

**ISOLASI KHAMIR DARI TETES TEBU (MOLASE) DAN POTENSINYA
DALAM MENGHASILKAN ETANOL**

SKRIPSI

Oleh :

**Lu'luul Fathimatuzzuhro Algas
(09630012)**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

**ISOLASI KHAMIR DARI TETES TEBU (MOLASE) DAN POTENSINYA
DALAM MENGHASILKAN ETANOL**

SKRIPSI

**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)**

**Oleh:
LU'LUUL FATHIMATUZZUHRO ALGUS
NIM. 09630012**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2014**

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Lu'Luul Fathimatuzzuhro Algas

NIM : 09630012

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Isolasi Khamir dari Tetes Tebu (Molase) dan Potensinya
dalam Menghasilkan Etanol

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 07 Juli 2014
Yang Membuat Pernyataan,

Lu'Luul Fathimatuzzuhro Algas
NIM. 09630049

**ISOLASI KHAMIR DARI TETES TEBU (MOLASE) DAN POTENSINYA
DALAM MENGHASILKAN ETANOL**

SKRIPSI

Oleh:
LU'LUUL FATHIMATUZZUHRO ALGUS
NIM. 09630012

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 07 Juli 2014

Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, M.Si (.....)
NIP. 19820616 200604 1 002
Ketua Penguji : A. Hanapi, M.Sc (.....)
NIPT. 201402 11 422
Sekretaris Penguji : Akyunul Jannah, S.Si, M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009
Anggota Penguji : Tri Kustono Adi, M.Sc (.....)
NIP. 19710311 200312 1 002

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M.Si
19790620 200604 2 002

**ISOLASI KHAMIR DARI TETES TEBU (MOLASE) DAN POTENSINYA
DALAM MENGHASILKAN ETANOL**

SKRIPSI

**Oleh:
LU'LUUL FATHIMATUZZUHRO ALGUS
NIM. 09630012**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal : 07 Juli 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Tri Kustono Adi, M.Sc
NIP. 19710311 200312 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M.Si
19790620 200604 2 002

MOTTO

كُتِبَ عَلَيْكُمُ الْقِتَالُ وَهُوَ كُرْهُ لَكُمْ وَعَسَىٰ أَن تَكْرَهُوا شَيْئًا
وَهُوَ خَيْرٌ لَّكُمْ وَعَسَىٰ أَن تُحِبُّوا شَيْئًا وَهُوَ شَرٌّ لَّكُمْ وَاللَّهُ يَعْلَمُ
وَأَنْتُمْ لَا تَعْلَمُونَ ﴿٢١٦﴾

Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu; Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui. (QS. Al-Baqarah, 2: 216)

Jadi Diri Sendiri, Cari Jati Diri, Dan Dapatkan Hidup Yang Mandiri Optimis, Karena Hidup Terus Mengalir Dan Kehidupan Terus Berputar Sesekali Liat Ke Belakang Untuk Melanjutkan Perjalanan Yang Tiada Berujung

Jadilah seperti karang di lautan yang kuat dihantam ombak dan kerjakanlah hal yang bermanfaat untuk diri sendiri dan orang lain, karena hidup hanyalah sekali. Ingat hanya pada Allah apapun dan di manapun kita berada kepada Dia-lah tempat meminta dan memohon.

Tidak ada masalah yang tidak bisa diselesaikan selama ada komitmen bersama untuk menyelesaikannya.

Berangkat dengan penuh keyakinan
Berjalan dengan penuh keikhlasan
Istiqomah dalam menghadapi cobaan

(Lu'luul Fathimatuzzuhro Algas/09630012)

Lembar Persembahan

Ya Allah

Terima kasih atas nikmat dan rahmat-mu yang agung ini, hari ini hamba bahagia

Sebuah perjalanan panjang dan gelap...telah kau berikan secercah cahaya terang

Meskipun hari esok penuh teka-teki dan tanda tanya yang aku sendiri belum tahu pasti jawabanya

Di tengah malam aku bersujud, kupertanya kepada-mu di saat aku kehilangan arah, kumohon petunjuk-mu

Aku sering tersandung, terjatuh, terluka dan terkadang harus kutelan antara keringat dan air mata

Namun aku tak pernah takut, aku takkan pernah menyerah karena aku tak mau kalah, Aku akan terus melangkah berusaha dan berdo'a tanpa mengenal putus asa.

Syukur alhamdulillah.....

Kini aku tersenyum dalam iradat-mu

Kini baru kumengerti arti kesabaran dalam penantian.....sungguh tak kusangka ya....allah

Kau menyimpan sejuta makna dan rahasia

Ibunda tercinta "Aowisia"

Kau kirim aku kekuatan lewat untaian kata

dan iringan do'a

Tak ada keluh kesah di wajahmu dalam

mengantar anakmu ke gerbang masa depan

yang cerah

Tuk raih segeggam harapan dan impian

menjadi kenyataan

Ayahanda tersayang "Agus"

Kau begitu kuat dan tegar

dalam hadapi hidup ini

Kau jadikan setiap tetes keringatmu sebagai semangat meraih cita-cita

Hari-harimu penuh tantangan dan pengorbanan

Tak kau hiraukan terik matahari membakar kulitmu

Tak kau pedulikan hujan deras mengguyur tubuhmu

Ibunda dan ayahanda.....

Inilah kata-kata yang mewakili seluruh rasa, sungguh aku tak mampu menggantikan kasihmu dengan

apapun, tiada yang dapat kub berikan agar setara dengan pengorbananmu padaku, kasih sayangmu tak

pernah bertepi cintamu tak pernah berujung...tiada kasih seindah kasihmu, tiada cinta semurni cintamu.

Adikku satu-satunya "dek Fia" yang selalu memberikan keceriaan di tengah keluarga, adik yang selalu

ceria dan juga rajin, selalu membuat kakak menjadi semangat.



Terimakasih kepada bu Akyunnul Jannah, S.Si, M.P dan bu Anik Maunatin, M.P yang telah membimbing dan memberikan semangat, baik moril maupun materil. Tulisan ini tidak akan tercipta tanpa orang-orang disekitarku yang mendukung, terimakasih atas do'anya. Semoga ilmu yang saya dapatkan bermanfaat. Amiin...

Untuk tulusnya persahabatan yang telah terjalin, spesial buat Dita, Hesti, Icus, Afi, Lya, Devi, Mia, dan Diah, suka duka, canda tawa, semua telah kita lewati bersama. Kalian sahabat terbaikkku.



Buat seseorang yang jauh di sana yang tetap setia menemaniku hingga saat ini, berbagai cobaan kita lalui, namun kau slalu menguatkanku, kaulah penyemangatku. Dan buat partnerku mas Hendi makasih atas kerjasamanya selama penelitian, tanpa pean tulisan ini tak mungkin terselesaikan, trimakasih untuk semuanya yang sudah kau ajarkan untukku, di sini kita sama-sama belajar.

Tak lupa juga kawan-kawan Biotek, yang selalu memberi keceriaan di lab, kak David thanks ilmunya ^_^, Farid, Asad, Ihyak, Maksum, mbak Zahra dan mbak Danar. Dan semua yang tak bisa ku sebut satu per satu, yang pernah ada atau pun hanya singgah dalam hidup ku, yang pasti kalian bermakna dalam hidupku...

KATA PENGANTAR



Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya, dan hanya dengan ridho-Nya semata penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian ini dengan judul : **“ISOLASI KHAMIR DARI TETES TEBU (MOLASE) DAN POTENSINYA DALAM MENGHASILKAN ETANOL”**. Pada kesempatan ini penulis ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi penelitian ini, khususnya kepada:

1. Kedua orang tua yang telah banyak memberikan nasihat, doa, dan dukungan baik moril maupun materil sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang Bapak Prof. H. Mudjia Raharjo, M.SI.
3. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Ibrahim Malang Ibu Dr. Drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si.
4. Ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si.
5. Para dosen pembimbing Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P, Ibu Anik Maunatin, S.T, M.P dan Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc, karena atas bimbingan,

pengarahan, kesabaran dan motivasinya penyusunan skripsi dapat diselesaikan.

6. Dosen Penguji Bapak A.Ghanaim Fasya dan juga Bapak Ahmad Hanapi, atas masukan dan sarannya skripsi ini bisa menjadi lebih baik.
7. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Seluruh Staf Laboratorium dan Staf Administrasi Jurusan Kimia dan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Keluargaku (Kedua Orang Tuaku dan Saudaraku).
10. Teman-temanku Se-penelitian (mas Hendi, Dita, Hesti, Farid, Asad, Ihyak, mbak Zahra dan mbak Danar).
11. Teman-teman kimia angkatan 2009 yang telah saling memotivasi dan membantu terselesainya skripsi ini.
12. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah khasanah ilmu pengetahuan.

Malang, 07 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-------------|
| KATA PENGANTAR | i |
| DAFTAR ISI | iii |
| DAFTAR GAMBAR | v |
| DAFTAR TABEL | vi |
| DAFTAR LAMPIRAN | vii |
| ABSTRAK | viii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 7 |
| 1.3 Tujuan | 7 |
| 1.4 Batasan Masalah | 7 |
| 1.5 Manfaat | 8 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 9 |
| 2.1 Pemanfaatan Tetes Tebu untuk Produksi Etanol dalam Perspektif Islam | 9 |
| 2.2 Tetes Tebu | 10 |
| 2.3 Etanol | 13 |
| 2.4 Fermentasi Etanol | 16 |
| 2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 23 |
| 2.6 Media Pertumbuhan | 28 |
| 2.6.1 Macam-macam Media | 29 |
| 2.6.2 <i>Yeast extract</i> | 30 |
| 2.7 Metode Isolasi | 31 |
| 2.8 Morfologi dan Pengecatan | 37 |
| 2.9 Analisis Kadar Bioetanol Dengan Kromatografi Gas | 39 |
| 2.10 Pengukuran Brix | 43 |
| | |
| BAB III METODOLOGI | 48 |
| 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian | 48 |
| 3.2 Alat dan Bahan | 48 |
| 3.2.1 Alat | 48 |
| 3.2.2 Bahan | 48 |
| 3.3 Rancangan Penelitian | 49 |
| 3.4 Tahap Penelitian | 50 |
| 3.5 Prosedur Penelitian | 51 |
| 3.5.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan | 51 |
| 3.5.2 Pembuatan Media | 51 |
| 3.5.2.1 Media <i>Yeast extract Peptone Glucose Agar</i> (YPGA) | 51 |
| 3.5.2.2 Media <i>Yeast extract Peptone Glucose Broth</i> (YPGB) | 52 |
| 3.5.3 Pengukuran Brix Tetes Tebu | 52 |
| 3.5.4 Isolasi Khamir dari Tetes tebu | 53 |
| 3.5.5 Identifikasi Khamir Hasil Isolasi dari Tetes Tebu | 53 |

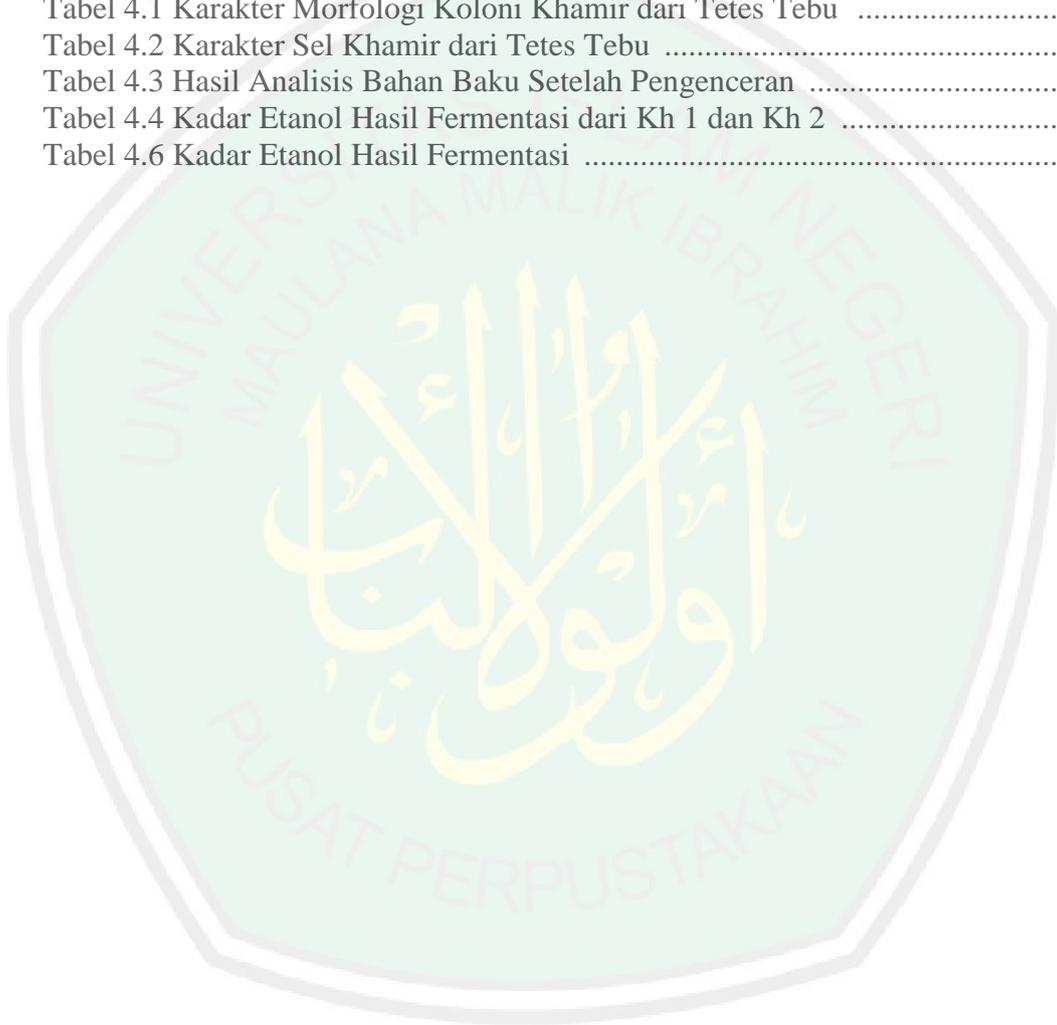
| | |
|--|-----------|
| 3.5.5.1 Uji Morfologi Koloni | 53 |
| 3.5.5.2 Uji Morfologi Sel | 54 |
| 3.5.6 Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh1 dan Kh2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi | 54 |
| 3.5.7 Pembuatan Inokulum | 55 |
| 3.5.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir | 55 |
| 3.5.9 Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh isolat Khamir Kh2 | 56 |
| 3.5.10 Destilasi Etanol Hasil Fermentasi | 56 |
| 3.5.11 Analisis Kadar Etanol dengan <i>Gas Chromatography</i> (GC) Metode Standar Internal | 56 |
| 3.5.11.1 Proses Persiapan Alat Kromatografi Gas | 56 |
| 3.5.11.2 Analisis Kadar Etanol dengan Kromatografi Gas | 57 |
| 3.5.12 Analisis Data | 57 |
| BAB IV PEMBAHASAN | 58 |
| 4.1 Isolasi Khamir dari Tetes Tebu (Molasses) | 58 |
| 4.2 Uji Khamir secara Makroskopis dan Mikroskopis | 60 |
| 4.2.1 Uji Khamir Secara Makroskopis | 60 |
| 4.2.2 Uji Khamir Secara Mikroskopis | 61 |
| 4.3 Preparasi Tetes Tebu (Molasses) | 64 |
| 4.4 Produksi Etanol Oleh Khamir Kh 1 dan Kh 2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi | 65 |
| 4.5 Produksi Etanol Oleh Khamir Kh 2 | 68 |
| 4.5.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir Kh 2 | 68 |
| 4.5.2 Pengaruh Lama Fermentasi oleh Khamir Kh 2 terhadap Produksi Etanol | 70 |
| 4.5.3 Destilasi Etanol Hasil Fermentasi | 73 |
| 4.5.4 Pengukuran Kadar Etanol dengan Metode Kromatografi Gas | 75 |
| 4.6 Analisis Kadar Gula Sisa Fermentasi | 78 |
| 4.7 Efisiensi Fermentasi | 79 |
| 4.8 Pemanfaatan Limbah Tetes Tebu dalam Perspektif Islam | 80 |
| BAB V KESIMPULAN | 85 |
| 5.1 Kesimpulan | 85 |
| 5.2 Saran | 85 |
| DAFTAR PUSTAKA | 86 |
| LAMPIRAN | 94 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 Tetes Tebu | 12 |
| Gambar 2.2 Jalur Glikolisis Substrat Karbohidrat | 18 |
| Gambar 2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 24 |
| Gambar 2.4 Kurva Pertumbuhan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 26 |
| Gambar 2.5 Teknik <i>Streak Plate</i> | 32 |
| Gambar 2.6 Alat Kromatografi Gas | 39 |
| Gambar 2.7 <i>Hand Brix Refraktometer</i> | 45 |
| Gambar 4.1 Isolat Terduga Hasil Isolasi dari Tetes Tebu | 59 |
| Gambar 4.2 Bentuk Sel Khamir Kh 1 Hasil Isolasi dari Tetes Tebu | 63 |
| Gambar 4.3 Kromatogram Isolat Kh1 | 67 |
| Gambar 4.4 Kromatogram Isolat Kh2 | 68 |
| Gambar 4.5 Kurva Pertumbuhan Isolat Kh 2 | 69 |
| Gambar 4.6 Skema Embden Meyerhoff-Pamas Pathway | 72 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 2.1 Komposisi Kimiawi Tetes Tebu (molase) | 11 |
| Tabel 2.2 Hasil Analisis Komposisi Tebu (molase) | 12 |
| Tabel 2.3 Karakteristik Pertumbuhan Koloni Bakteri | 32 |
| Tabel 4.1 Karakter Morfologi Koloni Khamir dari Tetes Tebu | 62 |
| Tabel 4.2 Karakter Sel Khamir dari Tetes Tebu | 64 |
| Tabel 4.3 Hasil Analisis Bahan Baku Setelah Pengenceran | 66 |
| Tabel 4.4 Kadar Etanol Hasil Fermentasi dari Kh 1 dan Kh 2 | 70 |
| Tabel 4.6 Kadar Etanol Hasil Fermentasi | 78 |



Daftar Lampiran

| | |
|--|-----|
| Lampiran 1 Diagram Penelitian | 95 |
| Lampiran 2 Skema Kerja | 96 |
| L.2.1 Sterilisasi Alat | 96 |
| L.2.2 Pembuatan Media | 96 |
| L.2.2.1 <i>Yeast extract</i> Peptone Glucose Agar | 96 |
| L.2.2.2 <i>Yeast extract</i> Glucose Broth | 96 |
| L.2.3 Preparasi Sampel | 97 |
| L.2.4 Isolasi Khamir | 97 |
| L.2.5 Identifikasi Khamir | 98 |
| L.2.5.1 Uji Morfologi Koloni | 98 |
| L.2.5.2 Uji Morfologi Sel | 98 |
| L.2.6 Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh1 dan Kh2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi | 98 |
| L.2.7 Pembuatan Inokulum | 99 |
| L.2.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir Kh 2 | 99 |
| L.2.9 Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Etanol dari Tetes Tebu Menggunakan Khamir Hasil Isolat | 99 |
| L.2.10 Destilasi Etanol Hasil Fermentasi | 100 |
| L.2.11 Penentuan Kadar Etanol dengan Metode Kromatografi Gas (GC) | 100 |
| Lampiran 3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir | 100 |
| Lampiran 4 Pembuatan Larutan H ₂ SO ₄ 0,1 N | 103 |
| Lampiran 5 Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standart 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 m/L (ppm) | 103 |
| Lampiran 6 Pengenceran Tetes Tebu Sebelum Proses Fermentasi | 105 |
| Lampiran 7 Data Analisis Panjang Gelombang Maksimum Glukosa Spektrofotometer Uv-Vis | 105 |
| L.7.1 Kurva Standar Glukosa | 106 |
| L.7.2 Data Analisis Kurva Standar Glukosa Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis | 107 |
| Lampiran 8 Analisis Kadar Gula Metode Fenol Sulfat | 108 |
| L.8.1 Analisis Kadar Gula Bahan Baku | 108 |
| L.8.2 Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis Bahan Baku Molase Sebelum Fermentasi | 109 |
| L.8.3 Analisis Kadar Gula Setelah Fermentasi | 110 |
| L.8.4 Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis Kadar Gula Setelah Fermentasi | 112 |
| L.8.5 Analisis Kadar Gula Terpakai Pada Proses Fermentasi | 113 |
| Lampiran 9 Analisis Kadar Etanol Hasil Tetes Tebu Menggunakan Kromatografi Gas | 114 |
| Lampiran 10 Kromatogram Standar Etanol dan <i>acrylonitril</i> | 115 |

| | |
|---|-----|
| Lampiran 11 Kromatogram Sampel | 116 |
| Lampiran 12 Perhitungan <i>Yield</i> | 122 |
| Lampiran 13 Menghitung Efisiensi Fermentasi | 123 |
| Lampiran 14 Dokumentasi Penelitian | 125 |



ABSTRAK

Fathimatuzzuhro, L. 2014. **Isolasi Khamir dari Tetes Tebu (Molase) dan Potensinya dalam Menghasilkan Etanol**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: Akyunul Jannah M.Si, Anik Maunatin M.P, dan Tri Kustono Adi, M.Sc.

Kata Kunci : Tetes tebu, Khamir, dan Etanol

Tetes tebu merupakan limbah pengolahan gula yang mengandung gula cukup tinggi sehingga sangat potensial dimanfaatkan sebagai media fermentasi. Fermentasi tetes tebu untuk menghasilkan etanol menjadi salah satu upaya mengurangi jumlah limbah dan memenuhi kebutuhan Bahan Bakar Minyak (BBM) yang semakin meningkat. Produksi etanol dapat dilakukan dengan bantuan khamir. Mengingat pentingnya peranan khamir dalam produksi etanol, maka perlu dilakukan isolasi khamir secara *endogenous* dari tetes tebu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi khamir dari tetes tebu dan mengetahui kemampuan khamir hasil isolasi dari tetes tebu dalam produksi etanol.

Penelitian ini meliputi isolasi serta identifikasi makroskopis dan mikroskopis khamir yang berhasil diisolasi dari tetes tebu. Selanjutnya, dilakukan uji kemampuan khamir terbaik hasil isolasi dari tetes tebu dalam menghasilkan etanol dengan variasi lama fermentasi yang terdiri dari 3, 4, 5, 6, dan 7 hari. Masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali, kemudian etanol hasil fermentasi dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas.

Hasil isolasi dari penelitian ini didapatkan 2 isolat khamir yaitu khamir Kh1 dan Kh2. Setelah dilakukan uji produksi etanol dari tetes tebu diperoleh hasil bahwa khamir Kh2 menghasilkan kadar etanol lebih tinggi daripada khamir Kh1. Berdasarkan hasil analisis pada perlakuan fermentasi oleh khamir Kh2 dengan variasi 3, 4, 5, 6, dan 7 hari diperoleh kadar etanol berturut-turut sebesar 10,995 %, 8,735 %, 20,355 %, 43,435 %, dan 9,965 %. Perlakuan yang terbaik adalah pada lama fermentasi 6 hari yaitu dengan *yield* 97,47 %, dan efisiensi fermentasi 88,17 %. Hal ini menunjukkan bahwa khamir Kh2 mempunyai potensi dan berperan dalam proses produksi etanol dari tetes tebu.

ABSTRACT

Fathimatuzzuhro, L. 2014. **Isolation of Yeast from Molasses (molasses) and Potency in Produce Ethanol**. Thesis. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology of the State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor: Jannah Akyunul M.Si, Anik Maunatin MP, and Tri Kustono Adi, M.Sc.

Keywords: Molasses, Yeast, and Ethanol

Molasses is a sugar processing wastes containing sugar high enough to potentially be used as fermentation media. Fermentation of molasses to produce ethanol be an effort to reduce the amount of waste and meet the needs of fuel oil (BBM) is increasing Ethanol production can be done with the help of yeast. One of the commonly used yeast is *Saccharomyces* sp. Given the importance of the role of yeast in ethanol production, it is necessary to be an endogenous yeast isolation from molasses. The purpose of this study was to isolate yeast from molasses and determine the ability of yeasts isolated from molasses in the production of ethanol.

This research includes the isolation and identification of macroscopic and microscopic yeasts isolated from molasses. Furthermore, the best test the ability of yeast isolated from molasses to produce ethanol by fermentation time variation consisting of 3, 4, 5, 6, and 7 days. Each repetition as much as 2 times, then ethanol fermentation results analyzed using gas chromatography.

Isolation results of this study were obtained 2 isolates of yeast, they were Kh1 yeast and Kh2 yeast. The production of ethanol from molasses obtained the result Kh2 yeast produces ethanol level which higher than Kh1 yeast. Based on the analysis result in the treatment of fermentation by Kh2 yeast with variations 3, 4, 5, 6, and 7 days were obtained ethanol levels successively are 10.995%, 8.735%, 20.355%, 43.435% and 9.965%. The best treatment is the fermentation for 6 days which obtains yield 97.47%, and fermentation efficiency 88.17%. It is show that the Kh2 yeast has the potential and function in the production of ethanol from molasses.

