

**PENGARUH PENAMBAHAN *YEAST EXTRACT* DAN LAMA
FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH
AIR KELAPA YANG DITAMBAHKAN TETES TEBU MENGGUNAKAN
KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

Oleh:

SILVIA ABDI PRATAMA

NIM. 15630067



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH PENAMBAHAN *YEAST EXTRACT* DAN LAMA
FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH
AIR KELAPA YANG DITAMBAHKAN TETES TEBU MENGGUNAKAN
KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

Oleh:
SILVIA ABDI PRATAMA
NIM. 15630067

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**PENGARUH PENAMBAHAN *YEAST EXTRACT* DAN LAMA
FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH
AIR KELAPA YANG DITAMBAHKAN TETES TEBU MENGGUNAKAN
KHAMIR *Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

Oleh:
SILVIA ABDI PRATAMA
NIM. 15630067

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 19 Juni 2020

Pembimbing I

Anik Maunatin, S. T., M. P
NIDT. 19760105 20180201 2 248

Pembimbing II

Ahmad Hanapi, M. Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**PENGARUH PENAMBAHAN *YEAST EXTRACT* DAN LAMA
FERMENTASI TERHADAP PRODUKSI BIOETANOL DARI LIMBAH
AIR KELAPA YANG DITAMBAHKAN TETES TEBU MENGGUNAKAN
*KHAMIR Saccharomyces cerevisiae***

SKRIPSI

Oleh:
SILVIA ABDI PRATAMA
NIM. 15630067

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 19 Juni 2020

Penguji Utama : Dr. Anton Prasetyo, M. Si
NIP. 19770925 200604 1 003



Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M. Si
NIDT. 19880711 20160801 2 067



Sekretaris Penguji : Anik Maunatin, S. T., M. P
NIDT. 19760105 20180201 2 248



Anggota Penguji : Ahmad Hanapi, M. Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069



Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati, M. Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Silvia Abdi Pratama

NIM : 15630067

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Pengaruh Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Limbah Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu Menggunakan Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Juli 2020

Yang membuat pernyataan



Silvia Abdi Pratama
NIM. 15630067

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahrobbil'aalamiin

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah dan ridho-Nya, sehingga dapat terselesaikan karya ini. Tak lupa sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW.

...

Saya persembahkan karya ini kepada segenap orang-orang yang paling berjasa dalam perjalanan saya menempuh pendidikan S1 Kimia di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sebagai tanda bakti, hormat, dan rasa terimakasih.

...

Kepada kedua orang tua saya (Ayah Mokhammad Abdullah dan Ibu Sri Utami) yang telah memberikan segala bentuk dukungan, doa, motivasi, nasehat dan kasih sayang yang tidak tergantikan. Semoga Allah selalu melimpahkan kasih sayang-Nya kepadamu, pahlawanku

...

Kepada seluruh dosen, staf laboran, administrasi, dan birokrasi Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, dan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang selalu memberikan bimbingan dan ilmu yang bermanfaat baik dalam proses saya menempuh pendidikan S1 Kimia, khususnya kepada **Ibu Anik Maunatin, S.T., M.P** selaku pembimbing penelitian, **Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc** selaku pembimbing agama, dan **Ibu Dewi Yuliani, M.Si** selaku konsultan.

...

Kepada teman-teman seperjuangan di Jurusan Kimia dan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sahabat sahabati PMII Rayon Pencerahan Galileo dan Komisariat Sunan Ampel Malang, sahabat Ilmuwan Muda, dan rekan-rekan Dewan Eksekutif Mahasiswa Universitas Tahun 2019-2020 yang telah memberikan dukungan, motivasi, dan doa. Saya beruntung pernah berproses bersamamu.

See you on top!

...

MOTTO

“Tidak ada hasil yang mengkhianati proses, berusaha dengan versi terbaikmu dan libatkan Allah dalam setiap prosesmu”

...

“Life has knocked me down a few times, it shows me things I never want to see. I experienced sadness and failures. But one thing that’s sure, I always try to get up. I believe in being strong when everything seems to be wrong. I believe that tomorrow is another day and I believe in the miracle of Allah SWT”

...

“Tidak peduli seberapa kalipun kau digagalkan, ditikung, atau dicurangi oleh sesama manusia, tapi kau tetap gigih dengan impianmu, maka jika memang suatu hal baik yang kau impikan adalah takdir yang sudah digariskan untukmu, itu akan tetap menjadi takdirmu, innalaha ma’anaa”

...

“Adalah hal paling indah dalam hidup, ketika kita mensyukuri setiap nikmat yang ada di hidup kita, tanpa membandingkan dengan nikmat yang orang lain punya. Senyumlah, syukuri hidupmu”

...

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Jurusan Kimia dan Skripsi yang berjudul **“Pengaruh Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Limbah Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu Menggunakan Khamir *Saccharomyces cerevisiae*”**.

Penelitian dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari arahan dan peran beberapa pihak terkait. Maka dari itu, penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua yang senantiasa memberikan dukungan baik materil maupun non materil.
2. Bapak Prof. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia.
5. Ibu Anik Maunatin, S.T., M.P, Bapak A. Hanapi M.Sc, Ibu Dewi Yuliani, M.Si, dan Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si selaku dosen pembimbing, konsultan, dan penguji yang senantiasa memberikan bimbingan dan arahan penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
6. Seluruh dosen dan laboran Jurusan Kimia yang telah memberikan arahan dan dukungan bagi penulis.
7. Teman-teman Jurusan Kimia yang telah membantu dan memberi motivasi dalam penyelesaian skripsi ini.

8. Seluruh pihak yang telah memberikan dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun penulis harapkan demi terwujudnya karya yang lebih baik. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua. *Aamiin ya Robbal 'alamiin.*

Malang, 20 Juli 2020

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Air Kelapa	7
2.2 Tetes Tebu (Molase)	8
2.3 Etanol	10
2.3.1 Produksi Bioetanol secara Fermentatif	11
2.3.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Bioetanol	14
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.5 Pemisahan Bioetanol dengan Metode Destilasi Fraksional	20
2.6 Kromatografi Gas	22
2.7 Metode Sulfat Fenol	24
2.8 Produksi Bioetanol dari Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu Menurut Perspektif Islam	26
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	28
3.2.1 Alat	28
3.2.2 Bahan	28
3.3 Rancangan Penelitian	29
3.4 Tahapan Penelitian	30
3.5 Pelaksanaan Penelitian	30
3.5.1 Pembuatan Media Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.5.1.1 Pembuatan Media YPGA (<i>Yeast Extract Peptone Glucose Agar</i>)	30

3.5.1.2	Pembuatan Media YPGB (<i>Yeast Extract Peptone Glucose Broth</i>)	31
3.5.2	Regenerasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.5.3	Pembuatan Inokulum <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
3.5.4	Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
3.5.5	Preparasi Media Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu	32
3.5.6	Produksi Bioetanol dengan Variasi Penambahan <i>Yeast Extract</i> dan Lama Fermentasi	33
3.5.7	Pemisahan Bioetanol dengan Metode Destilasi Fraksional	33
3.5.8	Analisis Kadar Bioetanol Menggunakan Kromatografi Gas	33
3.5.9	Analisis Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat Fenol	34
3.5.9.1	Pembuatan Kurva Standar Glukosa	34
3.5.9.2	Penentuan Kadar Total Gula Media Sebelum dan Sesudah Fermentasi	34
3.5.10	Penentuan Total Khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dengan Metode TPC	35
3.5.11	Analisis Data	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Preparasi Media Fermentasi	36
4.2	Regenerasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
4.3	Pembuatan Inokulum <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.4	Pengaruh Penambahan <i>Yeast Extract</i> dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu	41
4.5	<i>Yield</i> Bioetanol	46
4.6	Viabilitas Khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam Media Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu	48
4.7	Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam	51
BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	53
5.2	Saran	53
DAFTAR PUSTAKA		54
LAMPIRAN		62

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	62
Lampiran 2 Skema Kerja	63
Lampiran 3 Perhitungan Larutan	69
Lampiran 4 Data Penelitian	71
Lampiran 5 Kromatogram Bioetanol Hasil Analisis Menggunakan Instrumen Kromatografi Gas	88
Lampiran 6 Dokumentasi Kegiatan Penelitian	100



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Komposisi kimia air kelapa tua	8
Tabel 2.2	Komposisi kimia tetes tebu	9
Tabel 2.3	Sifat fisika etanol	10
Tabel 2.4	Warna komplementer dan panjang gelombang serapan	26
Tabel 3.1	Kombinasi penambahan <i>yeast extract</i> dan lama fermentasi	29
Tabel 4.1	Rata-rata kadar total gula media sebelum fermentasi	38
Tabel 4.2	Kadar bioetanol	42
Tabel 4.3	Hasil uji BNJ penambahan <i>yeast extract</i> terhadap kadar bioetanol	44
Tabel 4.4	Kadar bioetanol, gula terpakai, dan <i>yield</i>	46
Tabel 4.5	Hasil uji BNJ penambahan <i>yeast extract</i> terhadap <i>yield</i> bioetanol	48
Tabel 4.6	Jumlah koloni khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dalam media setelah fermentasi	49
Tabel L4.1	Absorbansi kurva standar glukosa	71
Tabel L4.2	Hasil analisis kadar gula media sebelum fermentasi	74
Tabel L4.3	Hasil analisis kadar gula media setelah fermentasi	75
Tabel L4.4	Hasil analisis kadar gula terpakai pada proses fermentasi	75
Tabel L4.5	Absorbansi kurva pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
Tabel L4.6	Hasil perhitungan jumlah khamir <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
Tabel L4.7	Hasil perhitungan kurva standar etanol	77
Tabel L4.8	Data analisis bioetanol menggunakan kromatografi gas	79
Tabel L4.9	Kadar bioetanol	80
Tabel L4.10	<i>Yield</i> bioetanol	81

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Air dan buah kelapa tua	7
Gambar 2.2	Jalur biosintesis etanol	12
Gambar 2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Gambar 2.4	Kurva pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Gambar 2.5	Alat destilasi fraksional	21
Gambar 2.6	Instrumentasi kromatografi gas	23
Gambar 2.7	Reaksi pada metode sulfat fenol	25
Gambar 4.1	Kurva standar glukosa	37
Gambar 4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hasil regenerasi	39
Gambar 4.3	Kurva pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Gambar 4.4	Kromatogram bioetanol	45
Gambar L4.1	Kurva standar glukosa	71
Gambar L4.2	Kurva pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
Gambar L4.3	Kurva standar etanol	78
Gambar L5.1	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₁ B ₁ ulangan 1	88
Gambar L5.2	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₁ B ₁ ulangan 2	89
Gambar L5.3	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₂ B ₁ ulangan 1	90
Gambar L5.4	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₂ B ₁ ulangan 2	91
Gambar L5.5	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₃ B ₁ ulangan 1	92
Gambar L5.6	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₃ B ₁ ulangan 2	93
Gambar L5.7	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₁ B ₂ ulangan 1	94
Gambar L5.8	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₁ B ₂ ulangan 2	95
Gambar L5.9	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₂ B ₂ ulangan 1	96
Gambar L5.10	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₂ B ₂ ulangan 2	97
Gambar L5.11	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₃ B ₂ ulangan 1	98
Gambar L5.12	Kromatogram bioetanol perlakuan A ₃ B ₂ ulangan 2	99
Gambar L6.1	Stok <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
Gambar L6.2	Hasil regenerasi <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
Gambar L6.3	Inokulum <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
Gambar L6.4	Air kelapa	100
Gambar L6.5	Tetes tebu	100
Gambar L6.6	Fermentasi bioetanol	100
Gambar L6.7	Proses destilasi bioetanol	101
Gambar L6.8	Produk bioetanol	101
Gambar L6.9	Hasil analisis gula dengan metode sulfat fenol	101
Gambar L6.10	Hasil perhitungan sel khamir dengan metode TPC	101

ABSTRAK

Pratama, S. A. 2020. **Pengaruh Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Limbah Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu Menggunakan Khamir *Saccharomyces cerevisiae***. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: Anik Maunatin, S.T., M.P, Ahmad Hanapi, M.Sc, dan Dewi Yuliani, M.Si

Kata Kunci: bioetanol, air kelapa, fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae*

Ketersediaan bahan bakar fosil yang semakin berkurang merupakan masalah umum di bidang energi. Salah satu produk energi alternatif yang berpeluang untuk dikembangkan adalah bioetanol. Bioetanol dapat diproduksi melalui fermentasi pada media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Hal tersebut dikarenakan terdapat kandungan gula pada air kelapa dan tetes tebu yang dapat dikonversi menjadi bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi dalam produksi bioetanol dari air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

Penelitian ini bersifat kuantitatif menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari dua faktor, yaitu penambahan *yeast extract* (0, 2, dan 4 g/L) dan lama fermentasi (2 dan 3 hari). Bioetanol yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan metode destilasi fraksional dan dianalisis kadarnya menggunakan kromatografi gas. Kadar total gula dianalisis dengan metode sulfat fenol, sedangkan viabilitas khamir dianalisis dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Two Way Anova* dan jika terdapat pengaruh yang signifikan, maka analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ).

Kadar bioetanol dan *yield* tertinggi yaitu 12,301 dan 80,127% dihasilkan pada perlakuan penambahan *yeast extract* 2 g/L dan lama fermentasi 2 hari. Kadar bioetanol dan *yield* terendah yaitu 1,339 dan 8,343% dihasilkan pada perlakuan penambahan *yeast extract* 4 g/L dan lama fermentasi 3 hari. Hasil uji statistik menunjukkan baik penambahan *yeast extract* maupun lama fermentasi memiliki pengaruh yang signifikan ($\text{sig} < \alpha$) terhadap bioetanol yang dihasilkan.

ABSTRACT

Pratama, S. A. 2020. **The Effect of Yeast Extract Addition and Fermentation Period on Bioethanol Production from Coconut Water Waste Added with Molasses Using *Saccharomyces cerevisiae* Yeast.** Undergraduate Thesis. Department of Chemistry, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisors: Anik Maunatin, S.T., M.P, Ahmad Hanapi, M.Sc, and Dewi Yuliani, M.Si

Key words: bioethanol, coconut water, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

Scarcity of fossil fuel is a common problem in the energy sector. One of alternative energy that has opportunity to be developed is bioethanol. Bioethanol can be produced through fermentation on coconut water media added with molasses using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. It was because there were sugar content on coconut water and molasses which could be converted into bioethanol. This research was aimed to determined the effect of yeast extract addition and fermentation period on bioethanol production from coconut water waste added with molasses using *Saccharomyces cerevisiae* yeast.

This research was classified as quantitative research using Randomized Group Design (RGD) which consist of two factors, yeast extract addition (0, 2, and 4 g/L) and fermentation period (2 and 3 days). Bioethanol product was then separated by fractional distillation method and bioethanol level was analyzed using gas chromatography. Total sugar content was analyzed using phenol sulfate method while viability of yeast was analyzed using Total Plate Count (TPC) method. The data obtained were analyzed using Two Way Anova, and if there were significant influences so the test would be followed by Honestly Significant Difference (HSD) test.

The highest level of bioethanol and yield was 12.301 and 80.127% produced in the treatment of 2 g/L yeast extract addition and 2 days fermentation period. The lowest level of bioethanol and yield was 1.339 and 8.334% produced in the treatment of 4 g/L yeast extract addition and 3 days fermentation period. Statistical test results showed that both yeast extract addition and fermentation period have significant effect ($\text{sig} < \alpha$) on the bioethanol produced.

مستخلص البحث

فاراتاما، س. أ. 2020. أثر إضافة مستخلص الخميرة والتخمير القديم ضد إنتاج الإيثانول الحيوي من ماء جوز الهند المضافة بواسطة قطرات من قصب السكر باستخدام *Saccharomyces cerevisiae*. تقرير نتائج البحوث. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: أنيك ماوناتين، الماجستير، أحمد هاناني، الماجستير، وديوي يولياني، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: الإيثانول الحيوي، ماء جوز الهند، التخمير، *Saccharomyces cerevisiae*

ويشكل انخفاض توافر الوقود الأحفوري مشكلة شائعة في مجال الطاقة. واحدة من منتجات الطاقة البديلة الأكثر احتمالاً لتطوير هو الإيثانول الحيوي. يمكن إنتاج الإيثانول الحيوي من خلال التخمير في وسائط ماء جوز الهند التي أضافت قطرات من قصب السكر باستخدام الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*. وذلك بسبب محتوى السكر في ماء جوز الهند وقطرات من قصب السكر التي يمكن تحويلها إلى الإيثانول الحيوي. يهدف هذا البحث إلى تحديد تأثير إضافة مستخلص الخميرة والتخمير الطويل في إنتاج الإيثانول الحيوي من ماء جوز الهند الذي أضاف قطرات من قصب السكر باستخدام الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*.

هذا البحث هو البحث الكمي باستخدام خطة عشوائية المجموعة (RAK) تتكون من عاملين، هما إضافة مستخلص الخميرة (0، 2، و 4 g/L) ومدة التخمير (2 و 3 أيام). ثم يتم فصل الإيثانول الحيوي الذي تم الحصول عليه بواسطة طرق التقطير الكسري وتحليل المستويات باستخدام كروماتوغرافيا الغاز. يتم تحليل مستويات السكر الإجمالية عن طريق طريقة كبريتات الفينول، في حين يتم تحليل قابلية بقاء الخميرة من خلال طريقة إجمالي عدد الصفائح (TPC). يتم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها باستخدام طريقتين Anova ويتبعها اختبار الاختلاف الحقيقي بصدق (BNJ) إذا كان هناك تأثير كبير.

أعلى مستوى من الإيثانول الحيوي والعائد هو 12.301 و 80.127% في الاختلاف من إضافة استخراج الخميرة 2 g/L ومدة التخمير 2 أيام. أدنى مستوى الإيثانول الحيوي والعائد هو 1.339 و 8.343% في إضافة اختلاف من مستخلص الخميرة 4 g/L وفترة تخمير لمدة 3 أيام. وأظهرت نتائج الاختبارات الإحصائية على حد سواء إضافة مستخلص الخميرة والتخمير الطويل تعطي تأثير كبير (سيج > α) إلى الإيثانول الحيوي المنتجة.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ketersediaan bahan bakar fosil yang semakin berkurang merupakan masalah umum di bidang energi. Sebagai upaya untuk menangani hal tersebut, penelitian tentang sumber energi terbarukan terus dikembangkan (Suprianto, dkk., 2016). Salah satu produk energi terbarukan yang memiliki peluang untuk dikembangkan adalah bioetanol (Senam, 2009). Menurut Salim, dkk. (2015), beberapa kelebihan bioetanol daripada energi alternatif lainnya, antara lain terbuat dari bahan-bahan alam yang mudah diperoleh, bernilai oktan tinggi, memiliki emisi gas CO yang rendah (19-25%), dan ramah lingkungan.

Bioetanol secara umum terbuat dari bahan-bahan yang mengandung gula, contohnya air kelapa tua (Malle, dkk., 2014). Air kelapa tua merupakan produk samping pengolahan buah kelapa tua yang sering dibuang sebagai limbah ke lingkungan. Adanya pembuangan limbah air kelapa ke lingkungan berpotensi menimbulkan polusi asam asetat yang disebabkan oleh terfermentasinya limbah air kelapa oleh mikroorganisme yang terdapat di lingkungan. Polusi asam asetat tersebut dapat menyebabkan bau tidak sedap sehingga mengganggu keberlangsungan kehidupan ekosistem (Reynad, 2017).

Limbah air kelapa tua dapat difermentasi menjadi bioetanol sehingga dapat meminimalisir terjadinya pencemaran lingkungan. Allah SWT menganjurkan manusia untuk memelihara lingkungan dan menjaga keseimbangan alam melalui firman-Nya dalam QS. Al A'raf ayat 56 sebagai berikut:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا ۚ إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya: “Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik” (QS. Al A’raf (7): 56).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa sebagai khalifah di muka bumi, manusia yang diberikan hak oleh Allah SWT untuk mengelola sumber daya alam hendaknya tidak melakukan kegiatan-kegiatan yang dapat menyebabkan pencemaran lingkungan (Ramli, dkk., 2015). Pembuangan limbah air kelapa yang dibuang ke lingkungan secara langsung dapat mengakibatkan terjadinya polusi asam asetat yang mencemari lingkungan (Reynad, 2017). Hal tersebut dapat diantisipasi dengan memanfaatkan limbah air kelapa untuk produksi bioetanol melalui fermentasi.

Child dan Nathanael (2016) menyebutkan air kelapa umumnya mengandung maksimal 4% gula, yang terdiri dari glukosa, fruktosa, sukrosa, maltosa, dan xilosa. Adanya kandungan gula tersebut menyebabkan air kelapa dapat digunakan sebagai bahan baku pada produksi bioetanol melalui proses fermentasi. Untuk mengoptimasi produksi bioetanol pada media air kelapa, salah satu cara yang dapat digunakan adalah dilakukan kombinasi substrat, contohnya dengan ditambahkan bahan lain yang memiliki kandungan gula tinggi, seperti tetes tebu. Menurut Toharisman dan Santosa (2009), tetes tebu mengandung 54% gula, yang terdiri dari sukrosa, fruktosa, glukosa, maltosa, dan xilosa. Hasil penelitian Ningsih (2009) dan Hartina, dkk. (2014) menyebutkan bahwa dalam produksi bioetanol, konsentrasi tetes tebu yang optimal digunakan adalah 20% brix. Hal tersebut dikarenakan terlalu tingginya kadar gula pada tetes tebu yang digunakan

pada fermentasi bioetanol menggunakan mikroorganisme dapat menyebabkan mikroorganisme mengalami tekanan osmotik yang tinggi sehingga mempengaruhi kinerjanya dalam fermentasi (Fakrudin, dkk., 2012).

Mikroorganisme yang dapat digunakan dalam produksi bioetanol bermacam-macam. Salah satunya adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* dapat melakukan fermentasi bioetanol secara anaerobik pada media yang mengandung gula, contohnya tetes tebu, air nipah, air kelapa, dan lain-lain (Sumerta dan Atit, 2017). Hartina, dkk. (2014) menambahkan *Saccharomyces cerevisiae* secara optimal dapat digunakan dalam produksi bioetanol dikarenakan bersifat fermentatif kuat dan resisten terhadap kadar bioetanol yang tinggi.

Efektivitas produksi bioetanol dapat dipengaruhi oleh lama fermentasi dan konsentrasi penambahan nutrisi mikroorganisme yang digunakan dalam produksi bioetanol (Fakrudin, dkk., 2012). Hasil penelitian Wulandari dan Budi (2015) menyebutkan bahwa bioetanol dengan kadar 1,89% secara optimal diproduksi pada media air kelapa oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan lama fermentasi 2 hari. Selain itu, hasil penelitian Tompang dan Nurul (2015) menunjukkan bahwa produksi bioetanol pada media air kelapa tua dengan hasil optimal sebesar 1,48% oleh *Saccharomyces cerevisiae* diperoleh pada lama fermentasi 2 hari dan pH 5,5. Andari, dkk. (2015) dalam hasil penelitiannya menambahkan bioetanol dengan kadar 0,55% dapat diproduksi dari air kelapa menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan penambahan nutrisi berupa urea 0,1 g/L dan lama fermentasi 4 hari.

Salah satu nutrisi yang dapat digunakan untuk mengoptimasi produksi bioetanol adalah *yeast extract* (Loureiro dan Malfeito, 2003). Secara umum, *yeast extract* memiliki kandungan nitrogen 11,4% (Frecdke, dkk., 2017). Menurut Pham, dkk. (2010), kandungan nitrogen dalam *yeast extract* dapat membantu proses biosintesis sel dan meningkatkan kinerja suatu mikroorganisme dalam menghasilkan produk-produk fermentasi, contohnya bioetanol.

Hasil penelitian Sheikh, dkk. (2016) menyebutkan penambahan *yeast extract* 2 g/L sebagai penambah nutrisi dapat mengoptimasi produksi bioetanol dari kulit kentang menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan lama fermentasi 4 hari sehingga diperoleh bioetanol dengan kadar optimal 2,83%, sedangkan jika tanpa penambahan *yeast extract* hanya dihasilkan bioetanol 2,17%. Selain itu, hasil penelitian Duhan, dkk. (2013) menyatakan penambahan *yeast extract* 2 g/L sebagai penambah nutrisi dapat mengoptimasi produksi bioetanol dari umbi kentang menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan lama fermentasi 2 hari sehingga diperoleh bioetanol dengan kadar optimal 7,11%, sedangkan jika tanpa penambahan *yeast extract* hanya diperoleh 6,10% bioetanol. Hasil penelitian Laopaibon, dkk. (2009) juga menyatakan bahwa penambahan *yeast extract* 3 g/L sebagai penambah nutrisi dapat mengoptimasi produksi bioetanol dari sari sorgum menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan lama fermentasi 3 hari sehingga diperoleh bioetanol dengan kadar 5,68%.

