L aquades, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian didinginkan dan digunakan sesuai kebutuhan. Selanjutnya sebanyak satu ose kultur stok *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 ditumbuhkan dalam media cair MEB masing-masing sebanyak 5 mL dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C untuk selanjutnya diinokulasikan dalam media glukosa atau molasses. Adapun Komposisi media MEB serta prosedur kerjanya dapat dilihat dapat dilihat pada Gambar 3.2 dan Tabel 3.2.



Gambar 3.2 Skema Pembuatan Starter

Tabel 3.1 Komposisi Media MEB untuk *S. cerevisiae*

Senyawa Kimia	Satuan
Ekstrak Malt	6,0 gram
Maltosa	1,8 gram
Dekstrosa	6,0 gram
Autoklaf 121°C	15 menit
Ekstrak Yeast	1,29

b) Preparasi Glukosa

Glukosa yang digunakan adalah glukosa komersial, dalam 10 ml aquades dibutuhkan sebanyak 17 gram glukosa. Kemudian glukosa murni diencerkan hingga derajat brix adalah 14 °Brix. Glukosa cair diatur keasamannya hingga pH 4,5 dengan menggunakan H₂SO₄ pekat konsentrasi 98%. Kemudian ditambahkan nutrisi seperti urea 0,429 g/L dan asam fosfat konsentrasi 10% sebanyak 0,007 ml/L. Kemudian larutan glukosa dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,72 atm.

c) Preparasi Molasses

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

d) Preparasi Starter

Pembuatan starter dilakukan dengan meremajakan dua strain *S. 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 otoklaf 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 didiinkubasi 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 molasses dengan derajat brix 14 °Brix yang telah dipreparasi dan disterilkan, kemudian diinkubasi selama 12 jam pada suhu 30 °C. Diagram alir pembuatan starter bioetanol dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.4.2 Penelitian Utama

Penelitian ini terdiri dari identifikasi fenotip yang meliputi morfologi dan fisiologi. Pengamatan morfologi meliputi bentuk Biomassa khamir, pewarnaan gram, dan bentuk sel khamir pada waktu produksi etanol optimal.

a) Perwarnaan Gram

Pewarnaan gram digunakan untuk menentukan memperjelas warna dinding sel khamir. Pewarnaan gram dilakukan dengan cara: kaca objek dibersihkan dengan alkohol sehingga bebas dari lemak, kaca objek difiksasi di atas lampu spiritus sampai kering, kaca objek yang telah difiksasi kemudian diberi satu tetes aquades steril. Bakteri dari media MEA diambil dengan jarum ose dan diletakkan pada tetesan aquades steril, koloni bakteri dan aquades dicampur hingga merata. Biarkan mongering di udara kemudian fiksasi di atas api. Teteskan 2-3 tetes larutan Kristal Violet, biarkan selama 1 menit, lalu bilas dengan air mengalir. Teteskan larutan lugol 1 tetes dan biarkan selama 1 menit, bilas dengan air mengalir dan keringkan, lalu bilas dengan alkohol. Terakhir teteskan larutan safranin dan biarkan selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Amati di bawah mikroskop.

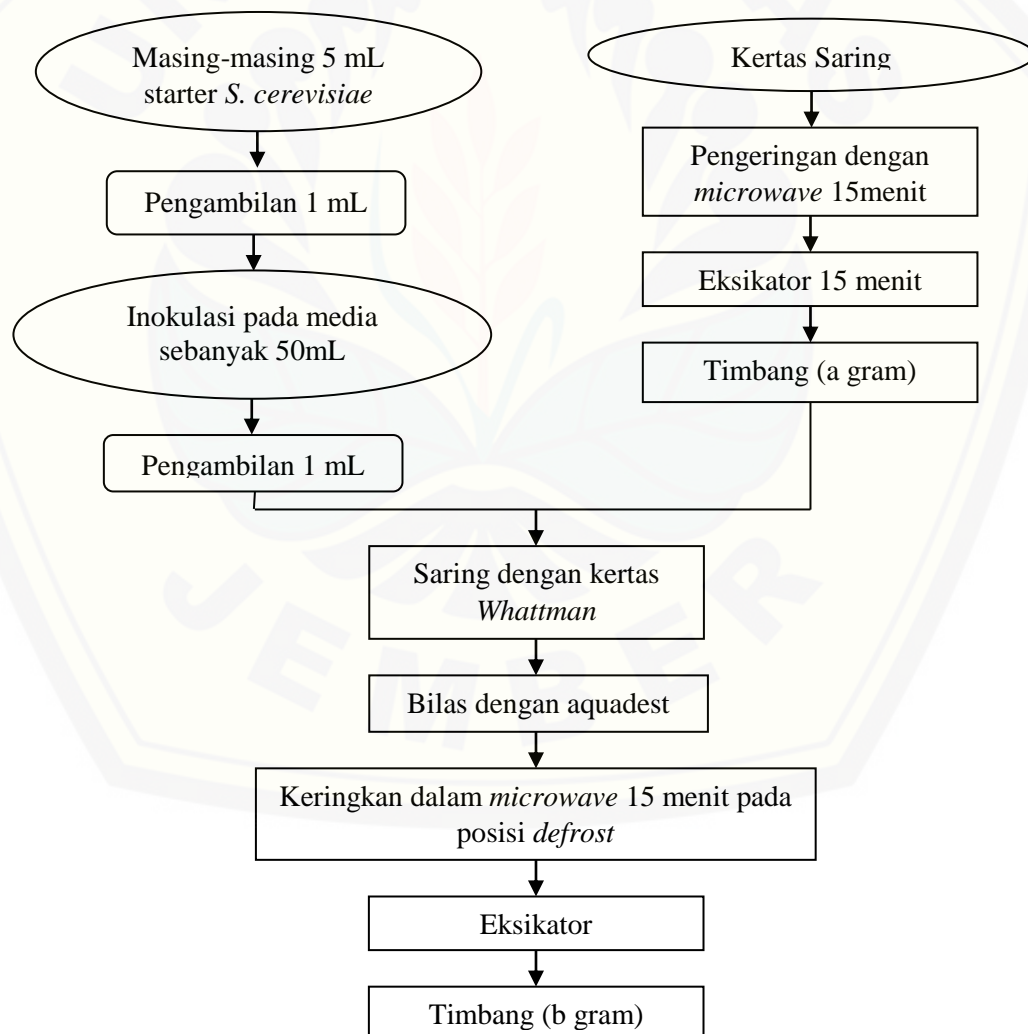
b) Pengukuran Diameter Sel

Setelah mencapai produksi optimum maka akan dilakukan pengukuran diameter sel *S. cerevisiae* dengan menggunakan mikroskop digital. Pengukuran menggunakan mikroskop digital dengan mengukur *budding sel* yang yang terpanjang. Kemudian hasil pengukuran diolah menggunakan aplikasi *imageJ* untuk identifikasi fisiologi terdiri dari suhu dan pH optimum pertumbuhan *S.cerevisiae*. Identifikasi selanjutnya adalah pola

fermentasi, ulangan dilakukan sebanyak 3 kali dengan tujuan validitas data. Pengukuran jumlah biomassa dengan metode pengukuran berat kering sel.

c) Pertumbuhan Khamir pH yang Berbeda dan Suhu Optimum

Derajat Keasaman/pH (Dufour *et al.*, 2002); Nilai pH sampel ditentukan menggunakan pH meter digital. Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi dengan menggunakan larutan buffer pH 4 dan pH 7. Setelah dikalibrasi, pH sampel diukur dengan membaca angka pada layar pH meter. Pengaruh pH terhadap jumlah *yield* yang dihasilkan dari fermentasi dengan pertumbuhan sel dilakukan pada media glukosa dengan variasi pH 4,5 dan 5. Sedangkan suhu optimal yang digunakan adalah 30 °C.



Gambar 3.3 Pengukuran Berat Kering Sel

d) Pengukuran Berat Kering Biomassa

Untuk pengukuran biomassa *S. cerevisiae* masing-masing strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 menggunakan metode pengukuran berat kering. Adapun skema atau diagram alir pengukuran berat kering dapat dilihat pada Gambar 3.3.

Prinsip dari pengukuran berat kering jumlah biomassa yang tumbuh dalam media adalah dengan menimbang berat kertas *whatman* dengan sel yang sudah tesarang dikurangi berat setelah dikeringkan dengan menggunakan *microwave* dan kemudian dikeringkan menggunakan oven 50 °C selama 4 jam. Pengamatan jumlah sel kering dilakukan pada rentang waktu 4 jam yang telah ditentukan yaitu 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam, 20 jam, dan 24 jam. Hal ini bertujuan untuk mengetahui fase pertumbuhan dari *S. cerevisiae* selama fermentasi.

3.5 Parameter Pengamatan

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

3.6 Prosedur Analisis

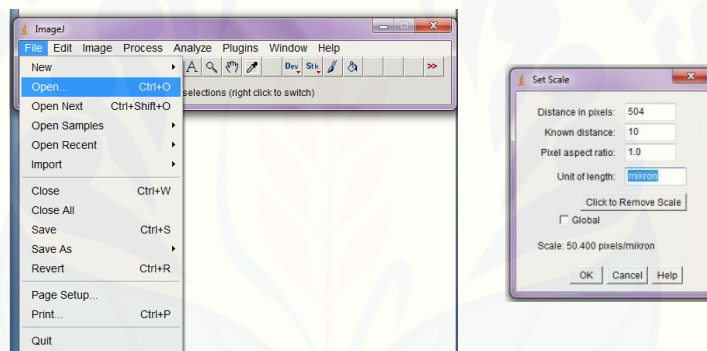
3.6.1 Pengukuran Sel Bakteri (Panjang dan Diameter) dengan Pewarnaan Gram

Salah satu teknik pewarnaan diferensial yang paling luas digunakan untuk bakteri ialah pewarnaan gram. Sampel ditempatkan pada gelas objek, kemudian ditetesi dengan larutan fisiologis/aquades 2–3 tetes dan dilakukan fiksasi di atas api. Setelah itu ditetesi dengan pewarna safranin, dibiarkan sampai kering (1–2 menit) dan dicuci dengan air mengalir. Dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Pertumbuhan panjang, lebar dan luasan sel *S. cerevisiae* dianalisa Menggunakan *software ImageJ* 1.38 kali. Sistem penganalisaannya menggunakan foto sel *S. cerevisiae* yang didigitasi di sekitar tepian sel sehingga akan menghasilkan nilai panjang, lebar, dan luasan sel secara

otomatis. Untuk menjaga tingkat keakurasian data yang dihasilkan oleh *ImageJ* maka dilakukan sebanyak tiga kali pengukuran sel dalam satu preparat. Satuan dari *ImageJ* telah dikalibrasi ke dalam mikro meter (μm). Data pengukuran secara manual atau langsung diolah menggunakan *software Microsoft Office Excel 2007*. Setelah sel bakteri terlihat, pengukuran sel bakteri dilakukan dengan menggunakan *software ImageJ*. Adapun metoda pengolahan menggunakan *software ImageJ*, adalah:

a) Membuka File (*Open*)