الملخص

فطمة الزهري ، L . 2014. العزل الخميرة من المولاس (دبس السكر) وفاعلية في إنتاج الإيثانول. البحث . القسم الكيمياء، الكلية العلمية والتكنولوجيا . الجامعة الحكومية الإسلامية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرفة: أكينون الجنة الماجستير ، أنيك ماوتين الماجستير ، وتري كوسطنو عدي، الماجستير

الكلمات الرئيسية: دبس والخميرة، والإيثانول

دبس السكر هو مخلفات تصنيع السكر التي تحتوي على السكر مرتفعة بما يكفي ليحتفل أن تستخدم وسائل الإعلام التخمير. تخمير المولاس لإنتاج الإيثانول يكون محاولة لتقليل كمية النفايات وتلبية الاحتياجات من زيت الوقود (BBM) آخذ في الازدياد. ويمكن أن يتم إنتاج الإيثانول مع مساعدة من الخميرة. واحدة من الخميرة شيوعا هو خميرة س. نظرا لأهمية دور الخميرة في إنتاج الإيثانول، فمن الضروري أن تكون العزلة الذاتية الخميرة من المولاس. وكان الغرض من هذه الدراسة لعزل الخميرة من المولاس وتحديد قدرة الخمائر المعزولة من دبس السكر في إنتاج الإيثانول. هذا البحث يتضمن عزل وتحديد الخمائر العيانية والمجهرية المعزولة من المولاس. وعلاوة على ذلك، فإن أفضل اختبار قدرة الخميرة المعزولة من دبس السكر لإنتاج الإيثانول عن طريق التخمير الاختلاف الوقت تتكون من 3، 4، 5، 6، و 7 أيام. كل التكرار بقدر 2 مرات، ثم تحليل النتائج باستخدام الإيثانول التخمير اللوني للغاز.

النتائج العزلة الحصول عليها من هذه الدراسة هي مخمر الخميرة 2 يعزل Kh1 و Kh2 . بعد اختبار إنتاج الإيثانول من المولاس المتحصل عليها أن الخمائر Kh2 التي تنتج مستويات عالية من الإيثانول. استنادا إلى تحليل في علاج الخميرة التخمير بواسطة Kh2 مع وجود اختلافات 3، 4، 5، 6، و 7 أيام من مستويات الإيثانول الحصول عليها تباعا من قبل 10،995٪، 8.735٪، 20.355٪، 43.435٪، 9.965٪. و أفضل علاج هو الوقت التخمير هو 6 أيام لانتاج 97.47٪، 88.17٪ وكفاءة التخمير. هذا يشير إلى أن Kh2 الخميرة لديه القدرة ودورها في إنتاج الإيثانول من المولاس.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka.” (Q.S ali Imran: 190-191).

Allah tidak menciptakan semua makhluk dengan sia-sia, yakni tanpa suatu tujuan, melainkan dengan adanya berbagai manfaat yang terdapat di dalamnya, bahkan sumber daya alam yang belum termanfaatkan secara maksimal seperti limbah tetes tebu (Abbas, 2009). Manusia diberikan kesempatan yang seluas-luasnya untuk mengambil manfaat dari hewan dan tumbuhan (Ahmad,dkk., 2006). Limbah tebu telah banyak dimanfaatkan oleh berbagai industri di Indonesia, khususnya limbah yang berupa tetes tebu (molase). Pemanfaatan limbah merupakan salah satu cara untuk mengurangi pencemaran lingkungan dan merupakan wujud rasa syukur kita terhadap semua yang telah Allah ciptakan untuk manusia. Karena Allah SWT menciptakan alam dan isinya seperti hewan

dan tumbuh-tumbuhan mempunyai hikmah yang amat besar, semuanya tidak ada yang sia-sia dalam ciptaan-Nya.

Perkembangan industri gula di Indonesia dari waktu ke waktu selalu menarik untuk dibahas. Produksi gula nasional selalu mengalami peningkatan dari tahun ke tahun, pada tahun 2003 meningkat dari 1,6 juta ton menjadi 2,25 juta ton pada tahun 2005 dan meningkat lagi menjadi 2,27 juta ton pada tahun 2006. Tahun 2008 lalu, produksi gula nasional dari 58 pabrik gula yang ada juga mengalami peningkatan cukup signifikan menjadi 2,78 juta ton (Data Riset Industri dan Pemasaran Gula di Indonesia, 2009). Pabrik gula selalu mengeluarkan limbah yang berbentuk cairan, padatan dan gas dalam operasionalnya setiap musim giling (setahun). Seiring dengan meningkatnya jumlah produksi gula dari tahun ke tahun, maka limbah yang dihasilkan juga semakin meningkat seperti limbah berbentuk cair yang berupa tetes (molasses). Pada tahun 2011 tetes yang dihasilkan oleh PTPN sebesar 310.167 ton, sedangkan pada tahun 2012 meningkat menjadi 367.046 ton. Peningkatan jumlah tetes dari tahun ketahun mendorong masyarakat untuk memanfaatkan tetes menjadi produk yang lebih bermanfaat (Aliya, 2013).

Tetes tebu atau biasa disebut molase adalah salah satu hasil samping dari proses pembuatan gula tebu (sukrosa) yang merupakan cairan kental sisa industri gula dan tidak dapat lagi membentuk kristal sukrosa pada proses kristalisasi (Paturau, 1982). Tetes tebu berupa cairan kental berwarna coklat kehitam-hitaman, berbau khas, berasa sepat manis. Tetes tebu tersusun dari bahan organik, anorganik dan air. Sekitar 52 % dari tetes tebu merupakan total gula (sukrosa,

dekstrosa atau glukosa, dan fruktosa), sekitar 10 % atau lebih adalah garam anorganik atau abu, 10-20 % air dan selebihnya bahan organik non gula. Kandungan gula dalam tetes tebu bervariasi tergantung varietas tebu, periode penanaman dan pemanenan, cara pengolahan di perusahaan dan lain sebagainya (Baikow, 1982). Industri yang memanfaatkan tetes salah satunya adalah industri yang menghasilkan produk distilasi seperti alkohol. Umumnya tetes tebu digunakan sebagai media untuk produksi alkohol di Indonesia karena bisa diperoleh secara luas dan murah, selanjutnya untuk memproduksi alkohol/etanol itu dapat dilakukan melalui proses fermentasi.

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia yang disebabkan oleh aktivitas mikroba ataupun oleh aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Jalur metabolisme karbohidrat yang pernah diselidiki adalah sistem fermentasi etanol oleh khamir (Berry, dkk., 1988). Khamir yang dapat digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces sp*, *Saccharomyces uvarum* dan *Kluyveromyces sp* (Rehm dan Reed, 1981). Adapun syarat mikroorganisme yang digunakan harus menghasilkan etanol yang tinggi, toleran terhadap kadar etanol tinggi, mampu hidup pada suhu tinggi, tetap stabil selama proses fermentasi dan pada pH rendah (Rehm dan Reed, 1981).

Berbagai mikroba telah digunakan dalam fermentasi etanol, diantaranya yang paling lazim adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae* (ragi) yang merupakan mikroorganisme paling komersial saat ini, serta mempunyai pertumbuhan sempurna pada suhu ± 30 °C dan pH 4,8 (Narita, 2005). Highina dkk. (2011) melakukan penelitian produksi etanol dari tetes tebu menggunakan

Saccharomyces cerevisiae dengan variasi pH yang digunakan adalah pH 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; dan 6. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa produksi bioetanol tertinggi diperoleh pada perlakuan pH 4,5 dengan kadar etanol yang dihasilkan sebesar 73 %. Selain faktor pH, perlakuan yang berpengaruh pada proses fermentasi adalah lama fermentasi. Wahyudi (1997) melaporkan bahwa fermentasi bioetanol dari tetes tebu memakan waktu 7 hari. Utami dkk. (2012) melakukan proses fermentasi tetes tebu menggunakan variasi konsentrasi gula 6, 8, 10, 12, dan 14 % (w/v) dan variasi lama fermentasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 hari dengan pH yang digunakan adalah pH 4,5. Bioetanol tertinggi diperoleh pada hari ke-6, dengan konsentrasi gula 10 % (w/v) dan bioetanol yang diperoleh sebesar 11,75 %.

Khamir dapat diperoleh dengan cara isolasi. Isolasi mikroorganisme adalah mengambil mikroorganisme yang terdapat di alam dan menumbuhkannya dalam suatu medium buatan. Proses pemisahan atau pemurnian dari mikroorganisme lain perlu dilakukan karena semua pekerjaan mikrobiologis, misalnya telaah dan identifikasi mikroorganisme, memerlukan suatu populasi yang hanya terdiri dari satu macam mikroorganisme saja. Prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lainnya yang berasal dari campuran bermacam-macam mikroba. Hal ini dapat dilakukan dengan menumbuhkannya dalam media padat sel-sel mikroba akan membentuk suatu koloni sel yang tetap pada tempatnya (Sutedjo, 1996).

Guimaraes (2006) melaporkan bahwa hasil isolasi *Saccharomyces* dari anggur, ditemukan spesies yang paling dominan sebanyak 61 koloni dengan

morfologi yang sesuai dengan spesies *Saccharomyces cerevisiae*. Istiana dkk., (2012) juga melakukan isolasi *Saccharomyces cerevisiae* dari 89 sampel yang terdiri atas tape singkong (27), tape ketan (16), ragi (32), kompos (3), lahang (4), madu (3), dan sampel lainnya. Sampel-sampel tersebut ditumbuhkan dalam cawan petri berisi media *sabourauds glucose agar* (SGA) dengan pH 5,5. Hasil pemeriksaan diperoleh sebanyak 7 isolat dari 89 sampel asal tape, ragi, cuka, madu dan lainnya (organ, cairan fermentasi) yang memiliki karakter morfologi *Saccharomyces cerevisiae*. Sedangkan *Saccharomyces sp.* telah diidentifikasi sebanyak 15 isolat, selanjutnya jenis khamir lain yang ditemukan adalah *Candida sp.* sebanyak 36 dan *Trichosporon sp.* sebanyak 17. Qureshi, dkk., (2007), melakukan isolasi sebanyak 25 sampel dari berbagai sumber yaitu makanan, jus jeruk dan tetes tebu kemudian dikumpulkan secara acak dari daerah yang berbeda dari Rawalpindi dan 40 jenis ragi diisolasi dengan menggunakan media selektif Sabouraud's dekstroza agar (SDA). Jumlah total jenis ragi yang terisolasi dari ragi roti, jus jeruk, sampingan, dan tetes tebu adalah 1, 14, 13 dan 12. Masing-masing dari 40 jenis sampel, 14 diidentifikasi sebagai *Saccharomyces cerevisiae*, 12 sebagai *Saccharomyces kluyveri*, 4 sebagai *Saccharomyces exigus* dan *Saccharomyces dairnensis*, 2 sebagai *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces octosporus* dan *Saccharomyces unisporus*.

Khamir yang diperoleh dapat diidentifikasi dengan melakukan pengamatan pada morfologi sel dan koloni. Pada penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati (2010), pengamatan morfologi sel *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan secara mikroskopik dengan pewarnaan sederhana menggunakan pewarna safranin.

Pengamatan dilakukan untuk memastikan bahwa khamir yang akan digunakan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme lain. Berdasarkan hasil pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1.000x, terlihat bentuk morfologi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai berikut: sel berbentuk bulat, oval, silinder, bulat panjang dengan salah satu ujungnya runcing, segitiga melengkung, bentuk botol atau lemon. Nova dkk., (2012) telah melakukan studi isolasi *Saccharomyces sp* dari limbah cair PT. Coca Cola yang dimulai dari pengambilan limbah padat coca cola yang diambil dari PT. Coca Cola, Sumatera Barat. Hasil isolasi menunjukkan 3 koloni jamur memiliki bentuk morfologi yang berbeda, koloni 1 memiliki bentuk bulat/oval, berwarna putih, licin dan mengkilap. Pada koloni 2 memiliki bentuk bulat, berwarna putih dengan hijau di tengahnya, memiliki sedikit hifa pada sekitar koloninya. Pada koloni 3 memiliki bentuk bulat/oval, berwarna putih, memiliki banyak hifa pada sekitar koloninya. Berdasarkan pengamatan visual berdasarkan morfologinya, maka koloni 1 memiliki kesamaan dengan *Saccharomyces sp*.

Berdasarkan penelitian-penelitian di atas, dapat diketahui bahwa khamir mempunyai peranan penting dalam membantu proses pembuatan etanol. Selama ini khamir yang digunakan pada umumnya diperoleh dari berbagai bahan pangan dan limbah industri, namun penggunaan khamir yang didapat dari limbah industri gula yang berupa tetes tebu (molase) masih sedikit, sehingga pada penelitian ini khamir akan diisolasi dari tetes tebu (molase) dan diharapkan bisa ditemukan khamir yang mempunyai ciri-ci seperti *Saccharomyces sp*. karena di dalam tetes tebu masih memiliki kandungan gula yang tinggi. Selain itu tujuan dari isolasi ini

agar khamir ini memiliki sifat yang adaptif dimana ketika diperoleh dari tetes tebu maka dapat digunakan dalam pembuatan etanol dengan bahan baku yang sama yaitu tetes tebu. Khamir hasil isolasi dari tetes tebu ini diharapkan dapat menghasilkan khamir yang berpotensi untuk menghasilkan produktivitas etanol tinggi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana isolasi khamir dari tetes tebu ?
2. Bagaimana kemampuan khamir hasil isolasi dari tetes tebu dalam produksi etanol dengan variasi lama fermentasi ?

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui hasil isolasi khamir dari tetes tebu.
2. Mengetahui kemampuan khamir hasil isolasi dari tetes tebu dalam produksi etanol dengan variasi lama fermentasi.

1.3 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Tetes tebu (molase) yang digunakan diperoleh dari limbah Pabrik Gula Pesantren Kediri.
2. Lama fermentasi yang digunakan untuk menghasilkan etanol adalah 3, 4, 5, 6, dan 7 hari dengan pH 5.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Untuk memberikan informasi kepada masyarakat tentang hasil isolasi khamir dari tetes tebu.
2. Untuk memberi informasi kepada masyarakat mengenai kemampuan khamir hasil isolasi dari tetes tebu dalam produksi etanol.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tetes Tebu untuk Produksi Bioetanol dalam Perspektif Islam

Limbah adalah sisa yang tidak terpakai dari hasil aktivitas manusia. Limbah sebenarnya adalah energi yang dapat dimanfaatkan untuk keperluan lainnya. Contohnya pabrik gula menghasilkan tetes sebagai hasil samping dari produksi gula. Apabila tetes tersebut dibuang ke lingkungan maka lama kelamaan akan menjadi sumber pencemaran dan menimbulkan kerusakan lingkungan.

Pemanfaatan limbah sangat penting untuk mengurangi pencemaran lingkungan, selain itu limbah juga mempunyai harga yang lebih murah. Umumnya limbah hasil pertanian ini masih mengandung sejumlah nutrisi, sehingga dapat dikonversi menjadi produk yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Pemanfaatan sumber daya alam khususnya yang saat ini tidak didayagunakan menjadi sangat penting. Sebagaimana Allah SWT telah berfirman dalam Al Quran surat al Isra ayat 27 yang berbunyi:


 إِنَّ الْمُبَذِّرِينَ كَانُوا إِخْوَانَ الشَّيْطَانِ ط وَكَانَ الشَّيْطَانُ لِرَبِّهِ كَفُورًا

Artinya: "Sesungguhnya pemboros-pemboros itu adalah saudara-saudara syaitan dan syaitan itu adalah sangat ingkar kepada Tuhannya". (Q.S al Isra: 27)

Tafsir Al-Jazairi (2009) memberikan definisi boros lebih merujuk pada penggunaan harta berupa uang. Karena mereka menghamburkan harta untuk bermaksiat dan berbuat fasik terhadap perintah Allah. Dan inilah kondisi setan

hingga mereka menyerupainya maka jadilah mereka saudara-saudara setan. Lingkup pembahasan boros juga bisa dikaitkan dalam penggunaan harta berupa sumber daya alam yang tidak dikelola secara baik sehingga menimbulkan masalah lain berupa pencemaran lingkungan yaitu limbah. Salah satu limbah yang mampu menghasilkan bioetanol adalah molase (tetes tebu).

2.2 Tetes Tebu

Tetes tebu (molasses) adalah salah satu hasil samping yang berasal dari proses pembuatan gula tebu (sukrosa). Tetes tebu ini merupakan cairan kental sisa industri gula yang tidak dapat lagi membentuk kristal sukrosa pada proses kristalisasi (Paturau, 1982). Komposisi tetes tebu dipengaruhi oleh varietas dan kematangan tebu, kondisi iklim dan tanah. Selain itu kondisi proses di dalam pabrik gula juga mempengaruhi komposisi tetes tebu (Backer, 1980). Setiap ton tebu akan menghasilkan sekitar 2,7 % tetes tebu, tetapi hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti varietas tebu, keadaan tanah, iklim dan sebagainya. Pada umumnya tetes tebu yang diperoleh bervariasi antara 2,2 - 3,7 % (Paturau, 1982).

Tetes tebu tersusun dari bahan organik, anorganik dan air. Sekitar 52 % dari tetes tebu merupakan total gula (sukrosa, dekstroza/glukosa, dan fruktosa), sekitar 10 % atau lebih adalah garam anorganik atau abu, 10-20 % air dan selebihnya bahan organik non gula. Kandungan gula dalam tetes tebu bervariasi tergantung dari varietas tebu, periode penanaman dan pemanenan, cara pengolahan dan lain sebagainya (Baikow, 1982). Menurut Martoyo, dkk (1991), tetes tebu di Indonesia umumnya mengandung sekitar 34-35 % sukrosa dan 20-25

% gula reduksi sedangkan padatan terlarutnya sekitar 90 %, di samping itu ada zat pereduksi lain yang berasal dari gula maupun bukan gula dengan presentase yang lebih kecil. Kadar bukan gula terutama tersusun oleh asam organik dan protein. Mineral yang terdapat pada tetes tebu terutama terdiri dari kalium, kalsium, dan magnesium. Komposisi kimiawi tetes disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimiawi tetes tebu (molase)

| Unsur | Kisaran (%) | Rata-rata (%) |
|----------------------------|-------------|---------------|
| Air | 17 – 25 | 20 |
| Sukrosa | 30 – 40 | 35 |
| Dekstrosa (Glukosa) | 4 – 9 | 7 |
| Laevulosa (Fruktosa) | 5 – 12 | 9 |
| Bahan pereduksi lain | 1 – 5 | 3 |
| Karbohidrat lain | 2- 5 | 4 |
| Abu | 7 – 15 | 12 |
| Unsur nitrogen | 2 – 6 | 4,5 |
| Unsur bukan nitrogen | 2 – 8 | 5 |
| Lilin, sterol, phosfolipid | 0,1 - 1,0 | 0,4 |
| Pigmen | - | - |
| Vitamin | - | - |

Sumber: Paturau (1982)

Komposisi tetes tebu dari gula tebu bervariasi tergantung pada varietas dan asal tanaman tebu, sifat tanah, iklim dan cara pengolahan. Tetes dari gula tebu disebabkan oleh kandungan asam alipatik pada proses klarifikasi (Kirk dan Othmer, 1963). Paturau (1982) menyatakan bahwa tetes tebu mengandung 30-40 % sukrosa, 4-9 % glukosa dan 5-12 % fruktosa. Menurut Tarigan (2009) tetes tebu tersusun dari bahan organik, anorganik, dan air. Tetes mengandung 21,7 % glukosa, 34,19 % sukrosa, 26,46 % air, dan 17,26 % abu. Pada Tabel 2.2 disajikan hasil analisis tetes tebu di Indonesia.

Tabel 2.2 Hasil analisis komposisi tetes tebu (molasses)

| Komponen | Presentase (%) |
|----------------------|-----------------------|
| Total gula (glukosa) | 55,37 |
| Sukrosa | 30,62 |
| Protein | 3,89 |
| Air | 20,33 |
| Abu | 13,09 |

Sumber: Subandi (1988)

Tetes tebu yang dihasilkan pabrik biasanya mengandung gula sekitar 48-55 %. Konsentrasi gula tersebut terlalu pekat untuk pertumbuhan khamir. Konsentrasi gula yang terlalu pekat kurang baik karena akan menghasilkan alkohol yang terlalu tinggi konsentrasinya sehingga menghambat pertumbuhan khamir. Tetes tebu yang akan digunakan diencerkan terlebih dahulu sehingga kadar gulanya mencapai 12-17 % atau secara kasar satu volume tetes tebu diencerkan menjadi empat volume total (Wanto dan Soebagyo, 1980).



Gambar 2.1 Tetes Tebu (Wibowo, 2011)

Tetes tebu berbeda dengan bahan baku umum yang digunakan dalam produksi alkohol seperti jagung dan kentang. Bahan tersebut mengandung karbohidrat yang disimpan sebagai pati sehingga harus mengalami perlakuan awal

misalnya dengan menambahkan enzim untuk menghidrolisis pati menjadi gula yang dapat difermentasi. Sebaliknya, karbohidrat dalam tetes tebu telah siap digunakan untuk fermentasi tanpa perlakuan pendahuluan karena sudah berbentuk gula (Hidayat, 2006).

Selain itu, tetes tebu merupakan sumber daya alam yang melimpah. Hal ini didukung dengan luas lahan perkebunan tebu yang terus meningkat dari tahun ke tahun untuk digunakan dalam produksi gula. Pada tahun 2009 areal perkebunan tebu di Indonesia mencapai 473 ribu ha atau naik 2,9 % dibanding pada tahun 2008 yang hanya mencapai 460 ha. Sejalan dengan meningkatnya areal perkebunan tebu, maka produksi pun meningkat dengan pertumbuhan sekitar 2,8 % (2,85 juta ton) pada tahun 2009. Selain itu, dalam rangka memenuhi kebutuhan gula nasional dari dalam negeri, pemerintah menetapkan akan memperluas areal tanaman tebu hingga 150.000 ha pada 2010 dengan tahap awal seluas 41.705 ha (ICN 2010).

Pada tahun 2011, menurut salah satu BUMN Perkebunan, PT Perkebunan Nusantara X (PTPN X) menyebutkan bahwa produksi tetes tebu yang berasal dari industri gula yang tersebar di daerah Jawa Timur mencapai 310,67 ton. Hasil ini menunjukkan bahwa ketersediaan tetes tebu di Indonesia sudah terjamin. Selain itu, tetes tebu juga memiliki harga yang murah.

2.3 Etanol

Etanol merupakan cairan tak berwarna dan larut dalam air. Jenis alkohol ini sering disebut juga sebagai alkohol biji-bijian. Etanol merupakan senyawa

alkohol yang mempunyai rumus kimia C_2H_5OH , zat cair tak berwarna, berbau khas, mudah terbakar, dan mudah bercampur dengan air. Etanol memiliki titik didih $78,5\text{ }^\circ\text{C}$ (Mulyono, 2006). Menurut Murdiyatno (2007), 68 % etanol di dunia digunakan sebagai bahan bakar. Produksi etanol tersebut banyak dikembangkan dengan komoditi pertanian melalui fermentasi. Menurut Harahap (2003), produksi etanol dengan cara fermentasi bisa diproduksi dari 3 macam karbohidrat yaitu bahan-bahan yang mengandung gula seperti gula, tebu, gula bit, molasses (tetes), sari buah dan lain-lain.

Dalam proses fermentasi alkohol digunakan ragi. Ragi ini dapat mengubah glukosa menjadi alkohol dan gas CO_2 . Ragi merupakan mikroorganisme bersel satu, tidak berklorofil dan termasuk golongan eumycetes. Menurut Nurdyastuti (2008), etanol dapat dibuat melalui proses fermentasi diikuti kemudian dengan proses destilasi sehingga serat dan gumpalan gula dari bahan dasar (jagung, gandum, kentang, tebu, buah-buahan ataupun sisa sayur-mayur) ataupun pengotor lainnya terpisah dari etanolnya. Produksi etanol dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut. Dalam proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air dilakukan dengan penambahan air dan enzim, kemudian dilakukan proses peragian atau fermentasi gula menjadi etanol dengan menambahkan *yeast* atau ragi. Selain etanol dapat diproduksi dari bahan baku tanaman yang mengandung selulosa, namun dengan adanya lignin mengakibatkan proses penggulaannya menjadi lebih sulit, sehingga pembuatan etanol dari selulosa tidak direkomendasikan. Meskipun teknik produksi etanol merupakan

teknik yang sudah lama diketahui, namun etanol untuk bahan bakar kendaraan memerlukan etanol dengan karakteristik tertentu yang memerlukan teknologi yang relatif baru di Indonesia antara lain mengenai neraca energi (*energy balance*) dan efisiensi produksi, sehingga penelitian lebih lanjut mengenai teknologi proses produksi etanol masih perlu dilakukan. Secara singkat teknologi proses produksi etanol tersebut dapat dibagi dalam tiga tahap, yaitu gelatinasi, sakarifikasi, dan fermentasi.