Pemisahan produk bioetanol dari media fermentasi dapat dilakukan melalui metode destilasi fraksional. Dalam penggunaan metode tersebut, terdapat keseimbangan uap-cair sehingga pemisahan bioetanol dapat terjadi secara optimal (Hartina, dkk., 2014). Analisis kadar bioetanol yang dihasilkan dapat dilakukan

menggunakan kromatografi gas. Kadar bioetanol ditentukan melalui perhitungan luas puncak area pada hasil kromatogram (Wulandari dan Budi, 2015).

Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan, mengingat masih terdapat kandungan gula pada air kelapa dan dengan tujuan untuk memproduksi bioetanol melalui fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*, maka dalam penelitian ini dilakukan studi mengenai pengaruh penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi dalam produksi bioetanol pada media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah yang terdapat dalam penelitian ini adalah bagaimana pengaruh penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol pada media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol pada media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan tambahan informasi mengenai keefektifan penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi yang optimal dalam produksi bioetanol pada media air kelapa yang ditambahkan tetes

tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* sehingga dapat digunakan sebagai referensi bagi para peneliti selanjutnya.

1.5 Batasan Penelitian

Batasan masalah yang terdapat dalam penelitian ini, antara lain:

1. Limbah air kelapa yang digunakan adalah limbah air kelapa tua yang diperoleh di Pasar Landungsari, Kota Malang.
2. Tetes tebu diperoleh dari limbah Pabrik Gula Ngadirejo, Kabupaten Kediri.
3. Substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah air kelapa tua yang ditambahkan tetes tebu hingga 20% brix.
4. Proses fermentasi dilakukan menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.
5. Variasi yang digunakan adalah konsentrasi penambahan *yeast extract* pada media fermentasi (0, 2, dan 4 g/L) dan lama fermentasi (2 dan 3 hari).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Air Kelapa

Air kelapa merupakan cairan endosperm buah kelapa (*Cocos nucifera* L.) yang terbentuk mulai bulan ketiga masa pematangan buah kelapa. Kadar maksimum air kelapa umumnya dicapai pada bulan ke delapan masa pematangan buah kelapa (Satheesh dan Prasad, 2013). Pada buah kelapa tua, air kelapa adalah hasil samping pengolahan buah kelapa yang belum banyak dimanfaatkan dan umumnya dibuang ke lingkungan sebagai limbah. Adanya pembuangan limbah air kelapa tua ke lingkungan tersebut dapat menyebabkan polusi asam asetat dan mengganggu keberlangsungan kehidupan ekosistem (Reynad, 2017). Air dan buah kelapa tua ditampilkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Air dan buah kelapa tua (Yong, dkk., 2009)

Beberapa zat gizi yang terdapat dalam air kelapa, antara lain karbohidrat, lemak, vitamin, dan protein (Warisno, dkk., 2009). Kandungan gula rata-rata per 100 gram air kelapa adalah 4,41%. Kandungan gula tersebut terdiri dari sukrosa,

glukosa, fruktosa, maltosa, dan xilosa. Komposisi kimia air kelapa tua dirangkum pada Tabel 2.1. Selain komposisi kimia air kelapa tua, nilai pH dan total keasaman juga mempengaruhi sifat kimia air kelapa. Nilai pH air kelapa tua berkisar 6,0-6,5 per 100 mL air kelapa. Adanya kandungan asam-asam organik dalam air kelapa juga dapat mempengaruhi pH air kelapa tua (Yong, dkk., 2009).

Tabel 2.1 Komposisi kimia air kelapa tua (Yong, dkk., 2009)

Komposisi	% (b/b)
Air	94,45
Minyak	0,15
Protein	0,52
Abu	0,47
Gula	
- Sukrosa	0,51
- Glukosa	1,48
- Fruktosa	1,43
- Maltosa dan xilosa	0,99

Air kelapa tua memiliki beberapa manfaat, antara lain untuk pembuatan minuman isotonik, media pertumbuhan mikroorganisme, obat-obatan, hadiah persembahan, vinegar, dan anti mikroba (Child dan Nathanael, 2016). Selain itu, air kelapa tua juga dapat digunakan sebagai media produksi bioetanol melalui fermentasi. Hal tersebut dikarenakan masih adanya kandungan gula dan nutrisi pada air kelapa tua (Satheesh dan Prasad, 2013).

2.2 Tetes Tebu (Molase)

Tetes tebu atau molase merupakan produk samping pada proses pengolahan gula dari tebu (Witono, 2003). Pada umumnya, tetes tebu memiliki pH 5,5, warna

coklat kehitaman, dan kepekatan yang tinggi dikarenakan tingginya kandungan gula. Warna coklat kehitaman pada tetes tebu disebabkan oleh adanya pigmen meladonin dan degradasi termal maupun kimiawi dari komponen penyusunnya selain gula (Harahap, 2003).

Kualitas tetes tebu dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain jenis tebu, lokasi penanaman, kondisi iklim tanam, kondisi penyimpanan, dan kesempurnaan cara pembersihan nira tebu. Secara fisik, kualitas tetes tebu dapat diketahui dari ada atau tidaknya buih yang terdapat dalam tetes tebu. Adanya buih yang terdapat dalam tetes tebu menunjukkan rendahnya kualitas tetes tebu yang dapat disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme (Puspitasari, 2008).

Tabel 2.2 Komposisi kimia tetes tebu (Toharisman dan Santosa, 2009)

Komposisi	% (b/b)
Air	20
Senyawa organik	
- Sukrosa	35
- Glukosa	7
- Fruktosa	9
- Maltosa dan xilosa	3
- Protein kasar	4
Senyawa anorganik	
- CuO	1,20
- K ₂ O	4,80
- MgO	0,98
- Na ₂ O	0,10
Fosfolipid dan sterol	0,40
Vitamin	
- Biotin (H)	2
- Kolin (B ₄)	8,02
- Riboflavin (B ₂)	2,5
- Piroksidin (B ₆)	2

Kandungan gula yang tinggi pada tetes tebu merupakan faktor utama yang menyebabkan tetes tebu berpotensi untuk digunakan sebagai bahan baku proses fermentasi gula. Pada industri pangan, tetes tebu umumnya digunakan dalam proses pembuatan penyedap makanan mononatrium glutamat. Selain pada industri pangan, tetes tebu juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam proses produksi bioetanol. Dalam produksi bioetanol, tetes tebu juga dapat ditambahkan pada substrat yang lain untuk mengoptimasi produk fermentasi yang dihasilkan (Hidayat, dkk., 2006). Tetes tebu umumnya memiliki nilai % brix sebesar 90% dengan kandungan gula 40-55%. Komposisi kimia tetes tebu dirangkum pada Tabel 2.2 (Toharisman dan Santosa, 2009).

2.3 Etanol

Etanol adalah senyawa organik golongan alkohol rantai tunggal yang memiliki rumus kimia C_2H_5OH (Caballero, dkk., 2016). Etanol memiliki beberapa karakteristik, antara lain berwujud cair, tidak berwarna, volatil, mudah terbakar, dan larut dalam air (Anggraini, dkk., 2017). Sifat-sifat fisika etanol dirangkum pada Tabel 2.3 (Caballero, dkk., 2016).

Tabel 2.3 Sifat fisika etanol (Caballero, dkk., 2016)

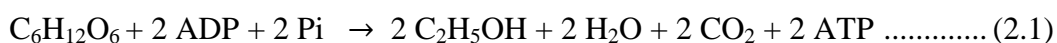
Sifat Fisika Etanol	
Titik beku	-114,1°C
Titik didih	78,32°C
Kelarutan dalam air pada 20°C	Sangat larut
Massa molekul relatif	46,07 g/mol
Densitas pada 20°C	0,7893 g/mol
Kalor penguapan pada 78,32°C	200,6 kal/g
Viskositas pada 20°C	1,17 cP
Kalor pembakaran pada 25°C	7092,1 kal/g
Kalor spesifik pada 20°C	0,579 kal/g

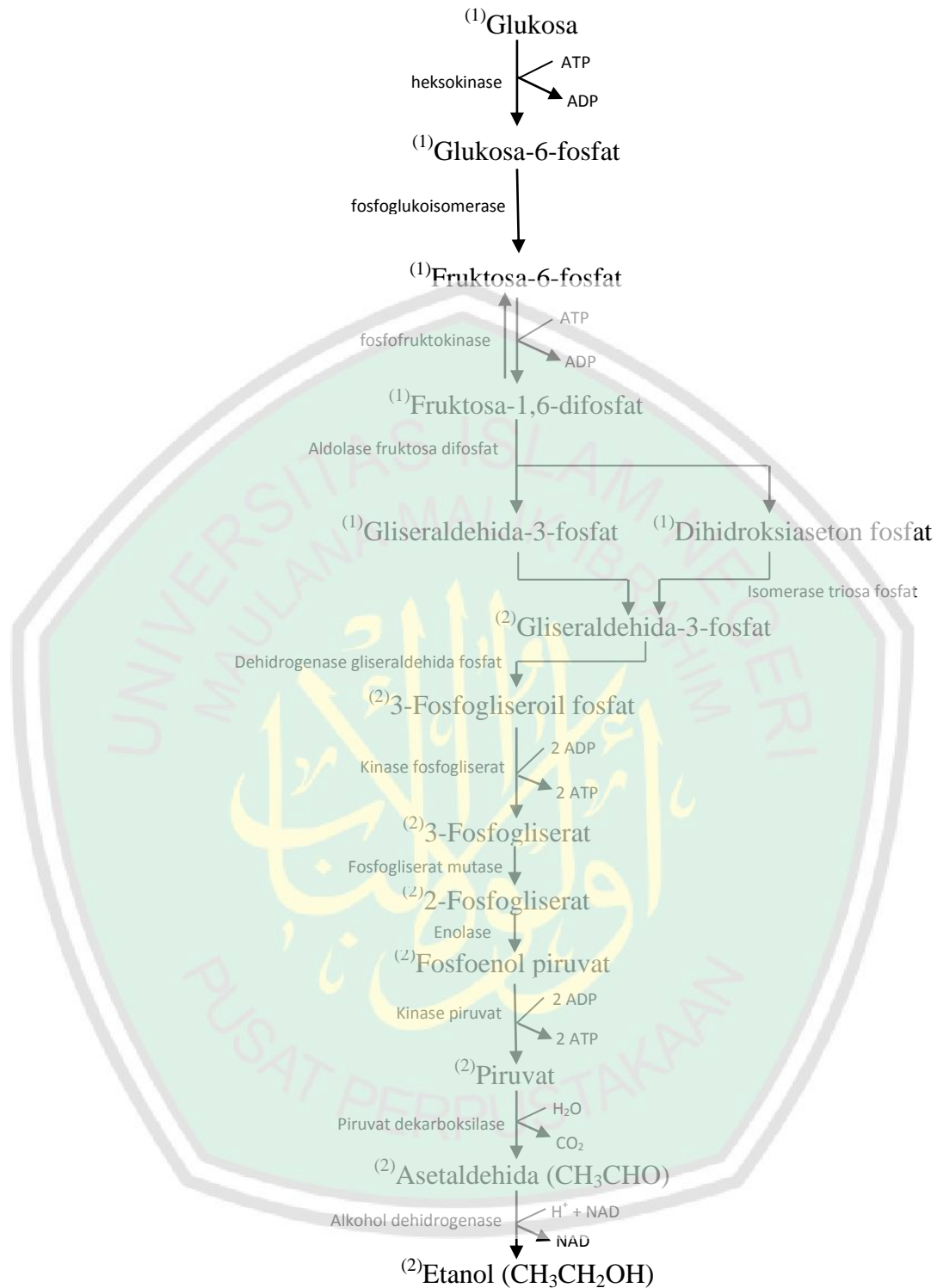
Berdasarkan bahan baku dan proses produksinya, etanol dibedakan menjadi dua, yaitu etanol sintesis dan bioetanol (etanol nabati). Etanol sintesis diproduksi secara sintesis dengan mereaksikan etana dan air pada tekanan dan suhu yang tinggi (300°C dan 70 atm). Berbeda dengan etanol sintesis, bioetanol diproduksi secara fermentatif menggunakan mikroorganisme dengan bahan baku yang mengandung gula (air kelapa, sorgum, tetes tebu, dan lain-lain) atau pati (jagung, singkong, dan umbi-umbian lain) (Richana, 2011).

2.3.1 Produksi Bioetanol secara Fermentatif

Bioetanol merupakan bahan bakar ramah lingkungan yang dapat diproduksi secara fermentatif dari bahan-bahan alam. Bioetanol dibedakan menjadi tiga golongan berdasarkan bahan baku produksinya. Golongan pertama adalah bioetanol yang diproduksi dari bahan-bahan yang memiliki banyak kandungan sukrosa (buah-buahan, tebu, dan sorgum) dan pati (jagung, gandum, padi, kentang, dan singkong). Golongan kedua adalah bioetanol yang diproduksi dari biomassa lignoselulosa, contohnya rumput-rumputan dan golongan tumbuhan berkayu. Golongan ketiga adalah bioetanol yang diproduksi dari biomassa alga (mikroalga dan makroalga) (Vohra, dkk., 2014).

Produksi bioetanol melalui fermentasi menggunakan mikroorganisme terdiri dari beberapa tahapan utama, yaitu preparasi substrat, fermentasi, pemisahan, dan purifikasi bioetanol. Secara umum, reaksi konversi gula menjadi etanol pada proses produksi bioetanol melalui fermentasi oleh mikroorganisme ditunjukkan pada persamaan 2.1 (Sheikh, dkk., 2016).





Gambar 2.2 Jalur biosintesis etanol (Cardona, dkk., 2010)

Proses biosintesis etanol menggunakan mikroorganisme dilakukan melalui beberapa tahapan. Tahapan pertama yaitu mikroorganisme akan mensekresi enzim

invertase untuk mengkonversi gula-gula non pereduksi pada substrat menjadi gula pereduksi. Setelah gula-gula pada substrat terkonversi menjadi gula pereduksi, tahapan biosintesis etanol akan memasuki jalur glikolisis. Pada tahap tersebut, glukosa dan fruktosa diubah menjadi asam piruvat. Asam piruvat yang telah dihasilkan selanjutnya mengalami dekarboksilasi menjadi asetaldehida dan asetaldehida didehidrogenasi menjadi etanol (Zhang dan David, 2014). Secara keseluruhan, tahapan proses biosintesis dalam produksi bioetanol ditampilkan pada Gambar 2.2 (Cardona, dkk., 2010).

Proses produksi bioetanol dapat dilakukan secara tertutup (*batch fermentation*), berkelanjutan (*continue fermentation*), dan setengah tertutup (*fed-batch fermentation*). Pada proses fermentasi tertutup, substrat ditambahkan di awal tanpa ada penambahan dan pengurangan substrat selama proses fermentasi. Fermentasi dengan menggunakan sistem tertutup merupakan sistem yang lebih sederhana dibandingkan sistem setengah tertutup dan berkelanjutan. Beberapa kelebihan dari sistem fermentasi tertutup, yaitu lebih mudah dikontrol dan fleksibel untuk beberapa produk spesifik (Azhar, dkk., 2017).

Proses fermentasi dengan sistem berkelanjutan dilakukan dengan penambahan substrat, media kultur, dan nutrisi secara berkelanjutan ke dalam bioreaktor yang mengandung inokulum mikroorganisme. Volume kultur dalam sistem fermentasi berkelanjutan harus diatur konstan dan produk fermentasi diambil secara terus menerus dari media. Berbagai jenis produk dapat diperoleh dari bagian atas bioreaktor, seperti etanol, sel, dan sisa gula. Kelebihan dari sistem fermentasi berkelanjutan adalah memiliki produktivitas yang tinggi, volume

bioreaktor yang lebih kecil, dan biaya investasi dan operasional yang murah (Azhar, dkk., 2017).

Fermentasi dengan sistem setengah tertutup merupakan kombinasi sistem tertutup dan kontinyu. Pada sistem setengah tertutup terdapat penambahan substrat tanpa adanya pengurangan produk pada fermentor. Beberapa kelebihan dari sistem fermentasi setengah tertutup, antara lain memiliki tingkat produktivitas tinggi, waktu fermentasi yang cepat, dan efek toksisitas yang lebih rendah pada media dibandingkan dengan sistem tertutup ataupun kontinyu (Azhar, dkk., 2017).

2.3.2 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Bioetanol

Produksi bioetanol melalui fermentasi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Masing-masing faktor memberikan pengaruh yang berbeda pada produksi bioetanol, namun pengaruh yang diberikan masih berkaitan satu sama lain. Faktor-faktor tersebut, antara lain jenis substrat dan mikroorganisme, konsentrasi inokulum, pH (keasaman), suhu, penambahan nutrisi, dan lama fermentasi. Pengaruh dari berbagai faktor tersebut terhadap proses produksi bioetanol dijelaskan di bawah ini (Fakrudin, dkk., 2012).

1. Jenis substrat

Subtrat yang biasa digunakan dalam produksi bioetanol merupakan bahan-bahan yang murah dan mudah diperoleh (Tesfaw dan Fassil, 2014). Beberapa jenis substrat yang dapat digunakan dalam produksi bioetanol, diantaranya bahan-bahan yang mengandung sukrosa, glukosa, pati, lignoselulosa, dan alga. Perbedaan substrat dapat mempengaruhi konsentrasi produk bioetanol yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang sama (Azhar, dkk., 2017). Hasil

penelitian Bharti dan Madhulika (2016) menunjukkan bioetanol dapat diproduksi oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan kadar 9,9% pada substrat singkong dan 13,6% pada substrat kulit biji kopi. Substrat yang digunakan dalam produksi bioetanol juga dapat dikombinasikan dengan substrat yang lain. Hasil penelitian Rivera, dkk. (2015) menunjukkan bioetanol dapat diproduksi dari campuran hidrolisat ampas tebu dan tetes tebu dengan hasil optimal dihasilkan 41,4% bioetanol pada lama fermentasi 42 Jam.

2. Jenis mikroorganisme

Bioetanol dapat diproduksi melalui fermentasi menggunakan berbagai jenis mikroorganisme (Mushlihah, 2011). Beberapa mikroorganisme yang umum digunakan dalam produksi bioetanol, seperti khamir *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces elipsoides*, *Saccharomyces kudriavzevii* (Lopez, dkk., 2009), dan bakteri *Zymomonas mobilis* (Faizah, 2012). Selain khamir dan bakteri, produksi bioetanol juga dapat menggunakan jamur, diantaranya *Pichia kudriavzevii*, *Candida gabrata*, *Torulasporea globosa*, dan *Kodamaea ohmeri* (Sumerta dan Atit, 2017).

3. Konsentrasi inokulum

Konsentrasi inokulum yang tepat dapat menghasilkan produk bioetanol yang optimal. Ketepatan konsentrasi inokulum dapat dipengaruhi oleh substrat dan jenis mikroorganisme dalam produksi bioetanol (Wanderley, dkk., 2014). Neelakandan dan Usharani (2009) dalam hasil penelitiannya menunjukkan bahwa bioetanol 8,8% dihasilkan dari sari jambu mente diproduksi secara optimal pada perlakuan konsentrasi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 10%

(v/v). Kadar bioetanol yang dihasilkan tersebut lebih tinggi daripada perlakuan konsentrasi inokulum 2, 4, 6, dan 8% (v/v).

4. pH

Nilai pH yang terlalu basa atau asam dapat menghambat fermentasi bioetanol dan menurunkan jumlah produk bioetanol yang dihasilkan. Pada pH yang terlalu tinggi, laju fermentasi akan menurun dikarenakan enzim-enzim yang dihasilkan oleh khamir untuk memproduksi bioetanol mengalami denaturasi. Jika pH fermentasi terlalu rendah, maka produksi bioetanol akan menurun dikarenakan nilai pH yang rendah dapat menyebabkan enzim-enzim yang dihasilkan oleh khamir untuk memproduksi bioetanol menjadi inaktif. pH optimum pada proses produksi bioetanol melalui fermentasi, yaitu 4,5-6,0 (Anggraini, dkk., 2017). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Tompang dan Nurul (2015) yang menunjukkan bioetanol dengan kadar 1,48% secara optimal dapat dihasilkan melalui fermentasi air kelapa tua oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada pH 5,5.

5. Suhu

Salah satu faktor penting dalam produksi bioetanol yang berpengaruh pada tingkat keakuratan adalah suhu (Pham, 2009). Secara umum, suhu optimal yang dibutuhkan untuk produksi bioetanol menggunakan khamir adalah 28-32°C, sedangkan di luar kisaran suhu tersebut maka kadar produk bioetanol yang dihasilkan akan lebih rendah (Lopez, dkk., 2009). Hasil penelitian Tompang dan Nurul (2015) menyebutkan kadar bioetanol yang dihasilkan pada fermentasi air kelapa tua dengan suhu 50°C oleh *Saccharomyces cerevisiae*

lebih rendah daripada perlakuan suhu 30 dan 40°C, sedangkan kadar bioetanol yang dihasilkan pada suhu 30 dan 40°C tidak berbeda nyata satu sama lain.

6. Nutrisi

Produksi bioetanol dapat dioptimasi melalui penambahan nutrisi yang dapat digunakan pada proses pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme yang digunakan, antara lain unsur C, P, N, vitamin, dan mineral. Beberapa sumber nutrisi yang digunakan untuk mengoptimasi produksi bioetanol, antara lain urea, vitamin B kompleks, amonium sulfat, kalsium fosfat (Utama, dkk., 2016), *yeast extract*, dan pepton (Duhan, dkk., 2013). Penambahan nutrisi tersebut berfungsi membantu proses sintesis protein dalam sel sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas sel dalam memproduksi bioetanol (Putri, dkk., 2016). Duhan, dkk. (2013) menyebutkan penambahan *yeast extract* 2 g/L sebagai penambah nutrisi dapat mengoptimasi produksi bioetanol dari umbi kentang menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan lama fermentasi 2 hari sehingga diperoleh bioetanol dengan kadar optimal 7,11%, jika tanpa penambahan *yeast extract* hanya diperoleh 6,10% bioetanol. Hal tersebut dikarenakan *yeast extract* mengandung sekitar 10-12% nitrogen sehingga dapat memaksimalkan pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (Utami, dkk., 2017).

7. Lama fermentasi

Lama fermentasi yang dibutuhkan mikroorganisme menghasilkan bioetanol berbeda-beda. Bioetanol secara optimal dihasilkan oleh mikroorganisme pada fase logaritmik (Anggraini, dkk., 2017). Produksi bioetanol umumnya membutuhkan waktu 30-96 jam (Loureiro dan Malfeito, 2003). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Tompong dan Nurul (2015) yang menunjukkan

produksi bioetanol dari air kelapa tua optimal dihasilkan 1,48% bioetanol pada pH 5,5 dan lama fermentasi 2 hari.

2.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir anaerob berukuran 5–10 μm , berwarna putih, berbentuk bulat (Setyowati dan Deswaty, 2007). *Saccharomyces cerevisiae* adalah mikroorganisme golongan ascomycota yang tidak memiliki hifa dan tubuh buah. Bentuk fisik *Saccharomyces cerevisiae* ditampilkan pada Gambar 2.3. Klasifikasi *Saccharomyces cerevisiae* adalah sebagai berikut (Ahmad, 2005):

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Ascomycota
Kelas	: Saccharomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Famili	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Saccharomyces</i>
Spesies	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

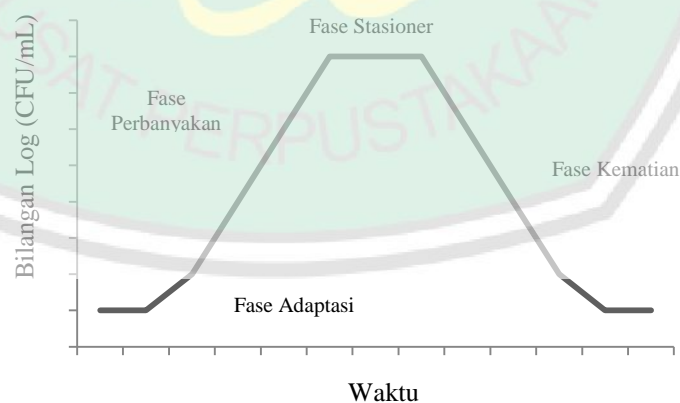


Gambar 2.3 *Saccharomyces cerevisiae* (Setiowati dan Deswaty, 2007)

Cara reproduksi *Saccharomyces cerevisiae* adalah dengan membelah diri. Hal tersebut sangat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan dan ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan dalam pertumbuhan sel (Ahmad, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim invertase dan zimase sehingga dapat

memproduksi bioetanol melalui fermentasi beberapa jenis gula, seperti glukosa, sukrosa, maltosa, galaktosa, dekstrosa, raffinosa, dan trehalosa. Jika substrat yang digunakan mengandung gula golongan disakarida, maka gula tersebut akan dihidrolisis oleh enzim invertase membentuk monosakarida. Monosakarida yang diperoleh selanjutnya dikonversi oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi bioetanol oleh enzim zimase yang dihasilkan (Azizah, dkk., 2012).