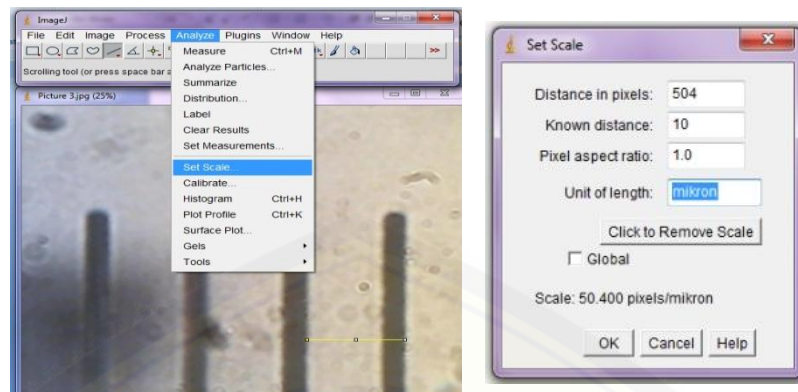
Software ImageJ diaktifkan, kemudian diklik *open* untuk membuka *file* gambar yang akan diukur, misal: *picture 3.jpg*. Tahap open file dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Tahap *Open* file

b) Mengatur Skala pada Gambar

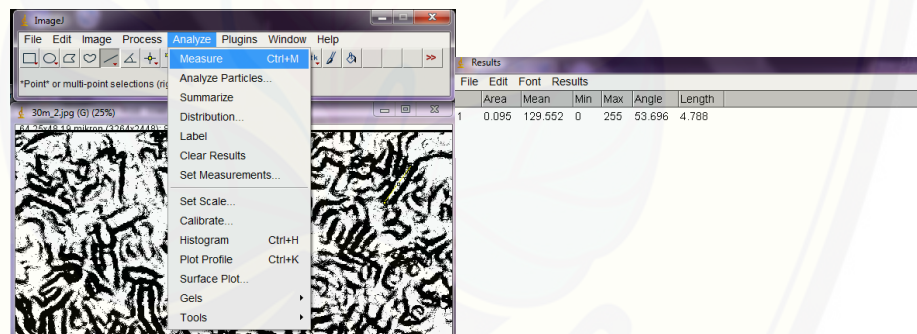
Tahap selanjutnya, mengatur skala pada gambar terhadap *software ImageJ*. Pada contoh ini proses skala acuan dalam satuan mikrometer. Caranya dengan membuat garis lurus terhadap gambar, kemudian klik *Analyze; Set Scale*. Pada *windows set scale* dimasukkan parameter di *know distance* = 10 mikron; dan 10 mikron di kolom *unit of length*. Kolom *global* di klik untuk mengatur skala tersebut menjadi *default* ukuran. Pengaturan skala awal dapat dilihat pada Gambar 3.5.



Gambar 3.5 Pengaturan Skala Awal

c) Pengukuran Panjang dan Diameter (*Analyze*)

Proses pengukuran panjang dan diameter mikroba pada gambar dengan perintah *Analyze; Measure*. Hasil pengukuran akan menampilkan sebuah *window*, yang memperlihatkan hasil pengukuran mikroba yang diukur. Hasil akhir pengukuran dapat dilihat pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Hasil Akhir Pengukuran

3.6.2 Pengukuran dan Penghitungan Total Biomassa (Ristiati, 2000)

Sebanyak 1 ml sampel dipisahkan antara supernatan dengan biomassa ke dalam kertas whattman yang telah diketahui bobot awalnya. Kemudian kertas whattman yang telah berisi biomassa dibilas dengan akuades steril sebanyak 1 ml. Setelah itu sampel diletakan dalam eksikator selama 15 menit. Kemudian kertas whattman yang berisi biomassa dikeringkan menggunakan microwave selama 15 menit. Bobot kering biomassa adalah bobot kertas whattman yang berisi biomassa yang telah dikeringkan dikurangi dengan bobot awal tabung.

$$\text{Bobot sel kering (g/l)} = \frac{\text{bobot biomassa kering}}{\text{ml sampel}}$$

Data total mikroba dan perubahan pH ulangan 1 dan 2 dikalkulasi dengan mencari rata-rata dari kedua ulangan. Rerata dari setiap data ini kemudian ditampilkan dalam bentuk grafik. Data total mikroba disajikan dalam bentuk grafik semi-logaritmik. Sedangkan data perubahan pH disajikan dalam bentuk grafik skala aritmetik. Grafik-grafik yang telah didapatkan kemudian dianalisa secara deskriptif. Perhitungan lain yang dilakukan yaitu kecepatan pertumbuhan spesifik dan waktu generasi (*doubling time*). Analisa deskriptif juga diterapkan untuk data hasil perhitungan kecepatan pertumbuhan spesifik dan waktu generasi selama fase logaritmik. Berikut merupakan perhitungan matematik terhadap kecepatan pertumbuhan spesifik dan waktu generasi pada fase log (Widdel, 2007).

a) Perhitungan Kecepatan Pertumbuhan Spesifik (*Specific Growth Rate*, μ)

Kecepatan pertumbuhan spesifik dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{\Delta t}$$

dimana : μ = kecepatan pertumbuhan spesifik ($\mu\text{g/jam}$)

X_1 = total mikroba jam ke-1 (μg)

X_2 = total mikroba jam ke-2 (μg)

Δt = selisih waktu ($t_2 - t_1$) (jam)

b) Perhitungan Waktu Generasi (*Doubling Time*, t_d).

Waktu generasi dihitung dengan menggunakan rumus :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

dimana : t_d = waktu generasi (jam)

$\ln 2 = \ln (2X_1) - \ln (X_1) = 0,693$

μ = kecepatan pertumbuhan spesifik ($\mu\text{g/jam}$)

3.6.3 Penentuan Kadar Gula Reduksi dengan Metode *Dinitrosalisilic Acid* (DNS)

a) Pembuatan *Reagen DNS*

Sebanyak 1,76 g NaOH (PA) 2 g DNS, dan 60 g K-Na Tartarat ditambahkan 100 ml akuades dan diaduk hingga larut. Setelah itu larutan ditera hingga 200 ml dan disimpan dalam botol coklat (Miller, 1959).

b) Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar diperoleh dengan cara membuat seri konsentrasi glukosa dari larutan glukosa standar 0,1% = 0,1 g/100 ml = 1 mg/ml dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Larutan tersebut kemudian dibuat seri konsentrasi larutan glukosa dengan cara:

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

Keterangan :

V_1 = volume larutan glukosa standar 1mg/ml yang akan diambil

M_1 = konsentrasi larutan glukosa standar (1mg/ml)

V_2 = volume larutan dengan konsentrasi yang diinginkan (ditera ke 10 ml)

M_2 = konsentrasi larutan glukosa yang diinginkan

Misalkan konsentrasi larutan glukosa yang diinginkan adalah 0,05 mg/ml, maka V_1 yang harus diambil adalah sebagai berikut :

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

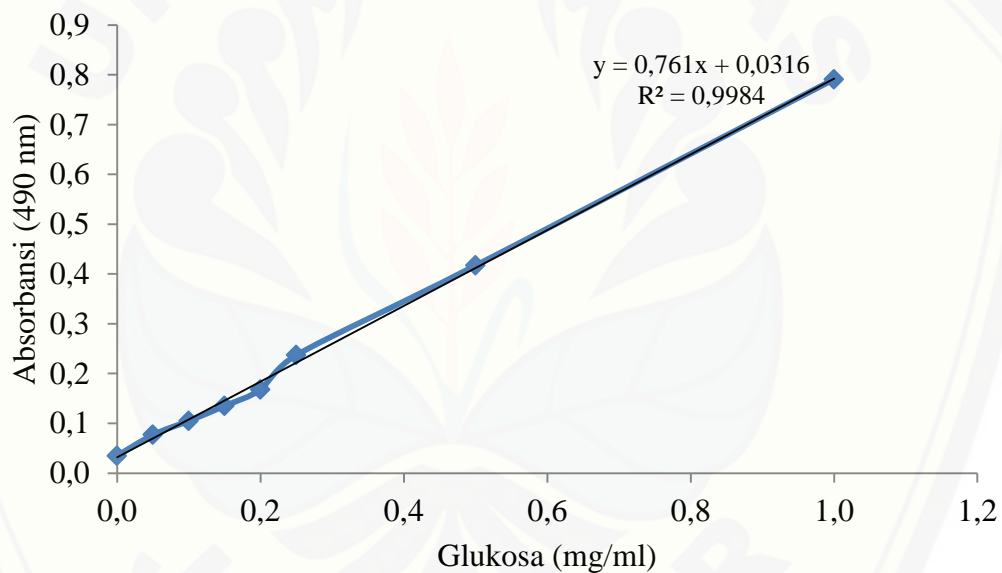
$$V_1 = (10 \text{ ml} \times 0,05 \text{ mg/ml}) / 1 \text{ mg/ml}$$

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

Setelah diketahui V_1 , maka diambil sebanyak 0,5 ml V_1 dan ditera ke 10 ml yang kemudian dari larutan tersebut diambil 0,5 ml untuk dilakukan analisa. 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 standar glukosa dan nilai pengukuran absorbansi dapat dilihat pada Tabel 3.2 serta kurva standar gula reduksi dapat dilihat pada Gambar 3.7.

Tabel 3.2 Seri Konsentrasi Pengambilan Larutan Standart Glukosa dan Nilai Pengukuran Absorbansi

Glukosa Standar (mg/mL)	DNS (ml)	Penambahan Aquades setelah dipanaskan (ml)	Absorbansi (540 nm)	Volume total (ml)
0,00	1	5	0,035	6,5
0,50	1	5	0,077	6,5
1,00	1	5	0,105	6,5
1,50	1	5	0,135	6,5
2,00	1	5	0,168	6,5
2,50	1	5	0,237	6,5
3,00	1	5	0,417	6,5
3,50	1	5	0,791	6,5



Gambar 3.7 Kurva Standart Gula Reduksi

c) 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 $y = 0,761x + 0,0316$

$$\text{Kadar Gula Pereduksi (mg/mL)} = \mathcal{X} \times \text{FP}; \text{ dimana } \mathcal{X} = \frac{y-0,0316}{0,761}$$

Keterangan :

y = Absorbansi sampel

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

3.6.4 Analilis Kadar Etanol

Analisis kadar etanol menggunakan metode *Chamber Conway* (Kartika *et al.*, 1992) 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. Berikut ini adalah perhitungan untuk mendapatkan konsentrasi larutan C yang digunakan.