Menurut Suriawiria (1986) dalam Manshur (1998) pembuatan etanol dapat dilakukan dengan dua cara yaitu :

1. Cara sintesis

Pada cara sintesis dilakukan reaksi kimia untuk mengubah bahan baku menjadi alkohol. Misalnya dengan reaksi hidrasi etilena yang merupakan hasil samping pada proses penyulingan minyak bumi.

Reaksi yang terjadi dapat dituliskan sebagai berikut :



2. Cara fermentasi

Cara ini dilakukan dengan menggunakan aktivitas mikroba. Pada proses fermentasi akan dihasilkan bioetanol. Bioetanol adalah etanol yang dihasilkan dari *biomassa* atau bahan baku alami melalui proses fermentasi.

Produksi bioetanol dengan bahan baku tanaman yang mengandung pati atau karbohidrat, dilakukan melalui proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air dilakukan dengan penambahan air dan enzim dengan

perbandingan 1:2, kemudian dilakukan proses peragian atau fermentasi gula menjadi etanol dengan penambahan yeast atau ragi.

2.4 Fermentasi Etanol

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen) maupun aerob. Secara umum, Fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal (Dirmanto, 2006).

Fermentasi mempunyai pengertian aplikasi metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai tinggi, seperti asam-asam organik, protein sel tunggal, antibiotika, dan biopolymer. Fermentasi merupakan proses yang relatif murah yang pada hakekatnya telah lama dilakukan oleh nenek moyang kita secara tradisional dengan produk-produknya yang sudah biasa dikonsumsi manusia sampai sekarang seperti tape, tempe, oncom, dan lain-lain (Nurhayani, 2000).

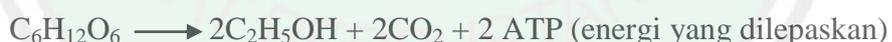
Fermentasi dapat diartikan sebagai perubahan gradual oleh enzim beberapa bakteri, khamir dan jamur. Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi pengasaman susu, dekomposisi pati dan gula menjadi alkohol dan karbondioksida, serta oksidasi senyawa nitrogen organik (Hidayat, 2006).

Pada proses fermentasi lebih dari 3 hari terjadi perombakan gula menjadi alkohol, akan dapat menyebabkan minuman sari buah beralkohol (Siswadji, 1985). Pada proses fermentasi melibatkan beberapa enzim yang dikeluarkan oleh

kapang, sehingga jumlah sel kapang yang hidup paling tinggi terdapat pada lama fermentasi 3 hari dan semakin lama fermentasi aktivitas kapang semakin menurun (Inggrid, 2003).

Lamanya proses fermentasi tergantung kepada bahan dan jenis produk yang akan dihasilkan. Proses pemeraman singkat (fermentasi tidak sempurna) yang berlangsung sekitar 1-2 minggu dapat menghasilkan produk dengan kandungan etanol 3-8 %. Contohnya adalah produk bir. Sedangkan proses pemeraman yang lebih panjang (fermentasi sempurna) yang dapat mencapai waktu bulanan bahkan tahunan seperti dalam pembuatan anggur dapat menghasilkan produk dengan kandungan etanol sekitar 7-18 % (Hidayat, 2006).

Reaksi dalam fermentasi berbeda-beda tergantung pada jenis gula yang digunakan dan produk yang dihasilkan. Secara singkat glukosa ($C_6H_{12}O_6$) yang merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan etanol ($2C_2H_5OH$). Reaksi fermentasi ini dilakukan oleh ragi, dan digunakan pada produksi makanan. Persamaan reaksi kimia yaitu :



Dijabarkan sebagai gula (glukosa, fruktosa dan sukrosa) alkohol (etanol) + karbondioksida + energi (ATP) (Nurdyastuti, 2008).

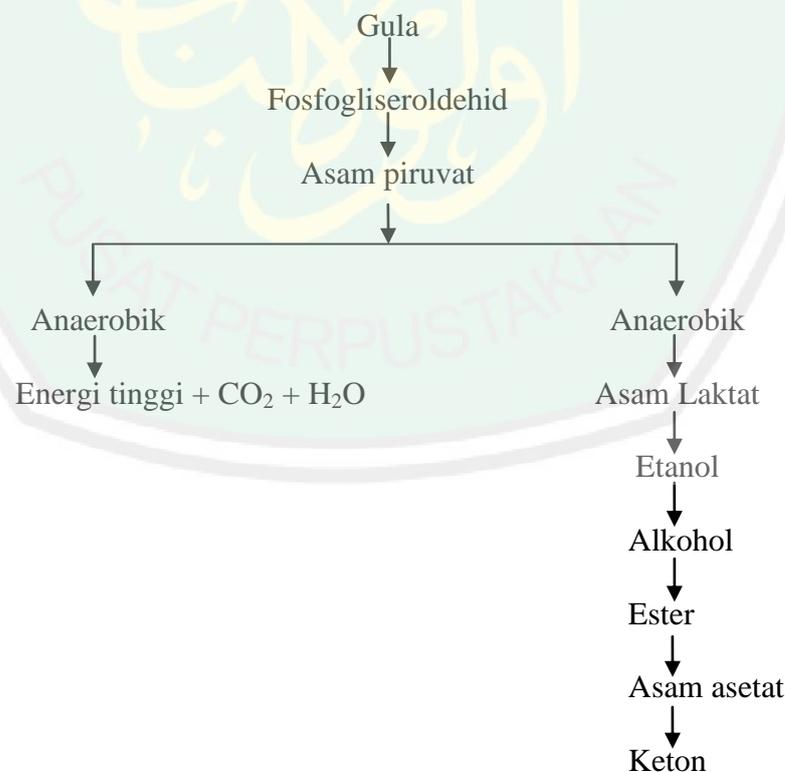
Untuk memperoleh hasil yang optimum, persyaratan untuk pertumbuhan ragi harus diperhatikan, yaitu (Winarno, 1980):

- pH dan kadar karbohidratnya dari substrat
- Temperatur selama fermentasi
- Kemurnian dari ragi itu sendiri

Proses fermentasi tergantung pada banyak sedikitnya penambahan khamir dalam bahan. Semakin banyak jumlah ragi yang diberikan berarti semakin banyak jumlah khamir yang terlibat, sehingga kadar alkohol meningkat (Tarigan, 1988).

Semakin lama fermentasi maka asam yang dihasilkan akan lebih banyak (Yuliani, 2003). Proses terjadinya penurunan pH dapat terjadi dari awal fermentasi diakibatkan terbentuknya asam-asam selama proses fermentasi berlangsung. Asam-asam yang terbentuk seperti asam asetat, asam piruvat, dan asam laktat dapat menurunkan pH (Muljono dan Daewis, 1990).

Jika tumbuh dalam keadaan anaerobik, kebanyakan khamir lebih cenderung memfermentasi substrat karbohidrat untuk menghasilkan etanol bersama sedikit produk akhir sesuai jalur glikolisis menurut Buckle (1987) sebagai berikut:



Gambar 2.2 Jalur Glikolisis Substrat Karbohidrat

Semakin lama waktu fermentasi maka semakin tinggi pula kadar alkohol yang dihasilkan dan semakin banyak dosis ragi yang diberikan maka kadar alkohol juga semakin tinggi (Sugiarti, 2007). Bahwa tinggi rendahnya kadar gula dan kadar alkohol setiap gramnya dipengaruhi oleh banyak sedikitnya kandungan karbohidrat. Hal ini menunjukkan bahwa kadar karbohidrat yang lebih tinggi mempengaruhi kadar alkohol yang dihasilkan dalam proses fermentasi karbohidrat (Sriyanti, 2003).

Beberapa faktor yang mempengaruhi proses fermentasi diantaranya adalah pH, suhu, konsentrasi gula, waktu fermentasi, aerasi, nutrisi, dan jenis mikroba (Hasanah, 2008).

a. Derajat Keasaman (pH)

Untuk fermentasi bioetanol, khamir memerlukan media dengan suasana asam, yaitu antara pH 4-5 (Hidayat dkk., 2006). Pada pH 3, khamir (ragi) sebenarnya masih dapat melakukan fermentasi, tetapi agak lambat. Karena sangat pentingnya pH maka pada sebagian besar proses fermentasi pH diatur dengan suatu sistem pengendali pH.

Derajat keasaman (pH) diatur antara 4,5 - 5,0 dengan menambahkan asam sulfat 1-2 liter per 1000 liter substrat. Periyasami (2009) mengatakan bahwa pH yang digunakan dalam fermentasi bioetanol dari tetes tebu adalah 4, sedangkan Elena (2009) mengatakan bahwa pH yang sesuai untuk proses fermentasi adalah pH 4,5. Perubahan pH dapat mempengaruhi pembentukan hasil samping. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan khamir juga tergantung pada konsentrasi

gula. Untuk menurunkan pH dapat digunakan asam sulfat dan untuk menaikkan pH digunakan natrium benzoat.

b. Suhu

Temperatur selama fermentasi perlu mendapatkan perhatian, karena disamping temperatur mempunyai efek yang langsung terhadap pertumbuhan khamir juga mempengaruhi komposisi produk akhir. Pada temperatur yang terlalu tinggi akan menonaktifkan khamir, begitu sebaliknya dengan suhu rendah. Selama proses fermentasi akan terjadi pembebasan panas sehingga akan lebih baik apabila pada tangki fermentasi dilengkapi dengan unit pendingin. Temperatur optimal untuk khamir berkisar antara 25-30 °C dan temperatur maksimal antara 35-47 °C. Beberapa jenis khamir dapat hidup pada suhu 0 °C (Hidayat dkk., 2006).

Highina dkk., (2011) mengatakan bahwa suhu yang diperlukan untuk fermentasi alkohol adalah 30 °C. Menurut Periyasami dkk., (2009) suhu optimal untuk fermentasi bioetanol adalah 35 °C. Kenaikan suhu akan menurunkan ketahanan khamir terhadap alkohol yang dihasilkan dan akan meningkatkan pembentukan asam asetat yang bersifat racun. Sedangkan Abdalbasit dkk., (2012) menyatakan bahwa suhu optimal pertumbuhan khamir pada proses fermentasi antara 33 °C.

c. Konsentrasi Gula

Wanto dan Soebagyo (1980) menyatakan bahwa tetes tebu harus diencerkan terlebih dahulu sehingga kadar gulanya 12-17 % atau dengan menambahkan air sebanyak empat kali volume tetes tebu. Bahan bergula tersebut

harus dipasteurisasi dahulu sebelum inokulasi sehingga mikroorganisme yang mengganggu fermentasi alkohol tidak aktif.

Utami dkk. (2012) melakukan penelitian tentang pengolahan limbah tetes tebu menjadi bioetanol. Parameter yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah kadar gula (6 %, 8 %, 10 %, 12 %, dan 14 %) dan waktu fermentasi (1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, 5 hari, 6 hari, dan 7 hari). Bioetanol tertinggi diperoleh pada konsentrasi gula 10 % dengan kadar bioetanol sebesar 11,75 %.

d. Lama Fermentasi

Pada proses fermentasi, jumlah mikroba antara lain dipengaruhi oleh waktu fermentasi yakni semakin lama waktu fermentasi jumlah mikroba semakin banyak dan produksi bioetanol semakin tinggi. Proses ini akan berhenti jika kadar bioetanol sudah meningkat sampai tidak dapat ditolerir lagi oleh sel-sel khamir. Tingginya kandungan bioetanol akan menghambat pertumbuhan khamir dan hanya mikroba yang toleran terhadap bioetanol yang tinggi yang dapat tumbuh. Menurut Hidayat dkk., (2006) fermentasi alkohol memakan waktu sekitar 30-40 jam. Abdalbasit dkk., (2012) mengatakan bahwa waktu fermentasi alkohol yang diperlukan adalah 3 hari. Periyasami (2009) juga menyatakan bahwa waktu fermentasi optimum bioetanol dicapai pada hari ke-3. Wahyudi (1997) melaporkan bahwa waktu fermentasi bioetanol optimum didapatkan pada hari ke-7. Sedangkan Utami dkk., (2012) mengatakan bahwa waktu fermentasi biasanya berlangsung secara sempurna selama 6 hari.

e. Aerasi

Berdasarkan kemampuannya untuk mempergunakan oksigen bebas, mikroorganisme dapat diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu: aerob (memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya), anaerob (tidak membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya), dan fakultatif (dapat tumbuh dengan baik pada keadaan ada oksigen bebas maupun tidak ada oksigen bebas). Sebagian besar khamir merupakan mikroorganisme aerob. Khamir dari kultur aerob akan menghasilkan alkohol dalam jumlah yang lebih besar apabila dibandingkan dengan khamir kultur anaerob. Akan tetapi efek ini tergantung khamir yang digunakan (Fardiaz, 1988). Aerasi yang ditujukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel khamir (ragi) penting untuk dilakukan. Aerasi harus dilakukan secukupnya, karena apabila berlebihan akan menyebabkan penurunan hasil bioetanol, rasa tawar dan terbentuknya asam-asam yang berlebihan (Hidayat dkk., 2006).

f. Nutrien

Dalam pertumbuhannya mikroba memerlukan nutrien. Nutrien yang dibutuhkan digolongkan menjadi dua yaitu nutrien makro dan nutrien mikro. Nutrien makro meliputi unsur C, N, P, K. Unsur C didapat dari substrat yang mengandung karbohidrat, unsur N didapat dari penambahan urea, sedang unsur P dan K dari pupuk NPK (Halimatuddahlia, 2003). Unsur mikro meliputi vitamin dan mineral-mineral lain yang disebut *trace element* seperti Ca, Mg, Na, S, Cl, Fe, Mn, Cu, Co, Bo, Zn, Mo, dan Al (Irianto, 2006).

g. Jenis mikroba

Mikroba berperan penting dalam proses fermentasi karena aktivitas enzim yang dimilikinya sehingga dapat terjadi perubahan-perubahan dalam proses fermentasi tersebut. Adapun macam-macam mikroba adalah sebagai berikut (Erdiyanti, 1999):

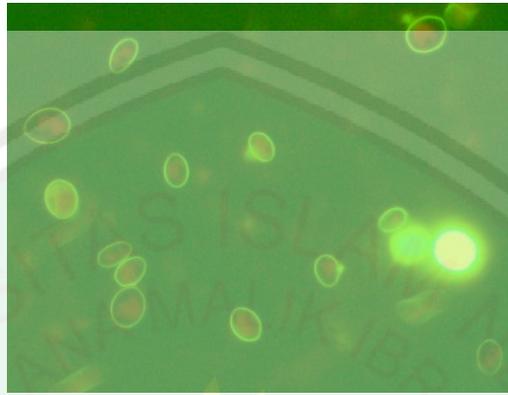
- a. Khamir, misalnya *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenul* dan *Candida* yang dapat mengubah glukosa menjadi alkohol.
- b. Bakteri, misalnya *Acetobacter* yang dapat merubah alkohol menjadi asam asetat.
- c. Kapang, misalnya *Amylomyces reuxii* (*Clamydomucor oryzae*) dan *Rhizopus* yang dapat mengubah amilum menjadi glukosa.

Ada sejumlah mikroba yaitu khamir dan bakteri yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bioetanol. Pada saat ini 95% dari fermentasi bioetanol melibatkan penggunaan spesies *Saccharomyces cerevisiae* dan spesies yang ada hubungannya dengan spesies ini (Rahayu, 1987).

2.5 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya (Gambar 2.3). dapat berkembang biak dengan membelah diri melalui “budding cell”. Reproduksiya dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampilan makroskopik mempunyai koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak dan

memiliki sel bulat dengan askospora 1-8 buah (Nikon, 2004; Landecker, 1972; Lodder, 1970).



Gambar 2.3 *Saccharomyces cerevisiae*
Sumber: Michael (2008)

Taksonomi *Saccharomyces spp.* Menurut Kavanagh (2005), sebagai berikut:

| | |
|----------|-----------------------------------|
| Kingdom | : Fungi |
| Division | : Ascomycota |
| Class | : Ascomycetes |
| Ordo | : Saccharomycetales |
| Familia | : Saccharomycetaceae |
| Genus | : <i>Saccharomyces</i> |
| Species | : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

Saccharomyces adalah genus dalam kerajaan jamur yang mencakup banyak jenis ragi. *Saccharomyces* berasal dari bahasa Latin yang berarti gula jamur. Banyak anggota dari genus ini dianggap sangat penting dalam produksi makanan. Salah satu contoh adalah *Saccharomyces cerevisiae*, yang digunakan dalam pembuatan anggur, roti, dan bir. Anggota lain dari genus ini termasuk *Saccharomyces bayanus*, digunakan dalam pembuatan anggur, dan *Saccharomyces boulardii*, digunakan dalam obat-obatan. Koloni dari *Saccharomyces* tumbuh pesat dan jatuh tempo dalam 3 hari. Mereka rata, mulus,

basah, glistening atau kuyu, dan cream untuk cream tannish dalam warna. Ketidakmampuan untuk memanfaatkan nitrat dan kemampuan untuk berbagai memfermentasi karbohidrat adalah karakteristik khas dari *Saccharomyces* (Agus, 2011).

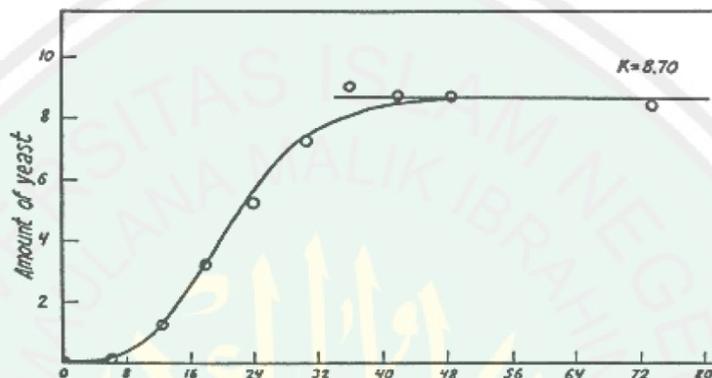
Saccharomyces cerevisiae adalah jamur bersel tunggal yang telah memahat milestones dalam kehidupan dunia. Jamur ini merupakan mikroorganisme pertama yang dikembangbiakkan oleh manusia untuk membuat makanan (sebagai ragi roti, sekitar 100 SM, Romawi kuno) dan minuman (sebagai jamur fermentasi bir dan anggur, sekitar 7000 SM, di Assyria, Caucasia, Mesopotamia, dan Sumeria). Di Indonesia sendiri, jamur ini telah melekat dalam kehidupan sehari-hari. Nenek moyang kita dan hingga saat ini kita sendiri menggunakannya dalam pembuatan makanan dan minuman, seperti tempe, tape, dan tuak.

Saccharomyces cerevisiae mempunyai kemampuan untuk mengfermentasi bermacam-macam gula yaitu sukrosa, glukosa, fruktosa, galaktosa, manosa, maltose, dan maltotriose. Tahap permulaan penggunaan gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan melalui dua cara, pertama yaitu pemindahan senyawa gula ke dalam membran sel, kedua menghidrolisis senyawa gula di luar sel dan diikuti dengan pemindahan hasil hidrolisis ke dalam membrane sel (Rahayu dan Kuswanto, 1988).

Pertumbuhan sel merupakan puncak aktivitas fisiologi yang saling mempengaruhi secara berurutan. Proses pertumbuhan ini sangat kompleks meliputi pemasukan nutrien dasar dari lingkungan ke dalam sel dan konversi

bahan-bahan nutrient menjadi energi (Kultsum, 2009). Pertumbuhan mikrobial ditandai dengan peningkatan jumlah dan massa sel serta kecepatan pertumbuhan tergantung pada lingkungan fisik dan kimia.

Kurva pertumbuhan mikroba secara umum adalah sebagai berikut:



Gambar 2.4 Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*
Sumber: Hasanah, 2008

Dari gambar 2.4 di depan menunjukkan pertumbuhan dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* yang mula-mula lambat, lalu cepat, dan akhirnya melambat saat mendekati nilai tertentu. Pada waktu ke 0-6 *Saccharomyces cerevisiae* mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan dengan substrat dan kondisi lingkungan disekitarnya. Pada waktu ke 7-11 *Saccharomyces cerevisiae* mengalami proses membelah dengan kecepatan masih rendah karena baru selesai tahap menyesuaikan diri, fase ini disebut fase pertumbuhan awal. Pada waktu ke 12-42 *Saccharomyces cerevisiae* membelah dengan cepat dan konstan. Pada waktu ini jumlah *Saccharomyces cerevisiae* meningkat dengan kecepatan eksponensial, fase ini disebut fase logaritmik. Pada waktu ke 43-168 memasuki fase stasioner dimana fase ini jumlah mikroba yang hidup sebanding dengan yang mati. Dengan demikian semakin berkurangnya jumlah nutrisi *Saccharomyces*

cerevisae dan substrat, sehingga *Saccharomyces cerevisiae* akan semakin menurun dengan bertambahnya waktu (Hasanah, 2008).

Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dapat diketahui dengan mengetahui nilai absorbansi atau dengan mengetahui *optical density* (OD). Nilai absorbansi yang terbaca tiap analisa dalam fermentasi akan menunjukkan grafik yang tidak jauh beda dengan Gambar 2.4.

Saccharomyces cerevisiae memerlukan media dan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Unsur-unsur yang dibutuhkan adalah: karbon, nitrogen, hidrogen, oksigen, fosfor, potassium, zat besi dan magnesium (Manshur, 1998).

Saccharomyces cerevisiae yang penting dalam pembuatan roti memiliki sifat dapat memfermentasikan maltosa secara cepat (lean dough yeast), memperbaiki sifat osmotolerance (sweet dough yeast), rapid fermentation kinetics, freeze dan thaw tolerance, dan memiliki kemampuan memetabolisme substrat. Pemakaian ragi dalam adonan sangat berguna untuk mengembangkan adonan karena terjadi proses peragian terhadap gula, memberi aroma (alkohol). *Saccharomyces cerevisiae* juga telah digunakan dalam beberapa industri lainnya, seperti industri roti (bakery), industri flavour, (menggunakan ekstrak ragi/yeast extracts), industri pembuatan alkohol (farmasi) dan industri pakan ternak.

Khamir lebih banyak digunakan untuk memproduksi alkohol secara komersial dibandingkan dengan bakteri. Hal ini disebabkan karena khamir dapat memproduksi alkohol dalam jumlah besar, tetapi pembuatan etanol dengan bantuan mikroorganisme seperti ragi atau khamir (*Saccharomyces cerevisiae*)

yang selama ini banyak digunakan umumnya tidak tahan pada etanol konsentrasi tinggi yang dihasilkan yang menyebabkan produktivitas etanolnya rendah. Oleh karena itu dibutuhkan mikroorganisme yang lebih berpotensi untuk menghasilkan produktivitas etanol yang tinggi dan yang mampu memenuhi semua kelemahan dari *Saccharomyces cerevisiae* (Gunasekaran dan Raj, 1999).

Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (Marx, 1991). Selain itu untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen. Pada uji fermentasi gula-gula mempunyai reaksi positif pada gula dekstrosa, galaktosa, sukrosa, maltose, raffinosa, trehalosa, dan negatif pada gula laktosa (Lodder, 1970).

2.6 Media Pertumbuhan

Media adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat hara (nutrient) yang berguna untuk membiakkan mikroba. Dengan mempergunakan bermacam-macam media dapat dilakukan isolasi, perbanyakan, pengujian sifat-sifat fisiologis dan perhitungan jumlah mikroba (Sutedjo, 1996).

Supaya mikroba dapat tumbuh baik dalam suatu media, maka medium tersebut harus memenuhi syarat-syarat antara lain (Sutedjo, 1996):

- a. Harus mengandung semua zat hara yang mudah digunakan oleh mikroba
- b. Harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba yang ditumbuhkan
- c. Harus mengandung zat-zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba

- d. Harus berada dalam keadaan steril sebelum digunakan, agar mikroba yang diinginkan dapat tumbuh baik.

2.6.1 Macam-macam Media

Media dapat digolongkan berdasarkan atas susunan kimianya, sifat wujudnya dan fungsinya. Penggolongan media berdasarkan susunan kimia (Sutedjo,1996):

1. Media anorganik. Yaitu media yang tersusun dari bahan-bahan anorganik
2. Media organik. Yaitu media yang tersusun dari bahan-bahan organik
3. Media sintetik (media buatan). Yaitu media yang susunan kimianya diketahui dengan pasti. Media ini umumnya digunakan untuk mempelajari kebutuhan makanan suatu mikroba
4. Media non sintetik. Yaitu media yang susunan kimianya tidak dapat ditentukan dengan pasti. Media ini umumnya digunakan untuk menumbuhkan dan mempelajari taksonomi mikroba.