Saccharomyces cerevisiae adalah khamir yang biasa digunakan dalam produksi bioetanol. Hal tersebut dikarenakan *Saccharomyces cerevisiae* memiliki laju pertumbuhan dan fermentasi yang cepat, resisten terhadap konsentrasi gula yang tinggi (13-20%), pH optimum fermentasi rendah, dan suhu optimum fermentasi merupakan suhu ruang (28-32°C) (Anggraini, dkk., 2017). Selain itu, Azhar, dkk. (2017) menambahkan *Saccharomyces cerevisiae* dapat ditumbuhkan secara sederhana pada media yang murah dan resisten terhadap konsentrasi etanol yang tinggi (> 40 g/L).



Gambar 2.4 Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (Kartz, 2005)

Saccharomyces cerevisiae menghasilkan bioetanol pada fase logaritmik (Anggraini, dkk., 2017). Secara umum, *Saccharomyces cerevisiae* memiliki fase pertumbuhan yang sama dengan mikroorganismenya lainnya yang terdiri dari empat fase, yaitu fase adaptasi, logaritmik, stasioner, dan kematian (Purwoko, 2007). Mula-mula, *Saccharomyces cerevisiae* beradaptasi di lingkungan yang baru pada masa awal inokulasi dengan mensintesis enzim yang diperlukan untuk memecah sumber makanan yang dibutuhkan. Pada tahapan ini tidak terdapat peningkatan jumlah populasi. Fase ini disebut dengan fase adaptasi. *Saccharomyces cerevisiae* kemudian memasuki fase logaritmik. Dalam fase tersebut, *Saccharomyces cerevisiae* mengalami pertumbuhan dan perkembangan yang cepat sehingga terdapat kenaikan garis pada kurva yang signifikan (Alsuhaime, dkk., 2012).

Fase selanjutnya adalah fase stasioner. Pada fase tersebut, pertumbuhan sel melambat dikarenakan adanya kuantitas yang sama antara jumlah sel yang hidup dan mati. *Saccharomyces cerevisiae* selanjutnya memasuki fase kematian. Fase tersebut ditandai dengan adanya penurunan garis pada kurva yang disebabkan oleh menurunnya jumlah sel hidup (Alsuhaime, dkk., 2012). Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* ditampilkan pada Gambar 2.4 (Kartz, 2005).

2.5 Pemisahan Bioetanol dengan Metode Destilasi Fraksional

Pemisahan produk bioetanol dari media fermentasi merupakan salah satu tahapan penting dalam produksi bioetanol. Metode pemisahan yang umum digunakan dalam pemisahan bioetanol dari media fermentasi adalah destilasi (Arman, dkk., 2014). Hal ini dikarenakan adanya perbedaan titik didih yang cukup besar antara air dan bioetanol sehingga memungkinkan bioetanol dapat dipisahkan

melalui destilasi (Marjoni, 2014). Proses pemurnian zat cair dari campurannya dalam proses destilasi dilakukan melalui penguapan kemudian diembunkan kembali dan ditampung sebagai destilat (Prasojo, dkk., 2006).

Salah satu metode destilasi adalah destilasi fraksional atau destilasi fraksinasi (Arman, dkk., 2014). Prinsip kerja dari destilasi fraksional adalah pemisahan senyawa berdasarkan titik didihnya dengan adanya refluks parsial yang memungkinkan terjadinya keseimbangan uap-cair. Semakin banyak atau semakin panjang kolom fraksional yang digunakan pada proses destilasi fraksional, maka semakin optimal pemisahannya (Hartina, dkk., 2014). Rangkaian alat destilasi fraksional ditampilkan pada Gambar 2.5 (Budiman, 2007).



Gambar 2.5 Alat destilasi fraksional (Budiman, 2007)

Alat-alat utama yang digunakan dalam destilasi fraksional, terdiri dari labu alas bulat yang berfungsi sebagai tempat sampel, kolom fraksional untuk pemisahan, kondensor untuk pengembun uap pada proses destilasi, dan tempat

penampung destilat. Untuk mengontrol suhu uap dalam proses destilasi digunakan termometer, sedangkan pemanas dalam destilasi dapat digunakan kompor listrik yang dapat diatur suhunya (Sukri, 1999).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses pemisahan bioetanol, antara lain suhu dan waktu destilasi. Kedua faktor tersebut berpengaruh pada kemurnian dan efisiensi etanol yang dihasilkan (Arman, dkk., 2014). Marjoni (2014) dalam hasil penelitiannya yang memproduksi bioetanol dan melakukan pemisahan dengan destilasi fraksional menunjukkan kadar etanol tertinggi (16,60%) dari fermentasi kulit ubi kayu menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* diperoleh pada suhu destilasi 78°C dan lama destilasi 2 jam.

2.6 Kromatografi Gas

Kromatografi gas merupakan suatu metode pemisahan senyawa berdasarkan distribusi antara fase gerak dan fase diam. Dalam kromatografi gas, fase diam dapat berupa zat cair atau padat, sedangkan fase geraknya adalah gas. Cara kerja pada kromatografi gas dimulai dengan diinjeksikan suatu sampel melalui sistem injeksi sampel yang suhu di dalamnya sudah diatur. Pada tahap selanjutnya, senyawa-senyawa dalam sampel tersebut akan diuapkan dan dialiri oleh gas pembawa menuju kolom. Zat terlarut akan teradsorpsi pada bagian atas fase diam. Sesuai dengan nilai koefisien partisi (K_D) masing-masing komponen, zat terlarut tersebut kemudian terelusi dengan laju rambatan masing-masing komponen menuju ke detektor (Flowlis, 2006).

Detektor kemudian mencatat sinyal-sinyal yang timbul akibat perbedaan konsentrasi dan laju elusi. Sinyal-sinyal yang telah dideteksi oleh detektor

tersebut selanjutnya diubah oleh rekorder menjadi kromatogram. Melalui pembacaan kromatogram yang dihasilkan, maka dapat diketahui kadar suatu senyawa dalam sampel (Flowlis, 2006).



Gambar 2.6 Instrumentasi kromatografi gas (Khopkar, 2014)

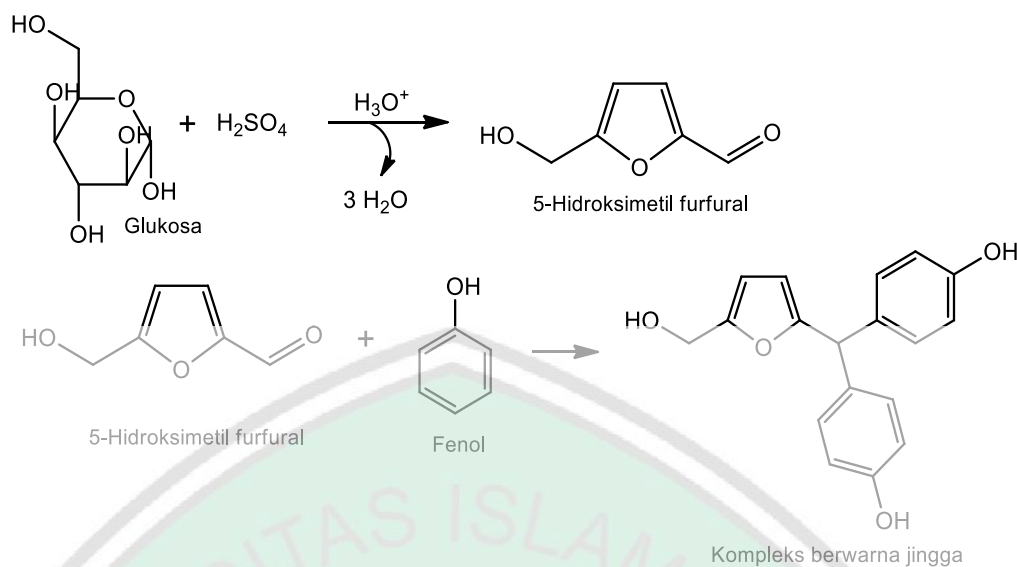
Instrumentasi kromatografi gas terdiri dari beberapa komponen penyusun, yaitu regulator aliran, sistem injeksi sampel, kolom, fase diam, detektor, dan rekorder. Rangkaian instrumentasi kromatografi gas ditampilkan pada Gambar 2.6 (Khopkar, 2014). Kromatografi gas dapat digunakan dalam analisis senyawa-senyawa volatil, salah satunya adalah bioetanol. Kadar bioetanol melalui analisis menggunakan kromatografi gas dapat ditentukan dengan dihitung luas area puncak bioetanol pada kromatogram (Tompang dan Nurul, 2015). Laju alir, temperatur, dan volume injeksi dioptimasi terlebih dahulu sebelum melakukan analisis sehingga tingkat kesalahan dapat diminimalisir menjadi kurang dari 0,4-0,7% untuk mendapatkan data kadar bioetanol yang valid (Quan, dkk., 2012).

Analisis kuantitatif menggunakan kromatografi gas terdiri dari dua metode, yaitu baku eksternal dan internal. Metode baku eksternal digunakan untuk

menganalisis sampel yang mengandung beberapa senyawa sehingga dibutuhkan standar yang banyak. Metode baku internal digunakan untuk analisis sampel yang mengandung senyawa signifikan (Gandjar dan Rohman, 2007). Secara umum, analisis kadar bioetanol dengan kromatografi gas menggunakan baku internal asetonitril. Dipilihnya asetonitril sebagai baku internal dikarenakan asetonitril merupakan senyawa yang stabil dan memiliki sifat-sifat fisika yang hampir sama dengan etanol tetapi berbeda secara kimiawi. Analisis kadar bioetanol dengan kromatografi gas dihasilkan dua puncak. Puncak yang pertama adalah puncak etanol, sedangkan puncak yang kedua adalah puncak asetonitril. Dalam metode ini dibutuhkan kurva standar etanol dalam penentuan kadar bioetanol yang dihasilkan (Iswanto, 2015).

2.7 Metode Sulfat Fenol

Metode sulfat fenol merupakan metode kolorimetri yang umum digunakan untuk mengukur total gula dalam sampel. Prinsip dari metode tersebut adalah gula yang terdapat pada sampel direaksikan dengan fenol dan asam sulfat pekat sehingga dihasilkan senyawa stabil furfural dengan warna jingga kekuningan (Albalasmeh, dkk., 2013). Dalam metode tersebut, asam sulfat pekat berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida menjadi monosakarida dan menghidrasinya menjadi senyawa 5-hidroksimetil furfural, lalu senyawa tersebut akan bereaksi dengan fenol membentuk senyawa kompleks berwarna jingga kekuningan (Qalsum, dkk., 2015). Reaksi pada metode sulfat fenol ditampilkan pada Gambar 2.7 (Gultom, 2001).



Gambar 2.7 Reaksi pada metode sulfat fenol (Gultom, 2001)

Analisis total gula dalam metode sulfat fenol membutuhkan kurva standar. Kurva standar merupakan plot hubungan antara absorbansi (sumbu y) dan konsentrasi (sumbu x) yang dibuat dengan menggunakan aturan Lambert-Beer sehingga berupa garis lurus. Kurva standar yang umum digunakan dalam analisis menggunakan metode sulfat fenol adalah kurva standar glukosa. Pembuatan kurva standar tersebut berfungsi untuk memperoleh persamaan linier sehingga dapat digunakan dalam perhitungan kadar total gula dalam sampel (Suhardjo, 2000).

Kompleks berwarna jingga hasil reaksi pada metode sulfat fenol dapat dianalisis pada daerah *visible* dengan panjang gelombang 480-490 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hal tersebut dikarenakan warna jingga pada senyawa kompleks yang dihasilkan merupakan warna komplementer yang optimum menyerap sinar pada panjang gelombang tersebut (Gultom, 2001). Data warna komplementer dan panjang gelombang serapan dirangkum pada Tabel 2.4 (Khopkar, 2014).

Tabel 2.4 Warna komplementer dan panjang gelombang serapan (Khopkar, 2014)

Panjang Gelombang (nm)	Warna yang Ditransmisikan	Warna Komplementer
380-435	Violet	Kuning kehijauan
435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru kehijauan	Jingga
490-500	Biru kehijauan	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Kuning kehijauan	Biru keunguan
580-595	Kuning	Biru
595-650	Jingga	Biru kehijauan
650-780	Merah	Hijau

2.8 Produksi Bioetanol dari Limbah Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu Menurut Perspektif Islam

Pemanfaatan limbah air kelapa dan tetes tebu untuk produksi bioetanol melalui fermentasi merupakan salah satu upaya konservatif lingkungan. Melalui hal tersebut, maka terjadinya kerusakan lingkungan dapat diminimalisir. Selain itu, bioetanol dapat digunakan sebagai bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan dan mudah diperoleh melalui fermentasi bahan-bahan alam yang mengandung gula (Khatiwada, 2010). Allah SWT berfirman sebagai berikut:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

Artinya: “Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar)” (QS. Ar Ruum (30): 41).

Berdasarkan tafsir Al Misbah, ayat di atas menjelaskan bahwa terjadinya berbagai kerusakan alam umumnya merupakan akibat dari perbuatan manusia. Manusia hendaknya menyadari hal tersebut. Manusia dianjurkan untuk segera menghentikan perbuatan-perbuatan yang merusak alam dan melakukan perbuatan-perbuatan baik yang bermanfaat untuk kelestarian alam (Shihab, 2002). Dalam

tafsir Fi Zhilahlil Qur'an juga disebutkan bahwa QS. Ar Ruum ayat 41 di atas mengisyaratkan kepada manusia untuk segera menghentikan perbuatan-perbuatan yang dapat merusak lingkungan (Quthb, 2000).

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَبْصَارِ ۝ ١٩٠
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ ۗ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا
 سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۝ ١٩١

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal. (Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia, mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka”* (QS. Ali Imran (3): 190-191).

QS. Ali Imran ayat 190-191 di atas berdasarkan tafsir Jalalayn menyebutkan bahwa manusia sebagai makhluk ulul albab hendaknya memikirkan tentang hikmah dari ciptaan Allah SWT (Al-Mahalli dan Jalaluddin, 2018). Berdasarkan tafsir Al-Kasyaf, istilah ulul albab dalam ayat di atas diartikan sebagai orang yang senantiasa menggunakan akal dan nalarnya untuk melihat, menyimpulkan, dan mengambil hikmah setiap ciptaan Allah SWT (Al-Zamakhsyari, 2008).

Penciptaan bumi dan segala isinya merupakan bentuk keagungan Allah SWT. Manusia sebagai makhluk ulul albab hendaknya menyadari bahwa semua yang diciptakan Allah SWT tidak ada yang sia-sia (Alfiyah, 2018). Salah satu contohnya yaitu air kelapa. Air kelapa secara umum digunakan dalam pembuatan minuman isotonik, obat-obatan, dan anti mikroba (Child dan Nathanael, 2016). Pengolahan limbah air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menjadi bioetanol melalui fermentasi merupakan bentuk eksplorasi manfaat dari ciptaan Allah SWT.

BAB III

METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Februari–Desember 2019 di Laboratorium Bioteknologi, Kimia Organik, dan Instrumentasi UV-Vis, Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Instrumentasi Kromatografi Gas, Jurusan Teknik Kimia, Politeknik Negeri Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, gelas arloji, labu ukur 10, 25, dan 100 mL, Erlenmeyer 100, 500, dan 1000 mL, gelas beaker 50, 100, dan 500 mL, bola hisap, pipet ukur 10 mL, cawan petri, gunting, plastik wrap, korek api, spirtus, jarum ose, spatula, pengaduk mekanis, autoklaf, oven, inkubator, aluminium foil, plastik, karet, tisu, mikropipet 100–1000 μL , *blue tip*, *microtube*, *sentrifuge*, penjepit, rak dan tabung reaksi, *hot plate*, *Laminar Air Flow*, spektrofotometer UV-Vis, dan kromatografi gas.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini adalah air kelapa tua, tetes tebu, khamir *Saccharomyces cerevisiae*, *yeast extract*, pepton, glukosa, agar, NaOH 7%, HCl 7%, NaCl 0,85%, akuades, alkohol 70%, fenol 5%, H₂SO₄ 98%, aluminium foil, dan tisu secukupnya.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi pada produksi bioetanol dari limbah air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Analisis dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) *Two Way ANOVA* dengan dua faktor sebagai variabel bebas, yaitu penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi. Variabel terikat yang digunakan, antara lain kadar etanol, total gula, dan total khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Percobaan ini dilakukan dengan tiga kali ulangan. Kombinasi penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi dirangkum pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kombinasi penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi

Konsentrasi <i>Yeast Extract</i> yang Ditambahkan	Lama Fermentasi	
	2 Hari (B ₁)	3 Hari (B ₂)
0 g/L (A ₁)	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂
2 g/L (A ₂)	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
4 g/L (A ₃)	A ₃ B ₁	A ₃ B ₂

Proses penelitian diawali dengan preparasi media fermentasi berupa air kelapa yang ditambahkan tetes tebu hingga 20% brix. Media yang telah dipreparasi selanjutnya ditambahkan *yeast extract* dengan variasi konsentrasi 0, 2, dan 4 g/L, lalu ditambahkan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* 10% dan difermentasi dengan variasi lama fermentasi 2 dan 3 hari. Hasil fermentasi selanjutnya didestilasi pada suhu 0-78°C dan destilat dianalisis kadar etanolnya

menggunakan kromatografi gas. Kadar total gula pada media fermentasi dianalisis menggunakan metode sulfat fenol dan total khamir *Saccharomyces cerevisiae* dianalisis menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan dari penelitian ini adalah:

1. Pembuatan media pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*
2. Regenerasi *Saccharomyces cerevisiae*
3. Pembuatan inokulum *Saccharomyces cerevisiae*
4. Pembuatan kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*
5. Preparasi media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu
6. Produksi bioetanol dengan variasi penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi
7. Pemisahan bioetanol dengan metode destilasi fraksional
8. Analisis kadar bioetanol menggunakan kromatografi gas
9. Analisis kadar total gula dengan metode sulfat fenol
10. Penentuan total khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan metode *Total Plate Count* (TPC)
11. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Pembuatan Media Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

3.5.1.1 Pembuatan Media YPGA (*Yeast Extract Peptone Glucose Agar*)

Media *Yeast Extract Peptone Glucose Agar* (YPGA) digunakan untuk regenerasi *Saccharomyces cerevisiae*. Beberapa bahan yang digunakan dalam pembuatan media YPGA, yaitu *yeast extract* 0,5 gram, pepton 1 gram, glukosa 2

gram, dan agar 3 gram. Bahan-bahan tersebut selanjutnya dilarutkan dengan akuades 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan yang diperoleh lalu dimasukkan masing-masing 6 mL ke tabung reaksi dan ditutup menggunakan kapas. Larutan selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 1 jam menggunakan autoklaf, lalu didinginkan hingga menjadi padat dalam keadaan miring (Saidi, dkk., 2015).

3.5.1.2 Pembuatan Media YPGB (*Yeast Extract Peptone Glucose Broth*)

Media *Yeast Extract Peptone Glucose Broth* (YPGB) digunakan pada pembuatan inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan media YPGB, yaitu *yeast extract* 1 gram, pepton 2 gram, dan glukosa 4 gram. Bahan-bahan tersebut selanjutnya dilarutkan dengan akuades 100 mL dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam botol kaca masing-masing 20 mL dan ditutup menggunakan kapas. Larutan selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C selama 1 jam (Saidi, dkk., 2015).

3.5.2 Regenerasi *Saccharomyces cerevisiae*

Khamir *Saccharomyces cerevisiae* diambil 2 ose dan diinokulasi pada media YPGA steril. Media YPGA yang telah diinokulasi tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diregenerasi tersebut digunakan untuk pembuatan inokulum (Hartina, dkk., 2014).

3.5.3 Pembuatan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan inokulum dilakukan dengan dipindahkan 2 ose *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diregenerasi ke dalam 20 mL media YPGB. Media YPGB yang telah berisi inokulum *Saccharomyces cerevisiae* tersebut diaduk pada kecepatan 150 rpm dan suhu ruang (28-32°C) sampai inokulum mencapai fase logaritmik. Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* tersebut selanjutnya digunakan untuk produksi bioetanol (Hartina, dkk., 2014).

3.5.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

Inokulum khamir *Saccharomyces cerevisiae* 25 mL diinokulasikan dalam 225 mL media YPGB. Pertumbuhan khamir diamati dengan cara diambil 4 mL suspensi khamir dan dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) berdasarkan nilai absorbansinya setiap 2 jam (waktu inkubasi 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, dan 24 jam). Pengukuran nilai OD dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan dengan dibuat plot antara lama inkubasi dan absorbansi yang dihasilkan (Hartina, dkk., 2014).

3.5.5 Preparasi Media Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu

Air kelapa dijernihkan dengan cara penyaringan hingga terpisah dengan residu yang ada. Air kelapa yang diperoleh kemudian ditambahkan tetes tebu hingga 20% brix. Nilai pH media tersebut diatur hingga 5,5. Media yang diperoleh kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 2 jam pada suhu 121°C. Media tersebut selanjutnya digunakan pada produksi bioetanol melalui

proses fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Analisis kadar total gula dilakukan menggunakan metode sulfat fenol (Tompang dan Nurul, 2015).

3.5.6 Produksi Bioetanol dengan Variasi Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi

Media air kelapa yang telah ditambahkan tetes tebu hasil preparasi sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 10 mL inokulum *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast extract* kemudian ditambahkan dengan variasi 0, 0,2, dan 0,4 gram, kemudian diaduk dengan pada suhu ruang menggunakan kecepatan 150 rpm dengan variasi lama fermentasi 2 dan 3 hari. Kadar total gula pada proses fermentasi dihitung menggunakan metode sulfat fenol, sedangkan produk bioetanol dipisahkan dari media fermentasi menggunakan metode destilasi fraksional.

3.5.7 Pemisahan Bioetanol dengan Metode Destilasi Fraksional

Sampel hasil fermentasi sebanyak 100 mL dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Labu alas bulat yang telah diisi sampel hasil fermentasi tersebut lalu dirangkai dengan alat destilasi fraksional. Destilasi dilakukan dengan suhu 0-78°C dan destilat ditampung dalam gelas ukur 50 mL. Destilat kemudian diukur kadar bioetanolnya menggunakan kromatografi gas (Chatchareya, dkk., 2007).

3.5.8 Analisis Kadar Bioetanol Menggunakan Kromatografi Gas

Masing-masing destilat hasil destilasi diambil 1 μ L dan diinjeksikan ke dalam alat kromatografi gas. Penentuan kadar bioetanol dilakukan dengan

dihitung luas puncak hasil kromatogram bioetanol. Analisis kadar bioetanol dilakukan dengan kondisi operasi sebagai berikut (Tompang dan Nurul, 2015):

Tipe alat	: Simadzu GC
Gas pembawa	: N ₂
Laju alir N ₂	: 30 mL/menit
Suhu injektor	: 250°C
Tekanan	: 100 kPa
Jenis kolom	: carbowax
Suhu kolom	: 250°C
Detektor	: FID

3.5.9 Analisis Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat Fenol

3.5.9.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan glukosa standar 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm diambil 2 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi. Masing-masing larutan glukosa tersebut ditambahkan larutan fenol 5% (*b/v*) sebanyak 1 mL, lalu dikocok. Ditambahkan 5 mL asam sulfat pekat dan diinkubasi selama 10 menit. Larutan selanjutnya dikocok hingga homogen dan ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit. Nilai Absorbansi larutan tersebut kemudian diukur pada panjang gelombang 490 nm menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis (Albalasmeh, dkk., 2013).

3.5.9.2 Penentuan Kadar Total Gula Media Sebelum dan Sesudah Fermentasi

Media sebelum atau sesudah fermentasi diambil 2 mL ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan fenol 5% (*b/v*) sebanyak 1 mL, lalu dikocok. Asam sulfat pekat 5 mL kemudian ditambahkan dan larutan dalam tabung reaksi diinkubasi selama 10 menit. Larutan tersebut selanjutnya dikocok hingga homogen dan ditempatkan dalam penangas air selama 15 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm (Albalasmeh, dkk., 2013).