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$1 \text{ ml} \times 96\% = 100 \text{ ml} \times M_2$$

$$M_2 = \frac{96\%}{100} = 0,96\%$$

Hal ini berarti volume etanol per 100 ml larutan C = $\frac{0,96 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} = 0,0096 \text{ ml}$. Nilai ini digunakan untuk mendapatkan nilai etanol dalam seri konsentrasi pengambilan larutan standar etanol yang disajikan dalam Tabel 3.3. Berikut ini adalah contoh perhitungan dalam pengambilan 0,2 ml etanol.

$$M_{\text{etanol}} = 0,2 \text{ ml} \times 0,96\% = 0,00192 \text{ ml}$$

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

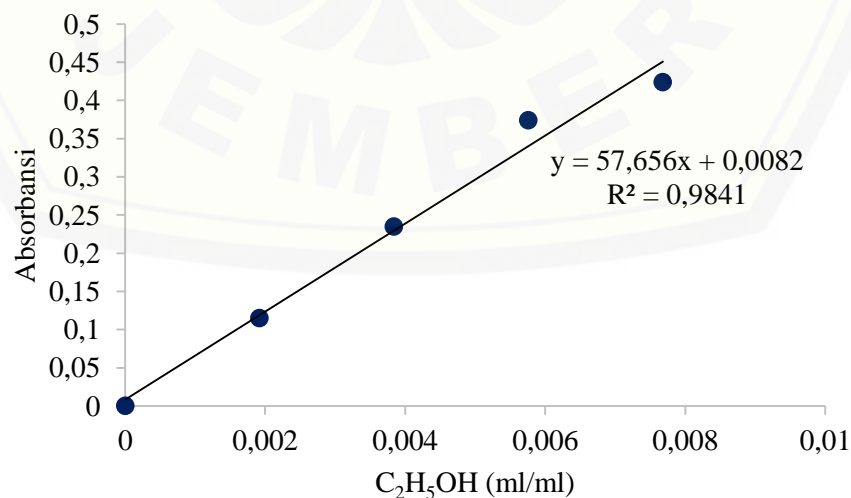
a. 2 ml Larutan B + 1 ml akuades (blanko)

- 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

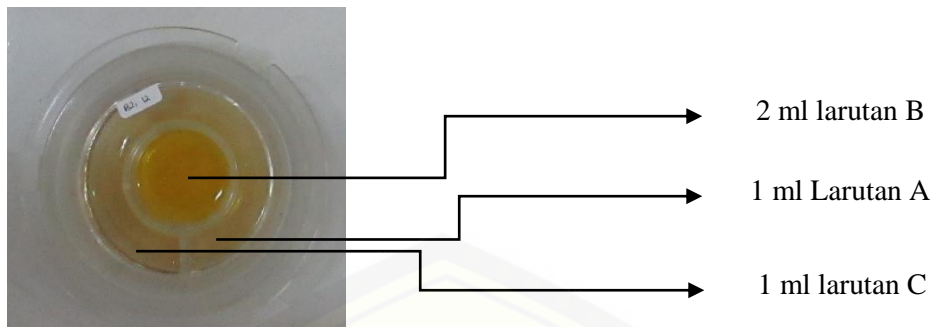
Sebelum cawan conway ditutup, ditambahkan 1 ml larutan A dan digoyangkan untuk mencampurkan larutan A dan C. Cawan conway dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar. Setelah 2 jam, 2 ml akuades ditambahkan dalam larutan B dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 605 nm. Nilai dari hasil pengukuran absorbansi larutan standart etanol dan kurva standart etanol dapat dilihat pada Tabel 3.3 dan Gambar 3.8.

Tabel 3.3 Seri Konsentrasi Pengambilan Larutan Standart Etanol dan Nilai Pengukuran Absorbansi

Glukosa (mg/ml)	Penambahan Aquades untuk pengenceran (ml)	DNS (ml)	Penambahan Aquades setelah dipanaskan (ml)	Absorbansi (nm)	Volume total (ml)
0,00	0,50	1	5	0,035	6,5
0,05	0,45	1	5	0,077	6,5
0,10	0,40	1	5	0,105	6,5
0,15	0,35	1	5	0,135	6,5
0,20	0,30	1	5	0,168	6,5
0,25	0,25	1	5	0,237	6,5
0,50	0,00	1	5	0,417	6,5
1,00	-0,5	1	5	0,791	6,5



Gambar 3.8 Kurva Standart Etanol



Gambar 3.9 Prosedur Penggunaan Cawan Conway dalam Analisa Jumlah 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 jumlah etanol dapat dilihat pada Gambar 3.9.

Jumlah etanol sampel dihitung dengan persamaan:

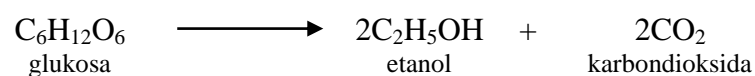
- Konsentrasi C_2H_5OH (ml/ml) $x = \frac{y-0,0082}{57,656}$
- Konsentrasi C_2H_5OH (g/ml) $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{0,789 \text{ g}}{\text{ml}}$
- Konsentrasi C_2H_5OH (ml/L) $x = \frac{y-0,0082}{57,656} \times \frac{1000 \text{ ml}}{L}$

Keterangan :

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

Perhitungan jumlah etanol teoritis :

1 mol glukosa menghasilkan 2 mol etanol :



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

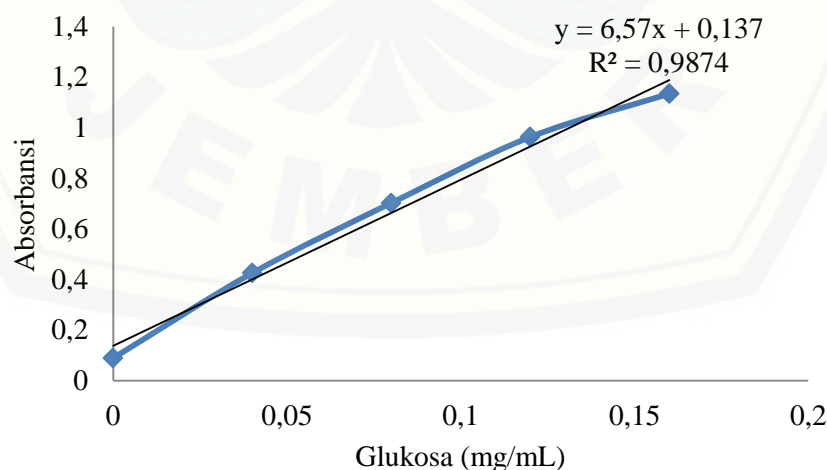
3.6.5 Penentuan Kadar Total Gula

Pengukuran Kadar Total Gula menggunakan metode *fenol* (Dubois *et al.*, 1956). Sebelum melakukan pengujian sampel dilakukan pembuatan kurva standar fenol yang digunakan. Pembuatan kurva standar total gula adalah sebagai berikut: 2 ml larutan glukosa standar yang mengandung 0, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 μg glukosa masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml larutan fenol 5% dan di vortex. Kemudian 5 ml asam sulfat pekat ditambah dengan cepat. Biarkan selama 15 menit, kocok dan tempatkan dalam penangas air selama 15 menit. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 490 nm.

Tabel 3.4 Data Nilai Absorbansi Glukosa pada Konsentrasi Berbeda

Konsentrasi Glukosa (mg/mL)	Absorbansi
0	0,089
0,04	0,425
0,08	0,702
0,12	0,963
0,16	1,134

Keterangan : Larutan Gula Standar = 0,1 % = 0,1 g/100 mL = 1 mg/mL



Gambar 3.10 Kurva Standar Total Gula

Total gula pada molasses diukur dengan menggunakan Metode Fenol. Pengujian sampel sama dengan pembuatan kurva standar fenol hanya 2 ml larutan glukosa diganti dengan 2 ml sampel. Berdasarkan kurva standart total gula diperoleh persamaan $y = 6,57x + 0,137$, sehingga dapat diperoleh rumus total gula adalah sebagai berikut.

$$\text{Total Gula (mg/ml)} = \frac{\left(\frac{y-b}{a} \times FP\right) mg}{ml \text{ sampel}} = \frac{\left(\frac{y-0,137}{6,57} \times FP\right) mg}{ml \text{ sampel}}$$

Keterangan : y = Absorbansi ; FP = Faktor pengenceran

3.6.6 Perhitungan Kinetika Fermentasi

- Laju Konsumsi = $\frac{\Delta S (g/L)}{\text{Lama Fermentasi (jam)}}$
- Produktivitas = $\frac{\text{Konsentrasi etanol sampel}(g/L)}{\text{Lama Fermentasi (jam)}}$
- Yield Etanol = $\frac{\text{Konsentrasi etanol sampel}(g/L)}{\Delta S (g/L)}$
- Efisiensi Fermentasi = $\frac{\text{Konsentrasi etanol sampel}(g/L)}{\text{Etanol teoritis (g/L)}} \times 100 \%$
- Growth Rate (/jam) = $\frac{\text{Ln Biomassa yeast saat fase log } X_2 - \text{Ln populasi yeast jam ke } X_0}{\text{Lama fase log (jam ke } T_2 - \text{jam ke } T_0)(\Delta t)}$
- Growth Yield $\left(\frac{\log \frac{cfu}{ml}}{\frac{g}{l}}\right) = \frac{\text{Biomassa yeast jam ke } T_2 - \text{Biomassa yeast jam ke } T_0 (\Delta x)}{\text{gula reduksi jam ke } T_0 - \text{gula reduksi jam ke } T_2 (\Delta s)}$

3.6.7 Analisis Data

Data total mikroba dan perubahan pH ulangan 1 dan 2 dikalkulasi dengan mencari rata-rata dari kedua ulangan. Rerata dari setiap data ini kemudian ditampilkan dalam bentuk grafik. Data total mikroba disajikan dalam bentuk grafik semi-logaritmik. Data perubahan pH disajikan dalam bentuk grafik skala aritmetik. Grafik-grafik yang telah didapatkan kemudian dianalisis menggunakan Uji T. Perhitungan lain yang dilakukan yaitu kecepatan pertumbuhan spesifik dan waktu generasi (*doubling time*). Analisa deskriptif juga diterapkan untuk data hasil perhitungan kecepatan pertumbuhan spesifik dan waktu generasi selama fase logaritmik.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN, dan FNCC 3210 memiliki karakteristik morfologi (bentuk dan ukuran) yang sama dengan *S. cerevisiae* pada umumnya yaitu berbentuk oval, bulat, dan memanjang dengan ukuran sel antara 4–8 μ m dengan suhu pertumbuhan optimal yang digunakan adalah 30°C.
2. pH pertumbuhan optimal yaitu 4,5 mempengaruhi secara signifikan terhadap biomassa *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dan kadar etanol yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae* strain ATCC 9763.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai lama waktu fermentasi agar mengetahui sejauh mana *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dan ATCC 9763 tahan terhadap kadar etanol tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agricultural Outlook. 2013. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2013-2022 : Biofuel*. <http://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?QueryId=481695&vh0000&vf0&l&il&lang=en> [diakses 16 Juli 2014].
- Anonim, 2004. *Rensselaer Polytechnic Institute*. [serial online]. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/yeast2.htm>. [2 Desember 2014].
- Bai, F.W., Anderson, W.A., dan Moo-Young. 2008. Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks. *Journal of Biotechnology Advance*. Volume 26: Halaman 89–105.
- Basso, L.C., Amorim, V. de., Oliveira, A. J. de., dan Lopes, M.L. 2008. Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 8 : 1155-1163.
- Bisson, L. 2001. *The Alcoholic Fermentation*. Davis: University of California.
- Buglass, A.J. 2011. *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*. https://books.google.co.id/books?id=gNc34oNpg0AC&dq=factors+affecting+alcoholic+fermentation&source=gbs_navlinks_s [diakses 20 Maret 2015].
- Ceccata-Antonini, S.R. dan P.C. da Silva. 2002. Hyphal-Like Extension and Pseudohyphal Formation in Industrial Strains of Yeasts Induced by Isoamyl Alcohol. *Braz. J. of Microb.* 33, 209-212.
- Ceccata-Antonini, S.R. dan P.E. Sudbery. 2004. Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. of Microb.* 35, 73-181.
- Chotineeranat, S., R. Wansuksri, K. Piyachomkwan, P. Chatakanonda, P. Weerathaworn dan K. Sriroth . 2010. Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Sug. Tech.* 12, 120-124.
- Dake, M.S., Amarpurkar, S.V., Salunkha, M.L., dan Kamble, S.R. 2010. Production of Alcohol by *Saccharomyces* sp. Using Natural Carbohydrate Sources. *Advance Biotech Vol. 10 (06): 37-41*.
- Dellweg. 1983. *Biotechnology*. Weinheim: Chemie.

- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2011. Kebutuhan Gula Nasional Mencapai 5.700 Juta Ton Tahun 2014. *Makalah Temu Koordinasi Kehumasan Direktorat Jenderal Perkebunan*. Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian.
- Dufour, L., Alarcon, P., dan Chuzel. 2002. *Improving The Bread Making Potential of Cassava Sour Starch*. Colombia: International Centre for Tropical Agriculture (CIAT).
- Elena, P., Rapeanu, G., Bonciu, C., Vicol, C., dan Bahrim. 2009. *Investigation of Yeast Performances in The Fermentation of Beet and Cane Molasses to Ethanol Production*. Ovidius University Press, 20 (2):202-203.
- Fardiaz, S. 1988. *Fisiologi Fermentasi*. Bogor: Insitut Pertanian Bogor.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Insitut Pertanian Bogor.
- Frazier, W.C., dan Westhoff, D.C. 1978. *Food Microbiology 4th Edition*. New York : McGraw-Hill Book Publishing, Co. Ltd.
- Funke, B.R., Tortora, G.J, dan Case, C,L. 2004. *Microbiology: an Introduction, 8th*. San Francisco : Benjamin Cummings.
- Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles dan G.R. Fink. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *Saccaromyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*. 68, 1077-1090.
- Gross, T.J, Faull, S., Ketteridge dan Springham, D. 1995. *Introductory Microbiology. Chapman and Hill 2-6*. London: Boundry Row.
- Hauser, M., P. Horn, H. Tournu, N.C. Hauser, J.D. Hoheisel, A.J.P. Brow dan J.R. Dickinson. 2007. A transcriptome analysis of isoamyl alcohol-induced filamentation in yeast reveals a novel role for Gre2p as isovaleraldehyde reductase. *FEMS Yeast Res* 7,84–92.
- Hidayat, N.M.C., dan Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Jakarta: Andi.
- Izmirliglu, G. dan Demirci, A. 2012. Ethanol production from Waste Potato Mash by Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Science* 2012 (2): 738-753.
- Judoamidjojo, M., Abdul, A.D., Endang, G.S. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Kartika, B., Guritno, D., Purwadi, dan Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.

- Kuswanto dan Sudarmaji, S. 1997. *Prosedur Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Lay, W.B.1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Lin, T. dan Tanaka, S. 2006. Ethanol Fermentation From Biomass Resources: Current Status And Prospects. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.69:627-642.
- Lorenz, M.C., S. Cutler dan J. Heitman. 2000. Characterization of Alcohol-induced Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Of the Cell.* 11, 183–199.
- Marboen, Ade. 2014. *OPEC Perkiraan Permintaan Minyak Dunia Naik*. [serial online]. <http://www.antaraneews.com/berita/423752/opec-perkiraan-permintaan-minyak-dunia-naik>. [7 September 2015].
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* Vol.31:426-428.
- Moat, A.G. 1979. *Microbial Physiology*. New York : Jhon Wiley and Sons.
- Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K., dan Zia-ul-Hussain, S. 2010. Comparative Study on Two Commercial Strains of *saccharomyces cerevisiae* for Optimum Ethanol Production on Industrial Scale. *Journal of Biomedicine and Bioechnology Volume 2010*.
- Narendranath, N.V. dan Power, R. 2005. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology 2005* : 2239-2243.
- Nevoigt, E. 2008. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 2008*, 72(3):379.
- Nurdyastuti, I. 2008. *Teknologi Proses Bio-Etanol*. Jakarta: Balai Besar Teknologi Pati-BPPT.
- Panikov, N.S. 2014. *Kinetics, Microbial Growth*. https://www.researchgate.net/profile/Nicolai_Panikov/publication/220042850_Kinetics_Microbial_Growth/links/0fcfd50bfa37eb6dcd000000.pdf [diakses 25 Januari 2016]
- Pelczar. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.

- Pramana, A. S. 2008. *Selayang Pandang Tentang Molase (Tetes Tebu)*. [serial online]. <http://anggitasaputradwipramana.bolgsport.com>. [4 Maret 2014].
- Prescot, S.C. dan Dunn, C.G. 1981. *Industrial Microbiology*. New York: McGraw-Hill Book Co. Ltd.
- Pereira, F.B., Guimares, P.M.R., Teixeira, J.A., dan Domingues, L. 2010. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* Strains for Efficient Very High Gravity Bio-Ethanol Fermentation Processes. *Bioetchnol Lett (2010) 32* : 1655-1661.
- Qureshi, N., Hodge, D., dan Vertes, A. 2014. *Biorefineries: Biochemical Processes for Liquid Biofuels*. https://books.google.co.id/books?id=2Uh1AgAAQBAJ&dq=factors+affecting+ethanol+fermentation&source=gbs_navlinks_s [diakses 7 Maret 2015].
- Ristiati, N. P. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional.
- Reed, G. dan H.J. Rehm. 1983. *Biotechnology Vol III. Industrial Microbiology*. Westport, Conecticut: AVI Publishing Company Inc.
- Rodmui, A., Kongkiattikajorn, J., dan Dandusitapun, Y. 2008. Optimization of Agitation Conditions for Maximum Ethanol Production by Coculture. *Kasetsart Journal (Natural Science) 42*: 285-293.
- Roosifta, L.B. 2004. *Potensi Dan Prospek Khamir Dalam Meningkatkan Diversifikasi Pangan di Indonesia*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Rubio-Arroyo, M.F., Vivanco-Loyo, P., Juarez, M., Poisot, M., dan Ramirez-Galicia, G. 2011. Bio-Ethanol Obtained by Fermentation Process with Continous Feeding of Yeast. *J. Mex. Chem. Soc. 2011, 55(4)*: 242-245.
- Salvadó, Z., Lopez, F.N.A., Guillamon, J.M., Salazar, G., Querol, A., dan Barrio, E. 2011. Temperature Adaptation Markedly Determines Evolution within Genus *Saccharomyces*. *Applied and Environmental Microbiology 2011, 77(7)*: 2292.
- Satyanarayana, T., Johri, B.I., dan Prakash, A. 2012. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Science and Business Media.
- Smith, P.G. 2007. *Application of Fluidization to Food Processing*. Oxford: Blackwell Publishing Company.

- Stewart, G.G. and Russell., 1985. *Biology of Saccharomyces*. London: Dalam Biology of Industrial Microorganism, Cummings Publ. Inc.
- Sudbery, P., N. Gow dan J. Berman. 2012. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*, *Trends in Microb.* 23, 1-8.
- Suriawiria, U. 1986. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Bandung: Angkasa.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., dan Ingleedew, W.M. 2002. Influence of Medium Buffering capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, 68(4): 1616.
- Toharisman. 2010a. *Sekali lagi : Etanol dari Tebu*. <http://sugarresearch.org>. Diakses pada tanggal 6 Januari 2011 [dalam “Bioetanol Molase Tebu” Nur Fatimah, S. TP PBT Pertama BBP2TP Surabaya]
- Toharisman. 2010b. *Keunggulan Bioetanol dari Bahan Baku Tebu*. <http://www.gppindonesia.com>. Diakses pada tanggal 6 Januari 2011 [dalam “Bioetanol Molase Tebu” Nur Fatimah, S. TP PBT Pertama BBP2TP Surabaya]
- Underkofler, L. A. dan R. J. Hickey. 1954. *Industrial Fermentation*. New York: Chemical Publishing Co. Inc.
- Vasconcelos, J. N. D., Lopes, C.E., dan de Franca, F.P. 2004. Continuous ethanol Production Using Yeast Immobilized on Sugarcane Stalks. *Braz J Chem Eng.* Vol.21 (3): 357–365.
- Volk, W. A. dan Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan oleh Soenartono Adisoemarto. Jakarta: Erlangga.
- Winarno, F.G. dan S. Fardiaz. 1987. *Biofermentasi dan Biosintesa Protein*. Bandung: Angkasa.
- Wyman, C.E., dan Hinman, N.D. 1990. *Ethanol: Fundamentals of ethanol production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 24:25, 735–753.
- Xin, Yongfei, Zuoying dan Zhouygui. 2003. The effect of different substrate concentration on ethanol fermentation. *Fd Ferment Indus.* Vol.29: 21-23.
- Yingling, B., Zongcheng, Y., Honglin, W., dan Li, C. 2010. Optimization of Bioethanol Production during Simultaneous Saccharification and Fermentation in Very High-Gravity Cassava Mash. *Antonie van Leeuwenhoek* (2011) 99:329-339.

Zayed, G.Z.A. dan Foley, J. 1987. The Influence of Fermentation Conditions on Ethanol Yields from Sugar Beet Molases and Fodder Beet Juice Using *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Irish Journal of Food Science and Technology*. Vol.11:119-133.



LAMPIRAN

Lampiran A. Data Pengukuran Sel *S. cerevisiae* strain ATCC 9763, BATAN dan FNCC 3210

A.1 Data Pengukuran Sel *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763

Jam Ke	Ukuran	Ulangan 1			Ulangan 2			Rerata	stDev
		1	2	3	1	2	3		
24	Diameter	1,198	3,398	1,498	2,198	2,498	1,398	2,031	0,836
	Panjang	5,217	5,996	6,399	5,096	6,399	5,963	5,845	0,567
48	Diameter	3,498	1,548	2,948	1,398	1,748	1,498	2,106	0,890
	Panjang	6,704	6,737	8,715	6,050	7,689	6,704	7,100	0,949

A.2 Data Pengukuran Sel *S. cerevisiae* Strain BATAN

Jam Ke	Ukuran (µm)	Ulangan 1			Ulangan 2			Rerata	stDev
		1	2	3	1	2	3		
24	Diameter	1,448	2,197	2,149	1,099	2,049	1,749	1,782	0,438
	Panjang	6,261	9,632	4,936	4,714	7,475	3,799	6,136	2,143
48	Diameter	1,598	1,398	1,997	1,698	1,298	1,348	1,556	0,265
	Panjang	6,996	6,038	8,761	7,469	5,697	5,866	6,805	1,183

A.3 Data Pengukuran Sel *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210

Jam Ke	Ukuran	Ulangan 1			Ulangan 2			Rerata	stDev
		1	2	3	1	2	3		
24	Diameter	1,149	2,198	1,598	2,099	1,599	2,699	1,890	0,550
	Panjang	4,962	5,217	6,981	4,65	4,607	4,740	5,193	0,905
48	Diameter	1,548	1,948	1,848	1,348	1,198	1,498	1,565	0,288
	Panjang	6,737	8,565	8,057	6,034	5,183	6,446	6,837	1,266

Lampiran B. Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Glukosa**B.1 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH****B.1.1 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4**