Penggolongan media berdasarkan sifat wujudnya (Sutedjo,1996):

1. Media cair yaitu media yang berbentuk cair
2. Media padat. Yaitu media yang berbentuk padat. Media ini dapat berupa bahan organik alamiah, misalnya yang dibuat dari kentang, wortel, dan lain-lain, atau dapat juga berupa bahan anorganik misalnya silica gel
3. Media padat yang dapat dicairkan, (semi solid), yaitu yang apabila dalam keadaan panas berbentuk cair, sedangkan dalam keadaan dingin berbentuk padat, misalnya media agar.

Penggolongan media berdasarkan fungsinya (Sutedjo,1996):

1. Media diperkaya. Yaitu media yang ditambahi zat-zat tertentu misalnya serum darah ekstrak tanaman dan lain sebagainya, sehingga dapat digunakan untuk menumbuhkan mikroba yang bersifat heterotrof.
2. Media selektif. Yaitu media yang ditambahi zat kimia tertentu untuk mencegah pertumbuhan mikroba lain (bersifat selektif). Misalnya media yang mengandung Kristal violet pada kadar tertentu dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif tanpa mempengaruhi pertumbuhan bakteri gram negatif.
3. Media diferensial. Yaitu media yang ditambahi zat kimia (bahan) tertentu yang menyebabkan suatu mikroba membentuk pertumbuhan atau mengadakan perubahan tertentu sehingga dapat dibedakan tipe-tipenya.
Misalnya media daerah agar dapat digunakan untuk membedakan bakteri homolitik (pemecah darah) dan bakteri non hemolitik.
4. Media penguji. Yaitu media dengan susunan tertentu yang digunakan untuk pengujian vitamin. Vitamin asam-asam amino, antibiotika dan lain sebagainya.
5. Media untuk perhitungan jumlah mikroba. Yaitu media spesifik yang digunakan untuk menghitung jumlah mikroba dalam suatu bahan.
6. Media khusus. Yaitu media untuk menentukan tipe pertumbuhan mikroba dan kemampuannya untuk mengadakan perubahan-perubahan kimia tertentu.

2.6.2 Yeast Extract

Yeast extract terbuat dari ragi pengembang roti atau pembuat alkohol atau biasa dikenal dengan ekstrak khamir yang mengandung asam amino yang lengkap

dan vitamin B kompleks. Yeast Extract merupakan sumber yang amat kaya akan vitamin B, mengandung senyawa-senyawa karbon dan nitrogen organik (Pelczar, 2008).

Widayanti (2006) telah melakukan penelitian isolasi, pengelompokan warna dan optimasi media pertumbuhan aktinomiset selulolitik asal hutan Sulawesi Tengah. Isolate D2D2-2 memiliki biomassa terbesar ketika *yeast extract* (unsure N) ditambahkan pada media pertumbuhan CMC.

Gautam, dkk (2010) telah melakukan penelitian optimasi media pertumbuhan (*pepton, yeast extract, ammonium nitrate, sodium nitrate, dan beef extract*) untuk produksi selulase oleh *Trichoderma viride* didapatkan aktivitas enzim tertinggi.

2.7 Metode Isolasi

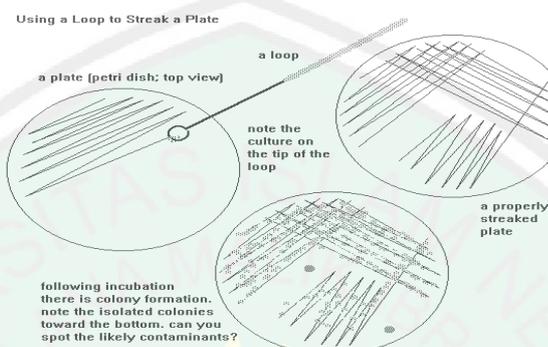
Metode-metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi biakan murni mikroorganisme antara lain cawan gores (*streak plate*), cawan tebar, dan cawan tuang (*pour plate*).

1. Teknik *Pour Plate* (Lempeng Tuang)

Teknik *Pour Plate* adalah suatu teknik dalam menumbuhkan mikroorganisme dalam media agar dengan cara mencampurkan media agar cair dengan stok kultur. Teknik ini umumnya digunakan pada metode *Total Plate Count* (TPC). Sedangkan teknik *streak plate* adalah suatu teknik dalam menumbuhkan mikroorganisme dalam media agar dengan cara menggores (*streak*) permukaan agar dengan jarum yang telah diinokulasi dengan kultur

mikroba. Teknik ini menjadikan mikroorganisme tumbuh dan tampak pada goresan-goresan inokulasi bekas jarum (Radchie, 2008).

2. Teknik *Streak Plate*



Gambar 2.5 Teknik *Streak Plate* (Rachdie, 2008)

Teknik *streak plate* (lempeng gores) adalah suatu teknik di dalam menumbuhkan mikroorganisme di dalam media agar dengan cara menstreak (menggores) permukaan agar dengan jarum ose yang telah diinokulasikan dengan kultur bakteri. Dengan teknik ini mikroorganisme yang tumbuh akan tampak dalam goresan-goresan inokulum bekas dari streak jarum enten.

Tabel 2.3 Karakteristik Pertumbuhan Koloni Bakteri

| Karakteristik Pertumbuhan Koloni Bakteri |
|---|
| Ukuran : Diameter koloni yang diukur di dalam mm atau cm |
| Bentuk Keseluruhan Koloni : Sirkular, irregular, punctiform, rhizoid |
| Tepi / Margin : Entire, lobate, erose, undulate |
| Elevasi : Datar (flat), raised, convex (cembung), pulvinate, umbonate, crateriform |
| Permukaan : Wrinkled, rough (kasar), concentric rings, dull, glistening, waxy |
| Pigmentasi : |
| Warna : merah, kuning, krim, putih, tidak berwarna |
| Kelarutan dalam air : larut dalam air, tidak larut dalam air |
| Opasitas : Transparan, translucent, opaque |
| Bau : manis, putrefactive, fruity |

Populasi mikroorganisme yang ada di alam sekitar kita ini sangatlah besar dan cukup kompleks. Beratus spesies mikroba menguasai setiap bagian tubuh kita. Mereka terdapat dalam jumlah yang cukup besar. Sebagai contoh, sekali kita

bersin dapat mnebarkan beribu-ribu mikroorganisme. Satu gram tinja dapat mengandung jutaan bakteri. Alam di sekitar kita, baik itu tanah, air, maupun udara juga dihuni oleh kumpulan mikroorganisme. Penelitian yang layak mengenai mikroorganisme dalam berbagai habitat ini memerlukan teknik untuk memisahkan populasi campuran yang rumit ini, atau yang biasanya dikenal dengan istilah biakan campuran, menjadi spesies yang berbeda-beda yang dikenal dengan istilah biakan murni. Biakan murni ini terdiri dari satu populasi sel yang semuanya berasal dari satu sel induk (Pelczar, 1986).

Mikroorganisme dapat diperoleh dari lingkungan air, tanah, udara, substrat yang berupa bahan pangan, tanaman dan hewan. Jenis mikroorganismenya dapat berupa bakteri, khamir, kapang dan sebagainya. Populasi dari mikroba yang ada di lingkungan ini sangatlah beraneka ragam sehingga dalam mengisolasi diperlukan beberapa tahap penanaman sehingga berhasil diperoleh koloni yang tunggal. Koloni yang tunggal ini kemudian yang akan diperbanyak untuk suatu tujuan penelitian misalnya untuk mengisolasi DNA mikroba yang dapat mendeteksi mikroba yang telah resisten terhadap suatu antibiotik. Atau untuk mengetahui mikroba yang dipakai untuk bioremediasi hidrokarbon (Ferdiaz, 1992).

Pemindahan bakteri dari medium lama ke medium yang baru atau yang dikenal dengan istilah inokulasi bakteri ini memerlukan banyak ketelitian. Terlebih dahulu kita harus mengusahakan agar semua alat-alat yang akan digunakan untuk pengerjaan medium dan pengerjaan inokulasi benar-benar steril. Hal ini untuk menghindari terjadinya kontaminasi, yaitu masuknya mikroba

lain yang tidak diinginkan sehingga biakan yang tumbuh di dalam medium adalah benar-benar biakan murni (Dwidjoseputro, 1990).

Di dalam keadaan yang sebenarnya dapat dikatakan bahwa tidak ada bakteri yang hidup secara tersendiri terlepas dari spesies yang lainnya. Kerap kali bakteri patogen kedapatan bersama-sama dengan bakteri saprob. Untuk menyendirikan suatu spesies dikenal beberapa cara, yaitu (Dwidjoseputro, 1990) :

1. Dengan pengenceran

Cara ini pertama kali dilakukan oleh Lister pada tahun 1865. Ia berhasil memelihara *Streptococcus lactis* dalam piaraan murni yang diisolasi dari sampel susu yang sudah masam. Suatu sampel dari suatu suspensi yang berupa campuran bermacam-macam spesies diencerkan dalam suatu tabung yang tersendiri. Dari hasil pengenceran ini kemudian di ambil kira-kira 1 mL untuk diencerkan lebih lanjut. Jika dari pengenceran yang ketiga ini diambil 0,1 mL untuk disebar pada suatu medium padat, kemungkinan besar kita akan mendapatkan beberapa koloni yang akan tumbuh dalam medium tersebut, akan tetapi mungkin juga kita hanya akan memperoleh satu koloni saja. Dalam hal yang demikian ini dapat kita jadikan piaraan murni. Jika kita belum yakin, bahwa koloni tunggal yang kita peroleh tersebut merupakan koloni yang murni, maka kita dapat mengulang pengenceran dengan menggunakan koloni ini sebagai sampel.

2. Dengan penuangan

Robert Koch (1843- 1905) mempunyai metode yang lain, yaitu dengan mengambil sedikit sampel campuran bakteri yang mudah diencerkan, dan sampel ini kemudian di sebar di dalam suatu medium yang terbuat dari kaldu dan gelatin

encer. Dengan demikian dia memperoleh suatu piaraan adukan. Setelah medium tersebut mengental maka selang beberapa jam kemudian nampaklah koloni-koloni yang masing-masing dapat dianggap murni. Dengan mengulang pekerjaan di atas, maka akhirnya akan diperoleh piaraan murni yang lebih terjamin. Ada beberapa metode yang biasanya dilakukan untuk menanam biakan di dalam medium diantaranya adalah (Lay, 1994):

1. Metode cawan gores

Metode ini mempunyai dua keuntungan yaitu menghemat bahan dan waktu. Namun untuk memperoleh hasil yang baik diperlukan keterampilan yang lumayan yang biasanya diperoleh dari pengalaman. Metode cawan gores yang dilakukan dengan baik kebanyakan akan menyebabkan terisolasinya mikroorganisme yang diinginkan. Dua macam kesalahan yang umum sekali dilakukan adalah tidak memanfaatkan permukaan medium dengan sebaik-baiknya untuk digores sehingga pengenceran mikroorganisme menjadi kurang lanjut dan cenderung untuk menggunakan inokulum terlalu banyak sehingga menyulitkan pemisahan sel-sel yang digores.

2. Metode cawan tuang

Cara lain untuk memperoleh biakan koloni murni dari populasi campuran mikroorganisme ialah dengan mengencerkan eksperimen dalam medium agar yang telah dicairkan dan didinginkan yang kemudian di cawankan. Karena konsentrasi sel-sel mikroba di dalam eksperimen pada umumnya tidak diketahui sebelumnya, maka pengenceran perlu dilakukan beberapa tahap sehingga sekurang-kurangnya satu di antara cawan-cawan tersebut mengandung koloni-

koloni terpisah baik di atas permukaan maupun di dalam agar. Metode ini memboroskan waktu dan bahan namun tidak memerlukan keterampilan yang terlalu tinggi.

Proses pemisahan/pemurnian dari mikroorganisme lain perlu dilakukan karena semua pekerjaan mikrobiologis, misalnya telaah dan identifikasi mikroorganisme, memerlukan suatu populasi yang hanya terdiri dari satu macam mikroorganisme saja. Teknik tersebut dikenal dengan Isolasi Mikroba. Terdapat berbagai cara mengisolasi mikroba, yaitu (Admin, 2008) :

1) Isolasi pada agar cawan

Prinsip pada metode isolasi pada agar cawan adalah mengencerkan mikroorganisme sehingga diperoleh individu spesies yang dapat dipisahkan dari organisme lainnya. Setiap koloni yang terpisah yang tampak pada cawan tersebut setelah inkubasi berasal dari satu sel tunggal. Terdapat beberapa cara dalam metode isolasi pada agar cawan, yaitu: Metode gores kuadran, dan metode agar cawantuang. Metode gores kuadran. Bila metode ini dilakukan dengan baik akan menghasilkan terisolasinya mikroorganisme, dimana setiap koloni berasal dari satu sel.

Metode agar tuang. Berbeda dengan metode gores kuadran, cawan tuang menggunakan medium agar yang dicairkan dan didinginkan (50°C), yang kemudian dicawankan. Pengenceran tetap perlu dilakukan sehingga pada cawan yang terakhir mengandung koloni-koloni yang terpisah di atas permukaan/di dalam cawan.

2) Isolasi pada medium cair

Metode isolasi pada medium cair dilakukan bila mikroorganisme tidak dapat tumbuh pada agar cawan (medium padat), tetapi hanya dapat tumbuh pada kultur cair. Metode ini juga perlu dilakukan pengenceran dengan beberapa serial pengenceran. Semakin tinggi pengenceran peluang untuk mendapatkan satu sel semakin besar.

3) Isolasi sel tunggal

Metode isolasi sel tunggal dilakukan untuk mengisolasi sel mikroorganisme berukuran besar yang tidak dapat diisolasi dengan metode agar cawan/medium cair. Sel mikroorganisme dilihat dengan menggunakan perbesaran sekitar 100 kali. Kemudian sel tersebut dipisahkan dengan menggunakan pipet kapiler yang sangat halus ataupun micromanipulator, yang dilakukan secara aseptis.

2.8 Morfologi dan Pewarnaan

Mikroba memiliki sifat-sifat pertumbuhan, morfologi, dan sifat fisiologi yang dapat dipelajari dengan melakukan isolasi terlebih dahulu. Isolasi merupakan suatu metode untuk memisahkan mikroba tertentu dari populasi campuran sehingga memudahkan proses identifikasi. Salah satu teknik isolasi ialah isolasi pada cawan agar untuk jenis mikroba yang dapat membentuk koloni terpisah pada media padat, yaitu bakteri dan kapang (Dwidjoseputro, 1990).

Karakterisasi merupakan salah satu kegiatan yang dilakukan untuk mengobservasi bakteri maupun kapang hasil isolasi (isolat). Kegiatan karakterisasi

dapat dilakukan berdasarkan sifat sitologi (bentuk sel, gerak atau motilitas, sifat Gram dan endospora), sifat morfologi, dan sifat fisiologi. Uji sifat morfologi mencakup sifat-sifat koloni, seperti ukuran, bentuk, warna dan tepian, sedangkan uji sifat fisiologi diantaranya uji hidrolisis pati, hidrolisis lemak, hidrolisis protein dan uji katalase (Nurjanna, 2007).

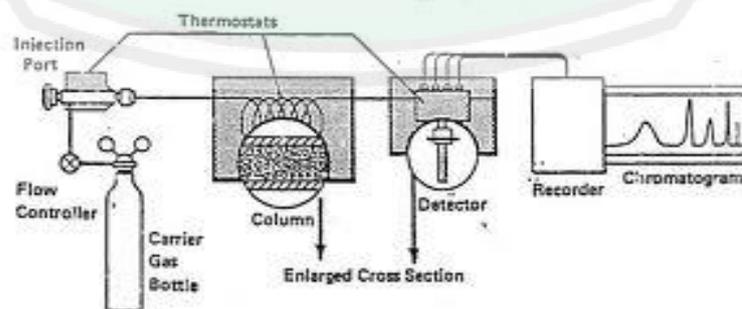
Pada umumnya sel khamir lebih besar dari pada kebanyakan bakteri, tetapi khamir yang paling kecil tidak sebesar bakteri yang terbesar. Setiap spesies mempunyai bentuk yang khas. Khamir sangat beragam ukurannya, berkisar antara 1 sampai 5 μ m, lebarnya dan panjangnya 5 sampai 30 μ m atau lebih. Pengamatan mikroskopis sel khamir dapat dilakukan dengan membuat preparat basah yang diberi larutan *methylen blue*. Pada pengecatan sederhana yaitu pemberian *methylen blue* 0,1 %, sel khamir dapat dibedakan antara sel yang mati dengan yang hidup. Pada sel yang mati akarnya berwarna biru. Sedangkan yang hidup tidak berwarna (transparan). Hal ini disebabkan oleh sifat membran sel yang selektif permeabel (Pelczar, 1986).

Khamir adalah mikroorganisme bersel tunggal dengan ukuran antara 5 dan 20 mikron. Biasanya berukuran 5-10 kali lebih besar dari bakteri. Terdapat berbagai macam bentuk ragi dan bentuk seringkali tergantung dari cara pembelahan selnya. Sel khamir dapat berbentuk lonjong, bentuk batang atau bulat. Sel-sel khamir sering dijumpai secara tunggal tetapi apabila anak-anak sel tidak dilepaskan dari induknya setelah pembelahan maka akan terjadi bentuk yang disebut pseudomisellium. Khamir tidak bergerak karena itu tidak mempunyai flagella. Beberapa jenis khamir membentuk kapsul di sebelah luar (Buckle, 1987).

2.9 Analisis Kadar Bioetanol Dengan Kromatografi Gas

Kromatografi gas-cair merupakan teknik analisis yang luas digunakan untuk keperluan pemisahan, identifikasi, dan kuantisasi berbagai senyawa. Teknik kromatografi gas-cair secara umum biasanya hanya dapat digunakan untuk senyawa-senyawa yang mudah menguap atau dapat diuapkan, baik berupa senyawa organik maupun anorganik. Salah satu contoh senyawa yang mudah menguap adalah etanol. Pada teknik ini, pemisahan terjadi akibat partisi komponen bersangkutan pada fase gerak dan fase diam yang terdapat di dalam kolom. Dengan demikian setiap komponen akan bergerak melalui kolom dengan kecepatan yang berbeda-beda dengan membentuk pita-pita kromatografi (Sastrohamidjojo, 2001).

Diagram skematik peralatan kromatografi gas ditunjukkan pada gambar 2.11 dengan komponen utama adalah kontrol dan penyedia gas pembawa, ruang suntik sampel, kolom yang diletakkan dalam oven yang dikontrol secara termostatik, sistem deteksi dan pencatat (detektor dan rekorder, serta komputer yang dilengkapi dengan perangkat pengolah data (Rohman, 2007).



Gambar 2.6 Alat kromatografi gas (Wiryawan, 2011)

Dasar kerja kromatografi gas adalah sebagai berikut, cuplikan diinjeksikan ke dalam injektor. Aliran gas pembawa akan membawa cuplikan yang telah teruapkan masuk ke dalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen cuplikan. Kemudian komponen-komponen dideteksi oleh detektor, dan kromatogram dalam bentuk puncak akan dihasilkan oleh rekorder (Sastrohamidjojo, 2001).

Analisis kuantitatif dengan kromatografi gas dapat didasarkan pada salah satu pendekatan, yaitu tinggi peak atau luas area peak analit dan standar. Untuk mengukur luas area dapat digunakan rumus sebagai berikut (Hendayana, 2006):

$$\text{Area peak} = X \times Y$$

Ket: X = tinggi peak

Y = lebar peak pada setengah tinggi peak

Selanjutnya terdapat 3 jenis metode analisis kuantitatif kromatografi gas yaitu metode standar kalibrasi, metode standar internal, dan metode normalisasi area. Penelitian ini menggunakan metode normalisasi area untuk analisis kadar bioetanol. Metode normalisasi area dimaksudkan untuk mengurangi kesalahan yang berhubungan dengan injeksi cuplikan. Dengan metode ini diperlukan elusi yang sempurna, semua komponen campuran harus keluar dari kolom. Area setiap peak yang keluar dihitung. Kemudian area yang muncul dikoreksi terhadap respon detector untuk jenis senyawa yang berbeda. selanjutnya konsentrasi analit ditentukan dengan membandingkan area suatu peak terhadap total area semua komponen (Hendayana, 2006).

Persentase relatif salah satu senyawa (komponen) dalam cuplikan dapat dihitung dengan membandingkan luas komponen dengan jumlah luas semua cuplikan.

$$\% \text{ Komponen} = \frac{\text{Luas Komponen}}{\text{Jumlah Luas Semua Cuplikan}} \times 100 \%$$

Hasanah (2008) melakukan analisa kadar etanol dari tape ketan hitam dan tape singkong dengan kromatografi gas. Sampel diinjeksikan melalui injektor yang bersuhu 200 °C, suhu kolom 100 °C (kolom yang digunakan adalah kolom porapak yang bersifat polar), suhu detektor 200 °C. Kadar bioetanol tertinggi diperoleh pada lama fermentasi 120 jam dengan kadar bioetanol tape ketan hitam mencapai 7,581 % dan kadar bioetanol tape singkong mencapai 11,811 %.

Kultsum (2009) melakukan analisa kadar bioetanol dari nira tebu dengan penambahan sumber N dari tepung kedelai hitam. Suhu injektor diprogram pada suhu 275 °C, suhu kolom diprogram pada suhu 125 °C (jenis kolom yang digunakan adalah kolom MS (*molecular sieve*) 5A yang bersifat polar, sedangkan suhu detektor yang digunakan adalah 250 °C. Kadar bioetanol tertinggi diperoleh pada sampel yang ditambahkan sumber nitrogen dan kadarnya mencapai 10,08 %.

Sholikhah (2010) mengukur kadar etanol dari nira siwalan menggunakan kromatografi gas, dengan pengaturan sebagai berikut; suhu injektor yang digunakan adalah 250 °C, suhu kolom diatur antara 150-255 °C (kolom yang digunakan adalah kolom MS (*molecular sieve*) 5A yang bersifat polar, suhu detektor diprogram pada suhu 250 °C. Kadar bioetanol tertinggi diperoleh pada waktu fermentasi 130 jam dengan kadar etanol sebesar 8,658 %.

Beberapa keuntungan metode kromatografi gas-cair antara lain adalah sebagai berikut :

1. Kecepatan

Gas yang merupakan fase gerak sangat cepat mengadakan kesetimbangan antara fase gerak dengan fase diam.

2. Sederhana

Alat kromatografi gas-cair relatif sangat mudah dioperasikan. Interpretasi langsung, data yang diperoleh dapat dikerjakan.

3. Sensitif

Kromatografi gas-cair sangat sensitif. Alat yang paling sederhana dapat mendeteksi konsentrasi dalam ukuran 0,01 %. Karena sensitifnya yang tinggi, maka alat ini hanya memerlukan cuplikan yang sedikit, biasanya dalam ukuran mikroliter.

4. Pemisahan

Kromatografi gas-cair mampu memisahkan molekul-molekul suatu campuran yang tidak mungkin dipisahkan dengan cara-cara yang lain.

5. Analisis

Dapat digunakan sebagai analisis kuantitatif yaitu dengan membandingkan waktu retensi dan analisis kuantitatif dengan membandingkan luas puncak.

6. Alat kromatografi gas-cair dapat dipakai dalam waktu yang lama dan berulang-ulang.

Sedangkan kekurangan metode kromatografi gas di antaranya adalah kromatografi gas tidak mudah dipakai untuk memisahkan campuran dalam jumlah

besar. Pemisahan pada tingkat mg mudah dilakukan, pemisahan pada tingkat gram mungkin dilakukan, tetapi pemisahan dalam tingkat pon atau ton sukar dilakukan kecuali jika ada metode lain.

2.10 Pengukuran Brix

Indeks bias merupakan salah satu dari beberapa sifat optis yang penting dari medium suatu bahan. Nilai indeks bias ini banyak diperlukan untuk menginterpretasi suatu jenis data spektroskopi. Indeks bias dari suatu bahan atau larutan merupakan parameter karakteristik yang sangat penting dan berkaitan erat dengan parameter-parameter lain seperti temperatur, konsentrasi dan lain-lain yang sering dipakai dalam bidang optik, kimia, dan industri obat-obatan. Indeks bias juga berperan penting dalam beberapa bidang diantaranya dalam teknologi film tipis dan fiber optik. Dalam bidang kimia, indeks bias dapat digunakan untuk mengetahui konsentrasi dan komposisi larutan, untuk menentukan kemurnian dan kadaluarsa dari oli, untuk menentukan kemurnian minyak goreng (Sutiah, 2008).

Indeks bias suatu larutan dapat diukur dengan menggunakan beberapa metode antara lain dengan metode interferometri seperti interferometri Mach-Zender, interferometri Fabry-Perot dan interferometri Michelson, menggunakan spektrometer dan refraktometer. Alat refraktometer modern mempunyai metode yang berbeda dalam pengukuran indeks bias, jangkauan pengukuran, tingkat akurasi, metode yang digunakan untuk merekam pergeseran cahaya, sifat dari sumber cahaya, pembuatan perangkat sampling dan pengukuran sel.