3.5.10 Penentuan Total Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan Metode TPC

Sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi berbeda yang masing-masing berisi 9 mL NaCl 0,85% steril. Campuran tersebut kemudian dikocok hingga homogen dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}). Pengenceran tingkat kedua (10^{-2}) kemudian diperoleh dengan cara dipipet larutan dari tabung pertama sebanyak 1 mL ke dalam tabung kedua. Proses pengenceran dilanjutkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-9} . Masing-masing sampel yang sudah diencerkan melalui setiap pengenceran diambil 1 mL dan dimasukkan pada cawan petri yang berisi media YPGA steril. Media yang telah diinokulasi tersebut kemudian didiamkan hingga memadat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Perhitungan total khamir dilakukan menggunakan persamaan 3.1 (Anaukwu, dkk., 2015).

$$\text{Total khamir} = \text{jumlah koloni terhitung} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \text{ CFU} \dots\dots(3.1)$$

3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa kadar etanol, total gula, dan total khamir *Saccharomyces cerevisiae* dianalisis varian *Two Way ANOVA* untuk menguji adanya pengaruh variasi penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi. Analisis kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan taraf signifikansi 5%, jika terdapat perlakuan yang berbeda nyata.

BAB IV

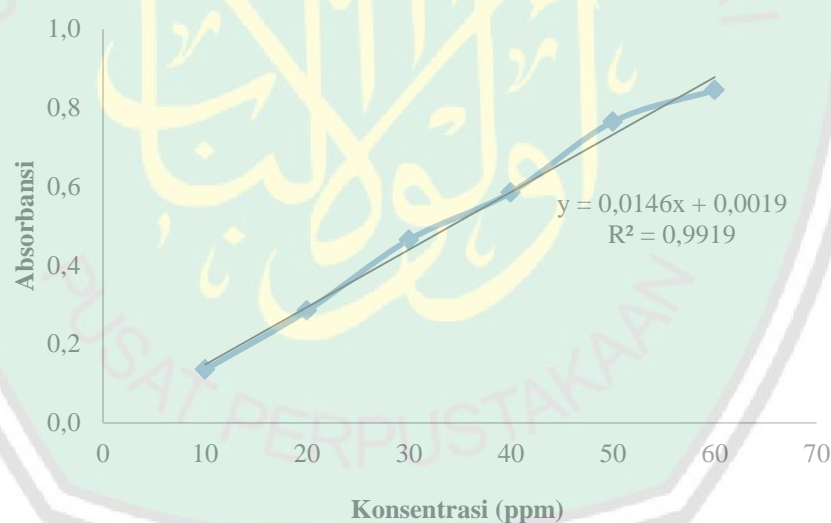
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Media Fermentasi

Air kelapa mengandung berbagai nutrisi yang dibutuhkan untuk perkembangan dan pertumbuhan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam memproduksi bioetanol, salah satunya yaitu gula sebagai sumber karbon. Selain gula, air kelapa memiliki kandungan mineral dan vitamin yang dapat berperan sebagai mikronutrien untuk mendukung kinerja *Saccharomyces cerevisiae* dalam memproduksi bioetanol, contohnya kalsium, magnesium, tiamin, riboflavin, niasin, asam folat, dan vitamin C (Yong, dkk., 2009). Dalam penelitian ini, air kelapa yang digunakan memiliki kadar gula 2,91%. Adanya kandungan gula yang rendah pada air kelapa dioptimalkan dengan ditambahkan tetes tebu yang memiliki kadar gula tinggi (50,605%).

Preparasi media fermentasi dilakukan dengan air kelapa ditambahkan tetes tebu hingga 20% brix. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi gula pada media fermentasi bioetanol yang terlalu tinggi ($> 20\%$ brix) dapat menyebabkan khamir mengalami tekanan osmotik sehingga mengurangi efisiensi kinerjanya dalam memproduksi bioetanol (Fakrudin, dkk., 2012). Nilai pH media fermentasi diatur hingga 5,5. Hal tersebut sesuai dengan Tompong dan Nurul (2015) yang menyebutkan bahwa pH optimum untuk produksi bioetanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* adalah 5,5. Kondisi pH media fermentasi sangat berpengaruh pada kinerja mikroorganisme dalam fermentasi.

Media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu yang telah dipreparasi kemudian ditambahkan *yeast extract* sebagai sumber nitrogen dengan konsentrasi 0, 2, dan 4 g/L. Pham, dkk. (2010) menyebutkan adanya kandungan nitrogen dalam *yeast extract* dapat membantu proses biosintesis sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga meningkatkan kinerjanya dalam fermentasi bioetanol. Media air kelapa yang ditambahkan tetes tebu sebelum difermentasi diukur kandungan total gulanya sehingga dapat diketahui jumlah konsumsi gula dalam proses fermentasi bioetanol. Pengukuran kadar total gula dilakukan menggunakan metode sulfat fenol dengan kurva standar glukosa. Kurva standar glukosa ditampilkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Kurva standar glukosa

Berdasarkan Gambar 4.1, kurva standar glukosa memiliki nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9919 yang menunjukkan tingkat linearitas yang tinggi, yang mana semakin tinggi absorbansi maka semakin tinggi konsentrasi glukosa.

Nilai R^2 pada kurva standar yang mendekati angka 1 menunjukkan korelasi yang tinggi antara kenaikan absorbansi dan konsentrasi glukosa (Riyanto, 2016). Persamaan linier berdasarkan kurva standar pada Gambar 4.1 di atas adalah $y = 0,0146x + 0,0019$. Persamaan tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar total gula media fermentasi. Data rata-rata kadar total gula media sebelum fermentasi dirangkum pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rata-rata kadar total gula media sebelum fermentasi

Perlakuan	Kadar Gula (%)
Air kelapa	2,910 ± 0,316
Tetes Tebu	50,605 ± 1,563
AK + TB + YE 0 g/L	14,139 ± 0,707
AK + TB + YE 2 g/L	15,185 ± 1,695
AK + TB + YE 4 g/L	15,495 ± 1,485

AK : Air Kelapa, TB : Tetes Tebu, YE : *Yeast Extract*

Berdasarkan Tabel 4.1, penambahan *yeast extract* dengan konsentrasi 2 dan 4 g/L mampu menambah kandungan total gula media fermentasi secara tidak signifikan. Hal tersebut dikarenakan dalam *yeast extract* juga terdapat karbohidrat sebanyak 8,21% sehingga dapat mempengaruhi hasil analisis kandungan total gula pada media fermentasi dengan metode sulfat fenol (Freedke, dkk., 2017). Berdasarkan Loureiro dan Malfeito (2003), *yeast extract* adalah sumber nitrogen sehingga penambahannya dengan konsentrasi yang rendah pada media fermentasi tidak memberikan perbedaan yang signifikan pada kandungan total gula media fermentasi. Nilai standar deviasi yang melebihi 5% menunjukkan adanya sebaran data yang kurang merata pada sampel yang dianalisis (Brown, 2002). Hal tersebut dimungkinkan karena adanya kendala teknis, seperti teknik pipetasi yang

kurang presisi dan adanya pemanasan yang kurang merata pada sampel yang dianalisis.

4.2 Regenerasi *Saccharomyces cerevisiae*

Regenerasi *Saccharomyces cerevisiae* dalam produksi bioetanol dilakukan untuk memperbarui nutrisi sehingga *Saccharomyces cerevisiae* akan tetap hidup. *Saccharomyces cerevisiae* diregenerasi pada media padat yang mengandung *yeast extract*, pepton, glukosa, dan agar (YPGA) steril. Selain itu, regenerasi *Saccharomyces cerevisiae* juga bertujuan untuk memelihara kestabilan genetik dari sel khamir (Pelczar dan Chan, 2008).

Regenerasi *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan waktu inkubasi selama 48 jam. Hal tersebut dikarenakan pada lama inkubasi 48 jam, *Saccharomyces cerevisiae* dimungkinkan berada pada fase logaritmik sehingga memiliki jumlah sel hidup yang tinggi (Hartina, dkk., 2014). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang memiliki bentuk fisik bulat, berkoloni, berwarna putih, dan tidak berbau (Pelczar dan Chan, 2008). Bentuk fisik khamir *Saccharomyces cerevisiae* hasil regenerasi ditampilkan pada Gambar 4.2.

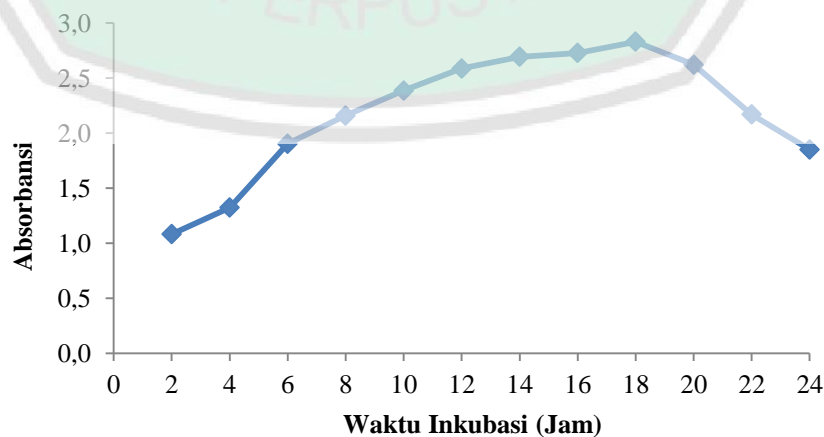


Gambar 4.2 *Saccharomyces cerevisiae* hasil regenerasi

4.3 Pembuatan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*

Inokulum merupakan biakan aktif dari *Saccharomyces cerevisiae* yang siap digunakan dalam proses fermentasi. Inokulum dibedakan menjadi dua, yaitu inokulum kerja dan inokulum induk. Inokulum induk dibuat dengan diinokulasi *Saccharomyces cerevisiae* hasil regenerasi pada media cair yang mengandung *yeast extract*, glukosa, dan pepton (YGPB) steril. Inokulum kerja dibuat melalui pengenceran inokulum induk pada media YGPB steril (Nugroho dan Dwi, 2018).

Penyetaraan tingkat kekeruhan melalui perhitungan nilai *Optical Density* (OD) menjadi 0,5 pada pembuatan inokulum kerja bertujuan untuk menyetarakan densitas dari suspensi *Saccharomyces cerevisiae* sehingga terdapat stabilitas jumlah sel yang digunakan dalam fermentasi. Panjang gelombang 600 nm digunakan dalam pengukuran nilai OD dikarenakan panjang gelombang tersebut dapat diserap oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* tanpa mengalami mutasi atau kerusakan sel (McBirney, dkk., 2016). Lama inkubasi pada pembuatan inokulum ditentukan melalui kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media YGPB yang ditampilkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

Hasil kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media YPGB pada Gambar 4.3 menunjukkan pembuatan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* optimal dilakukan selama 18 jam. Hal ini dikarenakan pada jam ke-18, *Saccharomyces cerevisiae* memiliki sel hidup paling tinggi. Berdasarkan Gambar 4.3, *Saccharomyces cerevisiae* berada pada fase logaritmik mulai jam ke-2 hingga jam ke-18 yang menunjukkan sel mengalami pertumbuhan dan perkembangan yang cepat ditandai dengan adanya kenaikan absorbansi yang dihasilkan. *Saccharomyces cerevisiae* kemudian mengalami fase stasioner, selanjutnya mulai jam ke-20 *Saccharomyces cerevisiae* mengalami fase kematian yang ditandai dengan adanya penurunan absorbansi yang disebabkan oleh jumlah sel hidup yang lebih sedikit daripada jumlah sel mati.

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Wardani dan Fenty (2013) dan Elevri dan Surya (2006) yang mengamati pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada media YPGB dan diperoleh bahwa *Saccharomyces cerevisiae* berada pada fase logaritmik pada jam ke-2 hingga jam ke-18, dan mengalami fase stasioner mulai jam ke-20. Hal tersebut juga hampir sama dengan Salari dan Rosita (2017) dalam hasil penelitiannya yang menunjukkan bahwa pada media YPGB, fase logaritmik dialami oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada jam ke-2 hingga jam ke-20, sedangkan pada jam ke-22 hingga jam ke-24, *Saccharomyces cerevisiae* mengalami fase stasioner.

4.4 Pengaruh Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu

Proses fermentasi dilakukan dengan variasi penambahan *yeast extract* sebanyak 0, 2, dan 4 g/L dan lama fermentasi selama 2 dan 3 hari. Bioetanol hasil

fermentasi dipisahkan melalui destilasi fraksional dan kadarnya dianalisis menggunakan kromatografi gas dengan metode baku internal asetonitril. Kadar bioetanol hasil analisis menggunakan kromatografi gas dirangkum pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar bioetanol

Perlakuan	Kadar Bioetanol (%)
A ₁ B ₁	9,651
A ₂ B ₁	12,301
A ₃ B ₁	6,849
A ₁ B ₂	3,247
A ₂ B ₂	4,611
A ₃ B ₂	1,339

A₁: yeast extract 0 g/L, A₂: yeast extract 2 g/L, A₃: yeast extract 4 g/L,
B₁: lama fermentasi 2 hari, B₂: lama fermentasi 3 hari

Berdasarkan Tabel 4.2, kadar bioetanol tertinggi diperoleh pada perlakuan A₂B₁ (penambahan yeast extract 2 g/L dan lama fermentasi 2 hari) yang menunjukkan perlakuan tersebut optimal digunakan dalam produksi bioetanol dari air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Kadar bioetanol pada lama fermentasi 2 hari yang tinggi menunjukkan *Saccharomyces cerevisiae* mengalami pertumbuhan dan perkembangan optimal sehingga dapat memproduksi bioetanol. Kadar bioetanol yang tinggi dengan penambahan yeast extract 2 g/L pada perlakuan A₂B₁ menunjukkan yeast extract yang ditambahkan sebagai sumber nitrogen pada konsentrasi tersebut dapat memaksimalkan proses sintesis sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga kinerjanya lebih optimal dalam memproduksi bioetanol (Laopaibon, dkk., 2009).

Berdasarkan Tabel 4.2, kadar bioetanol terendah pada penelitian ini diperoleh pada perlakuan A₃B₂ (penambahan yeast extract 4 g/L dan lama fermentasi 3 hari). Pada lama fermentasi 3 hari, nutrisi dalam media fermentasi

telah berkurang sehingga tidak mencukupi kebutuhan nutrisi yang dibutuhkan *Saccharomyces cerevisiae* untuk memproduksi bioetanol. Selain itu, pada lama fermentasi 3 hari, bioetanol yang telah diproduksi teroksidasi membentuk senyawa asam karboksilat yang dapat menyebabkan penurunan pH media fermentasi sehingga mengakibatkan kinerja *Saccharomyces cerevisiae* tidak optimal dalam memproduksi bioetanol (Prihandana, dkk., 2007). Adanya asam karboksilat yang terbentuk pada media fermentasi tidak terdeteksi pada kromatogram dikarenakan sebelum dilakukan analisis menggunakan kromatografi gas, bioetanol pada media fermentasi dipisahkan terlebih dahulu melalui metode destilasi fraksional. Prinsip kerja dari metode destilasi fraksional adalah pemisahan senyawa berdasarkan titik didihnya (Dutta, 2009). Menurut Bettelheim, dkk. (2009), selisih antara titik didih senyawa golongan asam karboksilat dan etanol cukup tinggi (titik didih senyawa golongan asam karboksilat $> 116^{\circ}\text{C}$, titik didih etanol $= 78^{\circ}\text{C}$) sehingga pemisahannya dapat terjadi secara optimal.

Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Malle, dkk. (2014) yang memproduksi bioetanol dari air kelapa menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dan diperoleh kadar optimal bioetanol pada lama fermentasi 2 hari sebanyak 1,17%, sedangkan pada lama fermentasi 3 hari terdapat penurunan kadar bioetanol hingga 0,75% yang disertai dengan penurunan pH hingga 4,15. Menurut Narendranath dan Ronan (2005), pH optimal *Saccharomyces cerevisiae* adalah 4,5-6,0. Nilai pH pada media fermentasi yang rendah akan menyebabkan kinerja enzim pada *Saccharomyces cerevisiae* dalam melakukan fermentasi tidak optimal atau strukturnya mengalami denaturasi (Suplatov, dkk., 2014).

Kadar bioetanol yang rendah pada penambahan *yeast extract* 4 g/L yang terdapat dalam perlakuan A₃B₂ dikarenakan adanya pengasaman pada media fermentasi. *Yeast extract* sebagai sumber nitrogen dikonsumsi oleh sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam bentuk asam amino bebas yang mana dalam jalur metabolismenya dihasilkan NH₄⁺ yang bersifat asam sebagai hasil samping (Ljungdahl dan Bertrand, 2012). Akumulasi molekul NH₄⁺ dengan jumlah yang banyak pada sel *Saccharomyces cerevisiae* menyebabkan ketidakseimbangan pH pada sel sehingga kinerjanya tidak optimal dalam memproduksi bioetanol (Judoamidjojo, dkk., 2009).

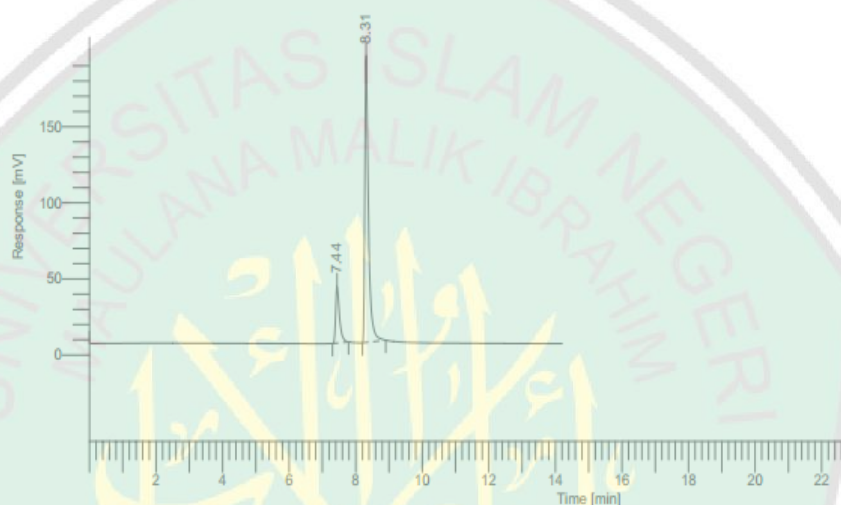
Hasil analisis *Two Way* ANOVA menunjukkan perlakuan lama fermentasi dan penambahan *yeast extract* memberikan pengaruh yang signifikan ($\text{sig} < \alpha$) terhadap kadar bioetanol. Hasil uji lanjut Beda Nyata Jujur (BNJ) menyebutkan perlakuan penambahan *yeast extract* 2 g/L menghasilkan kadar bioetanol yang berbeda nyata dengan perlakuan penambahan *yeast extract* 0 dan 4 g/L. Hal ini sesuai dengan Sheikh, dkk. (2016) dan Duhan, dkk. (2013) yang memproduksi bioetanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dan diperoleh kadar bioetanol tertinggi pada perlakuan penambahan *yeast extract* 2 g/L. Hasil uji BNJ pengaruh penambahan *yeast extract* terhadap kadar bioetanol dirangkum pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil uji BNJ penambahan *yeast extract* terhadap kadar bioetanol

Perlakuan	Kadar Bioetanol (%)
A ₃	4,094 ^a
A ₁	6,449 ^a
A ₂	8,456 ^b

A₁: *yeast extract* 0 g/L, A₂: *yeast extract* 2 g/L, A₃: *yeast extract* 4 g/L,
notasi yang berbeda (a dan b) menunjukkan perlakuan berbeda nyata

Hasil analisis *Two Way ANOVA* juga menyebutkan bahwa interaksi perlakuan penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi tidak berpengaruh signifikan ($\text{sig} > \alpha$) terhadap kadar bioetanol. Hal tersebut menunjukkan bahwa interaksi yang terjadi antara dua faktor (penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi) tidak mempengaruhi satu sama lain dalam produksi bioetanol (Tenaya, 2015).



Gambar 4.4 Kromatogram bioetanol

Hasil analisis kadar bioetanol menggunakan kromatografi gas menghasilkan kromatogram yang ditampilkan pada Gambar 4.4 dengan dua puncak, yaitu puncak etanol dan asetonitril pada waktu retensi sekitar 7,44 dan 8,31. Puncak etanol yang terletak di sebelah kiri puncak asetonitril dikarenakan titik didih etanol lebih rendah dari asetonitril (titik didih etanol = 78°C , titik didih asetonitril = 82°C) sehingga etanol terelusi lebih dahulu (Tompang dan Nurul, 2015). Hal tersebut sesuai dengan Iswanto (2015) yang menganalisis bioetanol menggunakan kromatografi gas metode baku internal asetonitril dan memperoleh dua puncak pada kromatogram, yaitu puncak bioetanol dan asetonitril pada waktu retensi 5,16

dan 6,09. Saidi, dkk. (2015) menganalisis bioetanol menggunakan kromatografi gas metode baku internal asetonitril juga diperoleh dua puncak pada kromatogram, yaitu puncak bioetanol dan asetonitril pada waktu retensi 6,02 dan 7,76. Perbedaan waktu retensi puncak etanol yang diperoleh tersebut dikarenakan perbedaan suhu yang digunakan dalam analisis menggunakan kromatografi gas.

4.5 Yield Bioetanol

Perhitungan *yield* bioetanol digunakan untuk mengetahui efisiensi fermentasi dalam proses produksi bioetanol. Semakin tinggi *yield* bioetanol menunjukkan semakin efisien proses fermentasi. Hasil perhitungan kadar gula terpakai selama proses fermentasi dan *yield* bioetanol dirangkum dalam Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Kadar bioetanol, gula terpakai, dan *yield*

Perlakuan	Kadar Bioetanol (%)	Kadar Gula Terpakai (%)	Yield (%)
A ₁ B ₁	9,651	13,138	75,102
A ₂ B ₁	12,301	15,328	80,127
A ₃ B ₁	6,849	14,964	43,639
A ₁ B ₂	3,247	13,000	24,116
A ₂ B ₂	4,611	14,321	30,110
A ₃ B ₂	1,339	14,839	8,343

A₁: yeast extract 0 g/L, A₂: yeast extract 2 g/L, A₃: yeast extract 4 g/L,
B₁: lama fermentasi 2 hari, B₂: lama fermentasi 3 hari

Hasil analisis *Two Way* ANOVA menunjukkan bahwa interaksi antara perlakuan penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi tidak memberikan pengaruh signifikan ($\text{sig} > \alpha$) terhadap *yield* bioetanol yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 4.4, diketahui bahwa *yield* tertinggi terdapat pada perlakuan A₂B₁ (penambahan *yeast extract* 2 g/L dan lama fermentasi 2 hari). Tingginya

nilai *yield* pada perlakuan tersebut menunjukkan semakin efisien proses fermentasi dalam produksi bioetanol (Ebrahimiaqda dan Kimberly, 2018).

Nilai *yield* tertinggi sebesar 80,127% dalam penelitian ini lebih rendah dari penelitian yang dilakukan oleh Doelle dan Horst (2002) yang memproduksi bioetanol secara optimal dengan *yield* 88,9% dari tetes tebu menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* MRTC1. Selain itu, penelitian Ruijin, dkk. (2012) menyebutkan bioetanol dengan *yield* 90,6% secara optimal diproduksi dari tetes tebu menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan penambahan urea sebagai sumber nitrogen sebanyak 0,25%. Malle, dkk. (2014) dalam hasil penelitiannya menyebutkan produksi bioetanol dari air kelapa oleh *Saccharomyces cerevisiae* diperoleh *yield* tertinggi sebesar 83% pada lama fermentasi 2 hari dengan penambahan amonium sulfat 60 g/L sebagai sumber nitrogen.

Nilai *yield* bioetanol yang masih rendah dalam penelitian ini dikarenakan adanya kendala teknis dalam proses destilasi, seperti kurangnya ketelitian dalam menghentikan waktu destilasi. Selain itu, adanya kondisi dimana etanol dan air dalam campuran mencapai titik azeotrop menyebabkan etanol dan air sulit dipisahkan melalui destilasi. Krell (2002) menyebutkan suatu campuran azeotrop memiliki titik didih konstan sehingga ketika dididihkan, titik didih fasa uap campuran tersebut sama dengan fasa cairnya. Etanol dan air mendidih pada 78,4 dan 100°C, sedangkan titik azeotrop antara campuran air dan etanol adalah pada 78,2°C sehingga pada suhu tersebut larutan etanol dan air dapat mendidih secara bersamaan pada tekanan atmosfer yang menyebabkan campuran etanol dan air sulit dipisahkan sehingga hasil destilasi tidak dapat diperoleh etanol murni 100%.