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	31,429	32,830	31,724	31,571	32,966	31,827	0,142	0,136	0,104	0,127	0,020
4	32,996	32,298	31,501	33,261	32,568	31,706	0,265	0,269	0,204	0,246	0,036
8	32,877	28,878	31,605	33,165	29,163	31,827	0,288	0,285	0,221	0,265	0,038
12	34,998	34,045	31,226	35,298	34,341	31,457	0,300	0,297	0,231	0,276	0,039
16	35,110	34,369	32,534	35,420	34,683	32,789	0,310	0,314	0,255	0,293	0,033
20	32,854	32,924	30,516	33,149	33,301	30,708	0,294	0,377	0,192	0,288	0,093
24	31,383	33,549	31,628	31,709	33,779	31,902	0,326	0,230	0,274	0,277	0,048

B.1.2 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	35,630	31,209	31,437	35,822	31,325	31,547	0,192	0,116	0,110	0,139	0,046
4	33,119	32,911	28,593	33,472	33,238	28,915	0,353	0,327	0,322	0,334	0,016
8	33,728	33,189	32,288	34,136	33,609	32,704	0,407	0,419	0,416	0,414	0,006
12	32,452	32,537	30,756	32,887	32,977	31,208	0,435	0,440	0,452	0,442	0,009
16	32,348	31,596	28,656	32,804	32,056	29,122	0,456	0,460	0,466	0,461	0,005
20	31,271	30,719	32,748	31,708	31,203	33,207	0,437	0,484	0,459	0,460	0,023
24	32,450	29,152	32,767	32,866	29,604	33,209	0,416	0,452	0,441	0,436	0,019

B.1.3 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	31,253	30,256	31,454	31,401	30,408	31,636	0,148	0,152	0,182	0,160	0,019
4	31,382	28,932	35,421	31,738	29,284	35,771	0,356	0,352	0,349	0,352	0,003
8	32,008	30,851	31,973	32,460	31,305	32,418	0,452	0,454	0,446	0,451	0,004
12	31,607	34,739	34,096	32,083	35,214	34,568	0,476	0,475	0,471	0,474	0,002
16	33,361	33,129	31,922	33,848	33,620	32,411	0,488	0,491	0,490	0,489	0,001
20	31,633	34,971	32,455	32,082	35,405	32,990	0,449	0,434	0,535	0,473	0,055
24	33,292	30,643	31,817	33,702	31,212	32,218	0,410	0,569	0,402	0,460	0,094

B.1.4 Data Biomassa *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5,5

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	31,981	30,094	32,296	32,119	30,256	32,357	0,139	0,162	0,060	0,120	0,053
4	31,765	32,480	32,694	31,907	32,659	32,839	0,143	0,179	0,145	0,156	0,021
8	29,289	30,556	35,593	29,399	30,794	35,751	0,111	0,237	0,159	0,169	0,064
12	30,297	33,924	28,594	30,463	34,117	28,766	0,166	0,193	0,172	0,177	0,014
16	31,590	29,183	33,404	31,767	29,399	33,593	0,177	0,215	0,190	0,194	0,019
20	33,003	29,056	33,337	33,153	29,223	33,567	0,150	0,166	0,229	0,182	0,042
24	32,300	28,865	31,159	32,422	28,995	31,441	0,122	0,131	0,282	0,178	0,090

B.2 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pHB.2.1 Data Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	30,384	34,930	31,724	30,501	35,112	31,867	0,117	0,182	0,144	0,147	0,033
4	34,066	31,793	31,501	34,291	31,996	31,716	0,225	0,202	0,214	0,214	0,011
8	32,987	28,878	31,605	33,225	29,123	31,827	0,238	0,245	0,221	0,235	0,012
12	34,916	34,045	31,226	35,161	34,301	31,467	0,245	0,257	0,241	0,248	0,008
16	35,007	33,369	32,534	35,260	33,593	32,809	0,253	0,224	0,275	0,251	0,026
20	31,554	32,924	30,516	31,819	33,193	30,788	0,264	0,269	0,272	0,269	0,004
24	32,383	32,549	31,628	32,609	32,739	31,982	0,226	0,190	0,354	0,257	0,086

B.2.2 Data Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	35,276	31,209	31,437	35,502	31,409	31,607	0,226	0,200	0,170	0,199	0,028
4	33,019	32,911	28,593	33,332	33,249	28,927	0,313	0,338	0,334	0,328	0,014
8	32,718	33,279	32,288	33,156	33,729	32,734	0,438	0,450	0,446	0,444	0,006
12	32,422	32,647	30,756	32,867	33,107	31,208	0,444	0,460	0,452	0,452	0,008
16	32,348	31,596	28,656	32,814	32,068	29,122	0,466	0,472	0,466	0,468	0,004
20	31,271	30,719	32,748	31,757	31,213	33,247	0,486	0,494	0,499	0,493	0,007
24	32,450	29,152	32,767	32,906	29,613	33,309	0,456	0,461	0,541	0,486	0,048

B.2.3 Data Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	33,253	30,256	32,456	33,410	30,448	32,606	0,157	0,192	0,150	0,166	0,023
4	30,382	28,932	34,421	30,708	29,294	34,781	0,326	0,362	0,359	0,349	0,020
8	32,008	30,851	31,973	32,450	31,305	32,428	0,442	0,454	0,456	0,451	0,007
12	31,817	34,739	34,096	32,283	35,204	34,558	0,466	0,465	0,461	0,464	0,002
16	33,361	33,129	31,922	33,844	33,619	32,398	0,484	0,490	0,477	0,483	0,007
20	31,633	34,971	32,454	32,142	35,479	32,950	0,509	0,508	0,496	0,505	0,007
24	33,292	30,643	31,817	33,800	31,108	32,328	0,508	0,465	0,512	0,495	0,026

B.2.4 Data Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5,5

Jam Ke	Berat Awal			Berat pengeringan			Berat sel kering			Rerata (mg/mL)	Stdev
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
0	32,990	29,105	32,226	33,119	29,246	32,363	0,130	0,141	0,136	0,136	0,006
4	31,785	32,480	32,692	31,917	32,625	32,826	0,133	0,145	0,134	0,137	0,007
8	29,265	31,556	35,553	29,399	31,690	35,698	0,135	0,134	0,146	0,138	0,007
12	30,307	32,924	28,554	30,443	33,067	28,694	0,136	0,143	0,140	0,140	0,003
16	31,583	29,183	35,404	31,721	29,326	35,560	0,138	0,142	0,157	0,146	0,010
20	33,083	29,056	33,337	33,213	29,213	33,497	0,130	0,156	0,159	0,149	0,016
24	32,450	28,865	31,119	32,572	28,998	31,251	0,122	0,134	0,132	0,129	0,007

Lampiran C. Data *Growth Rate* Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Glukosa

C.1 Data *Growth Rate* Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

Jam Ke	n pH 4	n pH 4,5	n pH 5	n pH 5,5	μ pH 4	μ pH 4,5	μ pH 5	μ pH 5,5
0	0,237	0,410	0,420	0,120	0,059	0,103	0,105	0,030
4	0,246	0,422	0,452	0,156	0,062	0,106	0,113	0,039
8	0,265	0,446	0,461	0,169	0,066	0,112	0,115	0,042
12	0,276	0,452	0,474	0,177	0,069	0,113	0,119	0,044
16	0,293	0,466	0,489	0,194	0,073	0,116	0,122	0,048
20	0,288	0,459	0,473	0,182	0,072	0,115	0,118	0,045
24	0,277	0,441	0,460	0,178	0,069	0,110	0,115	0,044

C.2 Data *Growth Rate* Biomassa *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH

Jam Ke	n pH 4	n pH 4,5	n pH 5	n pH 5,5	μ pH 4	μ pH 4,5	μ pH 5	μ pH 5,5
0	0,201	0,392	0,379	0,119	0,050	0,098	0,095	0,030
4	0,214	0,429	0,426	0,124	0,053	0,107	0,106	0,031
8	0,235	0,444	0,451	0,127	0,059	0,111	0,113	0,032
12	0,248	0,452	0,464	0,130	0,062	0,113	0,116	0,032
16	0,251	0,468	0,483	0,139	0,063	0,117	0,121	0,035
20	0,269	0,493	0,505	0,149	0,067	0,123	0,126	0,037
24	0,257	0,486	0,495	0,129	0,064	0,122	0,124	0,032

Keterangan:

t: waktu

n: jumlah sel

μ : *Growth Rate* (gram/jam)

Lampiran D. Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses**D.1 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH****D.1.1 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5**

Jam Ke	Berat Awal		Berat Kering		Berat Sel Kering		Rerata (mg/mL)	STDev
	1	2	1	2	1	2		
0	29,339	32,657	30,022	33,428	0,683	0,771	0,727	0,063
4	28,947	33,093	29,960	34,186	1,013	1,092	1,052	0,056
8	31,522	31,902	32,723	32,994	1,201	1,092	1,146	0,077
12	32,552	30,511	33,858	31,907	1,306	1,397	1,352	0,064
16	31,221	33,350	32,702	34,801	1,480	1,451	1,466	0,021
20	33,083	29,394	34,494	30,761	1,410	1,367	1,389	0,031
24	28,736	29,012	30,096	30,380	1,360	1,368	1,364	0,006

D.1.2 Data Biomassa *S. cerevisiae* strain ATCC 9763 pada pH 5

Jam Ke	Berat Awal		Berat Kering		Berat Sel Kering		Rerata (mg/L)	STDev
	1	2	1	2	1	2		
0	34,076	33,076	34,782	33,784	0,705	0,708	0,707	0,001
4	29,282	32,577	30,275	33,501	0,993	0,924	0,958	0,048
8	30,345	35,390	31,507	36,510	1,162	1,120	1,141	0,030
12	29,315	32,332	30,580	33,507	1,265	1,175	1,220	0,063
16	34,503	35,202	35,806	36,568	1,303	1,366	1,334	0,045
20	33,231	33,921	34,541	35,204	1,310	1,283	1,296	0,019
24	33,009	31,895	34,322	33,102	1,313	1,208	1,260	0,075

D.2 Data Biomassa *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH**D.2.1 Data Biomassa *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 pada pH 4,5**

Jam Ke	Berat Awal		Berat Kering		Berat Sel Kering		Rerata (mg/mL)	STDev
	1	2	1	2	1	2		
0	32,540	29,320	33,154	29,924	0,614	0,604	0,609	0,007
4	32,402	28,707	33,301	29,658	0,900	0,951	0,925	0,036
8	32,484	34,911	33,602	36,048	1,118	1,138	1,128	0,014
12	33,347	30,324	34,600	31,610	1,253	1,286	1,269	0,023
16	34,231	32,008	35,579	33,409	1,348	1,402	1,375	0,038
20	32,556	29,414	33,989	30,908	1,433	1,495	1,464	0,044
24	32,121	33,392	33,544	34,794	1,423	1,402	1,413	0,015