Indeks bias mutlak suatu medium adalah rasio dari kecepatan gelombang elektromagnetik dalam ruang hampa dengan kecepatannya dalam media tersebut. Indeks bias relatif adalah rasio dari kecepatan cahaya dalam satu medium ke dalam medium lain yang berdekatan. Refraksi terjadi pada semua jenis gelombang tetapi umumnya terjadi pada gelombang cahaya. Indeks bias medium memiliki panjang gelombang yang berbeda-beda. Suatu efek yang dikenal sebagai dispersi, memungkinkan prisma memisahkan cahaya putih menjadi warna penyusunnya. Untuk warna tertentu, indeks bias medium bergantung pada kerapatan medium, yang juga merupakan fungsi dari konsentrasi. Nilai indeks bias refraktometer, juga dikenal sebagai nilai Brix. Nilai Brix adalah konstan untuk suatu zat pada kondisi suhu dan tekanan standar. Ukuran total padatan terlarut dalam larutan, berkorelasi erat dengan fraksi molar komponen. Brix telah banyak digunakan untuk menentukan konsentrasi zat-zat seperti obat-obatan, makanan, jus buah, formula diet, dan larutan nutrisi parenteral (Chang, 2004). Pengukuran menggunakan metode tersebut cenderung rumit dan memakan waktu yang lama sehingga dibutuhkan suatu alat yang dapat mengukur indeks bias secara mudah dan cepat (Pedrotti, 1993).

Hand Brix Refraktometer bekerja menggunakan prinsip pembiasan cahaya ketika melalui suatu larutan. Ketika cahaya datang dari udara ke dalam larutan maka kecepatannya akan berkurang. Fenomena ini terlihat pada batang yang terlihat bengkok ketika dicelupkan ke dalam air. *Hand Brix Refraktometer* memakai prinsip ini untuk menentukan jumlah zat terlarut dalam larutan dengan melewatkan cahaya ke dalamnya. Sumber cahaya ditransmisikan oleh serat optik

ke dalam salah satu sisi prisma dan secara internal akan dipantulkan ke interface prisma dan sampel larutan. Bagian cahaya ini akan dipantulkan kembali ke sisi yang berlawanan pada sudut tertentu yang tergantung dari indeks bias larutannya. Metode analisis kuantitatif refraktometrik pada berbagai media cair berkembang lebih pesat dan lebih luas menggantikan metode yang volumetri dan gravimetri yang lebih banyak memakan waktu dan kurang akurat.



Gambar 2.7 Hand Brix Refraktometer

Bagian-bagian alat *Hand Brix Refraktometer* adalah sebagai berikut:

1. *Day light plate* (kaca)

Day light plate berfungsi untuk melindungi prisma dari goresan akibat debu, benda asing, atau untuk mencegah agar sampel yang diteteskan pada prisma tidak menetes atau jatuh.

2. Prisma (biru)

Prisma merupakan bagian yang paling sensitif terhadap goresan. Prisma berfungsi untuk pembacaan skala dari zat terlarut dan mengubah cahaya polikromatis (cahaya lampu/matahari) menjadi monokromatis.

3. Knop pengatur skala

Knop pengatur skala berfungsi untuk mengkalibrasi skala menggunakan akuades. Cara kerjanya ialah knop diputar searah atau berlawanan arah jarum jam hingga didapatkan skala paling kecil (0.00 untuk refraktometer salinitas, 1.000 untuk refraktometer urine).

4. Lensa

Lensa berfungsi untuk memfokuskan cahaya yang monokromatis.

5. *Handle*

Handle berfungsi untuk memegang alat refraktometer dan menjaga suhu agar stabil.

6. *Biomaterial strip*

Biomaterial strip terletak pada bagian dalam alat (tidak terlihat) dan berfungsi untuk mengatur suhu sekitar 18-28 °C. Jika saat pengukuran suhunya mencapai kurang dari 18 °C atau melebihi 28 °C maka secara otomatis refraktometer akan mengatur suhunya agar sesuai dengan *range* yaitu 18-28 °C.

7. Lensa pembesar

Sesuai dengan namanya, lensa pembesar berfungsi untuk memperbesar skala yang terlihat pada *eye piece*.

8. *Eye piece*

Eye piece merupakan tempat untuk melihat skala yang ditunjukkan oleh refraktometer.

9. Skala

Skala berguna untuk melihat , konsentrasi, dan massa jenis suatu larutan.

Cara kalibrasi Alat *Hand Brix Refraktometer*:

- a) Letakkan satu atau dua tetes akuades diatas kaca prisma
- b) Tutup penutup kaca prisma dengan perlahan
- c) Pastikan akuades memenuhi permukaan kaca prisma
- d) Pembacaan skala melalui lubang teropong, pastikan garis batas biru tepat pada skala 0 °Brix
- e) Jika garis batas biru tidak tepat pada skala 0 °Brix, putar skrup pengatur skala hingga garis batas biru tepat pada skala 0 °Brix

Cara penggunaan alat *Hand Brix Refraktometer* ialah:

- 1) Alat dibersihkan terlebih dahulu dengan tisu ke arah bawah
- 2) Ditetesi dengan akuades atau larutan NaCl 5 % pada bagian prisma dan *day light plat*
- 3) Dibersihkan dengan kertas tissue sisa akuades/NaCl yang tertinggal
- 4) Sampel cairan ditetaskan pada prisma 1-3 tetes
- 5) Skala kemudian dilihat ditempat yang bercahaya dan dibaca skalanya
- 6) Kaca dan prisma dibilas dengan akuades/NaCl 5 % serta dikeringkan dengan tisu
- 7) Alat disimpan di tempat kering

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 – Februari 2014, di Laboratorium Bioteknologi (Jurusan Kimia), Organik (Jurusan Kimia), Mikrobiologi (Jurusan Biologi), dan Optik (Jurusan Biologi) Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kertas saring, plastik wrap, kantong plastik tahan panas, kertas sampul, seperangkat alat gelas, kawat ose, rak tabung, jirigen, botol kecil, bunsen, korek api, gelas objek atau preparat, termometer, inkubator, lemari asam, timbangan analitik, laminar, *shaker incubator*, *hand brix refraktometer*, *hot plate*, *autoclave*, *vortex*, spektrofotometer uv-vis, *Gas Chromatography* HP 5890, oven, mikroskop komputer, seperangkat alat destilasi, dan mikro pipet.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tetes tebu (molasses) yang diperoleh dari limbah Pabrik Gula Pesantren Kediri. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah YPGA (*Yeast extract Peptone Glucose Agar*) dan YPGB (*Yeast extract Peptone Glucose Broth*), akuades, aseton, alkohol 70 % untuk desinfektan, spirtus, aluminium foil, kertas label, tissue, dan kapas

secukupnya, reagen pewarnaan *methylen blue*, dan minyak imersi. Untuk media YPGA dibutuhkan 10 g *yeast extract*, 10 g *peptone*, 30 g agar ditambah dengan sumber karbon 20 g glukosa. Sedangkan untuk media YPGB komposisinya sama yaitu 10 g *yeast extract*, 10 g *peptone*, dan 20 g glukosa.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian secara deskriptif. Tahap pertama adalah isolasi dan identifikasi makroskopis dan mikroskopis khamir yang berhasil diisolasi dari tetes tebu. Tahap kedua adalah uji kemampuan khamir hasil isolasi dari tetes tebu dalam menghasilkan etanol dengan variasi pada satu faktor, yaitu lama fermentasi yang terdiri dari 3, 4, 5, 6, dan 7 hari. Masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali, sehingga banyaknya perlakuan yang dilakukan sebanyak 10 kali, dan parameter yang dianalisis adalah kadar etanol.

Adapun proses penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut: tetes tebu diambil sebanyak 5 mL ditambahkan 45 mL akuades steril (pengenceran 10^{-1}) dan diinkubasi selama 72 jam. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat dari 10^{-2} sampai 10^{-10} . Hasil pengenceran diambil 1 mL dan ditanam dalam cawan petri secara *pour plate* kemudian ditambahkan media YPGA dan inkubasi selama 72 jam. Koloni yang tumbuh pada media YPGA diamati serta dipilih yang memiliki karakter morfologi koloni seperti khamir dan kemudian dimurnikan dengan metode *streak kuadran*. Setelah diperoleh isolat seperti khamir selanjutnya dilakukan identifikasi khamir secara kualitatif yang meliputi: Uji Morfologi Koloni dan Uji Morfologi Sel.

Isolat dengan karakteristik khamir diuji potensi dalam menghasilkan etanol. Tetes yang telah dipreparasi kemudian ditambahkan inokulum khamir sebanyak 10 mL, selanjutnya tetes siap difermentasi dengan lama fermentasi 3, 4, 5, 6, dan 7 hari. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 2 (dua) kali.

Tetes yang telah difermentasi selanjutnya didestilasi dengan suhu 75-85 °C. Destilat yang diperoleh diukur kadar bioetanolnya dengan alat kromatografi gas. Parameter yang dianalisis adalah kadar etanol hasil fermentasi.

3.4 Tahap-tahap Penelitian

Tahapan pada penelitian ini adalah:

1. Preparasi Alat dan Bahan
2. Pembuatan Media
 - a. Media YPGA (*Yeast extract Peptone Glucose Agar*)
 - b. Media YPGB (*Yeast extract Peptone Glucose Broth*)
3. Pengukuran Brix Sampel
4. Isolasi Khamir dari tetes tebu
5. Identifikasi khamir secara Kualitatif
 - a. Uji Morfologi Koloni
 - b. Uji Morfologi Sel
6. Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh 1 dan Kh 2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi
7. Pembuatan Inokulum

8. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir
9. Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh 2
10. Analisis Data

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Preparasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam isolasi khamir adalah (*erlenmeyer*, *bluetip*, tabung reaksi, dan cawan petri) dicuci bersih kemudian dikeringkan. Cawan petri dibungkus dengan menggunakan kertas sampul kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik yang tahan panas. *Bluetip* dibungkus dengan kertas alumunium kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik tahan panas dan *erlenmeyer* juga dimasukkan ke dalam kantong plastik tahan panas. Selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm selama 15 menit.

Adapun bahan (tetes tebu) yang telah didapat dari limbah Pabrik Gula Pesantren Kediri disimpan di tempat yang kering pada suhu ruang untuk proses selanjutnya (isolasi khamir). Dan disiapkan akuades, aseton, alkohol 70 % untuk desinfektan, spirtus, alumunium foil, kertas label, tissue, dan kapas secukupnya.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Media *Yeast extract Peptone Glucose Agar* (YPGA) (Thais.M, 2006)

Media YPGA ini dibuat dengan menimbang 5 g *yeast extract*, 5 g *pepton*, 10 g glukosa, dan 15 g agar. Kemudian dilarutkan dengan 500 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut. Selanjutnya media

tersebut dimasukkan ke dalam dua Erlenmeyer masing-masing 250 mL dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Larutan tersebut sebagian didinginkan dalam tabung reaksi pada keadaan miring hingga memadat.

3.5.2.2 Media *Yeast extract Peptone Glucose Broth* (YPGB) (Thais.M, 2006)

Media selanjutnya adalah YPGB dibuat dengan 5 g *yeast extract*, 5 g *peptone*, dan 10 g glukosa. Semua bahan dicampur dengan akuades sebanyak 500 mL, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian media tersebut dimasukkan ke dalam dua Erlenmeyer masing-masing volumenya 250 mL, ditutup kapas, dan disterilisasi dalam *autoclave*.

3.5.3 Pengukuran Brix Tetes Tebu (Wahyudi, 1997)

Dipipet 3 tetes larutan sampel dimasukkan dalam alat pengukur Brix (*Hand brix refraktometer*), yaitu pada celah antara prisma penutupnya yang kering dan basah. Diamati dengan cermat batas tajam antara garis terang dan gelap tepat pada titik potong sumbunya. Dengan mengatur ketepatan, batas tersebut hingga jelas, maka dapat diketahui skala (berupa angka) dan tidak boleh terlihat garis pelangi antaranya.

Sampel yang telah diketahui nilai Brixnya diencerkan dengan akuades hingga mencapai 20 °Brix. Akuades yang dibutuhkan untuk pengenceran dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{M_1 \cdot V_1}{V_2}$$

Keterangan: M_1 : Konsentrasi Brix awal

M_2 : Konsentrasi Brix akhir

V_1 : Volume sampel awal (sebelum diencerkan)

V_2 : Volume sampel akhir (setelah diencerkan)

3.5.4 Isolasi Khamir dari Tetes Tebu (Guimaraes, 2006)

Tetes sebanyak 5 mL ditambahkan 45 mL (pengenceran 10^{-1}) akuades steril dan diinkubasi selama 72 jam. Kemudian dilakukan isolasi dengan cara mengambil 1 mL larutan tetes tadi dan dimasukkan dalam 9 mL akuades steril (pengenceran 10^{-2}), selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^{-10} . Hasil dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-10} diambil 1 mL dan ditanam dalam cawan petri secara *pour plate* kemudian ditambahkan media YPGA dan inkubasi selama 72 jam. Koloni yang tumbuh pada media YPGA diamati serta dipilih yang mempunyai karakter morfologi koloni seperti khamir dan kemudian dimurnikan dengan metode *streak kuadran*.

3.5.5 Identifikasi Khamir Hasil Isolasi dari Tetes tebu

3.5.5.1 Uji Morfologi Koloni

Pengamatan makroskopik pada medium padat dilakukan menggunakan media YPGA. Satu ose biakan khamir diinokulasikan dengan metode empat kuadran gores ke dalam media kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Karakteristik morfologi makroskopik koloni khamir yang diamati pada

media padat antara lain: tekstur, warna, penampakan permukaan, tepi koloni, dan bentuk koloni.

3.5.5.2 Uji Morfologi Sel (Kusmiati, 2007)

Uji morfologi sel dilakukan dengan pewarnaan menggunakan *methylen blue*. Diambil 1 ose biakan dari masing-masing khamir, kemudian diteteskan pada kaca preparat yang telah ditetesi akuades. Preparat ditetesi dengan *methylen blue* dan minyak imersi, preparat diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 1000x.

3.5.6 Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh 1 dan Kh 2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi

Sebelum proses fermentasi dilakukan dengan variasi perlakuan lama fermentasi, maka dilakukan uji produksi etanol oleh isolat khamir Kh 1 dan Kh 2 untuk mengetahui khamir yang menghasilkan kadar etanol tertinggi dan kemudian khamir tersebut yang akan digunakan untuk produksi etanol pada perlakuan selanjutnya. Tetes tebu yang telah dipreparasi diambil 200 mL dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan inokulum Khamir Kh 1 dan Kh 2 masing-masing sebanyak 20 mL yang telah mencapai fase log, kemudian Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan *dishaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan waktu fermentasi 3 hari. Setelah proses fermentasi selesai dilakukan penyaringan untuk memisahkan kotoran-kotoran dalam media, selanjutnya untuk memisahkan etanol dari media fermentasi dilakukan proses destilasi. Destilat yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol dan ditutup rapat agar tidak mengalami penguapan,

selanjutnya destilat yang disimpan dalam botol siap untuk dianalisis dengan menggunakan gas *chromatography* (GC).

3.5.7 Pembuatan Inokulum (Kultsum, 2009)

Pembuatan inokulum dilakukan dengan cara memindahkan 2 ose biakan khamir ke dalam 100 mL media YPGB, kemudian di goyang dengan *shaker* pada kecepatan 150 rpm selama 48 jam. Inokulum digunakan untuk pembuatan kurva pertumbuhan.

3.5.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir (Sari dkk., 2013)

Sebanyak 40 mL inokulum dipindahkan dalam 250 mL media YPGB kemudian 4 mL inokulum diambil tiap 4 jam sekali sampai jam ke-72 dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 488 nm dengan menggunakan *spectrofotometer uv-vis* sehingga didapatkan nilai OD (*Optical Density*). Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu inkubasi dan OD (*Optical Density*).

3.5.9 Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh 2(Wahyudi, 1997)

Khamir yang digunakan dalam produksi etanol ini adalah khamir yang mempunyai kemampuan menghasilkan etanol tertinggi. Tetes yang telah diatur pHnya hingga 5 dimasukkan ke dalam Erlenmeyer sebanyak 100 mL, kemudian ditambahkan inokulum khamir yang telah mencapai fase log sebanyak 10 mL (Rahim, 2009), selanjutnya erlenmeyer ditutup dengan kapas dan diinkubasi

selama waktu fermentasi yang dikehendaki yaitu 3, 4, 5, 6, dan 7 hari. Setelah proses fermentasi selesai dilakukan penyaringan untuk memisahkan kotoran-kotoran dalam media, selanjutnya untuk memisahkan etanol dari media fermentasi dilakukan proses destilasi. Terbentuknya gelembung-gelembung udara menunjukkan proses fermentasi pembentukan etanol sedang berjalan.

3.5.10 Destilasi Etanol Hasil Fermentasi (Kultsum, 2009)

Dirancang alat destilasi. Dimasukkan filtrat hasil fermentasi ke labu alas bulat yang telah di isi dengan batu didih sehingga volumenya setengah volume labu. Dialirkan air kondensor menggunakan air es lalu dihidupkan mantel pemanas dengan suhu sedang. Ditampung destilat pada suhu 78,5 - 85 °C. Destilasi dihentikan jika sudah tidak ada destilat yang menetes dalam Erlenmeyer. Destilat yang didapat lalu dimasukkan dalam botol dan ditutup rapat. Destilat yang disimpan dalam botol siap untuk dianalisis dengan GC.

3.5.11 Analisis Kadar Etanol dengan *Gas Chromatography* (GC) Metode Standar Internal

Pengujian kadar etanol dilakukan dengan menggunakan metode *Gas Chromatography* (GC) melalui tahapan sebagai berikut :

1. Proses persiapan alat Kromatografi Gas (KG)
2. Analisis kadar alkohol dengan Kromatografi Gas (KG)

3.5.11.1 Proses Persiapan Alat Kromatografi Gas (KG)

Proses persiapan alat Kromatografi Gas (KG) adalah sebagai berikut; dinyalakan power alat KG dengan prosedur standart. Diatur kondisi kerja alat

sebagai berikut; suhu injektor 100 °C, suhu kolom HP 608 45 °C, suhu detektor 100 °C, detektor FID, gas pembawa N₂, kecepatan 2 mL/menit, selanjutnya alat siap digunakan.

3.5.11.2 Analisis Kadar Etanol dengan Kromatografi Gas (KG)

Adapun tahapan Analisis kadar etanol dengan menggunakan Kromatografi Gas (GC) yaitu, diambil (1 µl) dari masing-masing cuplikan dengan *syring*. Selanjutnya cuplikan diinjeksikan melalui injektor. Luas puncak etanol dari kromatogram dihitung. Untuk menentukan kadar sampel dengan alat GC dilakukan dengan cara membandingkan luas area antara larutan standar dengan luas area sampel.

3.5.12 Analisis Data

Pengolahan data hasil analisis dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif. Data hasil penelitian disusun dalam tabel-tabel, diklasifikasikan sehingga merupakan suatu susunan urutan data untuk memudahkan diinterpretasikan sesuai dengan hasil pengamatan yang ada.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Khamir dari Tetes Tebu (Molase)

Isolasi khamir pada tetes tebu dilakukan untuk mendapatkan khamir yang memiliki potensi untuk dapat mengubah glukosa menjadi alkohol. Saat ini 95 % dari fermentasi bioetanol melibatkan penggunaan khamir. Sebelum dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies dengan menggunakan uji biokimia melalui uji kemampuan fermentatif terhadap berbagai sumber karbon, maka sebelumnya dalam isolasi khamir harus ditemukan dulu mikroorganisme yang secara genus termasuk dalam kelompok khamir.

Isolasi khamir dalam penelitian ini dilakukan dengan mengambil 5 mL tetes tebu yang masih segar dan dimasukkan ke dalam 45 mL akuades steril kemudian diinkubasi selama 3 hari. Selanjutnya ditanam secara *pour plate* pada media *yeast extract*, pepton, glukosa dan agar (YPGA) untuk setiap seri pengenceran dan diinkubasi selama 3 hari dengan pengamatan dilakukan setiap hari. Pengenceran dilakukan untuk mengurangi kepadatan koloni yang tumbuh pada media isolasi sehingga memudahkan proses isolasi. Media YPGA yang digunakan sebelumnya, ditambahkan dengan senyawa antibiotik *chloramfenicol* sebanyak 25 g/mL untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme selain khamir khususnya. Antibiotik merupakan substansi yang dapat menghambat pertumbuhan organisme lain. Antibiotik juga dimanfaatkan untuk bertahan hidup dan menghadapi organisme lain yang mengancam keberadaannya (Pathania dan

Brown 2008). Pengamatan morfologi koloni masing-masing isolat khamir yang diamati yaitu meliputi karakteristik bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni dari tiap-tiap koloni. Semua isolat yang ditemukan dimurnikan dengan *streak quadrant* dan isolat murni yang didapatkan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Pada penelitian ini ditemukan 2 isolat khamir yaitu khamir Kh1 dan Kh2 dimana 2 jenis isolat ini menunjukkan ciri morfologi koloni dan sel seperti kelompok khamir. Jumlah mikroorganisme yang diperoleh sedikit karena pada saat isolasi sudah dikondisikan selektif dengan cara menambahkan senyawa antibiotik. Hasil isolat mikroorganisme yang diperoleh dari isolasi tetes tebu dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Isolat Khamir Hasil Isolasi dari Tetes Tebu

Identifikasi khamir dilakukan berdasarkan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dengan karakter morfologi koloninya yang meliputi bentuk koloni, warna koloni, karakteristik permukaan koloni, elevasi koloni, dan tepi koloni, sedangkan identifikasi morfologi mikroskopis dilakukan pewarnaan *methylen blue* untuk menentukan

bentuk selnya serta untuk menentukan isolat yang ditemukan termasuk dalam kategori bakteri atau khamir.

4.2 Uji Khamir secara Makroskopis dan Mikroskopis

4.2.1 Uji Khamir Secara Makroskopis

Khamir mudah dibedakan dengan bakteri karena khamir mempunyai ukuran sel yang lebih besar dan morfologi yang berbeda. Isolat khamir yang ditemukan yaitu khamir Kh1 dan Kh2 termasuk berbentuk sel bulat telur (elipsoidal) dengan pertumbuhan sel yang membentuk koloni maupun menyendiri. Ciri morfologi koloni isolat khamir Kh1 menunjukkan ciri yang sesuai dengan ciri khas khamir yaitu mempunyai bentuk bulat, berwarna krem, permukaan sedikit kasar, elevasi *low convex* dan tepi *entire*. Sedangkan untuk morfologi koloni isolat khamir Kh2 memiliki ciri-ciri yaitu berbentuk bulat, berwarna krem, permukaan halus, elevasi *low convex* dan tepi *entire*.

Secara pengamatan morfologi koloni dan sel dari khamir Kh1 dan Kh2 merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampilan makroskopik mempunyai koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan halus, tekstur lunak dan memiliki sel bulat dengan askospora 1-8 buah (Nikon, 2004 ; Landecker, 1972 ; Lodder, 1970).

Pada penelitian lainnya, Kusmiati (2007) telah menjelaskan bahwa karakteristik morfologi sel *Saccharomyces cerevisiae* galur RTA, RN4, dan SC

dan hasil karakterisasi menunjukkan bahwa sel khamir dapat berbentuk bulat halus, oval, silinder, bulat panjang dengan salah satu ujungnya runcing (*ogival*), segitiga melengkung (*triangular*), bentuk botol atau lemon. Dalam kultur yang sama, ukuran dan bentuk sel khamir mungkin berbeda karena pengaruh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan.

Tabel 4.1 Karakter Morfologi Koloni Khamir dari Tetes Tebu

| Kode Isolat Khamir | Pengamatan Koloni | | | | |
|--------------------|-------------------|-------|---------------|-------------------|---------------|
| | Bentuk | Warna | Permukaan | Elevasi | Tepi |
| Kh 1 | Bulat | Krem | Sedikit Kasar | <i>Low convex</i> | <i>Entire</i> |
| Kh 2 | Bulat | Krem | Halus | <i>Low convex</i> | <i>Entire</i> |

Keterangan :

Kh = Khamir

Elevasi (ketinggian) = *Low convex* (sedikit cembung).

Tepian Koloni = *Entire* (rata).

4.2.2 Uji Khamir Secara Mikroskopis

Khamir dapat dilihat dengan mikroskop dengan perwarnaan *Methylen blue* dan akan terlihat sebagai bulat transparan. *Methylen blue* merupakan indikator berbentuk kristal yang bila larut dalam air akan membentuk cairan berwarna biru. *Methylen blue* menjadi tidak berwarna dengan kehadiran enzim aktif. Oleh karena itu, sel khamir yang hidup akan tampak transparan. Sebaliknya, dengan ketiadaan enzim aktif, *methylen blue* akan tetap berwarna biru, oleh karena itu, sel yang mati akan tampak berwarna biru.