Berdasarkan Tabel 4.4, perlakuan lama fermentasi 2 hari menghasilkan *yield* bioetanol yang lebih tinggi daripada lama fermentasi 3 hari. Hal tersebut didukung dengan kadar bioetanol yang tinggi pada lama fermentasi 2 hari dan hasil analisis *Two Way* ANOVA yang menunjukkan bahwa lama fermentasi memberikan pengaruh signifikan ($\text{sig} < \alpha$) terhadap *yield* bioetanol.

Tabel 4.5 Hasil uji BNJ penambahan *yeast extract* terhadap *yield* bioetanol

Perlakuan	Yield Bioetanol (%)
A ₃	25,991 ^a
A ₁	29,541 ^a
A ₂	55,119 ^b

A₁: *yeast extract* 0 g/L, A₂: *yeast extract* 2 g/L, A₃: *yeast extract* 4 g/L, notasi yang berbeda (a dan b) menunjukkan perlakuan berbeda nyata

Hasil analisis *Two Way* ANOVA juga menyebutkan konsentrasi penambahan *yeast extract* memiliki pengaruh signifikan ($\text{sig} < \alpha$) terhadap *yield* bioetanol. Hal tersebut didukung dengan tingginya kadar bioetanol pada penambahan *yeast extract* 2 g/L yang menunjukkan konsentrasi penambahan *yeast extract* tersebut lebih efisien dalam produksi bioetanol. Hasil uji lanjut BNJ yang dirangkum pada Tabel 4.5 di atas menyebutkan penambahan *yeast extract* 2 g/L menghasilkan *yield* bioetanol tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan penambahan *yeast extract* 0 dan 4 g/L.

4.6 Viabilitas Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu

Viabilitas adalah kemampuan suatu mikroorganisme dalam bertahan hidup di lingkungannya (Sen dan Nicholas, 2011). Penentuan kemampuan hidup khamir *Saccharomyces cerevisiae* diukur dalam media fermentasi dengan perlakuan

penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi. Nilai OD *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,5 pada panjang gelombang 600 nm, sedangkan jumlahnya adalah $9,3 \times 10^9$ CFU/mL. Perhitungan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* pada media fermentasi dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Hasil perhitungan jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* dirangkum pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Jumlah koloni khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam media setelah fermentasi

Perlakuan	Jumlah Koloni (CFU/mL)
A ₁ B ₁	$6,3 \times 10^8$
A ₂ B ₁	$2,4 \times 10^9$
A ₃ B ₁	$5,3 \times 10^8$
A ₁ B ₂	$4,4 \times 10^8$
A ₂ B ₂	$6,0 \times 10^8$
A ₃ B ₂	$4,3 \times 10^8$

A₁: *yeast extract* 0 g/L, A₂: *yeast extract* 2 g/L, A₃: *yeast extract* 4 g/L,
B₁: lama fermentasi 2 hari, B₂: lama fermentasi 3 hari

Hasil analisis *Two Way* ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan lama fermentasi maupun penambahan *yeast extract* memberikan pengaruh signifikan ($\text{sig} < \alpha$) terhadap viabilitas khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Pada lama fermentasi 3 hari terdapat penurunan viabilitas sel jika dibandingkan dengan lama fermentasi 2 hari. Hal tersebut menunjukkan adanya penghambatan perkembangan dan metabolisme sel khamir *Saccharomyces cerevisiae* pada lama fermentasi 3 hari sehingga *Saccharomyces cerevisiae* tidak optimal dalam memproduksi bioetanol (Wiratno, dkk., 2013). Jumlah koloni *Saccharomyces cerevisiae* yang lebih rendah pada lama fermentasi 3 hari dikarenakan adanya penurunan pH media fermentasi sehingga *Saccharomyces cerevisiae* tidak dapat tumbuh secara optimal (Anggraini, dkk., 2017). Penurunan pH pada media

fermentasi dikarenakan selama proses fermentasi dihasilkan gas CO₂ terlarut yang bersifat asam (H₂CO₃) (Wulandari dan Budi, 2015) dan asam-asam organik sebagai hasil samping (Fadilah, dkk., 2018). Hal tersebut didukung dengan lebih rendahnya kadar dan *yield* bioetanol pada perlakuan lama fermentasi 3 hari daripada lama fermentasi 2 hari.

Viabilitas *Saccharomyces cerevisiae* tertinggi yang terdapat pada perlakuan penambahan *yeast extract* 2 g/L menunjukkan *yeast extract* dengan konsentrasi tersebut mampu mencukupi kebutuhan nitrogen yang digunakan untuk memaksimalkan proses sintesis sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga kinerjanya menjadi lebih optimal dalam memproduksi bioetanol (Duhan, dkk., 2013). Hal tersebut didukung dengan tingginya kadar dan *yield* bioetanol yang dihasilkan pada perlakuan penambahan *yeast extract* 2 g/L.

Yeast extract pada media fermentasi berfungsi sebagai sumber nitrogen dengan kandungan asam amino bebas sebesar 11,4% (Freedke, dkk., 2017). Sumber nutrisi nitrogen yang rendah pada media fermentasi dapat menyebabkan rendahnya pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*, sedangkan kelebihan nitrogen dalam media fermentasi dapat menyebabkan pengasaman pada media fermentasi sehingga menghambat aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* dalam memproduksi bioetanol (Duc, dkk., 2017).

Kadar bioetanol yang tinggi dan berbanding lurus dengan nilai *yield* menunjukkan semakin efisien proses fermentasi. Efisiensi proses fermentasi pada produksi bioetanol juga didukung oleh tingginya viabilitas khamir *Saccharomyces cerevisiae* selama proses fermentasi. Viabilitas khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang tinggi pada media fermentasi sangat diperlukan untuk mengoptimalkan

proses produksi bioetanol sehingga dapat memaksimalkan produk bioetanol yang dihasilkan (Arif, dkk., 2016).

4.7 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan bumi dan seisinya dengan bermacam-macam manfaat. Beberapa ada yang dapat dimanfaatkan secara langsung ataupun tidak langsung melalui proses-proses pengolahan tertentu. Manusia diberikan keleluasaan untuk mengelola sumber daya alam ciptaan Allah SWT di muka bumi. Tidak ada yang sia-sia dari segala sesuatu ciptaan Allah SWT. Semua diciptakan dengan manfaat dan tujuan masing-masing. Allah SWT berfirman dalam QS. Shaad ayat 27 sebagaimana berikut:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

Artinya: "Dan kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka" (QS. Shaad (38): 27).

Semua ciptaan Allah SWT masing-masing memiliki manfaat yang dapat diambil oleh manusia yang berakal. Salah satu contohnya yaitu dalam pemanfaatan tumbuh-tumbuhan. Tumbuh-tumbuhan dapat dimanfaatkan manusia baik untuk makanan, perabot rumah tangga, bahan bakar, dan kebutuhan lainnya. Pemanfaatan tumbuh-tumbuhan tersebut dapat dilakukan secara langsung ataupun melalui proses pengolahan tertentu. Salah satu contoh pemanfaatan tumbuhan yang melalui proses pengolahan tertentu adalah pemanfaatan air kelapa tua yang ditambahkan tetes tebu menjadi bioetanol sebagai alternatif bahan bakar minyak (Ebrahimiaqda dan Kimberly, 2018).

Produksi bioetanol dari air kelapa yang ditambahkan tetes tebu dalam penelitian ini dilakukan melalui proses fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan variasi penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi sehingga diperoleh bioetanol. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa tidak ada yang sia-sia dari segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT. Selain itu, khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang merupakan mikroorganisme berukuran sangat kecil juga memiliki tujuan dan manfaat dalam penciptaannya, salah satunya yaitu sebagai mikroorganisme yang memfermentasi gula menjadi bioetanol.

Bioetanol merupakan produk alternatif bahan bakar minyak yang memiliki peluang untuk dikembangkan (Senam, 2009). Salim, dkk. (2015) menyebutkan beberapa kelebihan yang dimiliki oleh bioetanol daripada energi alternatif lainnya, yaitu terbuat dari bahan-bahan alam yang mudah diperoleh, mengandung emisi gas CO yang rendah (19-25%), bernilai oktan tinggi, dan ramah lingkungan.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Perlakuan penambahan *yeast extract* dan lama fermentasi memiliki pengaruh signifikan terhadap produksi bioetanol dari limbah air kelapa yang ditambahkan tetes tebu menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Kadar dan *yield* bioetanol tertinggi sebesar 12,301 dan 80,127% diperoleh pada perlakuan penambahan *yeast extract* 2 g/L dan lama fermentasi 2 hari. Kadar dan *yield* bioetanol terendah sebesar 1,339 dan 8,343% diperoleh pada perlakuan penambahan *yeast extract* 4 g/L dan lama fermentasi 3 hari.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka perlu adanya penelitian lanjutan tentang variasi penambahan sumber nitrogen selain *yeast extract*, pH, konsentrasi inokulum, dan tetes tebu yang ditambahkan pada produksi bioetanol dari air kelapa menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, juga diperlukan optimasi proses pemurnian produk bioetanol yang dihasilkan menggunakan teknik pemurnian yang lain, seperti dehidrasi dan retifikasi sehingga dapat dihasilkan kadar bioetanol yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, R. Z. 2005. Pemanfaatan Khamir *Saccharomyces cerevisiae* untuk Makanan Ternak. *Wartazoa*, 15 (1): 49-55.
- Albalasmeh, A. A., Asmeret A. B., dan Teamrat A. G. 2013. A New Method for Rapid Determination of Carbohydrate and Total Carbon Concentrations Using UV Spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97: 253-261.
- Alfiyah, A. 2018. Kajian Kitab Al Kasyaf Karya Zamakhsyari. *Ilmu Al Qur'an dan Tafsir*, 1 (4): 56-65.
- Alsuhaim, H., Vojisavljevic V., dan Pirogova E. 2012. Effects of Non-thermal Microwave Exposures on The Poliferation Rate of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast. *Electrical and Computer Engineering*, 49 (1): 1-5.
- Al-Mahalli, J. dan Jalaluddin A. 2018. *Tafsir Jalalayn*. Jakarta: Ummul Quro.
- Al-Zamakhsyari, M. 2008. *Tafsir Al Kasyaf*. Berut: Daar Al-Fikr.
- Anaukwu, C. G., Franklin C. N., Onydeika I. O., Chinyere C. E., Chinedu C. O., Kingsley C. A., dan Etim J. A. 2015. Microbiological Analysis of Burukutu Beverage Produced in Southern Part of Nigeria. *Experimental Biology*, 5 (8): 18-22.
- Andari, Y., Abdul H. M., dan Endar P. 2015. Pengaruh Konsentrasi Ragi dan Waktu Fermentasi pada Proses Pembuatan Bioetanol dari Air Kelapa. Di dalam: Seminar Nasional Teknologi. *Prosiding Seminar Teknologi 2015*; Purwokerto, 28 November 2015. Purwokerto : Universitas Jendral Soedirman.
- Anggraini, S. P. A., Susy Y., dan Mauritsus M. S. 2017. Pengaruh pH Terhadap Kualitas Produk Etanol dari Molasses Melalui Proses Fermentasi. *Reka Buana*, 2 (2): 99-105.
- Arif, A. B., Wahyu D., Agus B., dan Nur R. 2016. Factorial Design with Three Factors for Optimization of Bioethanol Production from Sugar Cane Molasses. *Informatika Pertanian*, 25 (1): 145-154.
- Arman, M., Agus P., dan Sihani. 2014. Desain Sistem Instrumentasi dan Proses Distilasi Fraksinasi Berbasis Kendali Suhu. *System Engineering*, 2 (2): 71-79.
- Azhar, S. H. M., Rahmath A., Siti A. J., dan Hartinie M. 2017. Yeasts in Sustainable Bioethanol Production. *Biochemistry and Biophysic Reports*, 10: 52-61.

- Azizah, N. A., Al B. N., dan Sri M. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas. *Teknologi Pangan*, 1 (2): 72-77.
- Bharti, K. dan Madhulika C. 2016. Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae* with Different Perspectives: Substrates, Growth Variables, Inhibitor Reduction, and Immobilization. *Fermentation Technology*, 5 (2): 1-4.
- Bettelheim, F. A., William H. B., Mary K. C., dan Shawn O. F. 2009. *Introduction to General, Organic, and Biochemistry*. Ottawa: Mary Finch.
- Brown, G. W. 2002. Standard Deviation, Standard Error. *Biostatistic*, 136: 937-941.
- Budiman, A. 2007. *Destilasi: Teori dan Pengendalian Operasi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Caballero, B., Paul M. F., dan Fidel T. 2016. *Encyclopedia of Food and Health*. London: Elsevier.
- Cardona, C.A., Sanches O. J., dan Gutierrez L. F. 2010. *Process Synthesis for Fuel Ethanol Production*. New York: CRC Press.
- Chatchareya, S., Sukasem N, dan Teerapat H. 2007. The Mimic of Fractional Distillation Technology for Development of Homegrown Pot Distillery for Ethanol Distillation. *Energy Procedia*, 138: 985-990.
- Child, R. dan Nathanael W. R. N. 2016. Changes in The Sugar Composition of Coconut Water During Maturation and Germination. *Tropical Agriculture*, 2 (103): 326-329.
- Doelle, M. B. dan Horst W. D. 2002. Sugar Cane Molasses Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* MRTCC1. *Application of Microbiology and Biotechnology*, 33 : 31-35.
- Duc, C., Martine P., Isabelle S., Jessica N., Catherine T., dan Bruno B. 2017. A Set of Nutrients Limitations Trigger Yeast Cell Death in A Nitrogen-dependent Manner During Wine Alcoholic Fermentation. *Public Library of Science One*, 12 (9).
- Duhan, J. S., Ashok K., dan Sunil K. T. 2013. Bioethanol Production from Starchy Part of Tuberos Plant (Potato) Using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-170. *Microbiological Research*, 7 (46): 5253-5260.

- Dutta, B. K. 2009. *Principles of Mass Transfer and Separation Processes*. New Delhi: PHI Learning.
- Ebrahimiyaqda, E. dan Kimberly L. O. 2018. Evaluation and Modeling of Bioethanol Yield Efficiency from Sweet Sorghum Juice. *Bioenergy Research*, 7 (1): 2-9.
- Elevri, P. A. dan Surya R. P. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Dimobilisasi Agar Batang. *Akta Kimia Indonesia*, 1 (2): 105-114.
- Fadilah, U., I M. M. W., dan Semadi N. A. 2018. Studi Pengaruh pH Awal Media dan Lama Fermentasi pada Proses Produksi Etanol dari Hidrolisat Tepung Biji Nangka dengan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. *Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 6 (2): 92-102.
- Faizah, N. 2012. Pengaruh Penggunaan Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Ragi Tape untuk Fermentasi dalam Pembuatan Bioetanol dari Sampah Buah Tomat. *Skripsi*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Fakrudin, M., Muhammad A. Q., Monzhur M. A., dan Naiyyun C. 2012. Analysis of Key Factors Affecting Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* IFST-072011. *Biotechnology*, 11 (4): 248-252.
- Flowlis, R. 2006. *Kromatografi dan Spektroskopi*. Jakarta: Eramedia Publisher.
- Fredcke, J. K., Alicia K., dan Michelle M. C. 2017. *Bionutrients™ Technical Manual Advanced Bioprocessing*. New York: BD Group.
- Gandjar, I. G. dan Rohman A. 2007. *Analisis Obat secara Spektroskopi dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Gultom, T. 2001. *Biokimia*. Jakarta: JICA.
- Harahap, H. 2003. *Produksi Alkohol*. Medan: USU Digital Library.
- Hartina, F., Akyunul J, dan Anik M. 2014. Fermentasi Tetes Tebu dari Pabrik Gula Pagotan Madiun Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk Menghasilkan Bioetanol dengan Variasi pH dan Lama Fermentasi. *Alchemy*, 3 (1) : 93-100.
- Hidayat, N., Ody C. M., dan Suhartini S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: ANDI.
- Iswanto, H. 2015. Pengaruh Variasi Konsentrasi Substrat dan Inokulum Terhadap Produksi Etanol dari Tetes Tebu Menggunakan Isolat Khamir Kh2 Hasil Isolasi dari Tetes Tebu. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Judoamidjojo, R. M., Darwis A. A., dan Sa'id E. G. 2009. *Teknologi Fermentasi dan Biokonversi*. Bogor: Instiut Pertanian Bogor.
- Kartz, R. F. 2005. *Microbiology The Easy Way*. New York : Barron's Educational Series Inc.
- Khatiwada, D. 2010. Assesing The Sustainability of Bioethanol Production in Nepal. *Thesis*. Stockholm: KTH School of Industrial Engineering and Management.
- Khopkar, S. M. 2014. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Krell, E. 2002. *Handbook of Laboratory Distillation*. New York: Elsevier.
- Laopaibon, L., Nuanpeng S., Srinophakun P., dan Klanrit P. 2009. Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice Using Very High Gravity Technology: Effect of Carbon and Nitrogen Supplements. *Biotechnology*, 100 (18): 4176-4182.
- Ljungdahl, P. O. dan Bertrand D. 2012. Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phospate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 885-929.
- Lopez, F. N. A., Sandi O., Amparo Q., dan Eladio B. 2009. Effects of Temperature, pH, and Sugar Cocentration on The Growth Parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kudriavzevii*, and Their Interspecific Hybrid. *Food Microbiology*, 131: 120-127.
- Loureiro, M. dan Malfeito M. F. 2003. Spoilage Yeasts in The Wine Industry. *Food Microbiology*, 86 : 23-50.
- Malle, D., Kapelle I. B. D., dan Flourence L. 2014. Bioethanol Production from Waste Coconut Water Through Fermentation Process. *Chemistry*, 2: 155-159.
- Marjoni, M. R. 2014. Pemurnian Etanol Hasil Fermentasi Kulit Umbi Singkong (*Manihot utilissima pohl*) dari Limbah Industri Kerupuk Sanjai di Kota Bukittinggi Berdasarkan Suhu dan Waktu Destilasi. *Pharmaciana*, 4 (2): 193-200.
- McBirney, S. E., Kristy T., dan Andrea M. A. 2016. Wavelength-normalized Spectroscopic Analysis of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Saccharomyces cerevisiae* Growth Rates. *Biomedical Optic*, 7 (10): 4034-4042.
- Mushlihah, S. 2011. Pengaruh pH dan Konsentrasi *Zymomonas mobilis* untuk Produksi Etanol dari Sampah Buah Jeruk. *Skripsi*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

- Narendranath, N. V. dan Ronan P. 2005. Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Term of Growth and Metabolism of *Lactobacili* and *Saccharomyces cerevisiae* During Ethanol Production. *Application of Environmental Microbiology*, 71 (5): 2239-2243.
- Neelakandan, T. dan Usharani G. 2009. Optimization and Production of Bioethanol from Cashew Apple Juice Using Immobilized Yeast Cells by *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific*, 4 (2): 85-88.
- Ningsih, E. S. 2009. Optimasi Konsentrasi Molase dan pH Terhadap Produksi Etanol Hasil Fermentasi pada Suhu 28°C oleh *Saccharomyces cerevisiae*. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Nugroho, E. D. dan Dwi A. R. 2018. *Pengantar Bioteknologi (Teori dan Aplikasi)*. Sleman: Deepublish.
- Pelczar, M. J. dan Chan K. 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi Sistem Fermentasi Cair. *Teknologi Kimia dan Industri*, 1 (1): 139-149.
- Pham, R. D. 2009. *Industrial Yeasts*. Hanoi: Science and Technology Publishing House.
- Pham, T. N. L., Doan N. H. D., dan Le V. V. M. 2010. Using Fed-batch Fermentation in Very High Gravity Brewing: Effects of Tween80TM and Ergosterol Supplementation Performance of Immobilized Yeast in Calcium Alginate Gel. *Food Research*, 17 : 995-1002.
- Prasojo, B., Naryoko, Pathul D., Romulus T., dan Eka D. 2006. *Teori dan Aplikasi Fisika*. Jakarta: Ghalia Indonesia.
- Prihandana, R., Kartika N., Praptiningsih G. A., Dwi S., Sigit S., dan Roy H. 2007. *Bioetanol dari Ubi Kayu: Bahan Bakar Masa Depan*. Bandung: Agromedia.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta : Bumi Aksara.
- Puspitasari, R. 2008. Kualitas Molase sebagai Bahan Baku Produksi Alkohol Pabrik Spiritus Madusukmo Yogyakarta. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Putri, S. A., Fajar R., dan Rahmayuni. 2016. Hubungan Antara Kadar Gula Reduksi, Jumlah Sel Mikroba, dan Etanol dalam Produksi Bioetanol dari Fermentasi Air Kelapa dengan Penambahan Urea. *Fakultas Pertanian*, 3 (2) : 1-8.
- Qalsum, U., Anang W. M. D., dan Supriadi. 2015. Analisis Kadar Karbohidrat, Lemak, dan Protein dari Tepung Biji Mangga (*Magnifera indica* L.) Jenis Gadung. *Analisis Kadar Kimia*, 4 (4): 168-174.

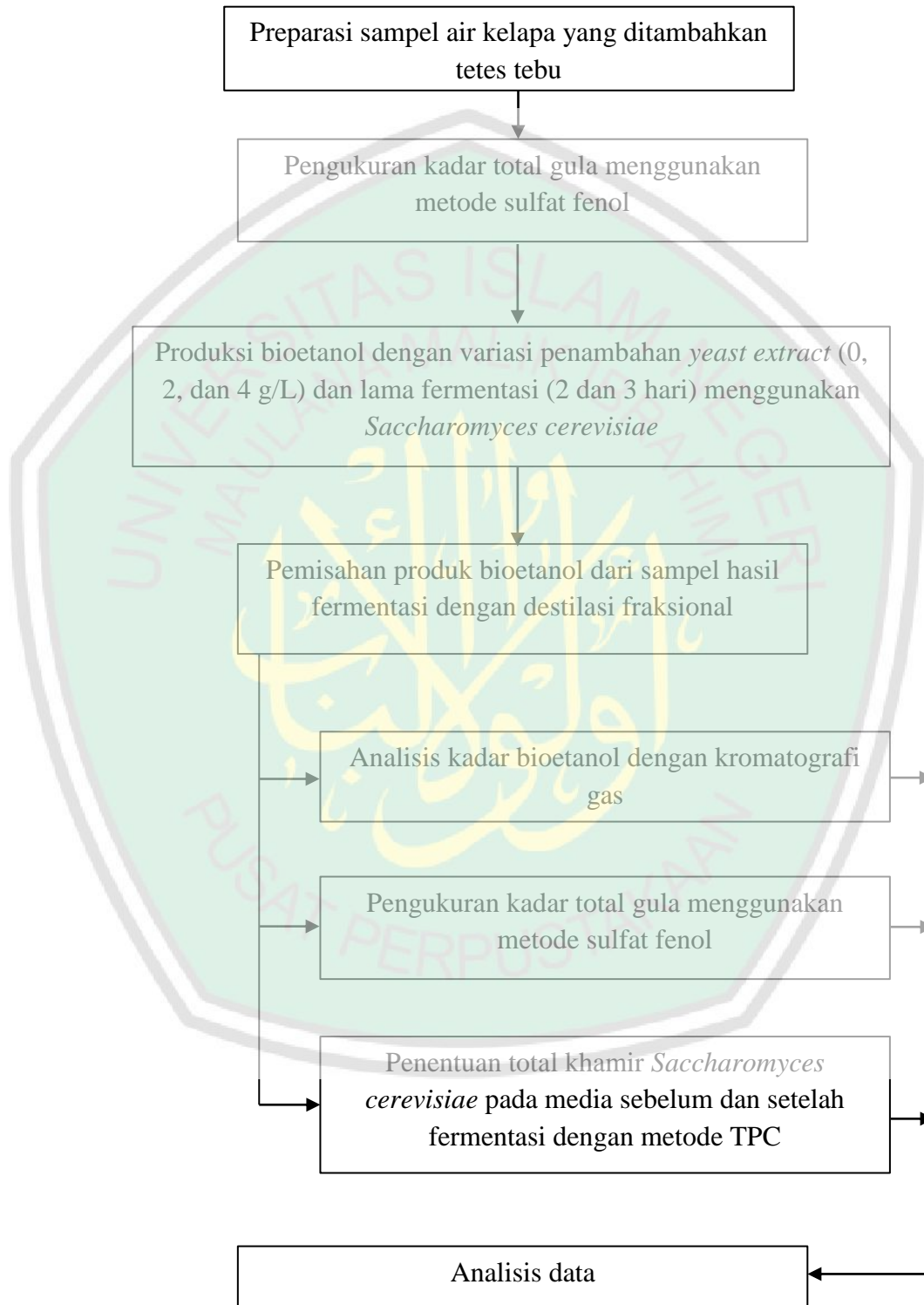
- Quan, C., Hong M. L., Ting H., Wei Z., Zhao T. D., dan Yu X. S. 2012. High-precision Analysis of Ethanol in Bioethanol by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *Chemical Analysis*, 17: 535-541.
- Quthb, S. 2000. *Tafsir Fi Zhilahil Qur'an*. Jakarta: Germa Insani Press.
- Ramli, S., Izzudin G., dan Abdul H. 2015. *Integrasi Islam dan Sains*. Jakarta: Adhiatama Press.
- Reynad, D. P. G. 2017. Pemanfaatan Limbah Air Kelapa Menjadi Pupuk Organik Cair Menggunkan Mikroorganisme *Aspergillus niger*, *Pseudomonas putida*, dan Bioaktivator EM4. *Skripsi*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Richana, N. 2011. *Bioetanol: Bahan Baku, Teknologi, Produksi, dan Pengendalian Mutu*. Bandung: Nuansa.
- Rivera, B. G., Beningo O., Javier G., Angel C., Jose M. D. G., dan Maria G. A. 2015. Bioethanol Production from Hydrolyzed Sugarcane Bagasse Supplemented with Molasses B in A Mixed Yeast Culture. *Renewable Energy*, 74: 399-405.
- Riyanto. 2016. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji*. Jakarta: Deepublish.
- Ruijin, Y., Mohammed A. A., Gasmalia A., Mehdi N., dan Su M. 2012. Production of Ethanol from Sudanese Sugar Cane Molasses and Evaluation of Its Quality. *Food Processing and Technology*, 3 (163).
- Saidi, D., Akyunul J., dan Anik M. 2015. Bioethanol Dehydration Process Using NaOH-Activated Zeolite at Various Concentration and Zeolite Weight. *Alchemy*, 4 (1): 32-38.
- Salari, R. dan Rosita S. 2017. Investigation of The Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9 (1): 3592-3597.
- Salim, T., Lia R., Wawan A., dan Sriharti. 2015. Bioethanol Production from Glucose by Thermophilic Microbes from Ciater Hot Springs. *Procedia Chemistry*, 16: 503-510.
- Satheesh, N. dan Prasad N. B. L. 2013. Production of Fermented Coconut Water Beverages. *Food and Agroindustry*, 6 (5): 281-289.
- Senam. 2009. Prospek Bioetanol sebagai Bahan Bakar yang Terbarukan dan Ramah Lingkungan. Di dalam: Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan, dan Penerapan MIPA*; Yogyakarta, 16 Mei 2009. Yogyakarta: Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.