D.2.2 Data Biomassa *S.cerevisiae* strain FNCC 3210 pada pH 5

Jam Ke	Berat Awal		Berat Kering		Berat Sel Kering		Rerata (mg/L)	STDev
	1	2	1	2	1	2		
0	32,449	31,514	33,123	32,134	0,674	0,620	0,647	0,038
4	31,898	31,512	32,653	32,300	0,755	0,789	0,772	0,023
8	28,689	33,010	29,887	34,207	1,198	1,197	1,197	0,001
12	33,073	29,003	34,487	30,410	1,414	1,407	1,410	0,005
16	32,357	31,214	33,821	32,692	1,465	1,479	1,472	0,010
20	29,317	30,456	30,788	31,992	1,470	1,536	1,503	0,046
24	33,345	29,312	34,743	30,725	1,398	1,414	1,406	0,011



Lampiran E. Data Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

E.1 Data Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

E.1.1 Data Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

Jam ke-	Abs		FP	Kons. Etanol (mL/L)		Etanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata Etanol % (v/v)	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	0,481	0,453	0	8,200	7,715	6,470	6,087	0,820	0,771	0,796	0,034
8	0,078	0,086	10	1,211	1,349	9,552	10,647	1,211	1,349	1,280	0,098
12	0,118	0,113	10	1,904	1,818	15,026	14,341	1,904	1,818	1,861	0,061
16	0,133	0,135	10	2,165	2,199	17,078	17,352	2,165	2,199	2,182	0,025
20	0,128	0,126	10	2,078	2,043	16,394	16,120	2,078	2,043	2,060	0,025
24	0,126	0,124	10	2,043	2,008	16,120	15,847	2,043	2,008	2,026	0,025

E.1.2 Data Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

Jam ke-	Abs		FP	Kons. Etanol (mL/L)		Etanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata Etanol % (v/v)	STDev
	1	2		1	2	1	2	1	2		
0	0	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,376	0,397	0	6,379	6,743	5,033	5,321	0,638	0,674	0,656	0,026
8	0,082	0,094	10	1,280	1,488	10,099	11,741	1,280	1,488	1,384	0,147
12	0,104	0,112	10	1,662	1,800	13,110	14,205	1,662	1,800	1,731	0,098
16	0,126	0,128	10	2,043	2,078	16,120	16,394	2,043	2,078	2,060	0,025
20	0,123	0,125	10	1,991	2,026	15,710	15,984	1,991	2,026	2,008	0,025
24	0,122	0,124	10	1,974	2,008	15,573	15,847	1,974	2,008	1,991	0,025

E.2 Data Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pH 5

E.2.1 Data Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

Jam ke-	Abs		FP	Kons. Etanol (mL/L)		Etanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata Etanol % (v/v)	STDev
	1	2		1	2	1	2	1	2		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,425	0,413	0	7,229	7,021	5,704	5,540	0,723	0,702	0,713	0,015
8	0,088	0,101	10	1,384	1,610	10,920	12,699	1,384	1,610	1,497	0,159
12	0,118	0,122	10	1,904	1,974	15,026	15,573	1,904	1,974	1,939	0,049
16	0,123	0,126	10	1,991	2,043	15,710	16,120	1,991	2,043	2,017	0,037
20	0,130	0,128	10	2,113	2,078	16,668	16,394	2,113	2,078	2,095	0,025
24	0,124	0,125	10	2,008	2,026	15,847	15,984	2,008	2,026	2,017	0,012

E.2.2 Data Kadar Etanol *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

Jam ke-	Abs		FP	Kons. Etanol (mL/L)		Etanol (g/L)		Etanol % (v/v)		Rerata Etanol % (v/v)	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	0,396	0,409	0	6,726	6,952	5,307	5,485	0,673	0,695	0,684	0,016
8	0,096	0,105	10	1,523	1,679	12,015	13,247	1,523	1,679	1,601	0,110
12	0,120	0,101	10	1,939	1,610	15,299	12,699	1,939	1,610	1,774	0,233
16	0,126	0,123	10	2,043	1,991	16,120	15,710	2,043	1,991	2,017	0,037
20	0,129	0,135	10	2,095	2,199	16,531	17,352	2,095	2,199	2,147	0,074
24	0,124	0,128	10	2,008	2,078	15,847	16,394	2,008	2,078	2,043	0,049

E.3 Contoh Perhitungan Kadar Etanol (ATCC 9763 pada pH 4,5 jam ke-24 ulangan 1)

- a. Konsentrasi etanol sampel (mL/mL) = $\frac{0,126-0,0082}{57,656} = 0,002043$ mL/mL
- b. Konsentrasi etanol sampel (mL/L) = $\frac{0,002043 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 2,043$ mL/L
- c. Konsentrasi etanol sampel (g/L) = $\frac{2,043 \text{ mL}}{\text{L}} \times \frac{0,789 \text{ g}}{\text{mL}} \times 10 = 16,120$ g/L

Lampiran F. Data Kadar Gula Reduksi *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

F.1 Data Kadar Gula Reduksi *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

F.1.1 Data Kadar Gula Reduksi *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,672	0,681	100	84,152	85,335	84,744	0,836
4	0,593	0,557	100	73,771	69,041	71,406	3,345
8	0,502	0,525	100	61,813	64,836	63,325	2,137
12	0,484	0,454	100	59,448	55,506	57,477	2,788
16	0,475	0,431	100	58,265	52,484	55,375	4,088
20	0,374	0,393	100	44,993	47,490	46,242	1,765
24	0,366	0,321	100	43,942	38,029	40,986	4,181

F.1.2 Data Kadar Gula Reduksi *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,681	0,668	100	85,335	83,627	84,481	1,208
4	0,609	0,589	100	75,874	73,246	74,560	1,858
8	0,539	0,574	100	66,675	71,275	68,975	3,252
12	0,474	0,465	100	58,134	56,951	57,543	0,836
16	0,423	0,421	100	51,432	51,170	51,301	0,186
20	0,375	0,367	100	45,125	44,074	44,599	0,743
24	0,362	0,363	100	43,417	43,548	43,482	0,093

F. 2 Data Kadar Gula Reduksi *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH

F.2.1 Data Kadar Gula Reduksi *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,667	0,674	100	83,495	84,415	83,955	0,650
4	0,631	0,613	100	78,765	76,399	77,582	1,673
8	0,607	0,575	100	75,611	71,406	73,509	2,973
12	0,522	0,478	100	64,442	58,660	61,551	4,088
16	0,488	0,438	100	59,974	53,403	56,689	4,646
20	0,421	0,392	100	51,170	47,359	49,264	2,695
24	0,401	0,326	100	48,541	38,686	43,614	6,969

F.2.2 Data Kadar Gula Reduksi *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

Waktu (Jam)	Absorbansi		FP	Gula reduksi (g/L)		Rerata	STDEV
	1	2		1	2		
0	0,685	0,673	100	85,861	84,284	85,072	1,115
4	0,594	0,606	100	73,903	75,480	74,691	1,115
8	0,571	0,587	100	70,880	72,983	71,932	1,487
12	0,520	0,531	100	64,179	65,624	64,901	1,022
16	0,491	0,515	100	60,368	63,522	61,945	2,230
20	0,397	0,401	100	48,016	48,541	48,279	0,372
24	0,340	0,335	100	40,526	39,869	40,197	0,465

F.3 Contoh Perhitungan Kadar Gula Reduksi (ATCC 9763 pada pH 4,5 jam ke-24)

Diketahui dari kurva standar gula reduksi diperoleh persamaan gula reduksi

$$y = 0,761x + 0,0316, \text{ sehingga}$$

$$x = \frac{y-0,0316}{0,761}$$

dimana x = kadar gula reduksi sebelum pengenceran ; y = absorbansi

a. Ulangan 1

$$x = \frac{0,366-0,0316}{0,761} = 0,43942 \text{ mg/mL} = 0,43942 \text{ g/L}$$

$$\text{Kadar Gula Reduksi Ulangan 1} = 0,43942 \text{ g/L} \times 100 = 43,942 \text{ g/L}$$

b. Ulangan 2

$$x = \frac{0,321-0,0316}{0,761} = 0,38029 \text{ mg/mL} = 0,38029 \text{ g/L}$$

$$\text{Kadar Gula Reduksi Ulangan 1} = 0,38029 \text{ g/L} \times 100 = 38,029 \text{ g/L}$$

c. Rerata = $\frac{43,942+38,029}{2} = 40,986 \text{ g/L}$

Lampiran G. Data Growth Rate Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

G.1 Data Growth Rate Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

G.1.1 Data Growth Rate Biomassa *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

Waktu (Jam)	Ln Biomassa pH 4,5 (mg/ml)		μ(/Jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	11,13	11,25				
12	11,78	11,85	0,054	0,049	0,052	0,003

G.1.2 Data Growth Rate Biomassa *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

Waktu (Jam)	Ln Biomassa pH 5 (mg/ml)		μ(/Jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	11,19	11,17				
12	11,81	11,67	0,052	0,042	0,047	0,007

G.2 Growth Rate Biomassa *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH

G.2.1 Data Growth Rate Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

Waktu (Jam)	Ln Biomassa pH 4,5 (mg/ml)		μ(/Jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	11,25	11,19				
12	11,85	11,81	0,049	0,052	0,051	0,002

G.2.2 Data Growth Rate Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

Waktu (Jam)	Ln Biomassa pH 5 (mg/ml)		μ(/Jam)		Rerata	STDEV
	1	2	1	2		
0	11,12	11,03				
12	11,86	11,85	0,062	0,068	0,065	0,005

G.3 Contoh Perhitungan Growth Rate Biomassa (ATCC 9763 pada pH 4,5)

- Ulangan 1, $\mu_1 = \frac{\text{Ln Biomassa yeast jam ke 12} - \text{Ln Biomassa yeast jam ke 0}}{\text{Lama fase log(jam ke 12-jam ke)}(\Delta t)}$
 $= \frac{11,78 - 11,13}{12} = 0,054/\text{jam}$
- Ulangan 2, $\mu_2 = \frac{\text{Ln Biomassa yeast jam ke 12} - \text{Ln Biomassa yeast jam ke 0}}{\text{Lama fase log(jam ke 12-jam ke)}(\Delta t)}$
 $= \frac{11,85 - 11,25}{12} = 0,049/\text{jam}$
- Rerata $\mu = \frac{\mu_1 + \mu_2}{2} = \frac{0,054 + 0,049}{2} = 0,052/\text{jam}$

Lampiran H. Data Growth Yield Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

H.1 Data Growth Yield Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

H.1.1 Data Growth Yield Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

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	0,330	0,321	7,135	5,232	0,046	0,061	0,054	0,011
8	0,518	0,321	10,940	2,854	0,047	0,112	0,080	0,046
12	0,624	0,625	15,696	16,648	0,040	0,038	0,039	0,002
16	0,798	0,679	30,917	30,441	0,026	0,022	0,024	0,002
20	0,728	0,595	41,857	35,674	0,017	0,017	0,017	0,000
24	0,677	0,597	49,943	37,100	0,014	0,016	0,015	0,002

H.1.2 Data Growth Yield Biomassa *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

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	0,287	0,217	6,659	3,330	0,043	0,065	0,054	0,016
8	0,457	0,413	11,891	8,562	0,038	0,048	0,043	0,007
12	0,559	0,467	15,221	19,026	0,037	0,025	0,031	0,009
16	0,597	0,659	28,539	24,734	0,021	0,027	0,024	0,004
20	0,604	0,575	45,662	48,040	0,013	0,012	0,013	0,001
24	0,608	0,500	47,565	55,651	0,013	0,009	0,011	0,003