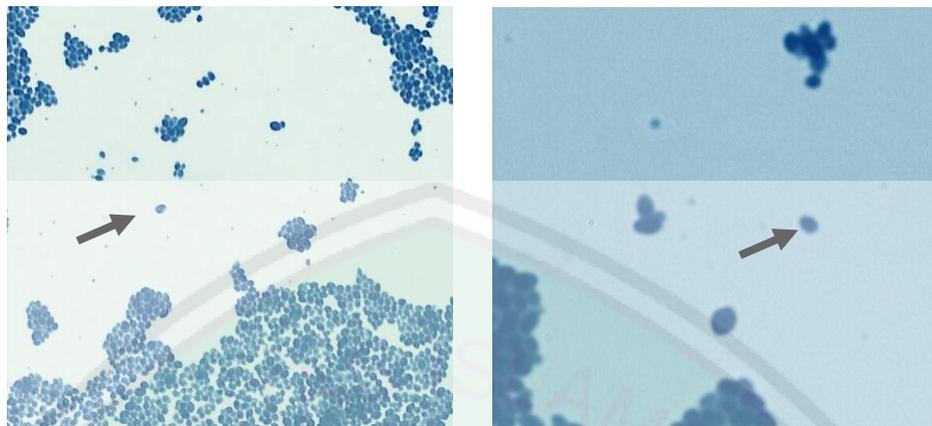
Khamir seringkali hampir tidak kelihatan karena tidak kontras dengan medium dimana mereka hidup. Oleh karena itu, perlu dilakukan pewarnaan agar khamir tampak jelas bila diamati dengan mikroskop. Pewarnaan ini ada yang bersifat non-diferensial dan diferensial. Penelitian ini bersifat differensial yang

bertujuan agar dapat membedakan antara jenis khamir yang berbeda. Contoh pewarnaan differensial adalah pewarnaan khamir dengan *methylen blue* sehingga sel mati dan sel hidup memiliki warna yang berbeda, dan pewarnaan tahan asam sehingga sel yang tahan asam akan berwarna merah, sedangkan sel lain tidak. (Harley dan Presscot, 2002).

Pewarnaan pada sel khamir, untuk sel yang mati akan lebih tajam atau kontras warnanya karena sel menjadi sangat permeabel terhadap warna. Pada pengamatan sel khamir terdapat sel khamir yang hidup berwarna transparan, warna sel khamir hidup berwarna transparan disebabkan karena sel membrannya masih memiliki sifat selektif permeabel sehingga cat *methylen blue* tidak dapat masuk. Sedangkan sel mati berwarna biru karena membran selnya tidak memiliki sifat selektif permeabel sehingga cat dapat masuk yang menyebabkan sel berwarna biru. Dalam penelitian ini, dibuat preparat dari khamir Kh1 dan Kh2. Masing-masing preparat ditetesi akuades steril. Pada preparat, sampel ditetesi oleh *methylen blue*. Karena pewarnaan ini, maka sel hidup dan sel mati dapat dibedakan.

Tabel 4.2. Karakter Sel Khamir dari Tetes tebu

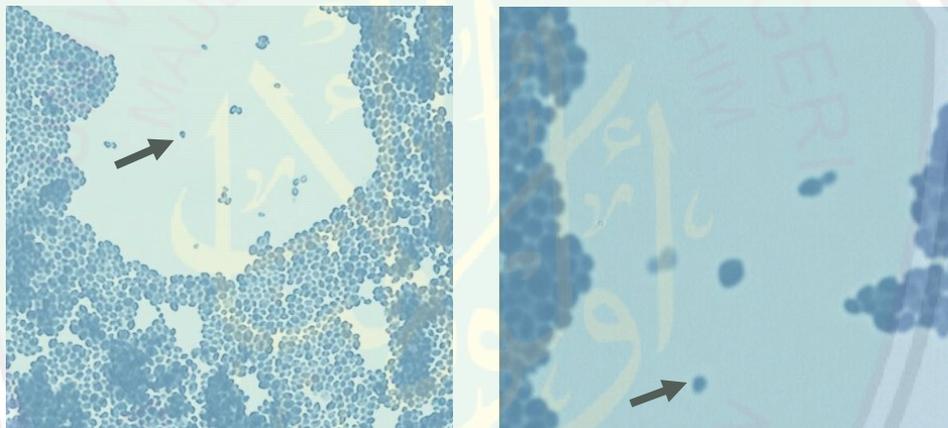
| No | Kode Isolat | Bentuk Sel | Kategori |
|----|-------------|--------------------|----------|
| 1 | Kh1 | Bulat (elipsodial) | Khamir |
| 2 | Kh2 | Bulat (elipsodial) | Khamir |



(Perbesaran 400x)

(Perbesaran 1000x)

Gambar 4.2 Bentuk Sel Khamir Kh1 Hasil Isolasi dari Tetes Tebu



(Perbesaran 400x)

(Perbesaran 1000x)

Gambar 4.3 Bentuk Sel Khamir Kh2 Hasil Isolasi dari Tetes Tebu

Gambar 4.2 dan 4.3 merupakan hasil pengujian pewarnaan dengan *methylen blue* menunjukkan bahwa sel khamir merupakan salah satu jenis khamir yang bereaksi dengan *methylen blue*, sehingga berwarna biru dan lebih mudah diamati. Gambar 4.2 dan 4.3 menunjukkan bahwa isolat khamir Kh1 dan Kh2 hasil isolasi dari tetes tebu yang diduga adalah khamir mempunyai ukuran sel yang lebih besar dari sel bakteri. Menurut Buckle (2008) khamir adalah mikroorganisme bersel tunggal dengan ukuran 5 dan 20 mikron. Biasanya

berukuran 5–10 kali lebih besar dari bakteri. Terdapat berbagai macam bentuk ragi tergantung dari cara pembelahan selnya. Sel khamir dapat berbentuk lonjong, bentuk batang atau bulat. Sel-sel khamir sering di jumpai secara tunggal, tetapi apabila anak-anak sel tidak dilepaskan dari induknya setelah pembelahan maka akan terjadi bentuk yang disebut *pseudemisellium*. Khamir tidak bergerak karena tidak mempunyai flagela. Beberapa jenis khamir membentuk kapsul disebelah luar.

4.3 Preparasi Tetes Tebu (Molase)

Preparasi sampel yang dilakukan meliputi pengukuran kadar total gula dan pengukuran nilai °Brix. Nilai °Brix yang cukup tinggi juga mempengaruhi kekentalan tetes dan kadar gulanya, semakin tinggi nilai °Brix maka semakin kental dan semakin tinggi pula kadar gula tetes tersebut, begitu juga sebaliknya. Konsentrasi gula yang masih cukup tinggi, tetes tersebut kurang baik untuk digunakan sebagai media fermentasi, karena khamir akan mengalami tekanan osmotik yang tinggi dan akan menyebabkan khamir tersebut mengalami stress dan pada akhirnya akan mempengaruhi kinerja fermentasi (Bafrcová, dkk., 1999 dalam Ishmayana, dkk., 2011). Oleh sebab itu, sebelum digunakan untuk proses fermentasi, tetes tersebut harus dipreparasi terlebih dahulu. Tetes harus diencerkan terlebih dahulu sehingga nilai °Brix menjadi lebih kecil dan tidak terlalu kental. Tetes tebu yang telah diencerkan menjadi 20 °Brix diatur pHnya sesuai dengan pH yang dikehendaki, yaitu 5. Hasil analisis bahan baku tetes tebu dapat dilihat pada Tabel 4.3:

Tabel 4.3 Hasil Analisis Bahan Baku Setelah Pengenceran

| Komponen | Hasil |
|------------------|--------|
| Brix | 20° |
| Kadar total gula | 56,4 % |
| pH | 5 |

4.4 Produksi Etanol Oleh Khamir Kh1 dan Kh2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi

Sebelum proses fermentasi dilakukan dengan variasi perlakuan lama fermentasi, maka dilakukan uji produksi etanol oleh khamir Kh1 dan Kh2 untuk mengetahui khamir yang menghasilkan kadar etanol tertinggi dan kemudian khamir tersebut digunakan untuk produksi etanol pada perlakuan selanjutnya. Proses fermentasi dilakukan dengan cara tetes tebu yang telah dipreparasi diambil sebanyak 200 mL, dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditambahkan inokulum Kh1 dan Kh2 yang telah mencapai fase log masing-masing sebanyak 20 mL (Rahim, 2009), kemudian Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan *dishaker* pada kecepatan 120 rpm selama 3 hari (72 jam).

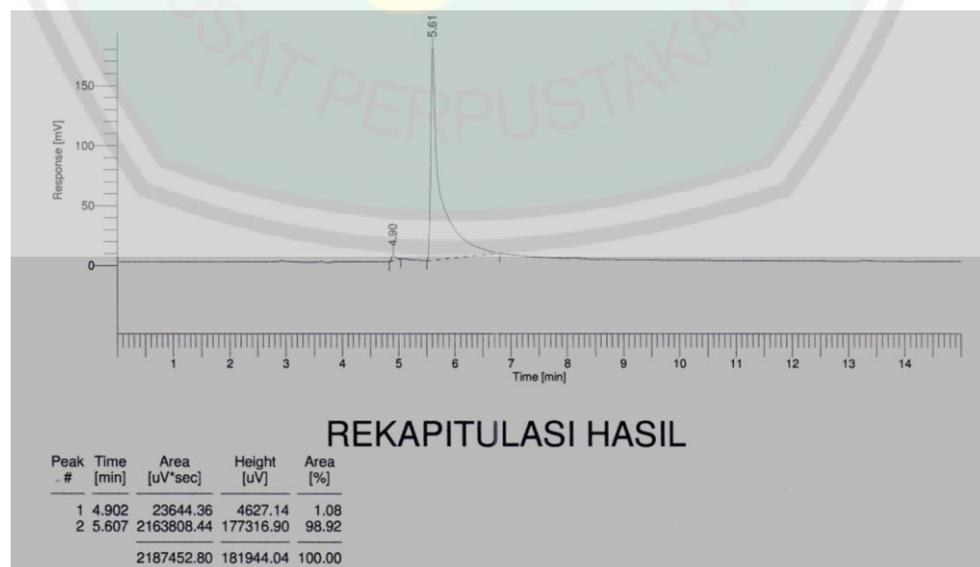
Etanol ini kemudian dimurnikan dengan menggunakan metode destilasi. Destilasi adalah salah satu metode dari pemurnian dengan cara memisahkan dua atau lebih komponen-komponen dalam suatu cairan berdasarkan perbedaan tekanan uap masing-masing komponen (Hidayat, 2007). Langkah-langkah pemisahan fase cair hasil fermentasi dengan destilasi yaitu, dimasukkan filtrat hasil fermentasi ke labu alas bulat yang telah di isi dengan batu didih sehingga volumenya setengah volume labu. Dialirkan air kondensor menggunakan air es lalu dihidupkan mantel pemanas dengan suhu sedang. Ditampung destilat pada suhu 78,5 - 85 °C. Senyawa yang menguap terlebih dahulu adalah etanol karena

titik didih rendah yaitu 78,9 °C dibandingkan dengan senyawa-senyawa lain seperti glukosa dengan titik didih 146 °C dan asam asetat dengan titik didih 118,1 °C atau air 100 °C. Semua fasa cair yang ada dalam sampel yang keluar dari labu alas bulat akan keluar melalui pipa *outlet* dan diembunkan kembali dengan pendingin atau kondensor, destilat yang sudah diembunkan akan ditampung dalam wadah terpisah. Destilasi dihentikan jika sudah tidak ada destilat yang menetes dalam Erlenmeyer. Destilat yang didapat lalu dimasukkan dalam botol dan ditutup rapat agar tidak mengalami penguapan karena etanol mempunyai sifat mudah menguap. Destilat yang disimpan dalam botol siap untuk dianalisis dengan GC.

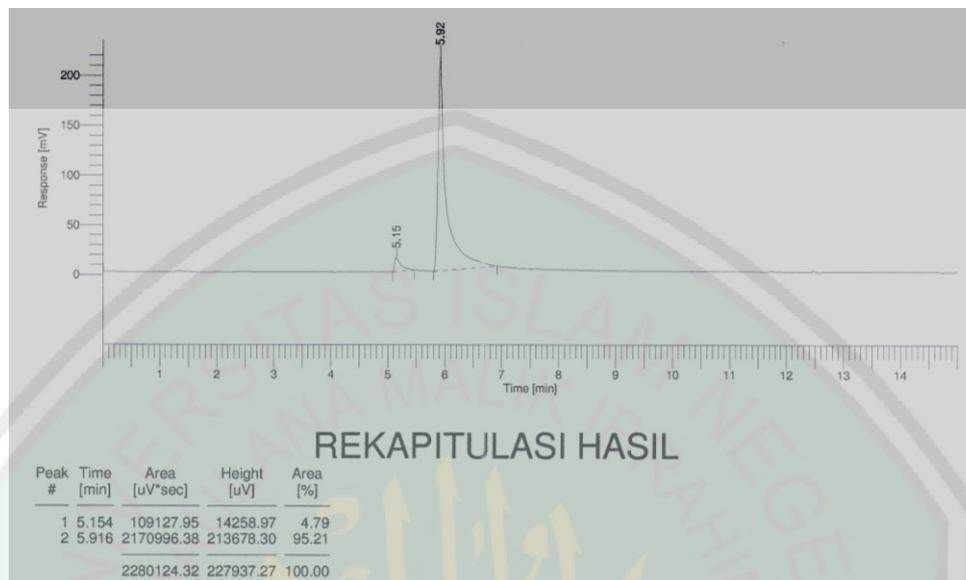
Proses pemisahan menggunakan analisis GC dilakukan dengan mengambil 1 µL cuplikan dengan *syring*. Selanjutnya cuplikan diinjeksikan melalui injektor dengan suhu injektor 100 °C. Suhu injektor harus lebih tinggi daripada titik didih sampel agar sampel dapat langsung menguap dan masuk ke dalam kolom dengan bantuan gas pembawa. Kolom yang digunakan adalah jenis kolom kapiler HP 608 mempunyai kemampuan memisahkan sampel 2 mL/menit dan bersifat semipolar. Suhu kolom diatur lebih rendah daripada suhu injektor yaitu 40 °C agar pemisahan terjadi dengan baik serta untuk mencegah terjadinya kerusakan komponen dalam kolom. Di dalam kolom inilah terjadi pemisahan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam sampel berdasarkan prinsip “*likes dissolves likes*”. Senyawa yang bersifat sama dengan kolom akan tertahan lebih lama, sedangkan senyawa yang berbeda dengan kolom akan diteruskan menuju detektor dengan waktu retensi yang lebih singkat.

Senyawa yang telah dipisahkan dalam kolom akan masuk ke dalam detektor. Suhu detektor diatur pada suhu 150 °C, hal ini bertujuan untuk mencegah kondensasi uap sampel yang mengakibatkan FID berkarat atau kehilangan sensitifitasnya (Gandjar dan Rohman, 2007). Senyawa yang keluar dari kolom dicampur H₂ dan udara kemudian dibakar pada nyala di bagian dalam detektor. Atom karbon senyawa organik dapat menghasilkan radikal CH yang selanjutnya menghasilkan ion CHO⁺ dalam nyala hidrogen-udara. CHO⁺ yang dihasilkan dalam nyala bergerak ke katoda yang berada di atas nyala. Arus yang mengalir di antara katoda dan anoda diukur dan diterjemahkan sebagai sinyal pada rekorder dan menghasilkan kromatogram (Hendayana, 2006).

Kromatogram pada sampel dengan perlakuan menggunakan inokulum khamir Kh1 dan Kh2 dapat dilihat pada Gambar 4.3. Kadar etanol dapat diketahui dengan perbandingan antara luas area dan berat etanol dan *acrylonitril* (Lampiran 10).



Gambar 4.3 Kromatogram Isolat Kh1



Gambar 4.4 Kromatogram Isolat Kh2

Uji produksi etanol oleh Kh1 dan Kh2 diperoleh hasil bahwa khamir Kh 2 yang menghasilkan kadar etanol tertinggi, seperti yang tertera pada Tabel 4.4. Dari Tabel 4.4 maka isolat khamir Kh2 yang digunakan untuk proses produksi etanol dengan variasi lama fermentasi.

Tabel 4.4 Kadar Etanol Hasil Fermentasi dari Kh1 dan Kh2

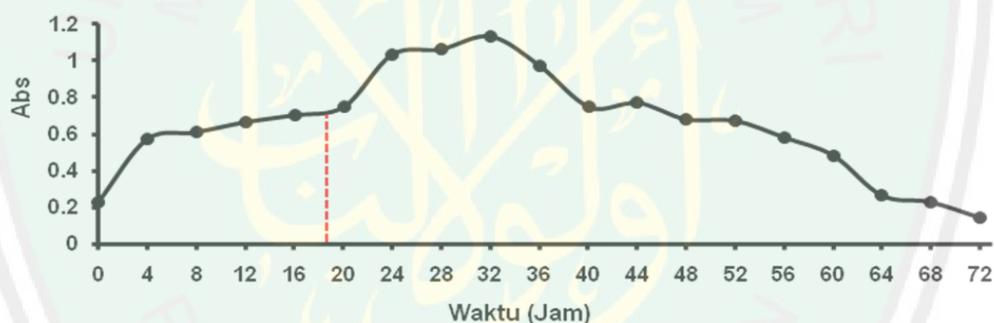
| No | Kode Isolat | Kadar Etanol (%) |
|----|-------------|------------------|
| 1. | Kh1 | 0,96 % |
| 2. | Kh2 | 4,53 % |

4.5 Produksi Etanol Oleh Khamir Kh2

4.5.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir Kh2

Kurva pertumbuhan memberikan gambaran bahwa dalam siklus kehidupan khamir itu memiliki 4 fase, yakni fase adaptasi, fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian (Pelczar, 2008). Berdasarkan kurva pertumbuhan dapat ditentukan

waktu inkubasi yang tepat oleh khamir dalam memproduksi enzim invertase dan enzim zimase. Menurut Tortora, dkk., (2001), pada fasa lag (adaptasi), jumlah perubahan sel sangat sedikit, sel tidak aktif karena populasi mikroba sedang mengalami aktivitas metabolisme tertentu yang meliputi DNA dan sintesis enzim. Umumnya waktu produksi enzim yang optimal adalah saat pertumbuhan khamir pada fase eksponensial mendekati fase stasioner dengan asumsi bahwa semakin banyak jumlah khamir, semakin banyak pula enzim yang dihasilkan. Untuk semakin menguatkan asumsi, maka kurva pertumbuhan dibuat dengan membuat grafik hubungan waktu inkubasi dengan nilai OD khamir dan kadar glukosa.



Gambar 4.5 Kurva Pertumbuhan Isolat Kh2

Gambar 4.5 menjelaskan bahwa pada kurva pertumbuhan di atas tidak mengalami fase adaptasi. Hal ini disebabkan karena inokulum yang diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan merupakan kultur yang berada dalam fase eksponensial dan media baru yang digunakan komposisinya sama dengan media yang lama sehingga fase adaptasi dapat dihindari. Menurut Purwoko (2007), fase adaptasi dapat dihindari (langsung ke fase eksponensial) jika sel di media lama dalam kondisi eksponensial dan dipindahkan ke media

baru, yang mana komposisi media baru sama dengan komposisi dengan media yang lama.

Fase eksponensial terjadi pada jam ke-0 hingga awal jam ke-24. Pada fase eksponensial sel mulai membelah dan masuk ke dalam periode pertumbuhan reproduksi sel paling aktif dan waktu regenerasinya konstan, ini dibuktikan dengan nilai absorbansi yang meningkat. Fase stasioner khamir terjadi pada awal jam ke-24 hingga jam ke-32. Menurut Tortora, dkk., (2001) pada fase stasioner laju pertumbuhan lambat sehingga jumlah khamir yang hidup dan mati seimbang dan populasinya stabil. Sedangkan fase kematian terjadi pada awal jam ke-32 hingga jam ke-72. Penyebab terhentinya pertumbuhan khamir pada fase ini adalah ketika konsentrasi sel sangat besar kekurangan nutrisi, akumulasi produk limbah dan lain-lain. Waktu inkubasi optimum khamir pada penelitian ini didapatkan pada jam ke-32, diasumsikan bahwa pada jam ke-18 pertumbuhan sel khamir mengalami peningkatan dan pembelahan secara produktif ditandai dengan nilai absorbansi yang tinggi. Oleh sebab itu, pada penelitian ini pembuatan inokulum dilakukan selama 18 jam, dan inokulum siap diinokulasikan pada media fermentasi.

4.5.2 Pengaruh Lama Fermentasi oleh Khamir Kh2 terhadap Produksi Etanol

Proses fermentasi melibatkan khamir Kh2 yang diduga sebagai khamir yang mempunyai sifat fermentatif yang kuat dan mempunyai tingkat resistensi yang tinggi terhadap etanol. Proses fermentasi oleh khamir Kh2 berlangsung

secara anaerobik, akan tetapi oksigen diperlukan pada proses pembibitan sebelum fermentasi untuk perkembangbiakan khamir itu sendiri (Hidayat, dkk., 2006).

Proses fermentasi dilakukan dengan cara tetes tebu yang telah dipreparasi diambil 200 mL dan ditambahkan inokulum Kh_2 yang telah mencapai fase log sebanyak 20 mL (Rahim, 2009), kemudian Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan *dishaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan variasi lama fermentasi yang dikehendaki yaitu 3, 4, 5, 6, dan 7 hari. Waktu fermentasi berpengaruh terhadap hasil fermentasi karena semakin lama inkubasi akan meningkatkan kadar bioetanol. Namun bila fermentasi terlalu lama nutrisi dalam substrat, akan habis dan khamir tidak dapat memfermentasi bahan organik (Purbarini, 2003). Pada proses fermentasi, jumlah mikroba antara lain dipengaruhi oleh waktu fermentasi yakni semakin lama waktu fermentasi jumlah mikroba semakin banyak dan produksi bioetanol semakin tinggi. Proses ini akan terhenti jika kadar bioetanol sudah meningkat sampai tidak dapat ditolerir lagi oleh sel-sel khamir (Hidayat, 2006). Setelah proses fermentasi selesai, dilakukan penyaringan untuk memisahkan kotoran yang ada dan untuk memisahkan bioetanol dari media fermentasi. Hartina (2013) menyatakan bahwa lama fermentasi optimum dalam menghasilkan kadar etanol tinggi adalah pada 6 hari.

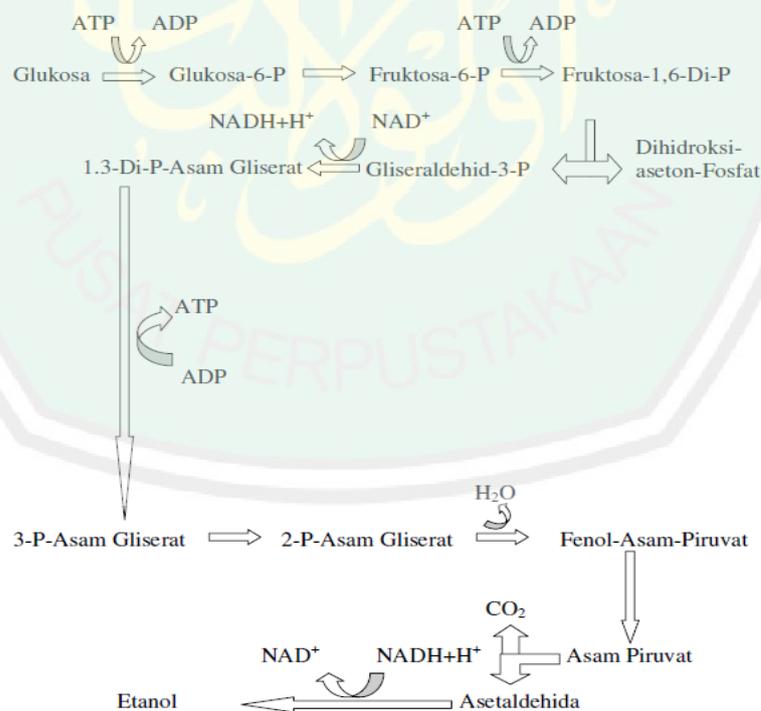
Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, atau dapat lebih jelasnya yaitu sebagai proses respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan akseptor elektron eksternal. Gula merupakan salah satu faktor dalam fermentasi, sehingga perbedaan reaksi fermentasi tergantung dari gula yang digunakan dan hasil dari produk. Glukosa ($C_6H_{12}O_6$) yang

merupakan gula paling sederhana, melalui fermentasi akan menghasilkan dua molekul etanol (C_2H_5OH) dimana reaksi fermentasi ini dilakukan oleh khamir, dan digunakan pada produksi makanan.