- Sen, K. dan Nicholas J. K. 2011. *Environmental Microbiology: Current Technology and Water Application*. Norwich: Caister Academic Press.
- Setyowati, T. dan Deswaty F. 2007. *Biologi Interaktif*. Jakarta: Azka Press.
- Sheikh, R. A., Omar A. A., dan Youssri M. A. S. 2016. Biochemical Studies on The Production of Biofuel (Bioethanol) from Potato Peels Wastes by *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of Fermentation Periods and Nitrogen Source Concentration. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30 (3): 497-505.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Suhardjo. 2000. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.
- Sukri, S. 1999. *Kimia Dasar*. Bandung: ITB.
- Sumerta, I. N. dan Atit K. 2017. Keragaman Jenis Khamir Penghasil Etanol yang Diisolasi dari Makanan Fermentasi di Kepulauan Riau. *Biologi Indonesia*, 13 (1): 61-69.
- Suplatov, D., Nikolay P., Evgeny K., Tatyana S., Pavel K., dan Vytas S. 2014. Computational Design of A pH Stable Enzyme: Understanding Molecular Mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* on Acid and Alkaline Conditions. *Bioengineering and Bioinformatics*, 9 (6): 1231-1264.
- Suprianto, T., Sigid M., dan Muhammad K. 2016. Bahan Bakar Gasohol (Premium-Bioetanol) dari Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan Pretreatment Lignocellulotic Material dan Fermentasi. *Kimia Lingkungan*, 16 (2): 101-200.
- Tenaya, I. M. N. 2015. Pengaruh Interaksi dan Nilai Interaksi pada Percobaan Faktorial. *Statistical Science*, 5 (1): 9-20.
- Tesfaw, A. dan Fassil A. 2014. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research*, 2 (1): 1-11.
- Toharisman, A. dan Santosa H. 2009. *Mutu Bahan Baku dan Preparasi Medium: Pelatihan Teknologi Alkohol*. Pasuruan: Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.
- Tompson, M. F dan Nurul A. H. A. 2015. High Temperature Bioethanol Production from Overly Matured Coconut Water by Two Commercial Yeast Strain. *Applied Engineering Research*, 10 (81): 59-63.

- Utama, W. B., Rudi K., dan Erwin A. 2016. Pembuatan Bioetanol Melalui Fermentasi Nira Tebu (*Saccharum officinarum*) Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan Penambahan Vitamin B Kompleks sebagai Nutrisi Fermentasi. *Mulawarman* 13 (2): 72-77.
- Utami, R., Edi N., Asri N., Maria A. M. A., dan Irina F. 2017. Fermentasi Whey Keju Menggunakan Biji Kefir (Kefir Grains) dengan Variasi Sumber Nitrogen. *Agritechnology*, 37 (4): 377-385.
- Vohra, M., Jagdish M., Rahul M., Satish P., dan Sanjay P. 2014. Bioethanol Production: Feedstock and Current Technologies. *Environmental Chemical Engineering*, 2: 573-584.
- Wanderley, M. C. D. A., Mariana L. S., dan Ester R. G. 2014. Selection of Inoculum Size and *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Ethanol in Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Sugar Cane Bagasse. *Biotechnology*, 13 (27): 2762-2765.
- Wardani, A. K. dan Fenty N. E. P. 2013. Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok (NRRL-Y 265). *Agritechnology*, 33 (2): 131-140.
- Warisno, Dahana, dan Kres. 2009. *Inspirasi Usaha Membuat Aneka Nata*. Jakarta: PT Agro Media Pustaka.
- Wiratno, R., Sasmita H. K., Sri M. 2010. Alcohol Production with Yeast: A Perception. *Basic Microbiology*. 47: 103-117.
- Witono. 2003. *Dasar-dasar Mikrobiologi Industri*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia.
- Wulandari, R. R. A. dan Budi U. 2015. Pembuatan Bioetanol dari Air Kelapa Tua Menggunakan Proses Fermentasi. Di dalam: Seminar Nasional Kimia 2015. *Prosiding Seminar Nasional Kimia 2015*; Yogyakarta, 24 Oktober 2015. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Yong, J. W. H., Liya G., Yan F. N., dan Swee N. T. 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*, 14: 5144-5164.
- Zhang, W. dan David R. N. 2014. *Synthetic Biology Application in Industrial Microbiology*. New York: Frontiers.

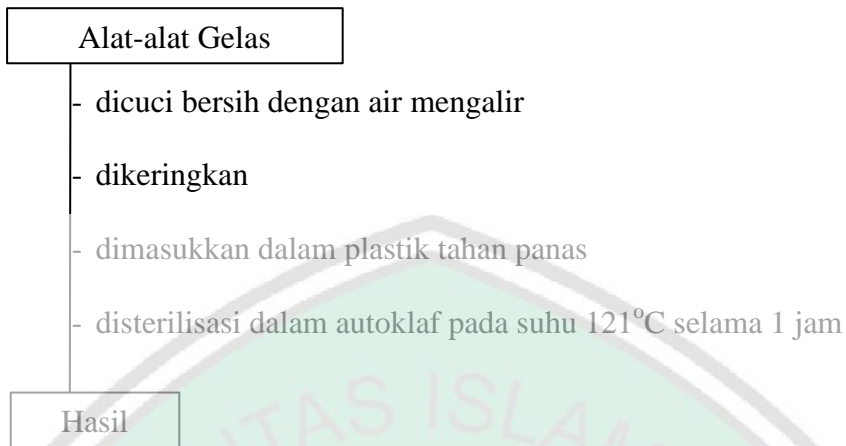
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



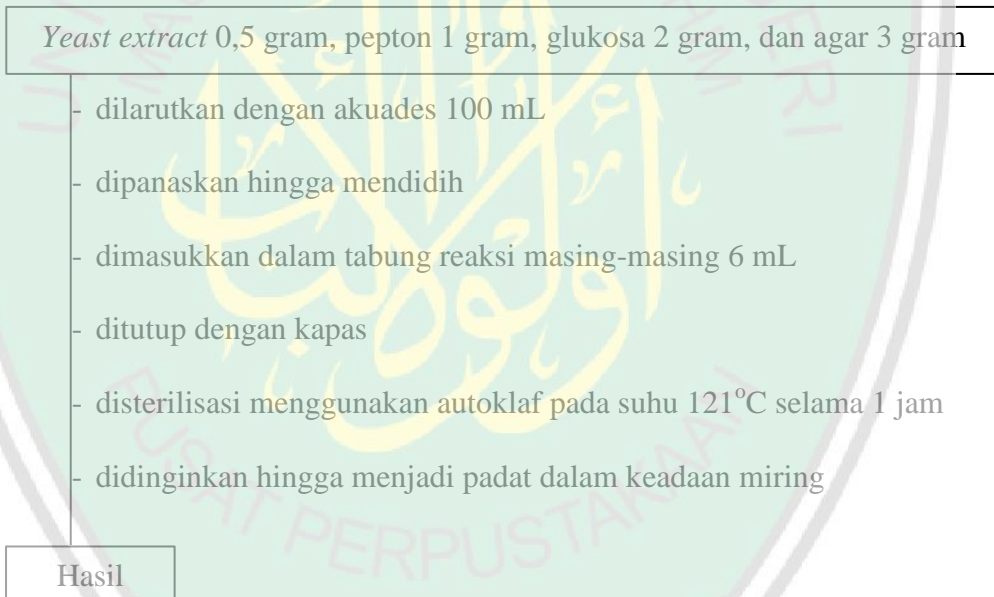
Lampiran 2. Skema Kerja

L2.1 Sterilisasi Alat



L2.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

L2.2.1 Pembuatan Media YPGA



L2.2.2 Pembuatan Media YPGB

Yeast extract 1 gram, pepton 2 gram, dan glukosa 4 gram

- dilarutkan dengan akuades 100 mL
- dipanaskan hingga mendidih
- dimasukkan dalam botol kaca masing-masing 20 mL
- ditutup dengan kapas
- disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 1 jam
- didinginkan

Hasil

L2.3 Regenerasi *Saccharomyces cerevisiae*

Stok Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

- diambil 2 ose
- diinokulasikan ke dalam media YPGA
- diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang

Hasil

L2.4 Pembuatan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*

Khamir *Saccharomyces cerevisiae* Hasil Regenerasi

- diambil 2 ose ke dalam media YPGB
- diaduk dengan kecepatan 150 rpm menggunakan pengaduk mekanis pada suhu 30°C sampai mencapai akhir fase logaritmik

Hasil

L2.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

25 mL Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*

- dimasukkan ke dalam 225 mL media YPGB
- diambil 4 mL setiap 2 jam sekali sampai jam ke-24
- diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm
- dibuat kurva antara absorbansi (y) dan lama inkubasi (x) yang dihasilkan pada panjang gelombang 600 nm

Hasil

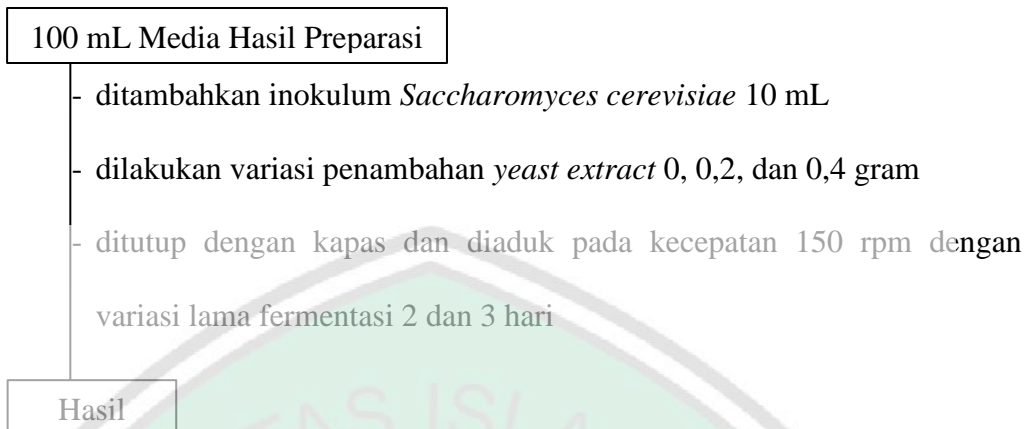
L2.6 Preparasi Media Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu

Air Kelapa

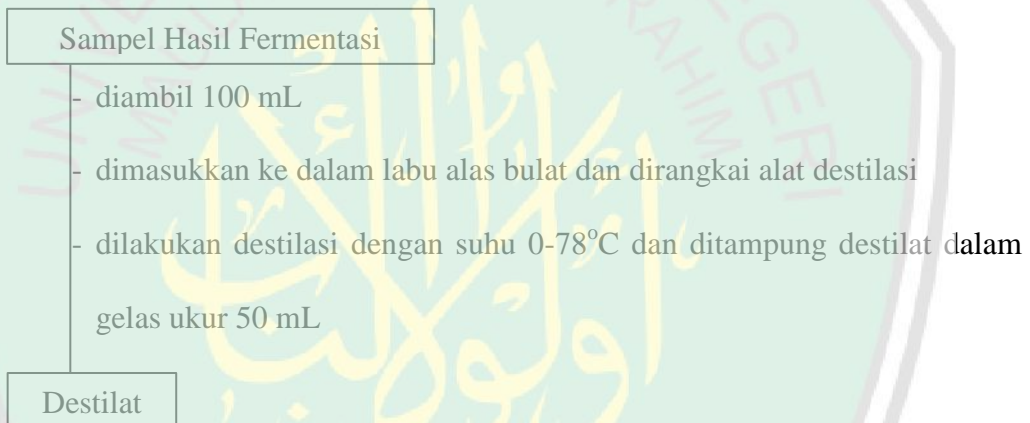
- dijernihkan dengan cara penyaringan, ditambahkan tetes tebu 20% brix
- diatur pH larutan 5,5
- disterilisasi pada suhu 121°C selama 1 jam menggunakan autoklaf
- dianalisis kadar total gula menggunakan metode sulfat fenol

Hasil

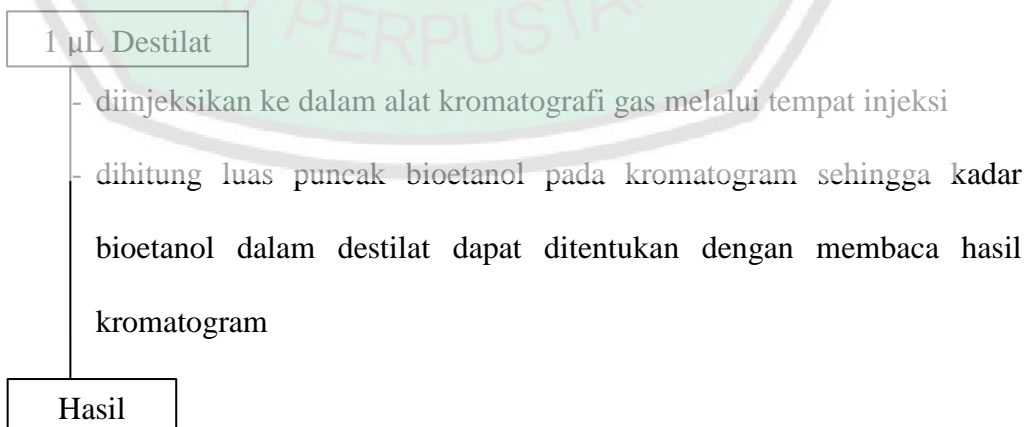
L2.7 Produksi Bioetanol dengan Variasi Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi



L2.8 Pemisahan Bioetanol Hasil Fermentasi Melalui Destilasi Fraksional



L2.9 Analisis Kadar Bioetanol Menggunakan Kromatografi Gas



L2.10 Analisis Kadar Total Gula dengan Metode Sulfat Fenol

L2.10.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan Glukosa Standar 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm

- diambil 10 mL ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 0,5 mL larutan fenol 5% dan dikocok
- ditambahkan 2,5 mL asam sulfat pekat dengan cepat
- dibiarkan selama 10 menit
- dikocok hingga homogen
- dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit
- diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm

Hasil

L2.10.2 Penentuan Kadar Total Gula Media Sebelum dan Sesudah Fermentasi

1 mL Media

- dimasukkan ke tabung reaksi
- ditambahkan 0,5 mL larutan fenol 5% dan dikocok
- ditambahkan 2,5 mL asam sulfat pekat dengan cepat
- dibiarkan selama 10 menit
- dikocok hingga homogen
- dipanaskan dalam penangas air selama 15 menit
- diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 490 nm

Hasil

L2.10.2 Analisis Total Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan Metode TPC

1 mL Inokulum Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL NaCl 0,85% steril
- dikocok hingga homogen dan diperoleh pengenceran 10^{-1}
- dilanjutkan hingga pengenceran sampai 10^{-9}
- dimasukkan pada cawan petri sebanyak 1 mL yang berisi media YPGA steril
- diinkubasi selama 48 jam
- dihitung total sel khamir (skala 30-300 koloni) pada cawan petri

Hasil

L2.11 Analisis Data

Data Kadar etanol, Kadar Total Gula, dan Total Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

- dianalisis dengan varian *Two Way ANOVA*
- dilanjutkan dengan uji BNJ dengan taraf signifikansi 5% jika terdapat perlakuan yang berbeda nyata

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Larutan

L3.1 Pembuatan Larutan HCl 7% (v/v)

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

$$37\% \times V_1 = 7\% \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 18,9 \text{ mL}$$

Cara pembuatan: pembuatan larutan HCl 7% dapat dilakukan dengan pengenceran larutan HCl p.a (37%) melalui perhitungan di atas.

L3.2 Pembuatan Larutan NaOH 7% (b/v)

$$\text{NaOH } 7\% (b/v) = \frac{7 \text{ gram NaOH}}{100 \text{ mL akuades}}$$

Cara pembuatan: 7 gram NaOH ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 mL, ditambahkan akuades hingga 100 mL dan diaduk hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

L3.3 Pembuatan Larutan Fenol 5% (b/v)

$$\text{Fenol } 5\% (b/v) = \frac{5 \text{ gram fenol}}{100 \text{ mL akuades}}$$

Cara pembuatan: fenol 5 gram ditimbang dan dimasukkan ke dalam gelas beaker 100 mL, lalu ditambahkan akuades hingga 100 mL dan diaduk hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

L3.4 Pembuatan Larutan Glukosa Standar 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm

$$\text{Stok glukosa baku} = \frac{100 \text{ mg glukosa anhidrat}}{100 \text{ mL akuades}} = 1000 \text{ ppm}$$

Cara pembuatan: pembuatan larutan glukosa 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm dilakukan dengan diencerkan larutan stok glukosa berdasarkan perhitungan berikut:

a. Konsentrasi 10 ppm:

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi 20 ppm:

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi 30 ppm:

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 30 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi 40 ppm:

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 4 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi 50 ppm:

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

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 50 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

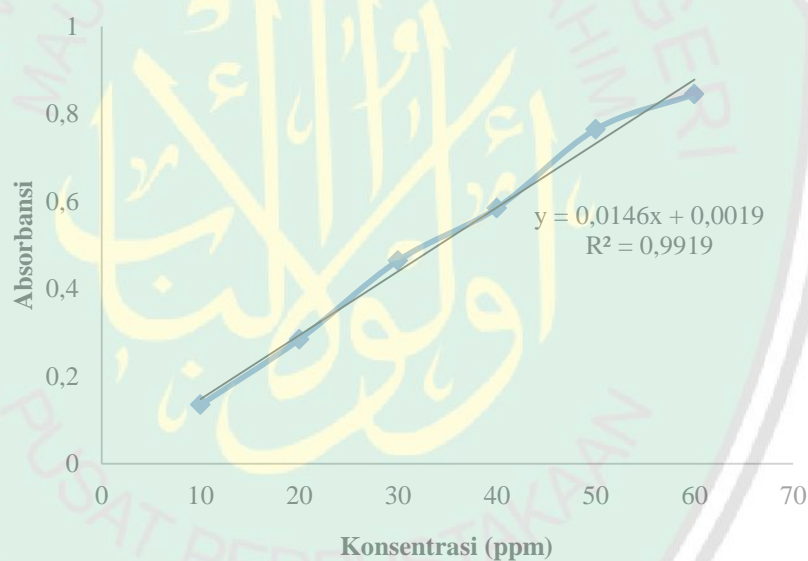
Lampiran 4. Data Penelitian

L4.1 Analisis Kadar Gula Menggunakan Metode Sulfat Fenol

L4.1.1 Kurva Standar Glukosa

Tabel L4.1 Absorbansi kurva standar glukosa

Konsentrasi	Absorbansi
10 ppm	0,1348
20 ppm	0,2843
30 ppm	0,4646
40 ppm	0,5845
50 ppm	0,7645
60 ppm	0,8448



Gambar L4.1 Kurva standar glukosa

L4.1.2 Kadar Gula Bahan Baku dan Media Sebelum Fermentasi

Bahan baku dan media sebelum fermentasi dianalisis dengan metode sulfat fenol dan diukur absorbansinya menggunakan UV-Vis. Absorbansi yang diperoleh kemudian diplotkan dengan kurva standar melalui persamaan $y =$

$0,0146x + 0,0019$ dengan y merupakan absorbansi dan x adalah kadar gula yang dicari. Perhitungan kadar gula bahan baku air kelapa adalah sebagai berikut:

- Konsentrasi analisa

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{0,1 \text{ g}}{250 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} = 400 \text{ ppm}$$

- Kadar gula bahan baku air kelapa dalam ppm

$$y = 0,0146x + 0,0019$$

$$0,1540 = 0,0146x + 0,0019$$

$$x = \frac{0,1540 - 0,0019}{0,0146}$$

$$x = 10,4178 \text{ ppm}$$

- Kadar gula bahan baku air kelapa dalam persen

$$\begin{aligned} \text{Kadar gula (\%)} &= \frac{\text{kadar gula dalam ppm}}{\text{konsentrasi analisa}} \times 100\% \\ &= \frac{10,4178}{400} \times 100\% \\ &= 2,605\% \end{aligned}$$

Perhitungan kadar gula bahan baku tetes tebu adalah sebagai berikut:

- Konsentrasi analisa

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{0,025 \text{ g}}{250 \text{ mL}} = \frac{25 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} = 100 \text{ ppm}$$

- Faktor pengenceran

$$\text{Faktor pengenceran} = \frac{250 \text{ mL}}{50 \text{ mL}} = 5$$

- Kadar gula bahan baku tetes tebu dalam ppm

$$y = 0,0146x + 0,0019$$

$$0,1469 = 0,0146x + 0,0019$$

$$x = \frac{0,1469 - 0,0019}{0,0146}$$

$$x = 9,932 \text{ ppm}$$

- Kadar gula bahan baku tetes tebu dalam persen

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{kadar gula dalam ppm}}{\text{konsentrasi analisa}} \times \text{FP} \times 100\%$$

$$= \frac{9,932}{100} \times 5 \times 100\%$$

$$= 49,658\%$$

Perhitungan kadar gula media sebelum fermentasi adalah sebagai berikut:

- Konsentrasi analisa

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{0,025 \text{ g}}{250 \text{ mL}} = \frac{25 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} = 100 \text{ ppm}$$

- Kadar gula media sebelum fermentasi dalam ppm

$$y = 0,0146x + 0,0019$$

$$0,2109 = 0,0146x + 0,0019$$

$$x = \frac{0,2109 - 0,0019}{0,0146}$$

$$x = 14,315 \text{ ppm}$$

- Kadar gula media sebelum fermentasi dalam persen

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{kadar gula dalam ppm}}{\text{konsentrasi analisa}} \times 100\%$$

$$= \frac{14,315}{100} \times 100\%$$

$$= 14,315\%$$

Tabel L4.2 Hasil analisis kadar gula media sebelum fermentasi

Perlakuan	Hasil Absorbansi		Kadar (%)			Rata-rata (%)	STDEV	
	U1	U2	U1	U2	U3			
Air Kelapa	0,1540	0,1973	2,910	2,605	3,346	2,779	8,730	0,316
Tetes Tebu	0,1469	0,1561	50,605	49,658	52,808	49,350	151,816	1,563
A ₁	0,2109	0,2195	14,139	14,315	14,904	13,199	42,418	0,707
A ₂	0,2220	0,2511	15,185	15,075	17,068	13,411	45,554	1,695
A ₃	0,2320	0,2661	15,945	15,760	18,096	13,980	47,836	1,485

L4.1.3 Kadar Gula Setelah Fermentasi

Analisis kadar gula setelah fermentasi dilakukan dengan metode sulfat fenol. Absorbansi yang diperoleh pada panjang gelombang 490 nm lalu dihitung persamaan $y = 0,0146x + 0,0019$. Nilai y merupakan absorbansi dan x adalah kadar gula yang dicari. Perhitungan kadar gula bahan baku setelah fermentasi adalah sebagai berikut:

- Konsentrasi analisa

$$\text{Konsentrasi analisa} = \frac{0,025 \text{ g}}{250 \text{ mL}} = \frac{25 \text{ mg}}{0,25 \text{ L}} = 100 \text{ ppm}$$

- Kadar gula setelah fermentasi

$$y = 0,0146x + 0,0019$$

$$0,1438 = 0,0146x + 0,0019$$

$$x = \frac{0,1438 - 0,0019}{0,0146}$$

$$x = 0,972 \text{ ppm}$$

- Kadar gula media setelah fermentasi dalam persen

$$\text{Kadar gula (\%)} = \frac{\text{kadar gula dalam ppm}}{\text{konsentrasi analisa}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,972}{100} \times 100\%$$

$$= 0,972\%$$

Tabel L4.3 Hasil analisis kadar gula media setelah fermentasi

Perlakuan	Hasil Absorbansi			Kadar (%)			Total (%)	Rata-rata (%)
	U1	U2	U3	U1	U2	U3		
A ₁ B ₁	0,1438	0,1510	0,1496	0,972	1,021	1,012	3,005	1,002
A ₂ B ₁	0,1349	0,1357	0,1350	0,912	0,916	0,912	2,740	0,913
A ₃ B ₁	0,1383	0,1502	0,1472	0,934	1,016	0,995	2,945	0,982
A ₁ B ₂	0,1597	0,1739	0,1710	1,081	1,178	1,158	3,417	1,139
A ₂ B ₂	0,1486	0,1674	0,1601	1,005	1,133	1,084	3,222	1,074
A ₃ B ₂	0,1496	0,1807	0,1598	1,012	1,225	1,082	3,318	1,106

L4.1.4 Kadar Gula Terpakai pada Proses Fermentasi

Pengurangan kadar gula sebelum fermentasi dengan kadar gula setelah fermentasi dilakukan untuk menghitung kadar gula terpakai selama fermentasi.