H.2 Data Growth Yield Biomassa *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH

H.2.1 Data Growth Yield Biomassa *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

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	0,286	0,347	4,281	4,705	0,067	0,074	0,070	0,005
8	0,505	0,534	9,513	11,279	0,053	0,047	0,050	0,004
12	0,639	0,681	19,026	24,842	0,034	0,027	0,031	0,004
16	0,734	0,798	33,295	33,174	0,022	0,024	0,023	0,001
20	0,819	0,891	34,247	36,309	0,024	0,025	0,024	0,000
24	0,810	0,798	46,138	46,621	0,018	0,017	0,017	0,000

H.2.2 Data *Growth Yield* Biomassa *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

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	0,082	0,169	7,610	7,964	0,011	0,021	0,016	0,007
8	0,524	0,577	11,891	12,018	0,044	0,048	0,046	0,003
12	0,740	0,787	15,696	15,019	0,047	0,052	0,050	0,004
16	0,791	0,859	21,404	20,948	0,037	0,041	0,039	0,003
20	0,797	0,916	50,419	49,455	0,016	0,019	0,017	0,002
24	0,724	0,794	56,602	55,746	0,013	0,014	0,014	0,001

H.3 Contoh Perhitungan *Growth Yield* Biomassa (ATCC 9763 pada pH 4,5 jam ke-4)

- a. Ulangan 1, $Y_1 (x/s) = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{x \text{ jam ke } 4 - x \text{ jam ke } 0}{s \text{ jam ke } 0 - s \text{ jam ke } 4} = \frac{0,330}{7,135} = 0,046 \text{ (log cfu/mL)(g/L)}$
- b. Ulangan 2, $Y_2 (x/s) = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{x \text{ jam ke } 4 - x \text{ jam ke } 0}{s \text{ jam ke } 0 - s \text{ jam ke } 4} = \frac{0,321}{5,232} = 0,061 \text{ (log cfu/mL)(g/L)}$
- c. Rerata, $Y_1 (x/s) = \frac{Y_1 + Y_2}{2} = \frac{0,046 + 0,061}{2} = 0,054 \text{ (log cfu/mL)(g/L)}$

Lampiran I. Data Kadar Total Gula *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

I.1 Data Kadar Total Gula *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

I.1.1 Data Kadar Total Gula *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

Jam Ke	Pengambilan (µL)	FP	Berat		Absorbansi		Kadar Gula (mg/400 µL)		Kadar Gula (mg/mL)		Rerata (mg/mL)	Stdev
			1	2	1	2	1	2	1	2		
0	400	1250	0,107	0,105	0,429	0,422	55,556	54,224	138,889	135,559	137,224	2,354
4	400	1250	0,104	0,102	0,414	0,411	52,702	52,131	131,754	130,327	131,041	1,009
8	400	1250	0,102	0,105	0,406	0,416	51,180	53,082	127,949	132,705	130,327	3,363
12	400	1250	0,102	0,104	0,396	0,387	49,277	47,565	123,193	118,912	121,052	3,027
16	400	1250	0,109	0,103	0,364	0,358	43,189	42,047	107,972	105,118	106,545	2,018
20	400	1250	0,102	0,103	0,341	0,347	38,813	39,954	97,032	99,886	98,459	2,018
24	400	1250	0,101	0,104	0,324	0,344	35,578	39,384	88,946	98,459	93,702	6,727

I.1.2 Data Kadar Total Gula *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

Jam Ke	Pengambilan (µL)	FP	Berat		Absorbansi		Kadar Gula (mg/400 µL)		Kadar Gula (mg/mL)		Rerata (mg/mL)	Stdev
			1	2	1	2	1	2	1	2		
0	400	1250	0,102	0,104	0,428	0,429	55,365	55,556	138,413	138,889	138,651	0,336
4	400	1250	0,103	0,103	0,414	0,422	52,702	54,224	131,754	135,559	133,657	2,691
8	400	1250	0,103	0,101	0,403	0,411	50,609	52,131	126,522	130,327	128,425	2,691
12	400	1250	0,103	0,102	0,396	0,389	49,277	47,945	123,193	119,863	121,528	2,354
16	400	1250	0,102	0,104	0,368	0,377	43,950	45,662	109,874	114,155	112,015	3,027
20	400	1250	0,102	0,103	0,332	0,328	37,100	36,339	92,751	90,849	91,800	1,345
24	400	1250	0,103	0,104	0,328	0,312	36,339	33,295	90,849	83,238	87,043	5,381

I.2 Data Kadar Total Gula *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH

I.2.1 Data Kadar Total Gula *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

Jam Ke	Pengambilan (µL)	FP	Berat		Absorbansi		Kadar Gula (mg/400 µL)		Kadar Gula (mg/mL)		Rerata (mg/mL)	Stdev
			1	2	1	2	1	2	1	2		
0	400	1250	0,102	0,106	0,425	0,429	54,795	55,556	136,986	134,287	135,637	1,909
4	400	1250	0,102	0,103	0,416	0,421	53,082	54,033	132,705	129,583	131,144	2,208
8	400	1250	0,104	0,104	0,405	0,402	50,989	50,419	127,473	123,008	125,241	3,157
12	400	1250	0,108	0,105	0,385	0,397	47,184	49,467	117,960	109,446	113,703	6,021
16	400	1250	0,103	0,103	0,355	0,375	41,476	45,282	103,691	101,113	102,402	1,823
20	400	1250	0,105	0,105	0,353	0,358	41,096	42,047	102,740	97,978	100,359	3,367
24	400	1250	0,104	0,108	0,328	0,337	36,339	38,052	90,849	87,666	89,257	2,250

I.2.2 Data Kadar Total Gula *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

Jam Ke	Pengambilan (µL)	FP	Berat		Absorbansi		Kadar Gula (mg/400 µL)		Kadar Gula (mg/mL)		Rerata (mg/mL)	Stdev
			1	2	1	2	1	2	1	2		
0	400	1250	0,102	0,102	0,438	0,431	57,268	55,936	143,170	139,882	141,526	2,324
4	400	1250	0,103	0,102	0,422	0,429	54,224	55,556	135,559	131,918	133,739	2,575
8	400	1250	0,103	0,103	0,413	0,421	52,511	54,033	131,279	127,865	129,572	2,414
12	400	1250	0,102	0,103	0,405	0,410	50,989	51,941	127,473	124,864	126,169	1,845
16	400	1250	0,102	0,102	0,393	0,382	48,706	46,613	121,766	118,935	120,350	2,002
20	400	1250	0,103	0,103	0,332	0,427	37,100	55,175	92,751	90,427	91,589	1,643
24	400	1250	0,103	0,103	0,319	0,392	34,627	48,516	86,568	84,136	85,352	1,719

I.3 Contoh Perhitungan Kadar Total Gula (ATCC 9763 pada pH 4,5 jam ke-24)

a. Ulangan 1

$$Total\ Gula\ 1 = \frac{\left(\frac{y-b}{a} \times FP\right) mg}{mL\ sampel} = \frac{\left(\frac{y-0,137}{6,57} \times FP\right) mg}{mL\ sampel} = \frac{\left(\frac{0,324-0,137}{6,57} \times 1250\right) mg}{400\ \mu L \times \frac{1}{1000}\ mL} = \frac{35,578\ mg}{0,4\ mL} = 88,946\ mg/mL$$

b. Ulangan 2

$$Total\ Gula\ 2 = \frac{\left(\frac{y-b}{a} \times FP\right) mg}{mL\ sampel} = \frac{\left(\frac{y-0,137}{6,57} \times FP\right) mg}{mL\ sampel} = \frac{\left(\frac{0,344-0,137}{6,57} \times 1250\right) mg}{400\ \mu L \times \frac{1}{1000}\ mL} = \frac{39,384\ mg}{0,4\ mL} = 98,459\ mg/mL$$

c. Rerata = $\frac{88,946+98,459}{2} = 93,702\ mg/mL$

Lampiran J. Data Kinetika Fermentasi *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

J.1 Data Kinetika Fermentasi *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada Berbagai Variasi pH

J.1.1 Data Kinetika Fermentasi *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5

Waktu (Jam)	Biomassa Yeast (mg/ml)	Growth yield	Total Gula (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	0,727	0,000	137,224	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	1,052	0,054	131,041	6,183	1,546	1,094	6,279	1,570	1,035	34,187
8	1,146	0,080	130,327	6,897	0,862	3,525	10,099	1,262	2,302	18,247
12	1,351	0,039	121,052	16,172	1,348	8,266	14,684	1,224	0,909	11,029
16	1,466	0,024	106,545	30,679	1,917	15,680	17,215	1,076	0,561	3,580
20	1,389	0,017	98,459	38,765	1,938	19,813	16,257	0,813	0,422	2,155
24	1,364	0,015	93,702	43,522	1,813	22,244	15,984	0,666	0,375	1,759

J.1.2 Data Kinetika Fermentasi *S.cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 5

Waktu (Jam)	Biomassa Yeast (mg/ml)	Growth yield	Total Gula (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	0,706	0,000	138,651	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,958	0,054	133,657	4,994	1,249	2,553	5,177	1,294	1,177	29,236
8	1,141	0,043	128,425	10,226	1,278	5,227	10,920	1,365	1,110	8,389
12	1,220	0,031	121,528	17,123	1,427	8,752	13,657	1,138	0,804	2,895
16	1,334	0,024	112,015	26,636	1,665	13,614	16,257	1,016	0,614	1,179
20	1,296	0,013	91,800	46,851	2,343	23,946	15,847	0,792	0,338	0,379
24	1,260	0,011	87,043	51,608	2,150	26,377	15,710	0,655	0,306	0,297

J.2 Data Kinetika Fermentasi *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada Berbagai Variasi pH

J.2.1 Data Kinetika Fermentasi *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5

Waktu (Jam)	Biomassa Yeast (mg/ml)	Growth yield	Total Gula (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	0,609	0,000	135,637	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,925	0,070	131,144	4,493	1,123	2,296	5,622	1,405	1,255	54,933
8	1,128	0,050	125,241	10,396	1,299	5,313	11,810	1,476	1,137	21,571
12	1,269	0,031	113,703	21,934	1,828	11,210	15,299	1,275	0,708	6,530
16	1,375	0,023	102,402	33,235	2,077	16,986	15,915	0,995	0,479	2,819
20	1,464	0,024	100,359	35,278	1,764	18,031	16,531	0,827	0,469	2,607
24	1,413	0,017	89,257	46,379	1,932	23,704	15,915	0,663	0,343	1,448

J.2.2 Data Kinetika Fermentasi *S.cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 5

Waktu (Jam)	Biomassa Yeast (mg/ml)	Growth yield	Total Gula (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	0,647	0,000	141,526	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,772	0,016	133,739	7,787	1,947	3,980	5,396	1,349	0,693	5,863
8	1,197	0,046	129,572	11,955	1,494	6,110	12,631	1,579	1,056	5,496
12	1,410	0,050	126,169	15,358	1,280	7,849	13,999	1,167	0,910	3,436
16	1,472	0,039	120,350	21,176	1,323	10,823	15,915	0,995	0,752	1,788
20	1,503	0,017	91,589	49,937	2,497	25,523	16,942	0,847	0,339	0,318
24	1,406	0,014	85,352	56,174	2,341	28,711	16,120	0,672	0,287	0,255