Persamaan reaksi kimia :



Pada awalnya gula yang disakarida akan di pecahkan menjadi monosakarida terlebih dahulu. Proses penguraian sukrosa dilakukan dengan bantuan enzim sukrase (invertase). Sukrosa yang dipecahkan menghasilkan glukosa dan fruktosa (Wirahadikusumah, 1985). Skema EMP ditunjukkan pada gambar 4.6:



Gambar 4.6 Skema Embden Meyerhoff-Parnas Pathway (Sebayang, 2006)

Glukosa mengalami fosforilasi menjadi glukosa-6-P dan fruktosa-6-P dengan ATP sebagai donor fosfat. Fruktosa-6-P kemudian diubah menjadi fruktosa 1,6-di-P menggunakan ATP sebagai donor fosfat. Fruktosa-1,6-di-P kemudian dipecah menjadi dua molekul C_3 yang terfosforilasi yaitu dihidroksiaseton fosfat dan gliseraldehid-3-P. Dihidroksi aseton fosfat selanjutnya teroksidasi menjadi gliserolfosfat kemudian diubah menjadi gliserol yang merupakan metabolit sekunder. Gliseraldehid-3-P tereduksi membentuk asam 1,3-di-fosfoglisarat kemudian mengalami defosforilasi menjadi 3-P-asam gliserat dengan melepaskan fosfat dan aseptor fosfat ADP membentuk ATP. Selanjutnya, 3-P-asam gliserat membentuk 2-P-asam gliserat kemudian terbentuk asam fosfoenol piruvat dengan menghasilkan ATP. Melalui reaksi dekarboksilasi, asam piruvat akan membentuk asetaldehid dan CO_2 yang kemudian akan mengalami reaksi oksidasi membentuk etanol.

Etanol yang diperoleh dari proses fermentasi mempunyai kemurnian rendah. Hal ini disebabkan karena dalam proses tersebut, substrat karbohidrat juga menghasilkan produk samping lain sesuai dengan jalur glikolisis seperti air, asam asetat, asam laktat, senyawa ester, keton, alkohol dan asam-asam lainnya (Buckle, 1987; Simanjuntak, 2009). Etanol ini kemudian dimurnikan dengan menggunakan metode destilasi.

4.5.3 Destilasi Etanol Hasil Fermentasi

Pada tahap pemurnian etanol, proses yang sering digunakan adalah proses destilasi. Destilasi adalah salah satu metode dari pemurnian dengan cara

memisahkan dua atau lebih komponen-komponen dalam suatu cairan berdasarkan perbedaan tekanan uap masing-masing komponen (Hidayat, 2007). Pemisahan bahan dengan metode destilasi ini dapat dilakukan jika komposisi fase uap memiliki perbedaan dengan komposisi fase cair. Jika komposisi fase uap sama dengan komposisi fase cair, maka pemisahan dengan jalan destilasi tidak dapat dilakukan (Irfani, 2007).

Pemurnian bioetanol menggunakan metode destilasi hanya akan menghasilkan etanol dengan kadar tertinggi 95,6 % karena akan membentuk campuran azeotrop. Azeotrop adalah campuran dari dua komponen kimia atau lebih pada perbandingan tertentu dimana komposisi tersebut tidak bisa diubah dengan destilasi sederhana. Saat campuran azeotrop dididihkan, uap yang terbentuk memiliki komposisi yang sama dengan cairannya. Karena komposisinya yang tidak berubah oleh pendidihan, azeotrop dikenal juga dengan istilah campuran didih tetap (*constant boiling mixture*). Campuran azeotropik etanol-air tergolong ke dalam azeotropik positif atau azeotropik dengan titik didih minimum. Etanol mendidih pada suhu 78,5 °C, air mendidih pada suhu 100 °C, akan tetapi campuran azeotropik etanol-air mendidih pada 78,2 °C yang lebih rendah dari titik didih masing-masing senyawa (Clark, 2005).

Langkah-langkah pemisahan fase cair hasil fermentasi dengan destilasi yaitu, dimasukkan filtrat hasil fermentasi ke labu alas bulat yang telah di isi dengan batu didih sehingga volumenya setengah volume labu. Dialirkan air kondensor menggunakan air es lalu dihidupkan mantel pemanas dengan suhu sedang. Ditampung destilat pada suhu 78,5 – 85 °C. Senyawa yang menguap

terlebih dahulu adalah etanol karena titik didih rendah yaitu 78,9 °C dibandingkan dengan senyawa-senyawa lain seperti glukosa dengan titik didih 146 °C dan asam asetat dengan titik didih 118,1 °C atau air 100 °C. Semua fasa cair yang ada dalam sampel yang keluar dari labu alas bulat akan keluar melalui pipa *outlet* dan diembunkan kembali dengan pendingin atau kondensor, destilat yang sudah diembunkan akan ditampung dalam wadah terpisah. Destilasi dihentikan jika sudah tidak ada destilat yang menetes dalam Erlenmeyer. Destilat yang didapat lalu dimasukkan dalam botol dan ditutup rapat agar tidak mengalami penguapan karena etanol mempunyai sifat mudah menguap. Destilat yang disimpan dalam botol siap untuk dianalisis dengan GC.

4.5.4 Pengukuran Kadar Etanol dengan Metode Kromatografi Gas

Metode kromatografi gas merupakan metode pemisahan modern yang dapat menghasilkan pemisahan yang efisien dalam waktu yang cepat. Mekanisme kerja dengan metode kromatografi gas adalah pertama kromatografi gas merk HP 5890 dihidupkan untuk memanaskan kondisi alat dan memprogram suhu. Gas pembawa dialirkan ke seluruh bagian alat agar semua bagian jenuh dengan gas pembawa. Gas pembawa (fase gerak) yang digunakan adalah Nitrogen (N₂). Pemilihan gas pembawa didasarkan pada detektor yang digunakan. Detektor yang digunakan pada penelitian ini adalah detektor ionisasi nyala (Flame Ionization Detektor/FID). Detektor ini jauh lebih peka daripada detektor daya hantar panas. Kepekaan detektor ionisasi nyala akan lebih meningkat apabila gas pembawa yang digunakan adalah N₂ (Hendayana, 2006).

Proses pemisahan dilakukan dengan mengambil 1 μL cuplikan dengan syring. Selanjutnya cuplikan diinjeksikan melalui injektor dengan suhu injektor 100 $^{\circ}\text{C}$. Suhu injektor harus lebih tinggi daripada titik didih sampel agar sampel dapat langsung menguap dan masuk ke dalam kolom dengan bantuan gas pembawa. Kolom yang digunakan adalah jenis kolom kapiler HP 608 mempunyai kemampuan memisahkan sampel 2 mL/menit dan bersifat semipolar. Suhu kolom diatur lebih rendah daripada suhu injektor yaitu 40 $^{\circ}\text{C}$ agar pemisahan terjadi dengan baik serta untuk mencegah terjadinya kerusakan komponen dalam kolom. Di dalam kolom inilah terjadi pemisahan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam sampel berdasarkan prinsip "*likes dissolves likes*". Senyawa yang bersifat sama dengan kolom akan tertahan lebih lama, sedangkan senyawa yang berbeda dengan kolom akan diteruskan menuju detektor dengan waktu retensi yang lebih singkat.

Senyawa yang telah dipisahkan dalam kolom akan masuk ke dalam detektor. Suhu detektor diatur pada suhu 150 $^{\circ}\text{C}$, hal ini bertujuan untuk mencegah kondensasi uap sampel yang mengakibatkan FID berkarat atau kehilangan sensitifitasnya (Gandjar dan Rohman, 2007). Senyawa yang keluar dari kolom dicampur H_2 dan udara kemudian dibakar pada nyala di bagian dalam detektor. Atom karbon senyawa organik dapat menghasilkan radikal CH yang selanjutnya menghasilkan ion CHO^+ dalam nyala hidrogen-udara. CHO^+ yang dihasilkan dalam nyala bergerak ke katoda yang berada di atas nyala. Arus yang mengalir di antara katoda dan anoda diukur dan diterjemahkan sebagai sinyal pada

rekorder dan menghasilkan kromatogram (Hendayana, 2006). Kadar bioetanol murni hasil fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Kadar Etanol Hasil Fermentasi

| Lama Fermentasi (Hari) | Rata-rata Kadar Etanol (%) |
|------------------------|----------------------------|
| 3 | 10,99 |
| 4 | 8,74 |
| 5 | 20,36 |
| 6 | 43,44 |
| 7 | 9,96 |

Hasil analisis kadar etanol lebih rinci dapat dilihat pada lampiran 9 dan kromatogram dari analisis GC dapat dilihat pada Lampiran 11. Kromatogram pada larutan standar menghasilkan dua puncak (Lampiran 10). Puncak pertama dengan waktu retensi 4,7 menit adalah etanol dan puncak yang kedua dengan waktu retensi 5,9 menit adalah *acrylonitril* sebagai standar baku internal. Pemilihan *acrylonitril* sebagai baku internal karena *acrylonitril* mempunyai titik didih yang hampir sama, bersifat stabil, dan tidak terdapat dalam sampel. Kromatogram pada sampel dengan perlakuan 6HU2 menghasilkan tiga puncak, yaitu dengan waktu retensi 4,5 menit, 5,2 menit, dan 18,8 menit. Puncak dengan waktu retensi 18,8 menit ini muncul dimungkinkan telah terjadi degradasi etanol sehingga berubah menjadi senyawa lain yang diduga sebagai senyawa asam karboksilat karena memiliki titik didih yang tinggi.

Azizah (2012) telah melakukan penelitian dalam pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. Berdasarkan penelitiannya diketahui bahwa perlakuan lama fermentasi (12, 24, 36, 48, dan 60 jam) tidak berpengaruh nyata

terhadap kadar alkohol. Fermentasi selama 60 jam menghasilkan kadar alkohol yang bekisar antara 1,21-2,25%. Penelitian mengenai bioetanol telah banyak dilakukan sebelumnya dan menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Kumalasari (2011), dengan menggunakan substrat kulit nanas kemudian difermentasi dengan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) selama 4 hari pada suhu 24-33 °C menghasilkan kadar alkohol bekisar 4,18-5,49%. Hal ini menunjukkan bahwa lama fermentasi pada penelitian ini belum mencapai waktu yang optimal. Sari, dkk (2008), menyatakan bahwa lama fermentasi yang paling optimal untuk proses pembuatan bioetanol adalah 3 hari. Jika fermentasi dilakukan lebih dari 3 hari, akan mengurangi kadar alkohol. Berkurangnya kadar alkohol disebabkan karena alkohol telah dikonversi menjadi senyawa lain, misalnya ester.

4.6 Analisis Kadar Gula Sisa Fermentasi

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi salah satunya adalah kadar gula. Gula merupakan substrat utama yang digunakan oleh khamir untuk pembuatan etanol. Kadar gula pada penelitian ini diukur dengan metode fenol H₂SO₄, begitu pula dengan kadar gula sisa setelah fermentasi. Kadar gula sisa setelah fermentasi merupakan kadar gula yang belum digunakan oleh khamir dalam proses fermentasi. Kadar gula sisa setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Kadar Gula Sisa Setelah Fermentasi

| Lama Fermentasi | Kadar Gula (%) |
|------------------------|-----------------------|
| 3 Hari | 14,39 |
| 4 Hari | 11,95 |
| 5 Hari | 12,05 |
| 6 Hari | 11,83 |
| 7 Hari | 15,14 |

Tabel 4.6 menunjukkan bahwa tidak semua perlakuan dengan kadar sisa gula rendah menghasilkan etanol tinggi. Pada perlakuan lama fermentasi 3 hari kadar sisa gula sebesar 14,39 % dengan kadar etanol sebesar 10,99 %, pada perlakuan lama fermentasi 6 hari mempunyai kadar sisa gula terendah yaitu 11,83 % dengan kadar etanol tertinggi yaitu 43,44 %, sedangkan pada perlakuan lama fermentasi 7 hari memiliki kadar sisa gula lebih tinggi sebesar 15,14 % dengan kadar etanol terkecil sebesar 9,96 %. Hal tersebut dimungkinkan penggunaan gula oleh khamir berbeda-beda pada setiap perlakuan.

Tingginya kadar sisa gula setelah fermentasi sangat menguntungkan secara komersial apabila diiringi dengan tingginya kadar etanol murni hasil fermentasi, karena dengan tingginya kadar sisa gula tersebut media fermentasi dapat digunakan kembali untuk proses fermentasi selanjutnya.

4.7 Efisiensi Fermentasi

Efisiensi fermentasi dapat digunakan sebagai parameter keberhasilan suatu proses fermentasi. Semakin tinggi nilai efisiensi fermentasi maka akan semakin tinggi produk yang dihasilkan (Kultsum, 2009). Efisiensi fermentasi diperoleh dari perbandingan etanol hasil fermentasi dengan kadar etanol teoritis (Kumalaningsih dan Hidayat (1995) dalam Juariah, dkk (2004)). Faktor-faktor

yang mempengaruhi efisiensi fermentasi antara lain pH, lama fermentasi, suhu, jenis mikroorganisme, kadar gula, dan sebagainya. Nilai efisiensi etanol (Lampiran 13) dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Efisiensi Fermentasi Etanol

| Perlakuan | Gula Sisa (%) | Gula Terpakai (%) | Etanol (%) | Yield (%) | Efisiensi Fermentasi (%) |
|-----------|---------------|-------------------|------------|-----------|--------------------------|
| 3 Hari | 14,39 | 42,01 | 10,99 | 26,17 | 22,32 |
| 4 Hari | 11,95 | 44,45 | 8,74 | 19,65 | 17,73 |
| 5 Hari | 12,05 | 44,35 | 20,36 | 45,89 | 41,32 |
| 6 Hari | 11,83 | 44,56 | 43,44 | 97,47 | 88,17 |
| 7 Hari | 15,14 | 41,25 | 9,96 | 24,15 | 20,22 |

Berdasarkan Tabel 4.7 menunjukkan bahwa perlakuan pada lama fermentasi 6 hari dengan inokulum sebanyak 20 mL mempunyai *yield* 97,47 % dengan nilai efisiensi 88,17 % sehingga perlakuan tersebut dapat dikatakan sebagai kondisi optimum dengan kadar etanol yang didapat sebesar 43,44 %.

4.8 Pemanfaatan Limbah Tetes Tebu dalam Perspektif Islam

Penelitian ini merupakan salah satu bentuk dalam pemanfaatan limbah hasil produksi. Pemanfaatan limbah merupakan salah satu cara untuk mengurangi pencemaran lingkungan dan merupakan wujud rasa syukur kita terhadap semua yang telah Allah ciptakan untuk manusia. Salah satu upaya manusia dalam menata tatanan kehidupan di alam adalah dengan menjaga keseimbangan kehidupan lingkungan hidup dan selalu merawatnya. Usaha memikirkan segala ciptaan Allah dalam keadaan apapun menjadi pondasi dasar sebagai sosok yang disebut *Ulul Albab* yang Allah jelaskan dalam QS Ali Imran 190-191.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَآخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: "Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka." (Q.S ali Imran: 190-191)

Al-Maraghi (1993) memberikan penjelasan bagian Q.S Ali Imran ayat 191 bahwa tidak ada segala sesuatu yang Allah ciptakan yang tidak berarti dan sia-sia, bahkan semua ciptaanNya adalah hak, yang mengandung hikmah-hikmah yang agung dan maslahat-maslahat yang besar. Seorang mukmin yang mau menggunakan akal pikirannya selalu mengharapkan kepada Allah dengan pujian, doa dan *ibtihal*, sesudah ia melihat bukti-bukti yang menunjukkan kepada keindahan hikmah. Ia pun luas pengetahuannya tentang detail-detail alam semesta yang menghubungkan antara manusia dengan Tuhannya. Konsekuensi logis dari penggunaan akal untuk tujuan mencari hikmah-hikmah tersebut adalah dengan menuntut ilmu.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dalam tetes tebu terdapat khamir Kh1 yang bisa membantu proses fermentasi dalam memproduksi etanol. Hal ini menjelaskan kepada kita tentang keberadaan hikmah yang besar dari alam hasil ciptaan Allah. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam surat Ad Dukhan 38:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لِنَعْبُدَ ۚ

Artinya: “dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya dengan bermain-main. (Q.S ad Dukhan: 38)

Dalam tafsir Al-Azhar tertulis “Lihat dan renungkanlah! Baik pada langit yang dapat engkau jangkau dengan penglihatan matamu, karena walau sampai satu juta tahun umurmu tidak juga engkau akan dapat menyelidiki semua langit. Atau keadaan pada bumi tempat engkau diam; dengan tumbuh-tumbuhannya, batu-batunya, gunung-gunungnya, laut daratnya, manusia dan binatangnya, burung dan ikannya, air dan apinya; atau ada yang di antara langit dan bumi, awan dan meganya, embun dan kabutnya, matahari dan bulannya dan bintang-gemintangnya. Ketahuilah bahwa semuanya itu tidaklah dijadikan Tuhan dengan main-main.”

Sayyid (2001) menafsirkan penggalan ayat di atas bahwa Allah tidak menciptakan alam ini dengan sia-sia dan batil melainkan menciptakannya dengan penuh benar dan kebenaran. Benar nilainya, benar undang-undangnya, dan benar dasarnya. Sesungguhnya alam ini memiliki hakikat. Maka ia bukanlah sesuatu yang “tidak ada” sebagaimana yang dikatakan oleh sebagian ahli filsafat, akan tetapi ia berjalan sesuai aturan. Maka ia tidak dibiarkan rusak dan amburadul, ia berjalan untuk suatu tujuan. Ia diatur wujud, gerak dan tujuannya dengan benar, ia tidak bercampur dengan kebatilan.

Hikmah penelitian ini adalah berlangsungnya ekosistem yang saling membutuhkan satu dengan yang lainnya (tetes tebu, khamir dan manusia) telah disinggung oleh Allah dalam surat Ali-Imran [3]: 27.

تُولِجُ اللَّيْلَ فِي النَّهَارِ وَتُؤَلِّجُ النَّهَارَ فِي اللَّيْلِ ۖ وَتُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَمِيتِ وَتُدْخِلُهُ
 الْمَمِيتَ مِنَ الْحَيِّ ۖ وَتَرْزُقُهُ مِمَّنْ تَشَاءُ بِغَيْرِ حِسَابٍ ﴿٢٧﴾

Artinya:

“Engkau masukkan malam ke dalam siang dan Engkau masukkan siang ke dalam malam. Engkau keluarkan yang hidup dari yang mati, dan Engkau keluarkan yang mati dari yang hidup. dan Engkau beri rezki siapa yang Engkau kehendaki tanpa hisab (batas)” (Ali-Imran [3]:27).

Maksud dari kalimat *وتخرج الحي من الميت وتخرج الميت من الحي* (Engkau keluarkan yang hidup dari yang mati, dan Engkau keluarkan yang mati dari yang hidup), Allah mengeluarkan tanaman dari biji-bijian dan biji-bijian dari tanaman (Syaiikh, 2007). Hasil penelitian memberikan gambaran maksud dari kalimat *وتخرج الحي من الميت* yakni, Allah menghidupkan khamir dari tetes tebu. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh 2 isolat khamir yang berhasil diisolasi dari molase. Hasil penelitian juga memberikan gambaran maksud dari kalimat *وتخرج الميت من الحي* yakni, Allah mengeluarkan enzim invertase dan zimase dari khamir yang berhasil diisolasi. Hasil uji kualitatif khamir, menunjukkan kadar etanol terbaik dihasilkan oleh khamir Kh2.

Maksud dari kalimat *وترزق من تشاء بغير حساب* (dan Engkau beri rezki siapa yang Engkau kehendaki tanpa hisab [batas]) yang termaktub dalam tafsir Ibnu Katsir adalah Allah memberikan kekayaan kepada orang yang Allah kehendaki dalam jumlah yang tidak dihitung, serta menahannya dari orang lain, karena pada yang demikian itu mengandung hikmah, keinginan dan kehendak Allah (Syaiikh, 2007). Hasil penelitian memberikan gambaran maksud dari kalimat *وترزق من تشاء بغير حساب* yakni, Allah memberikan rizki terhadap makhluknya tanpa hisab baik

khamir, tetes tebu maupun manusia. Berdasarkan hasil penelitian ini *yeast extract* merupakan nutrisi yang diberikan kepada khamir dan merupakan rizki yang diberikan oleh Allah melalui perantara manusia. Tiada daya dan kekuatan tanpa pertolongan dan campur tangan dari-Nya. Bentuk usaha manusia untuk mengisolasi khamir dari molase dan usaha dalam pemanfaatan tetes tebu dalam produksi etanol. Inilah nikmat rizki tak hingga yang diberikan Allah kepada makhluknya sesuai dengan kehendaknya.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini didapatkan 2 isolat khamir. Ciri morfologi koloni isolat khamir Kh1 yaitu mempunyai bentuk bulat, berwarna krem, permukaan sedikit kasar, elevasi *low convex* dan tepi *entire*. Sedangkan untuk morfologi koloni isolat khamir Kh2 memiliki ciri-ciri yaitu berbentuk bulat, berwarna krem, permukaan halus, elevasi *low convex* dan tepi *entire*. Hasil karakterisasi isolat Kh2 adalah dengan ciri-ciri sebagai berikut yaitu; khamir Kh2 merupakan salah satu jenis khamir yang bereaksi dengan *methylen blue*, sehingga berwarna biru dan lebih mudah diamati dengan bentuk sel bulat telur (elipsodial) dengan pertumbuhan sel yang membentuk koloni maupun menyendiri.

Berdasarkan hasil analisis pada perlakuan fermentasi dengan variasi 3, 4, 5, 6, dan 7 hari disimpulkan bahwa perlakuan yang terbaik adalah pada lama fermentasi 6 hari yaitu dengan rata-rata 43,435%, dengan *yield* 97,47 %, dan efisiensi fermentasi 88,17 %.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu adanya penelitian lanjutan tentang variasi konsentrasi substrat dan inokulum, sehingga didapatkan enzim invertase dan zimase terbaik dengan hasil yang maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbaas, I. 2009. *Al-Kalam Digital Versi 1.0 (Tafsir Ibnu Abbas)*. Bandung: Diponegoro.
- Abdalbasit, M., Gasmalla, A., Yang, R., Nikoo, M., and Man, S. 2012. Production of Etanol from Sudanese Sugar Cane Molasses and Evaluation of Its Quality. *Journal Food Processing and Technology*, Vol 3 issue 7, pp 1-3.
- Admin Azonano technology. 2008. *Bakteri menempatkan bekerja sebagai weavers tiny dari biomaterial nanoscale*. <http://www.azonano.com/nanotechnology%20news/bakteri-menempatkan-bekerja-sebagai-weavers-tiny-dari-biomaterial-nanoscale.html> [23 Desember 2010]. Diakses 20 April 2013.
- Ahmad, S.A., Hakim, E.H dan Makmur, L. 2006. *Ilmu Kimia Dan Kegunaan Tumbuh-Tumbuhan Obat Indonesia*. Bandung : ITB.
- Akhmaloka. 2003. Isolasi dan Karakterisasi Mutan sup45 *Saccharomyces cerevisiae* Sensitif Temperatur. *Jurnal Matematika dan Sains*. Vol.9. No.2. Hal: 223-239.
- Aliya, A. 2013. PTPN X Targetkan Produksi Gula Premium 200 Ribu Ton. <http://finance.detik.com/read/2013/01/09/101301/2136907/1036/ptpn-x-targetkan-produksi-gula-premium-200-ribu-ton>. Diakses tanggal 30 Mei 2013.
- Al-Jaziri, Jabir, A. B., dan Syaikh, 2009. *Tafsir Al-Qur'an Al-Aisar*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Al-Maraghi, A.M. 1993. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi Jilid 4*. Semarang: Toha Putra.
- Anwar, S. 2008. *Ampas Tebu*. <http://www.ampas-tebu.com>. Diakses tanggal 18 Januari 2013.
- Amerine, M. A., Berg, H, W., and Kunkee, R, E. 1987. *Technology of Wine Making*. The AVI Publ. Co. Inc, Westport Connecticut.
- Atit, K. 2007. *Penapisan Khamir Selulolitik *Cryptococcus sp.* yang Diisolasi Dari Tanah Kebun Biologi Wanema, Jaya Wijaya, Propinsi Papua*. Bogor: Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi – LIPI.
- Azizah, N., Al-Baarii, A, N., dan Mulyani, S. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi gas pada Proses Fermentasi

- Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan vol 1 no.2*.
- Backer, H. Kent, dan Patricia, L, Gallagher. 1980. *Management's View of Stock Splits, Financial Management 9 (Summer)*, 73-77.
- Baikow, V. E. 1982. *Manufacture and Refining of Raw Cane Sugar*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York.
- Berry, D. R. And C. Brown. 1988. *Physiology of Yeast Growth*. Di dalam Berry, D. R., G. G. Stewart and I. Russell (eds). *Yeast Biotechnology*. Allan dan Unwin, Sydney.
- Buckle, K. A., R. A. Edwards, G. H. Fleet, dan M. Wooton. 1985. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh Pumomo, H. dan Adiono. 1985. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G. H. F., dan M. Wooton. 1987. *Ilmu Pangan*. Diterjemahkan oleh Purnomo, Hari dan Adiono. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Chang, W, K., McClave, Chao, Y, C. 2004. *Enhancing Interpretation of Gastric Residual Volume by Refractometry*. *Nur Clin Pract* 19(5): 62-455.
- Data Riset Industri dan Pemasaran Gula di Indonesia. 2009. Workshop Budidaya dan Pemanfaatan Tetes untuk Bahan Pangan dan Energi. <http://arenindonesia.wordpress.com/kegiatan-tentang-aren/workshop/44>. Diakses 12 April 2013.
- Dinda. 2008. *Pembuatan Alkohol*. <http://medicafarma.blogspot.com/2008/06/pembutan-alkohol.html>. Diakses tanggal 2 Januari 2013.
- Dirmanto, S. 2006. *Fermentasi anaerob*. ([Http://www.kompas.com](http://www.kompas.com)) Akses tanggal 21februari 2011.Makassar.
- Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Malang: Djambatan.
- Fardiaz, S. 1989. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: Gramedia.
- Ferdiaz, S. 1992. *Fisiologi Fermentasi*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Frazier, W. C. 1977. *Food Microbiology*. Tata Mc Graw - Hill Pub. Co. Ltd., New Delhi.