Hasil kadar gula terpakai pada proses fermentasi dirangkum pada Tabel L4.4.

Kadar gula terpakai (%) = (kadar gula sebelum fermentasi – kadar gula setelah fermentasi)%

$$= (14,139\% - 0,972)\%$$

$$= 13,343\%$$

Tabel L4.4 Hasil analisis kadar gula terpakai pada proses fermentasi

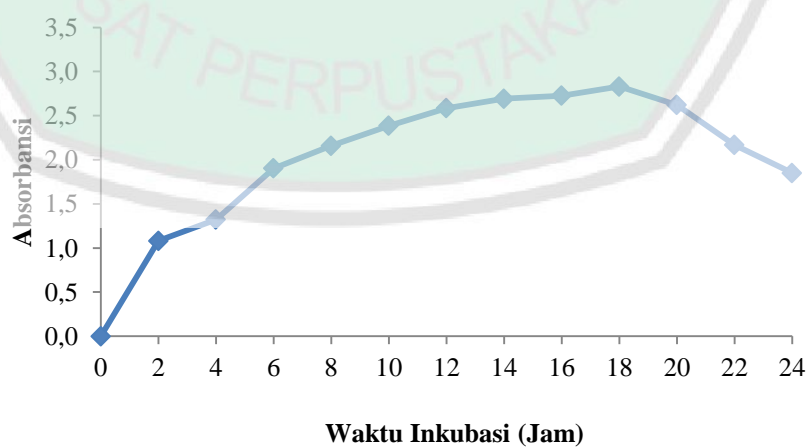
Perlakuan	Kadar (%)			Total (%)	Rata-rata (%)
	U1	U2	U3		
A ₁ B ₁	13,343	13,883	12,187	39,413	13,138
A ₂ B ₁	14,263	16,852	13,989	45,984	15,328
A ₃ B ₁	14,826	17,080	12,985	44,891	14,964
A ₁ B ₂	13,234	13,726	12,041	39,001	13,000
A ₂ B ₂	14,700	15,935	12,327	42,962	14,321
A ₃ B ₂	14,748	16,871	12,898	44,517	14,839

L4.2 Kurva Pertumbuhan Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Pertumbuhan khamir diamati dengan cara dilakukan pengukuran nilai OD suspensi khamir dengan dianalisis absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm setiap 2 jam selama 24 jam (waktu inkubasi 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, dan 24 jam). Data absorbansi dan grafik kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dirangkum dan ditampilkan pada Tabel L4.5 dan Gambar L4.2.

Tabel L4.5 Absorbansi kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

Waktu Inkubasi (Jam)	Absorbansi
2	1,082
4	1,323
6	1,903
8	2,159
10	2,385
12	2,586
14	2,692
16	2,730
18	2,827
20	2,621
22	2,168
24	1,850



Gambar L4.2 Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

L4.3 Perhitungan Jumlah Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Jumlah sel khamir *Saccharomyces cerevisiae* dihitung menggunakan Metode TPC. Hasil perhitungan dirangkum pada Tabel L4.6.

Tabel L4.6 Hasil perhitungan jumlah khamir *Saccaromyces cerevisiae*

Perlakuan	Jumlah Khamir (CFU/mL)			Total Khamir (CFU/mL)	Rata-rata Jumlah Khamir (CFU/mL)
	U1	U2	U3		
Sebelum Fermentasi	$4,1 \times 10^9$	$13,3 \times 10^9$	$8,1 \times 10^9$	$27,8 \times 10^9$	$9,3 \times 10^9$
A ₁ B ₁	$6,1 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$18,9 \times 10^8$	$6,3 \times 10^9$
A ₂ B ₁	$2,4 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$7,3 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$
A ₃ B ₁	$5,4 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$15,9 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$
A ₁ B ₂	$3,8 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$	$16,4 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
A ₂ B ₂	$7,9 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$17,9 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
A ₃ B ₂	$5,4 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$12,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$

L4.4 Analisis Kadar Bioetanol Hasil Fermentasi Menggunakan Kromatografi Gas

L4.4.1 Kurva Standar Etanol

Tabel L4.7 Hasil perhitungan kurva standar etanol

No.	Nama Standar	Berat (gr)		Area		Rasio	
		ACN	Etanol	Etanol	ACN	Berat	Area
1.	Std 1	0,0030	0,1557	1042,49	71270,80	0,019	0,0146
2.	Std 2	0,0035	0,1578	13706,18	865474,10	0,022	0,0158
3.	Std 3	0,0090	0,1543	40813,12	926015,40	0,058	0,0441
4.	Std 4	0,0192	0,1517	94798,27	911361,78	0,127	0,1040
5.	Std 5	0,0379	0,1571	342576,29	1955773,94	0,241	0,1752
6.	Std 6	0,0766	0,1570	561310,53	1498592,29	0,488	0,3746
7.	Std 7	0,1536	0,1565	1016639,23	1364111,03	0,981	0,7453

Rasio berat etanol dan asetonitril (ACN) dihitung berdasarkan pembagian berat ACN dengan berat etanol. Sedangkan rasio area dihitung berdasarkan pembagian luas area etanol dengan luas area asetonitril. Hasil rasio area dan rasio

berat kemudian diplotkan dalam kurva standar etanol dengan rasio area pada sumbu y dan rasio berat pada sumbu x. Kurva standar etanol ditampilkan pada Gambar L4.3.

$$\text{Rasio berat} = \frac{\text{berat ACN (gr)}}{\text{berat etanol (gr)}}$$

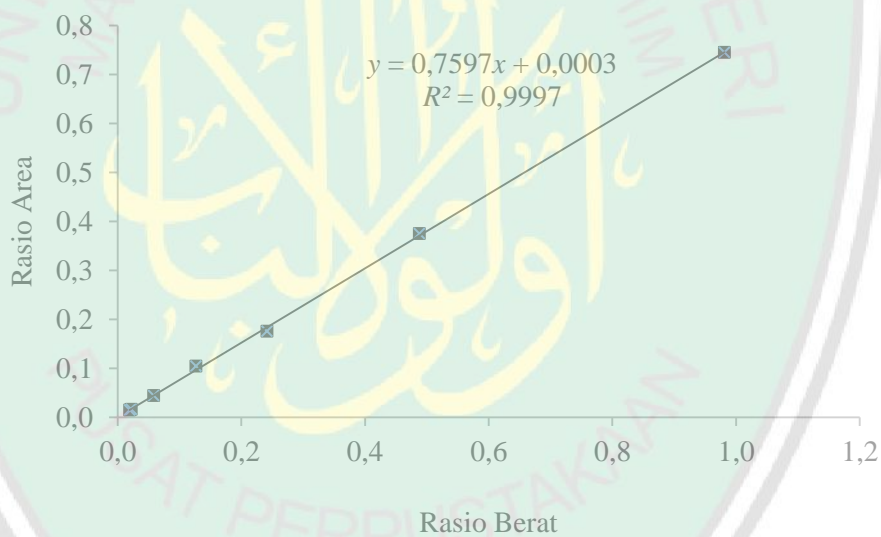
$$= \frac{0,0030 \text{ gr}}{0,1557 \text{ gr}}$$

$$= 0,0019$$

$$\text{Rasio area} = \frac{\text{luas area etanol}}{\text{luas area ACN}}$$

$$= \frac{1042,49}{71270,80}$$

$$= 0,0146$$



Gambar L4.3 Kurva standar etanol

L4.4.2 Hasil Analisis Kadar Bioetanol

Tabel L4.8 Data analisis bioetanol menggunakan kromatografi gas

No.	Nama Sampel	Berat (gr)		Area	
		Sampel	ACN	Etanol	ACN
1.	A ₁ B ₁ (1)	0,4787	0,0827	816878,01	1724425,33
2.	A ₁ B ₁ (2)	0,4761	0,0771	692193,33	1727623,79
3.	A ₂ B ₁ (1)	0,4745	0,0823	457672,20	542642,75
4.	A ₂ B ₁ (2)	0,4739	0,0809	1147566,97	2270324,88
5.	A ₃ B ₁ (1)	0,4744	0,0841	505733,19	1482558,73
6.	A ₃ B ₁ (2)	0,882	0,0802	662401,91	1379219,24
7.	A ₁ B ₂ (1)	0,4876	0,0785	193118,97	1675602,86
8.	A ₁ B ₂ (2)	0,4788	0,0748	351301,39	1776021,56
9.	A ₂ B ₂ (1)	0,4801	0,0782	299294,91	1435524,94
10.	A ₂ B ₂ (2)	0,4836	0,0757	461373,89	1994209,36
11.	A ₃ B ₂ (1)	0,4859	0,0835	63775,90	1516755,61
12.	A ₃ B ₂ (2)	0,4690	0,0782	143231,94	1788545,12

Kadar bioetanol hasil fermentasi dianalisis menggunakan kromatografi gas.

Data analisis bioetanol berupa berat dan luas area dirangkum dalam Tabel L4.8.

Hasil pembagian antara luas area etanol dan ACN yang diperoleh kemudian dihitung berdasarkan kurva standar dengan persamaan $y = 0,7597x + 0,0003$. Nilai y merupakan hasil pembagian antara luas area etanol dan ACN, sedangkan nilai x yang dicari. Nilai x kemudian dimasukkan dalam perhitungan % kadar bioetanol dengan persamaan sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

$$\frac{\text{luas area etanol}}{\text{luas area ACN}} = ax + b$$

$$\frac{816878,01}{1724425,33} = 0,7597x + 0,0003$$

$$0,4737 = 0,7597x + 0,0003$$

$$x = \frac{0,4737 - 0,0003}{0,7597}$$

$$x = 0,623$$

$$\begin{aligned} \% \text{Kadar bioetanol} &= \frac{x}{\text{berat sampel (gr)}} \times \text{berat ACN (gr)} \times 100\% \\ &= \frac{0,623}{0,4787} \times 0,0827 \times 100\% \\ &= 10,766\% \end{aligned}$$

Tabel L4.9 Kadar bioetanol

Nama Sampel	Kadar Bioetanol (%)		Total (%)	Rata-rata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2		
A ₁ B ₁	10,766	8,536	19,302	9,651
A ₂ B ₁	13,249	11,352	24,601	12,301
A ₃ B ₁	7,953	5,745	13,698	6,849
A ₁ B ₂	2,431	4,062	6,493	3,247
A ₂ B ₂	4,463	4,758	9,221	4,611
A ₃ B ₂	0,945	1,734	2,679	1,339

L4.5 Yield Bioetanol

Perhitungan *yield* dilakukan untuk mengetahui seberapa efisien proses fermentasi dalam menghasilkan produk fermentasi. Secara teoritis, konsentrasi glukosa 1 g/L akan menghasilkan etanol dengan konsentrasi 0,51 g/L dengan *yield* sebesar 51,1% melalui perhitungan sebagai berikut (Lopez, dkk., 2009):



Diketahui:

$$\text{mr glukosa} = 180,16 \text{ g/mol}$$

$$\text{mr etanol} = 46,07 \text{ g/mol}$$

Jika dilakukan fermentasi pada media yang mengandung 1 gram glukosa, secara teoritis etanol yang dihasilkan adalah sebagai berikut:

$$\text{berat etanol} = \frac{1 \text{ g glukosa}}{1} \times \frac{1 \text{ mol glukosa}}{180,16 \text{ g glukosa}} \times \frac{2 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol glukosa}} \times \frac{46,07 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}}$$

$$= \frac{2 \times 46,07 \text{ g etanol}}{180,16 \text{ L}}$$

$$= 0,511 \text{ g}$$

Maka, diperoleh berat etanol secara teoritis adalah 0,511 g dan *yield* dihitung sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Yield teoritis} &= \frac{\text{berat etanol (g)}}{\text{gula gula sebelum fermentasi (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{0,511}{1} \times 100\% \\ &= 51,1\% \end{aligned}$$

Berdasarkan hasil penelitian, data perhitungan *yield* dirangkum dalam Tabel L4.10. *Yield* eksperimen dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Yield eksperimen (\%)} &= \frac{\text{Konsentrasi bioetanol hasil analisis (\%)}}{\text{gula terpakai (\%)}} \times 100\% \\ &= \frac{10,766}{13,343} \times 100\% \\ &= 80,686\% \end{aligned}$$

Tabel L4.10 *Yield* bioetanol

Perlakuan	Yield (%)		Total (%)	Rata-rata (%)
	Ulangan 1	Ulangan 2		
A ₁ B ₁	80,686	69,517	150,203	75,102
A ₂ B ₁	92,891	67,363	160,254	80,127
A ₃ B ₁	53,642	33,635	87,277	43,639
A ₁ B ₂	18,369	29,593	48,232	24,116
A ₂ B ₂	30,361	29,859	60,220	30,110
A ₃ B ₂	6,408	10,278	16,686	8,343

L4.6 Uji Statistik Pengaruh Variasi Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol

L4.6.1 Pengaruh Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Kadar_Bioetanol

Penambahan_YE	Lama_Fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
A1	B1	9.65100	1.576848	2
	B2	3.24650	1.153291	2
	Total	6.44875	3.865840	4
A2	B1	1.23005E1	1.341382	2
	B2	4.61050	.208597	2
	Total	8.45550	4.508470	4
A3	B1	6.84900	1.561292	2
	B2	1.33950	.557907	2
	Total	4.09425	3.321821	4
Total	B1	9.60017	2.700000	6
	B2	3.06550	1.580037	6
	Total	6.33283	4.011780	12

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Kadar_Bioetanol

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	168.630 ^a	5	33.726	24.066	.001
Intercept	481.257	1	481.257	343.418	.000
Penambahan_YE	38.122	2	19.061	13.602	.006
Lama_Fermentasi	128.106	1	128.106	91.414	.000
Penambahan_YE * Lama_Fermentasi	2.403	2	1.201	.857	.470
Error	8.408	6	1.401		
Total	658.296	12			
Corrected Total	177.038	11			

a. R Squared = .953 (Adjusted R Squared = .913)

Post Hoc Tests
Penambahan_YE

Multiple Comparisons

Kadar_Bioetanol
Tukey HSD

(I) Penam bahan _YE	(J) Penam bahan _YE	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A1	A2	-2.00675*	.837070	.116	-4.57511	.56161
	A3	2.35450	.837070	.069	-.21386	4.92286
A2	A1	2.00675*	.837070	.116	-.56161	4.57511
	A3	4.36125*	.837070	.005	1.79289	6.92961
A3	A1	-2.35450	.837070	.069	-4.92286	.21386
	A2	-4.36125*	.837070	.005	-6.92961	-1.79289

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.401.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Kadar_Bioetanol

Tukey HSD

Penambahan_ YE	N	Subset	
		1	2
A3	4	4.09425	
A1	4	6.44875	
A2	4		8.45550
Sig.		.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1.401.

L4.6.2 Pengaruh Penambahan *Yeast Extract* dan Lama Fermentasi Terhadap *Yield Bioetanol*

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Yield_Bioetanol

Penambahan_YE	Lama_Fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
A1	B1	7.51015E1	7.897676	2
	B2	2.39810E1	7.936567	2
	Total	4.95412E1	30.214058	4
A2	B1	8.01270E1	18.051022	2
	B2	3.01100E1	.354968	2
	Total	5.51185E1	30.701062	4
A3	B1	4.36385E1	14.147085	2
	B2	8.34300	2.736503	2
	Total	2.59908E1	22.010610	4
Total	B1	6.62890E1	20.749669	6
	B2	2.08113E1	10.719573	6
	Total	4.35502E1	28.495525	12

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Yield_Bioetanol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8272.988 ^a	5	1654.598	15.066	.002
Intercept	22759.404	1	22759.404	207.231	.000
Penambahan_YE	1912.210	2	956.105	8.706	.017
Lama_Fermentasi	6204.654	1	6204.654	56.495	.000
Penambahan_YE * Lama_Fermentasi	156.124	2	78.062	.711	.528
Error	658.956	6	109.826		
Total	31691.349	12			
Corrected Total	8931.944	11			

a. R Squared = .926 (Adjusted R Squared = .865)

Post Hoc Tests
Penambahan_YE

Multiple Comparisons

Yield_Bioetanol
Tukey HSD

(I) Penam bahan _YE	(J) Penam bahan _YE	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A1	A2	-5.57725*	7.410332	.743	-28.31418	17.15968
	A3	3.55050	7.410332	.044	.81357	46.28743
A2	A1	5.57725*	7.410332	.743	-17.15968	28.31418
	A3	29.12775*	7.410332	.018	6.39082	51.86468
A3	A1	-3.55050	7.410332	.044	-26.28743	-.81357
	A2	-29.12775*	7.410332	.018	-51.86468	-6.39082

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 109.826.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Yield_Bioetanol

Tukey HSD

Penambahan_ YE	N	Subset	
		1	2
A3	4	2.59908E1	
A1	4	2.95412E1	
A2	4		5.51185E1
Sig.		.743	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 109.826.

L4.6.3 Viabilitas Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Air Kelapa yang Ditambahkan Tetes Tebu

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Jumlah_K hamir

Penambahan_YE	Lama_Fermentasi	Mean	Std. Deviation	N
A1	B1	2.29500E9	4.332724E8	3
	B2	5.45000E8	2.560762E8	3
	Total	1.42000E9	1.009985E9	6
A2	B1	2.44433E9	5.330416E7	3
	B2	5.96667E8	2.410567E8	3
	Total	1.52050E9	1.023983E9	6
A3	B1	7.62500E8	1.321221E8	3
	B2	4.25000E8	1.203121E8	3
	Total	5.93750E8	2.166665E8	6
Total	B1	1.83394E9	8.378145E8	9
	B2	5.22222E8	2.008904E8	9
	Total	1.17808E9	8.970897E8	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Jumlah_Khamir

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.299E19 ^a	5	2.598E18	45.024	.000
Intercept	2.498E19	1	2.498E19	432.985	.000
Penambahan_YE	3.103E18	2	1.552E18	26.893	.000
Lama_Fermentasi	7.743E18	1	7.743E18	134.197	.000
Penambahan_YE * Lama_Fermentasi	2.143E18	2	1.071E18	18.568	.000
Error	6.924E17	12	5.770E16		
Total	3.866E19	18			
Corrected Total	1.368E19	17			

a. R Squared = .925 (Adjusted R Squared = .894)

Post Hoc Tests
Penambahan_YE

Multiple Comparisons

Jumlah_Khamir
Tukey HSD

(I) Penam bahan _YE	(J) Penam bahan _YE	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A1	A2	-1.00500E8*	1.386805E8	.754	-4.70481E8	2.69481E8
	A3	8.26250E8	1.386805E8	.000	4.56269E8	1.19623E9
A2	A1	1.00500E8*	1.386805E8	.754	-2.69481E8	4.70481E8
	A3	9.26750E8*	1.386805E8	.000	5.56769E8	1.29673E9
A3	A1	-8.26250E8	1.386805E8	.000	-1.19623E9	-4.56269E8
	A2	-9.26750E8*	1.386805E8	.000	-1.29673E9	-5.56769E8

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 57696819444444400.000.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

Jumlah_Khamir

Tukey HSD

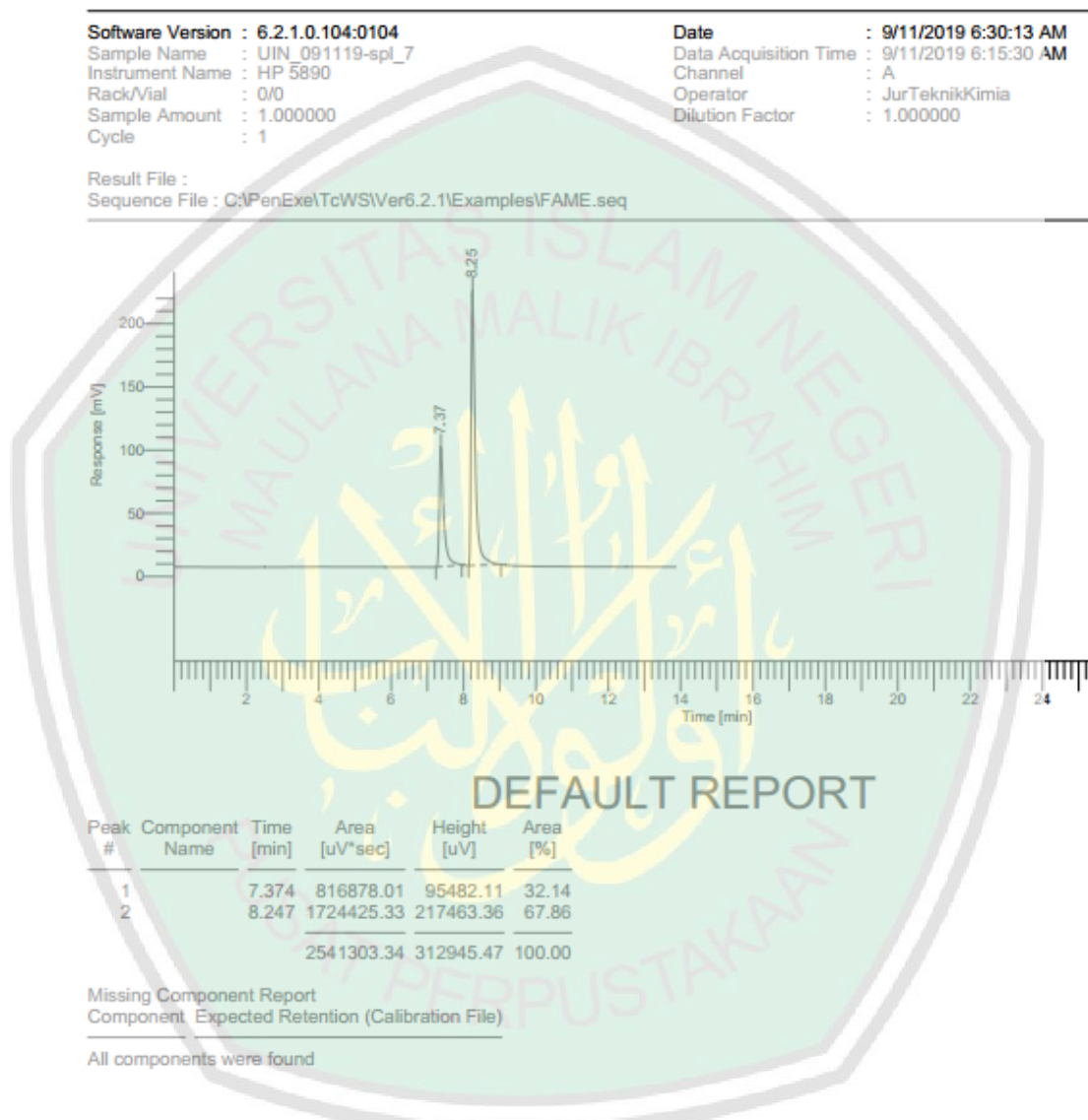
Penambahan_ YE	N	Subset	
		1	2
A3	6	5.93750E8	
A1	6	1.42000E8	
A2	6		1.52050E9
Sig.		.754	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) =
57696819444444400.000.