J.3 Contoh Perhitungan Kinetika Fermentasi (ATCC 9763 pada pH 4,5 jam ke-24)

g. Laju Konsumsi = $\frac{\Delta S \text{ (g/L)}}{\text{Lama Fermentasi (jam)}}$

- Laju konsumsi ulangan 1 = $\frac{49,943 \text{ g/L}}{24 \text{ jam}} = 2,081 \text{ g/L/jam}$; Laju konsumsi ulangan 2 = $\frac{37,100 \text{ g/L}}{24 \text{ jam}} = 1,546 \text{ g/L/jam}$
- Rata-rata laju konsumsi = $\frac{2,081 + 1,546}{2} = 1,813 \text{ g/L/jam}$

h. Produktivitas = $\frac{\text{Konsentrasi etanol sampel (g/L)}}{\text{Lama Fermentasi (jam)}}$

- Produktivitas ulangan 1 = $\frac{16,120 \text{ g/L}}{24 \text{ jam}} = 0,672 \text{ g/L/jam}$; Produktivitas ulangan 2 = $\frac{15,847 \text{ g/L}}{24 \text{ jam}} = 0,660 \text{ g/L/jam}$
- Rata-rata produktivitas = $\frac{0,672 + 0,660}{2} = 0,666 \text{ g/L/jam}$

i. Yield Etanol = $\frac{\text{Konsentrasi etanol sampel (g/L)}}{\Delta S \text{ (g/L)}}$

- Yield etanol ulangan 1 = $\frac{16,120 \text{ g/L}}{49,943 \text{ g/L}} = 0,323 \text{ g/g}$; Yield etanol ulangan 2 = $\frac{15,847 \text{ g/L}}{37,100 \text{ g/L}} = 0,427 \text{ g/g}$
- Rata-rata yield etanol = $\frac{0,323 + 0,427}{2} = 0,375 \text{ g/g}$

j. Efisiensi Fermentasi = $\frac{\text{Konsentrasi etanol sampel (g/L)}}{\text{Etanol teoritis (g/L)}} \times 100 \%$

- Efisiensi fermentasi ulangan 1 = $\frac{16,120 \text{ g/L}}{25,526 \text{ g/L}} \times 100\% = 1,265 \%$; Efisiensi fermentasi ulangan 1 = $\frac{15,847 \text{ g/L}}{18,962 \text{ g/L}} \times 100\% = 2,253 \%$
- Rata-rata efisiensi fermentasi = $\frac{1,265 + 2,253}{2} = 1,759 \%$

Lampiran K. Uji T Kurva *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 dan FNCC 3210 pada Media Molasses

K.1 Uji T Kurva Pertumbuhan *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5 dan pH 5

Waktu	Rerata 4,5	Rerata 5	STDEV 4,5	STDEV 5	STDEV ² 4,5	STDEV ² 5	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S x ₁ .x ₂	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,73	0,71	0,063	0,001	0,004	0,000	0,001	161,450	0,002	0,044	0,044	0,464	4,303	Tidak beda
4	1,05	0,96	0,056	0,048	0,003	0,002	0,740	161,450	0,003	0,052	0,052	1,794	4,303	Tidak beda
8	1,15	1,14	0,077	0,030	0,006	0,001	0,150	161,450	0,003	0,058	0,058	0,090	4,303	Tidak beda
12	1,35	1,22	0,064	0,063	0,004	0,004	0,987	161,450	0,004	0,063	0,063	2,074	4,303	Tidak beda
16	1,47	1,33	0,021	0,045	0,000	0,002	4,631	161,450	0,001	0,035	0,035	3,737	4,303	Tidak beda
20	1,39	1,30	0,031	0,019	0,001	0,000	0,385	161,450	0,001	0,026	0,026	3,594	4,303	Tidak beda
24	1,36	1,26	0,006	0,075	0,000	0,006	170,609	161,450	0,003	0,053	0,053	1,957	4,303	Tidak beda

K.2 Uji T Kurva Pertumbuhan *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5

Waktu	Rerata 4,5	Rerata 5	STDEV 4,5	STDEV 5	STDEV ² 4,5	STDEV ² 5	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S x ₁ .x ₂	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,61	0,65	0,007	0,038	0,000	0,001	31,290	161,450	0,001	0,027	0,027	-1,391	4,303	Tidak beda
4	0,93	0,77	0,036	0,023	0,001	0,001	0,419	161,450	0,001	0,031	0,031	5,013	4,303	Beda
8	1,13	1,20	0,014	0,001	0,000	0,000	0,007	161,450	0,000	0,010	0,010	-7,089	4,303	Tidak beda
12	1,27	1,41	0,023	0,005	0,001	0,000	0,041	161,450	0,000	0,017	0,017	-8,456	4,303	Tidak beda
16	1,37	1,47	0,038	0,010	0,001	0,000	0,069	161,450	0,001	0,028	0,028	-3,492	4,303	Tidak beda
20	1,46	1,50	0,044	0,046	0,002	0,002	1,116	161,450	0,002	0,045	0,045	-0,872	4,303	Tidak beda
24	1,41	1,41	0,015	0,011	0,000	0,000	0,573	161,450	0,000	0,013	0,013	0,543	4,303	Tidak beda

Keterangan:

- n = jumlah sampel
- x = rata-rata
- STDEV = simpangan baku
- S² = varians
- S = simpangan baku gabungan
- T_{hitung} > T_{tabel} = BN (Beda Nyata)
- T_{hitung} < T_{tabel} = TBN (Tidak Beda Nyata)

K.3 Uji T Kurva Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5 dan pH 5

Waktu	Rerata 4,5	Rerata 5	STDEV 4,5	STDEV 5	STDEV ² 4,5	STDEV ² 5	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S x ₁ .x ₂	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,00	0,00	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	0,80	0,66	0,034	0,026	0,001	0,001	0,563	161,450	0,001	0,030	0,030	4,600	4,303	Beda
8	1,28	1,38	0,098	0,147	0,010	0,022	2,250	161,450	0,016	0,125	0,125	-0,832	4,303	Tidak beda
12	1,86	1,73	0,061	0,098	0,004	0,010	2,560	161,450	0,007	0,082	0,082	1,590	4,303	Tidak beda
16	2,18	2,06	0,025	0,025	0,001	0,001	1,000	161,450	0,001	0,025	0,025	4,950	4,303	Tidak beda
20	2,06	2,01	0,025	0,025	0,001	0,001	1,000	161,450	0,001	0,025	0,025	2,121	4,303	Tidak beda
24	2,03	1,99	0,025	0,025	0,001	0,001	1,000	161,450	0,001	0,025	0,025	1,414	4,303	Tidak beda

K.4 Uji T Kurva Kadar Etanol *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5

Waktu	Rerata 4,5	Rerata 5	STDEV 4,5	STDEV 5	STDEV ² 4,5	STDEV ² 5	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S x ₁ .x ₂	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	0,00	0,00	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	0,71	0,68	0,015	0,016	0,000	0,000	1,174	161,450	0,000	0,015	0,015	1,865	4,303	Tidak beda
8	1,50	1,60	0,159	0,110	0,025	0,012	0,479	161,450	0,019	0,137	0,137	-0,759	4,303	Tidak beda
12	1,94	1,77	0,049	0,233	0,002	0,054	22,563	161,450	0,028	0,168	0,168	0,979	4,303	Tidak beda
16	2,02	2,02	0,037	0,037	0,001	0,001	1,000	161,450	0,001	0,037	0,037	0,000	4,303	Tidak beda
20	2,10	2,15	0,025	0,074	0,001	0,005	9,000	161,450	0,003	0,055	0,055	-0,949	4,303	Tidak beda
24	2,02	2,04	0,012	0,049	0,000	0,002	16,000	161,450	0,001	0,036	0,036	-0,728	4,303	Tidak beda

Keterangan:

- n = jumlah sampel
- x = rata-rata
- STDEV = simpangan baku
- S² = varians
- S = simpangan baku gabungan
- T_{hitung} > T_{tabel} = BN (Beda Nyata)
- T_{hitung} < T_{tabel} = TBN (Tidak Beda Nyata)

K.5 Uji T Kurva Kadar Total Gula *S. cerevisiae* Strain ATCC 9763 pada pH 4,5 dan pH 5

Waktu	Rerata 4,5	Rerata 5	STDEV 4,5	STDEV 5	STDEV ² 4,5	STDEV ² 5	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S x ₁ .x ₂	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	137,22	138,65	2,354	0,336	5,543	0,113	0,020	161,450	2,828	1,682	1,682	-0,849	4,303	Tidak beda
4	131,04	133,66	1,009	2,691	1,018	7,240	7,111	161,450	4,129	2,032	2,032	-1,287	4,303	Tidak beda
8	130,33	128,42	3,363	2,691	11,312	7,240	0,640	161,450	9,276	3,046	3,046	0,625	4,303	Tidak beda
12	121,05	121,53	3,027	2,354	9,163	5,543	0,605	161,450	7,353	2,712	2,712	-0,175	4,303	Tidak beda
16	106,54	112,01	2,018	3,027	4,072	9,163	2,250	161,450	6,618	2,572	2,572	-2,126	4,303	Tidak beda
20	98,46	91,80	2,018	1,345	4,072	1,810	0,444	161,450	2,941	1,715	1,715	3,883	4,303	Tidak beda
24	93,70	87,04	6,727	5,381	45,248	28,959	0,640	161,450	37,103	6,091	6,091	1,093	4,303	Tidak beda

K.6 Uji T Kurva Kadar Total Gula *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210 pada pH 4,5 dan pH 5

Waktu	Rerata 4,5	Rerata 5	STDEV 4,5	STDEV 5	STDEV ² 4,5	STDEV ² 5	F _{hitung}	F _{tabel}	S ²	S	S x ₁ .x ₂	T hitung	T tabel	Kesimpulan
0	135,64	141,53	1,909	2,324	3,643	5,403	1,483	161,450	4,523	2,127	2,127	-2,769	4,303	Tidak beda
4	131,14	133,74	2,208	2,575	4,876	6,628	1,359	161,450	5,752	2,398	2,398	-1,082	4,303	Tidak beda
8	125,24	129,57	3,157	2,414	9,969	5,828	0,585	161,450	7,898	2,810	2,810	-1,541	4,303	Tidak beda
12	113,70	126,17	6,021	1,845	36,251	3,405	0,094	161,450	19,828	4,453	4,453	-2,799	4,303	Tidak beda
16	102,40	120,35	1,823	2,002	3,324	4,006	1,205	161,450	3,665	1,914	1,914	-9,375	4,303	Tidak beda
20	100,36	91,59	3,367	1,643	11,337	2,700	0,238	161,450	7,019	2,649	2,649	3,310	4,303	Tidak beda
24	89,26	85,35	2,250	1,719	5,063	2,956	0,584	161,450	4,010	2,002	2,002	1,950	4,303	Tidak beda

Keterangan:

- n = jumlah sampel
- x = rata-rata
- STDEV = simpangan baku
- S² = varians
- S = simpangan baku gabungan
- T_{hitung} > T_{tabel} = BN (Beda Nyata)
- T_{hitung} < T_{tabel} = TBN (Tidak Beda Nyata)