Lampiran 5. Kromatogram Bioetanol Hasil Analisis Menggunakan Instrumen Kromatografi Gas

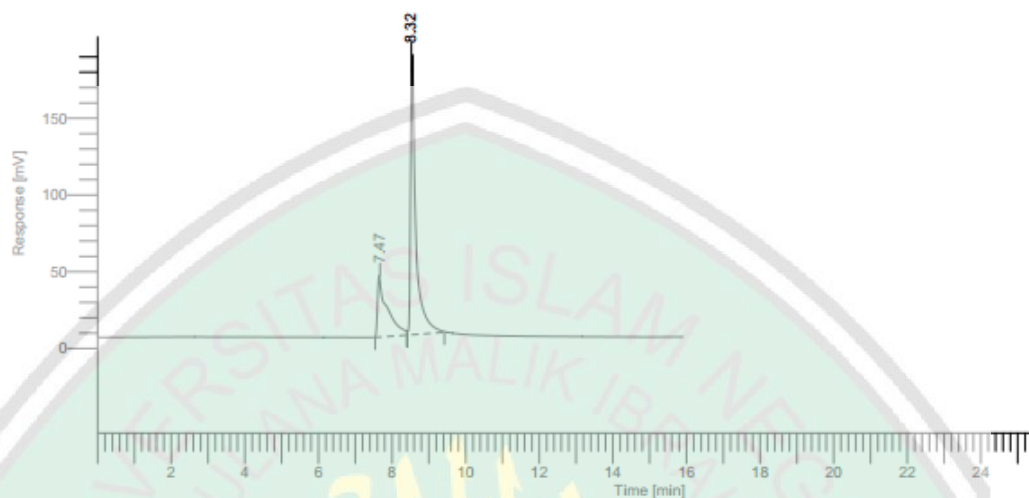


Gambar L5.1 Kromatogram perlakuan A₁B₁ ulangan 1

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_2
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 4:39:47 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 4:23:52 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.468	692193.33	40000.83	28.61
2		8.318	1727623.79	182184.71	71.39
			2419817.12	222185.54	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

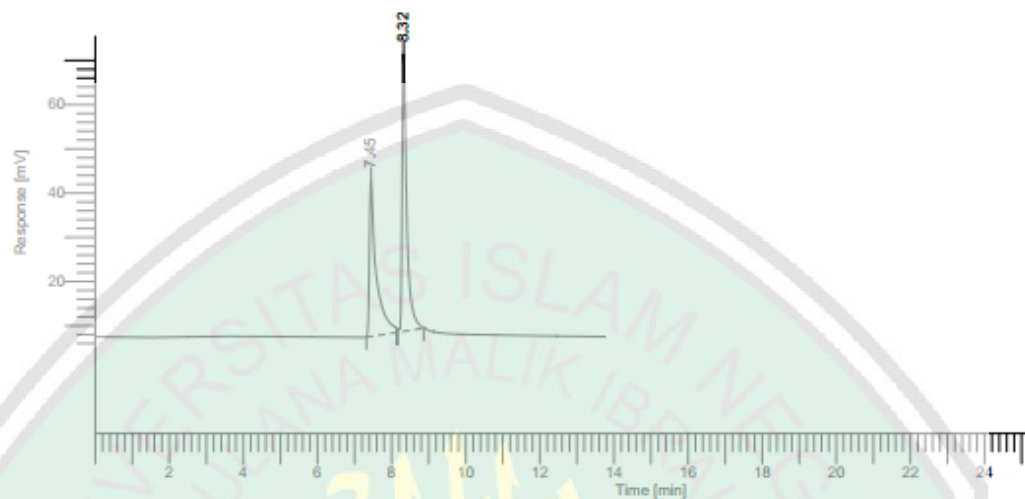
All components were found

Gambar L5.2 Kromatogram perlakuan A₁B₁ ulangan 2

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_9
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 7:12:58 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 6:58:17 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.447	457672.20	35247.44	45.75
2		8.324	542642.75	63112.58	54.25
			1000314.95	98360.01	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

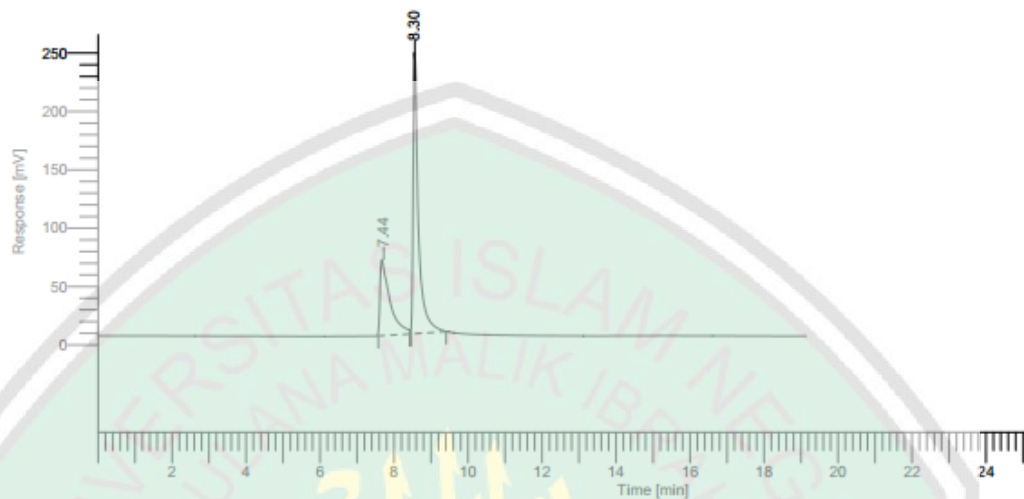
All components were found

Gambar L5.3 Kromatogram perlakuan A₂B₁ ulangan 1

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_3
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 5:12:53 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 4:53:45 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.442	1147566.97	65138.65	33.58
2		8.308	2270324.88	242331.43	66.42
			3417891.86	307470.08	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

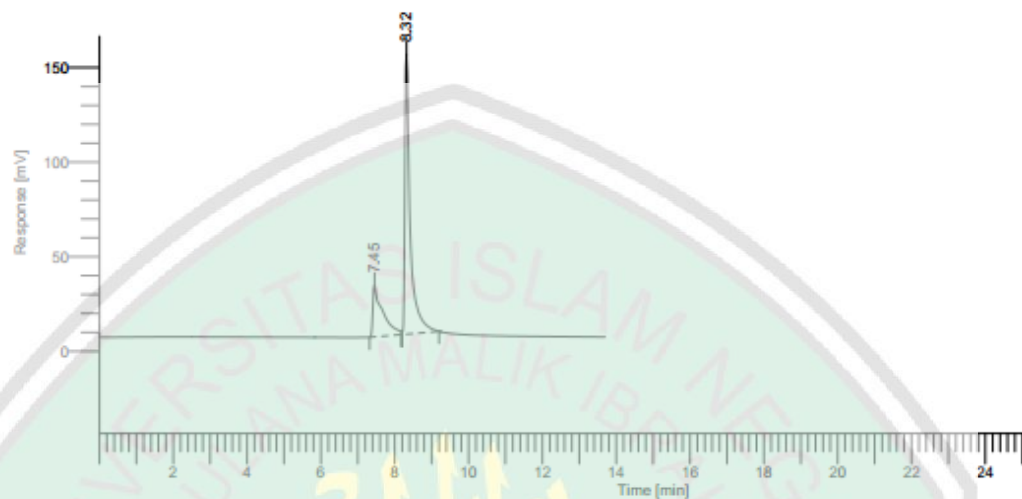
All components were found

Gambar L5.4 Kromatogram perlakuan A₂B₁ ulangan 2

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_11
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 7:42:23 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 7:27:59 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.455	505733.19	27538.91	25.44
2		8.319	1482558.73	148232.50	74.56
			1988291.92	175771.41	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

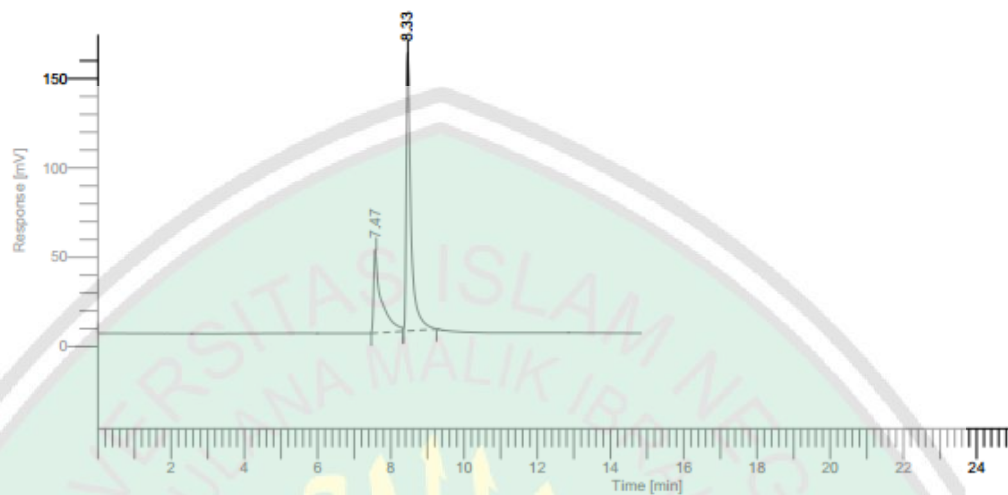
All components were found

Gambar L5.5 Kromatogram perlakuan A₃B₁ ulangan 1

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_5
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 5:46:38 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 5:31:46 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.469	662401.91	46427.74	32.44
2		8.332	1379219.24	155481.72	67.56
			2041621.15	201909.46	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

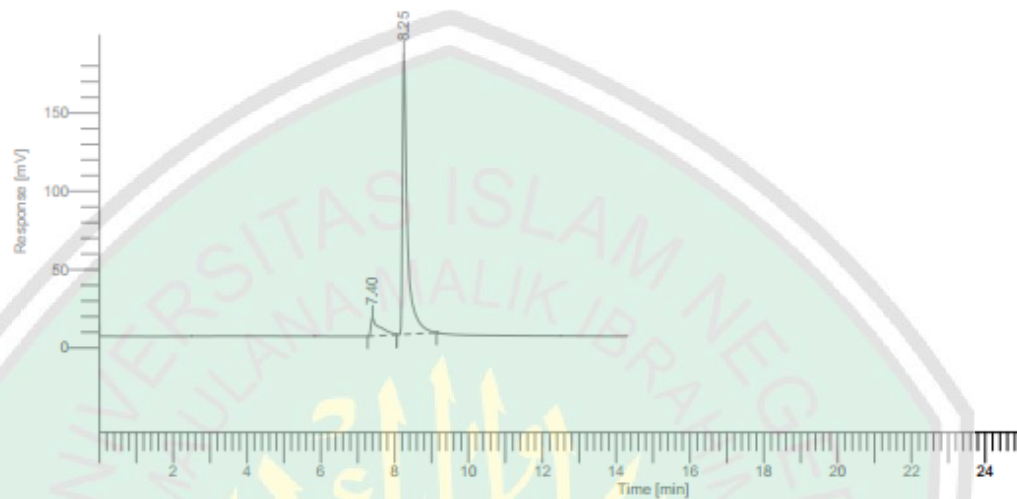
All components were found

Gambar L5.6 Kromatogram perlakuan A₃B₁ ulangan 2

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_8
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 6:44:33 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 6:29:56 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.403	193118.97	11608.11	10.33
2		8.252	1675602.86	179052.25	89.67
			1868721.83	190660.36	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

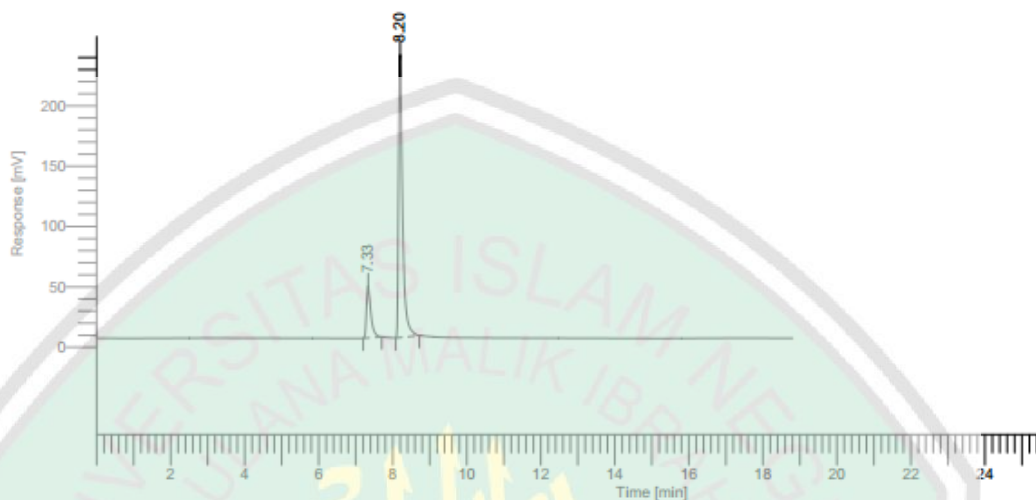
All components were found

Gambar L5.7 Kromatogram perlakuan A₁B₂ ulangan 1

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_4
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 5:32:04 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 5:12:34 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.335	351301.39	42977.33	16.51
2		8.197	1776021.56	234356.93	83.49
			2127322.95	277334.25	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

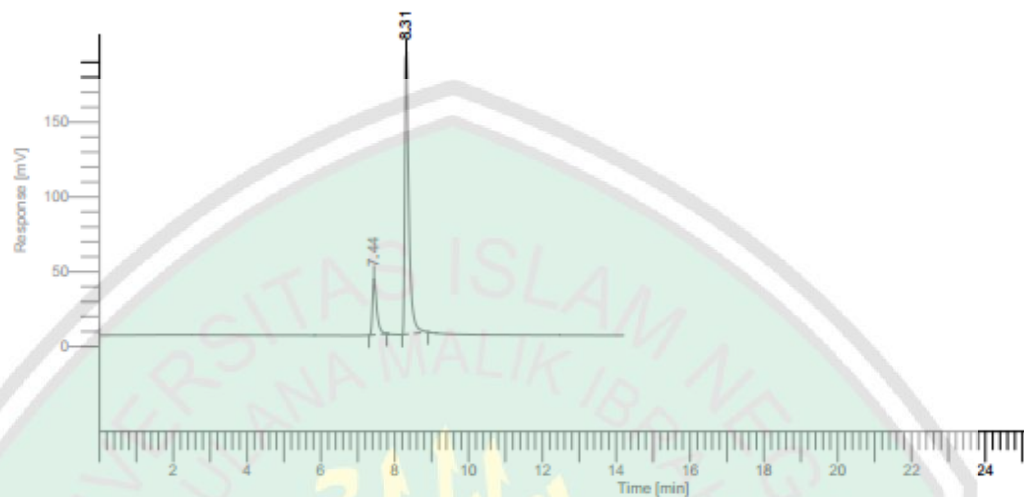
All components were found

Gambar L5.8 Kromatogram perlakuan A₁B₂ ulangan 2

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_12
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 7:57:08 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 7:42:07 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.441	299294.91	37742.02	17.25
2		8.313	1435524.94	188157.98	82.75
			1734819.84	225900.00	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

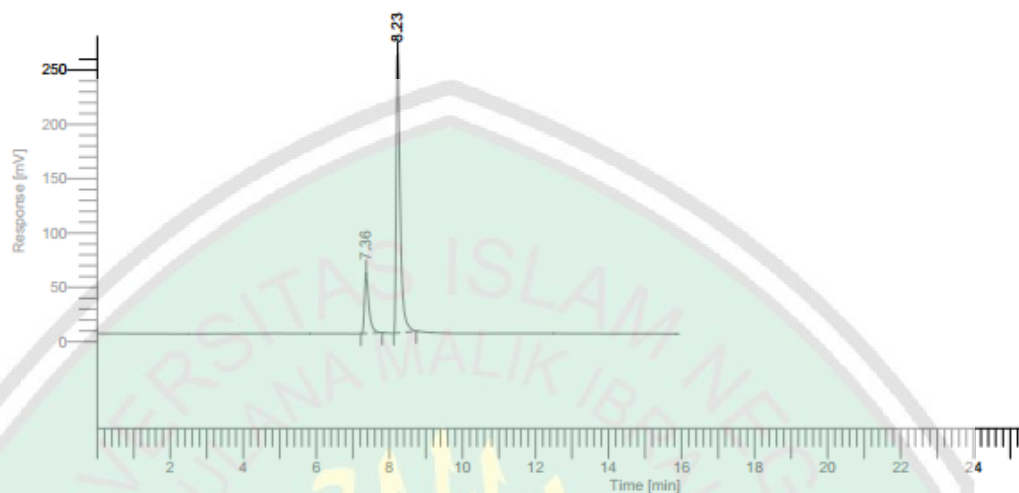
All components were found

Gambar L5.9 Kromatogram perlakuan A₂B₂ ulangan 1

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-sp1_6
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 6:03:01 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 5:46:24 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.363	461373.89	55788.19	19.18
2		8.228	1944709.36	257138.85	80.82
			2406083.25	312927.03	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

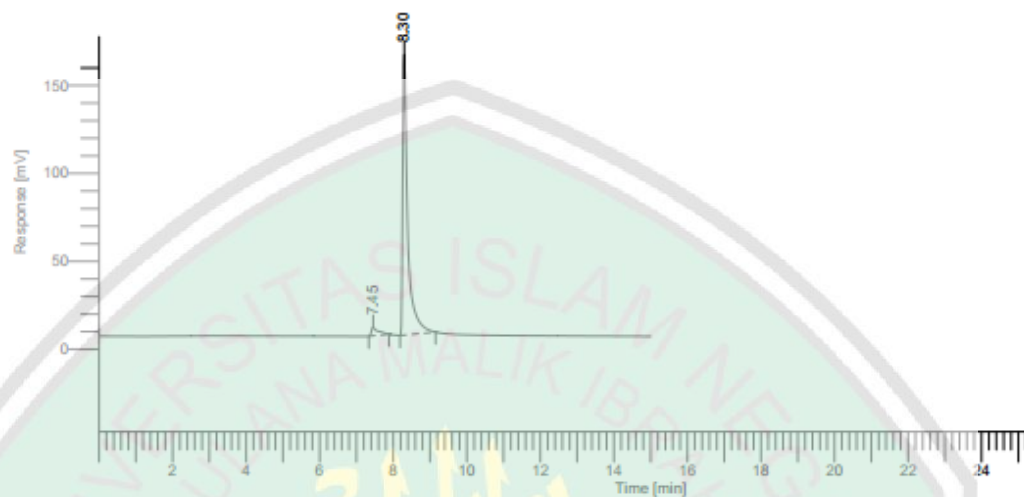
All components were found

Gambar L5.10 Kromatogram perlakuan A₂B₂ ulangan 2

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_10
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 7:28:14 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 7:12:36 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.453	63775.90	4900.98	4.04
2		8.300	1516755.61	158777.82	95.96
			1580531.51	163678.80	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

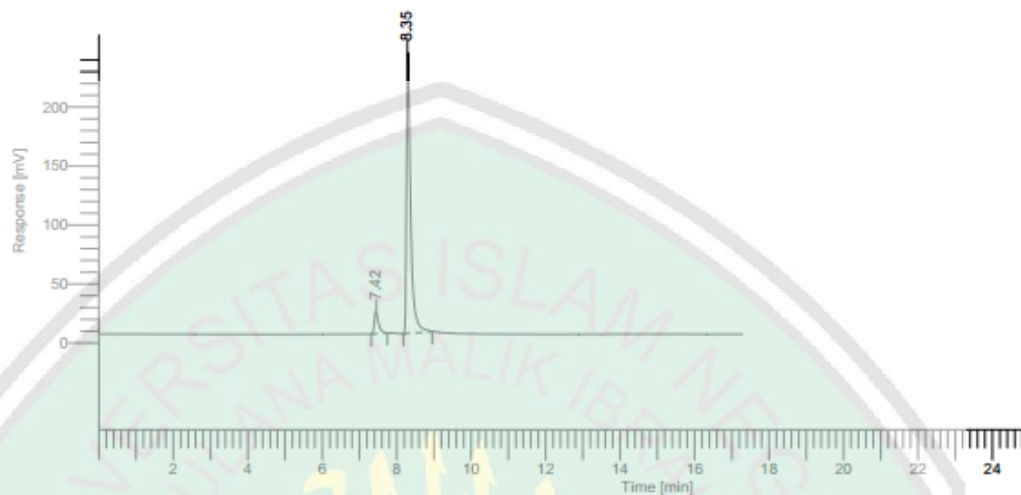
All components were found

Gambar L5.11 Kromatogram perlakuan A₃B₂ ulangan 1

Software Version : 6.2.1.0.104:0104
 Sample Name : UIN_091119-spl_1
 Instrument Name : HP 5890
 Rack/Vial : 0/0
 Sample Amount : 1.000000
 Cycle : 1

Date : 9/11/2019 4:22:09 AM
 Data Acquisition Time : 9/11/2019 4:05:07 AM
 Channel : A
 Operator : JurTeknikKimia
 Dilution Factor : 1.000000

Result File :
 Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.2.1\Examples\FAME.seq



DEFAULT REPORT

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]
1		7.420	143231.94	18871.37	7.41
2		8.355	1788545.12	237541.81	92.59
			1931777.06	256413.19	100.00

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Gambar L5.12 Kromatogram perlakuan A₃B₂ ulangan 2

Lampiran 6. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



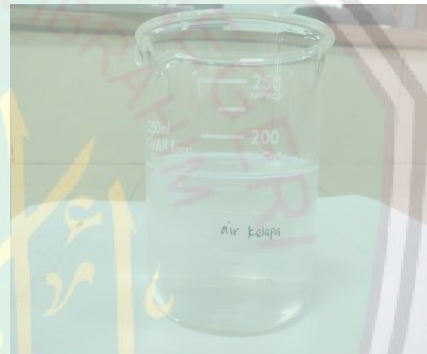
Gambar L6.1 Stok *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar L6.2 Hasil Regenerasi *Saccharomyces Cerevisiae*



Gambar L6.3 Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar L6.4 Air kelapa



Gambar L6.5 Tetes tebu



Gambar L6.6 Fermentasi bioetanol



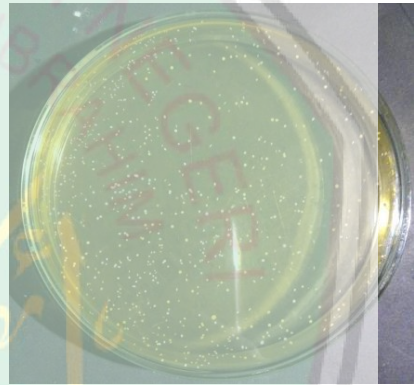
Gambar L6.7 Proses destilasi



Gambar L6.8 Produk bioetanol



Gambar L6.9 Hasil analisis gula dengan metode sulfat fenol



Gambar L6.10 Hasil perhitungan sel khamir dengan metode TPC