- Fiechter, A. 1982. *Advances in Biochemical Engineering*. Berlin: Springer – Verlag.
- Gandjar, G, I., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gautman, S. B. 2010. *Biology*. New York: McGraw-Hill.
- Guimaraes, T. M. 2006. Isolation and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of Winery Interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 42. No.1. Hal: 121.
- Gunasekaran, P and Raj, K. C. 1999. *Fermentation Technology-Zymomonas mobilis*. Departement of Microbial Technology, School of Biological Sciences. India: Mandurai Kamaraj University, Tamil Nadu.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Harahap, H. 2003. *Karya Ilmiah Produksi Alkohol*. Medan: USU digital library.
- Harley dan Presscot. 2002. *Laboratory Exercise in Microbiology*. McGraw-Hill Publisher. USA.
- Hartina, F. 2013. Fermentasi Tetes Tebu Dari Pabrik Gula Pagotan Madiun Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* Untuk Menghasil Bioetanol dengan Kajian Variasi pH dan Lama Fermentasi. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hasanah, H. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol Tape Ketan Hitam (*Oryza sativa L var forma glutinosa*) dan Tape Singkong (Manihot utilissima Pohl). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknoli Uniersitas Islam Negeri.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: Remaja Rosdakarya.
- Herland. 2009. *Mikrobiologi Dasar*. <http://ekmon-saurus.com/2008/11/bab-9-aktivitas-enzim.html>. Diakses tanggal 15 Februari 2013.
- Hidayat dan Suhartini.2006. *Mikrobiologi Industri*. Jakarta: Andi.
- Highina, B, K., Hashima, I., dan Bugaje, I, M. 2011. Optimization of Ethanol Production from Sugar Molasses in Nigeria. *Journal of Applied Technology in Enviromental Sanitation*. Volume 1, number 3: 233-237.

- ICN. 2010. Perkembangan Produksi Gula di Indonesia. *International Council Nurses*.
- Inggrid. 2003, Kinetika Inhibisi oleh Produk Pada Fermentasi Etanol dari Molasses dengan *Saccaromyces cereviceae*. *Thesis*.Jurusan Teknik Kimia. Surabaya: ITS.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi menguak dunia Mikroorganisme*. Bandung: Yrama Widya.
- Irianto, K. 2007. *Mikrobiologi*. Bandung: Yrama Widya.
- Ishmayana, S., Learmonth, P, R., and Kennedy, J, U. 2011. Fermentation Performance of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in Media With High Sugar Concentration. *Proceeding of the 2th International Seminar on Chemistry*, pp 379-385, Jatinangor.
- Istiana, Eni K., Djaenudin, G., dan Sukardi, H. 2012. *Isolasi Dan Identifikasi Sacharomyces Cerevisiae Beserta Aktivitas In Vitro Terhadap Salmonella Typhimurium*. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.
- Juwita, R. 2012. Studi Produksi Alkohol Dari Tetes Tebu (*Saccharum Officinarum* L) Selama Proses Fermentasi. *Skripsi*. Makassar: Universitas Hasanuddin Makassar.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi Biology and Applications*. John Willey & Sons Ltd. England.
- Kirk, RE, and Othmer, DF. 1963. *Encyclopedia Of Chemical Technology* 2nd edition. Vol. 13. John Wiley & Sons Inc. New York.
- Kultsum, U. 2009. Pengaruh Variasi Nira Tebu (*Saccharum Officinarum*) dari Beberapa Varietas Tebu Dengan Penambahan Sumber Nitrogen (N) dari Tepung Kedelai Hitam (*Glycine Soja*) sebagai Substrat Terhadap Efisiensi Fermentasi Etanol. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri.
- Kumar, V., Cotran, R.S., and Robbins. 2011. Characterization of Alcohol Resistant Yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. *International Research Journal of Microbiology*. Vol.2 (10).
- Kusdriana, D. 2009. *Studi Tentang Industri Dan Pemasaran Gula Di Indonesia*. Jakarta: PT Media Data Riset.

- Kusmiati. 2010. Efek Sumber Karbon Berbeda terhadap Produksi α -Glukan oleh *Saccharomyces Cerevisiae* pada Fermentor Air Lift. *Jurnal Natural Indonesia*. Vol.13. No.2. Hal: 138 – 145.
- Landecker, E. M. 1972. *Fundamentals of The Fungi*. New Jersey: Prentice Hall Inc.
- Lay, B.W., Hastowo, S. 1994. *Mikrobiologi*. Jakarta: Rajawali Persada.
- Lodder, J. 1970. *The Yeast : A Taxonomic Study Second Revised and En larged Edition*. The Netherland, Northolland Publishing Co, Amsterdam.
- Madigan, M. T. 2003. *Brock Biology of Microorganism*. United State of America: Pearson Education, inc.
- Manshur. 1998. Penentuan pH dan Suhu Optimum pada Fermentasi Onggok menjadi Etanol dengan Biakan *Schizosaccharomyces* sp. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Martoyo, Theresia, E. S. Bambang dan Bachtiar. 1991. *Diktat Analisis Kadar Gula Total dalam Tetes (Molase)*. Pasuruan: Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia.
- Marx, J. L. 1991. *Revolusi Bioteknologi*. Terjemahan : Wilder Yatim. Edisi I, Cetakan I. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia : 69-73.
- Michael, J., Jr, Pelczar., Chan, E, C, S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Moat, A. G. 1979. *Microbial Physiology*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Muljono, J., dan A.A Daewis. 1990. *Teknologi Fermentasi. Pusat Antara Universitas Bioteknologi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bina Aksara.
- Muslimin, L. W. 1996. *Mikrobiologi Lingkungan*. Bogor: IPB-Press.
- Narita, V. 2005. *Saccharomyces cerevisiae Superjamur yang Memiliki Sejarah Luar Biasa*. Jakarta: Gramedia Pustaka.
- Nikon. 2004. *Saccharomyces Yeast Cells : Nikon Microscopy*. Phase Contrast ImageGallery.
<http://www.microscopyu.com/galleries/pliasecontrast/saccharomycessmall>.
Diakses 12 April 2013.

- Nurdyastuti, I. 2008. *Teknologi Proses Bio-Etanol*. Jakarta: Balai Besar Teknologi Pati-BPPT.
- Nurhayani, 2000. *Peningkatan Kandungan Protein Kulit Ubi Kayu Melalui Proses Fermentasi*. Vol 6. JMS.
- Nova, B., Sumaryati, S., dan Rahmiana, Z. 2012. Studi Isolasi *Saccharomyces* sp Dari Limbah Cair PT.Coca Cola dan Aplikasinya Sebagai Sel Biomassa Untuk Penyerapan Ion Logam Pb (II) Pada Limbah Cair Rsup Dr. M. Djamil Padang. *Jurnal Kimia Unand*, Volume 1 Nomor 1 Tahun 2012. Jurusan Kimia FMIPA Unand.
- Pathania R, Brown E. D. 2008. Small and Lethal: Searching For New Antibacterial Compound with Novel Model Of Action. *Minireview. Biochem. Cell Biol.* 86: 111-115.
- Paturau, J. M. 1982. *By - Product of the Cane Sugar Industry*. Amsterdam: Elsevier Scientific Publ. Co.
- Pedrotti, F,L dan L, S, Pedrotti. 1993. *Introduction to Optics Second edition*. New Jersey: Prentice-Hall.
- Pramana. A. S. D. 2009. Selayang Pandang Tentang Molase (Tetes Tebu). <http://anggitasaputradwipramana.bolgsport.com>. Diakses pada tanggal 4 Januari 2011.
- Prasetyo, A.K., Hadi, W. 2011. Pembuatan Etanol dari Sampah Pasar Melalui Proses Hidrolisis Asam dan Fermentasi Bakteri *Zymomonas Mobilis*. *Skripsi*. Jurusan Teknik Lingkungan FTSP. Surabaya: ITS.
- Pelczar. J. Michael dan Chan E.C.S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Pelczar, M. J. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Purbarini, A. 2003. Pengaruh Waktu Inkubasi pada Fermentasi Cairan Kopi dengan Inokulasi Kultur Kombucha Terhadap Kadar Alkohol dan Tanin. *Jurnal FKIP Jurusan Biologi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikrobia*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Qureshi, S, K., Tariq, M., and Shehla, S. 2007. Isolation and Taxonomic Characterization of Yeast Strains on the Basis of Maltose Utilization Capacity for Bread Making. *International Journal of Agriculture & Biology*. Department of Food Technology. Pakistan: University of Arid Agriculture.

- Rachdie. 2008. *Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroba*. <http://rachdie.blogspot.com/2006/10/14/faktor-yang-mempengaruhi-pertumbuhan-mikroba/>. Diakses 17 April 2013.
- Rahayu, E, S. 1992. *Teknologi Pengolahan Minuman Beralkohol*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Gajah Mada.
- Rehm, H. J. dan G. Reed. 1981. *Biotechnology*. Volume 1. Microbial Fundamentals. Verlag Chemi GmbH, Weinheim.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Sanger. 2004. *Peptidase of Saccharomyces cerevisiae*. <http://merops.sanger.ac.uk/speccards/peptidase/spOO0895.htm>. Diakses 28 April 2013.
- Sastrohamidjojo. 2001. *Spektroskopi*. Jakarta: Liberty.
- Sebayang, F. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase Secara Fermentasi Menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Terimobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses*, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara, hlm 75-80.
- Syaikh, A. 2006. *Tafsir Ibnu Katsir* Jilid 1. Terjemahan M. Abdul Ghoffar. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Sholikhah, M. S. 2010. Kajian Kadar Etanol dan Asam Asetat dalam Cairan Nira Siwalan (*Borassus Flabellifer* Linn) Menggunakan Metode Kromatografi Gas. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Siswadji, C. L. 1985. Pembuatan minuman sari tape dari ekstraksi tape ubi kayu (*Manihot sp*). *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sriyanti. 2003. *Studi Komparatif Kadar Gula dan Alkohol Pada Tape Singkong dengan Varietas Yang Berbeda*. FKIP Jurusan Biologi. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Subandi, M. Syam, dan A. Widjono, 1988. *Tetes Tebu*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor.
- Sugiyarti. 2007. *Pengaruh Waktu Fermentasi dan Dosis Ragi Terhadap Kadar Alkohol pada Fermentasi Sari Umbi Ketela Pohon (Manihotutilissima)*

Pohl) Varietas Randu. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Jurusan Biologi. Surakarta: UMS.

Suriawiria, U. 1986. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Papis Sinar Sinanti.

Sutedjo, M. 1996. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta: Rineka Cipta.

Sutiah. 2008. Studi Kualitas Minyak Goreng dengan parameter Viskositas dan Indeks Bias. *Skripsi*. Semarang: FMIPA Universitas Diponegoro.

Tarigan, J. 1988. *Pengantar Mikrobiologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan. Jakarta.

Tarigan. 2009. Pra Rancangan Pembuatan pabrik bioetanol dari Molase Kapasitas produksi 98.000 ton/tahun. <http://Repository.usu.ac.id>. Diakses tanggal 24 Maret 2013.

Tortora, G., Fince, B, R., and Case, C, L. 2001. *Introduction Microbiologi edisi 7*. San Fransisco Spanyol: Addison Weasly angman.

Utami, I, L., Erwan, A., dan Meida, S. 2012. *Proses Pengolahan Limbah Tetes Tebu Menjadi Ethanol*. Universitas Pembangunan Nasional (UPN) "Veteran" Jawa Timur dalam Seminar Nasional Teknik Kimia Soebardjo Brotohardjono IX vol D.10-1–D.10-6.

Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1998. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markham. Jakarta: Erlangga.

Wahyudi. 1997. Produksi Alkohol Oleh *Saccharomyces Ellipsoideus* Dengan Tetes Tebu (Molase) Sebagai Bahan Baku Utama. *Skripsi*. Fakultas teknologi pertanian Institut Pertanian Bogor: Bogor.

Wanto, E. P. dan A. Soebagyo. 1980. *Dasar-dasar Mikrobiologi Industri*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI.

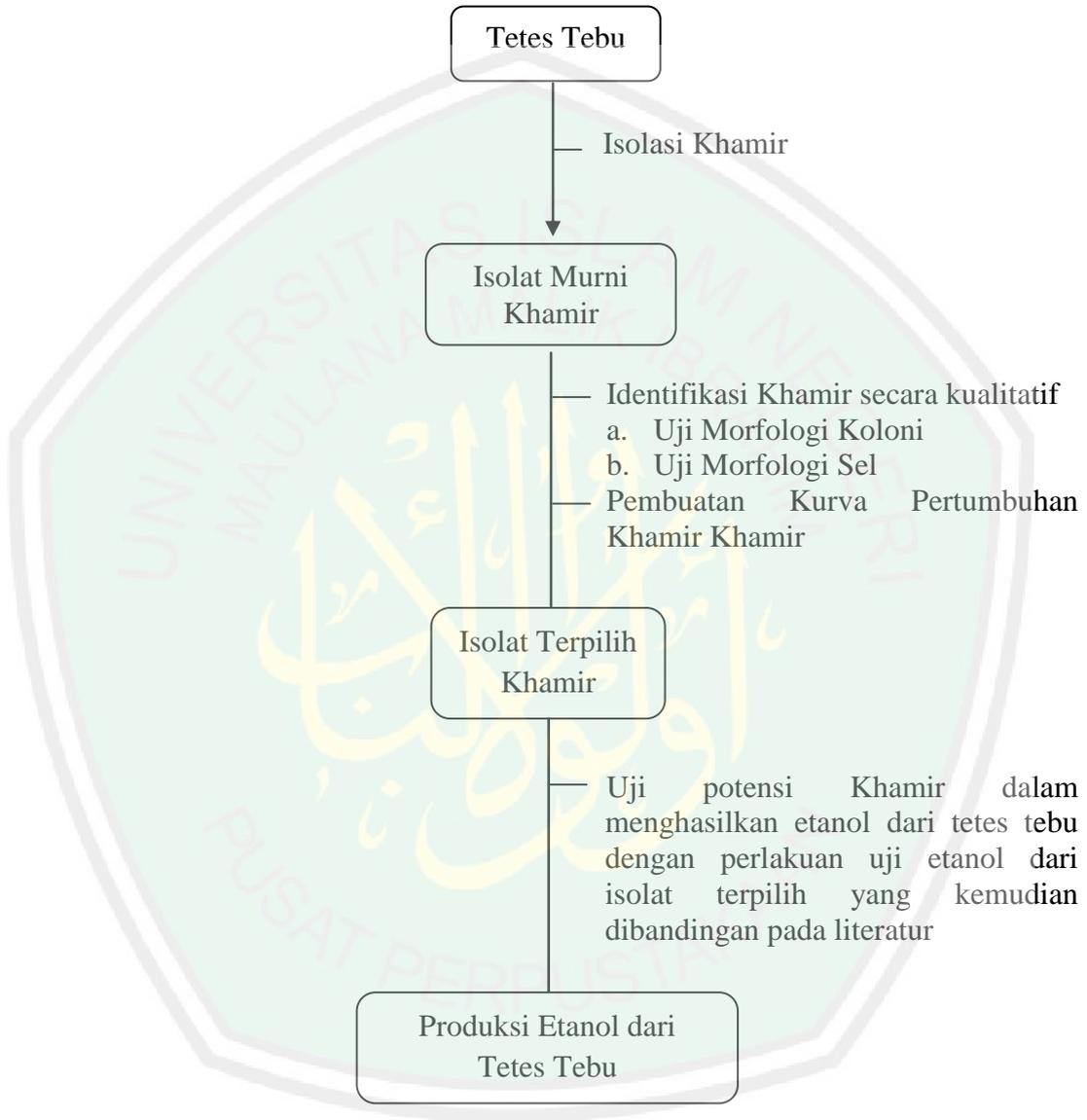
Watson, D. (1988). Intraindividual and interindividual analyses of Positive and Negative Affect: Their relation to health complaints, perceived stress, and daily activities. *Journal of Personality and Social Psychology*, 54, 1020-1030.

Wibowo, A, H. 2011. Jual Tetes Tebu Murah, Ready dan Siap Delivery Pulau Jawa. <http://bismacenter.ning.com/forum/topics/jual-tetes-tebu-molases-molase>. Diakses Tanggal 27 Februari 2013.

- Widayanti, R., Solihin, D.D., Sajuthi, D., Perwita, D. 2006. *Kajian Penanda Genetik Gen Cytochrome B pada Tarsius sp.* J Sain Vet 24 (1): 1-8.
- Wijiyono. 2009. Keanekaragaman Bakteri Serasah Daun *Avicennia marina* yang Mengalami Proses Dekomposisi pada Berbagai Tingkat Salinitas di Teluk Tapian Nauli. *Tesis Biologi USU*. Medan
- Winarno, F.G. 1980. *Enzim Pangan*. Bogor: Pusbangtepa.
- Winarto, 2007. *Kimia Pangan*. Bogor: Pusbangtepa.
- Wiryanawan, A. 2011. Instrument Kromatografi Gas. http://www.chemistry.org/materi_kimia/instrumen_analisis/kromatografi1/instrumentasi-kromatografi-gas/. Diakses pada tanggal 9 November 2012.
- Yuliani, 2003. Studi daur Ulang Limbah Cair Fermentasi Etanol yang Berbahan Baku Molase Dengan Teknologi Membran. *Tesis*. Program Pasca Sarjana. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

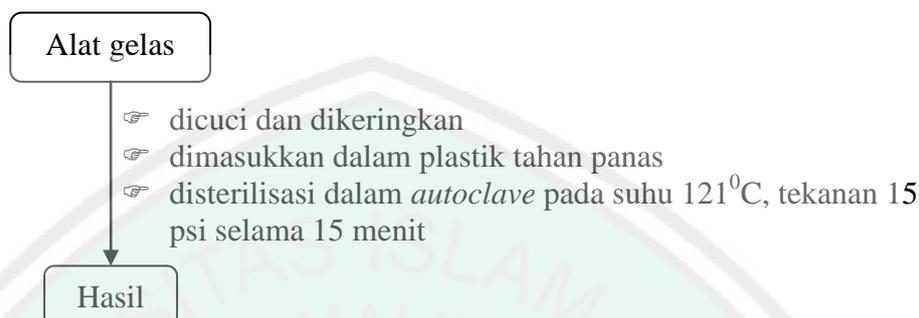
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Penelitian



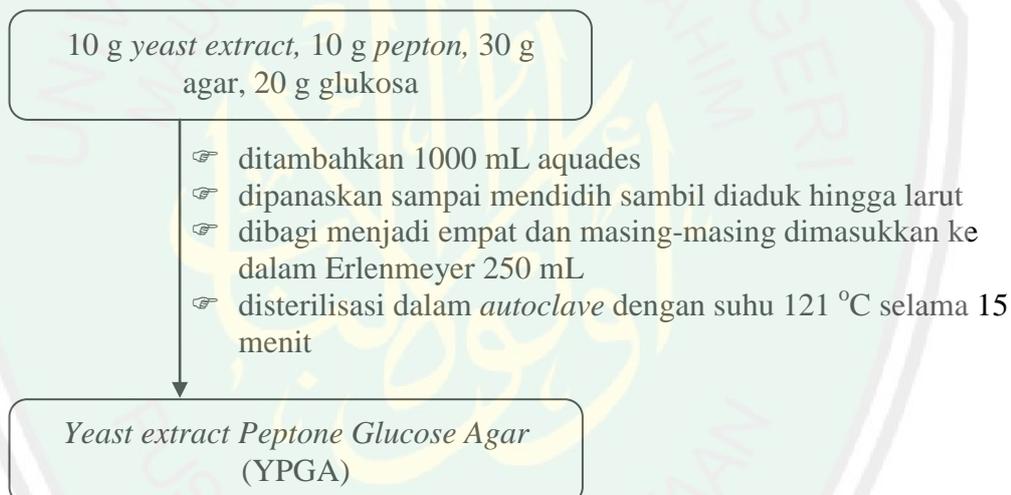
Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Sterilisasi Alat (Indahsari, 2012)

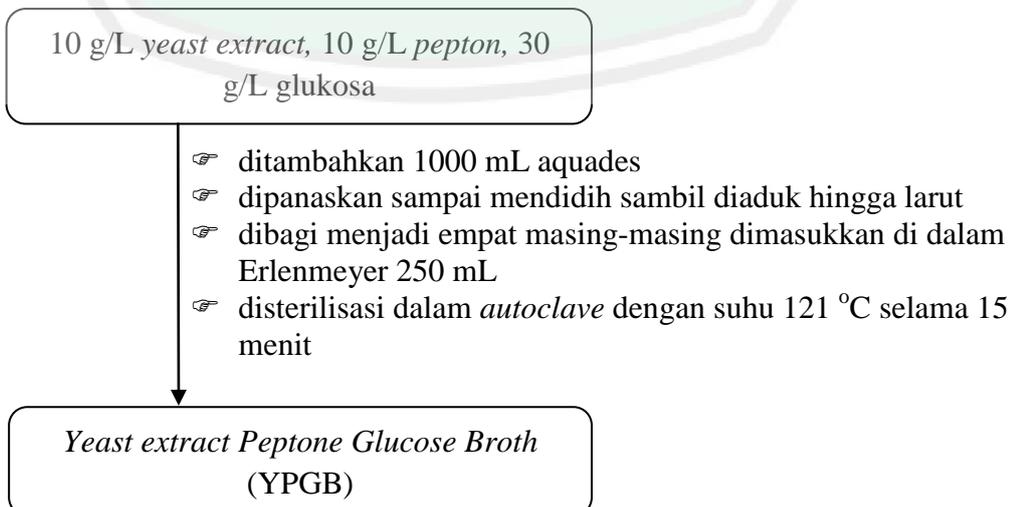


L.2.2 Pembuatan Media

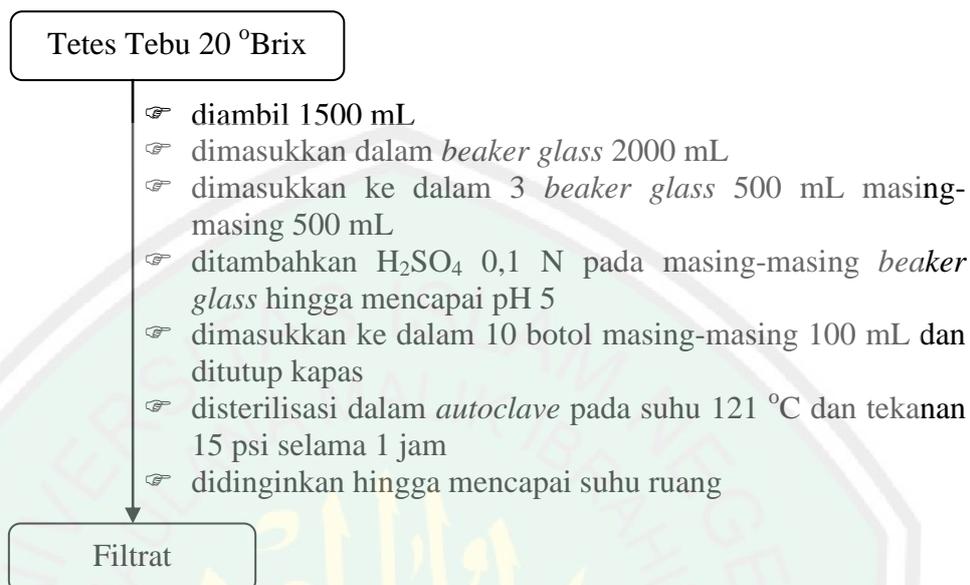
L.2.2.1 *Yeast extract Peptone Glucose Agar* (YPGA) (Thais M, 2006)



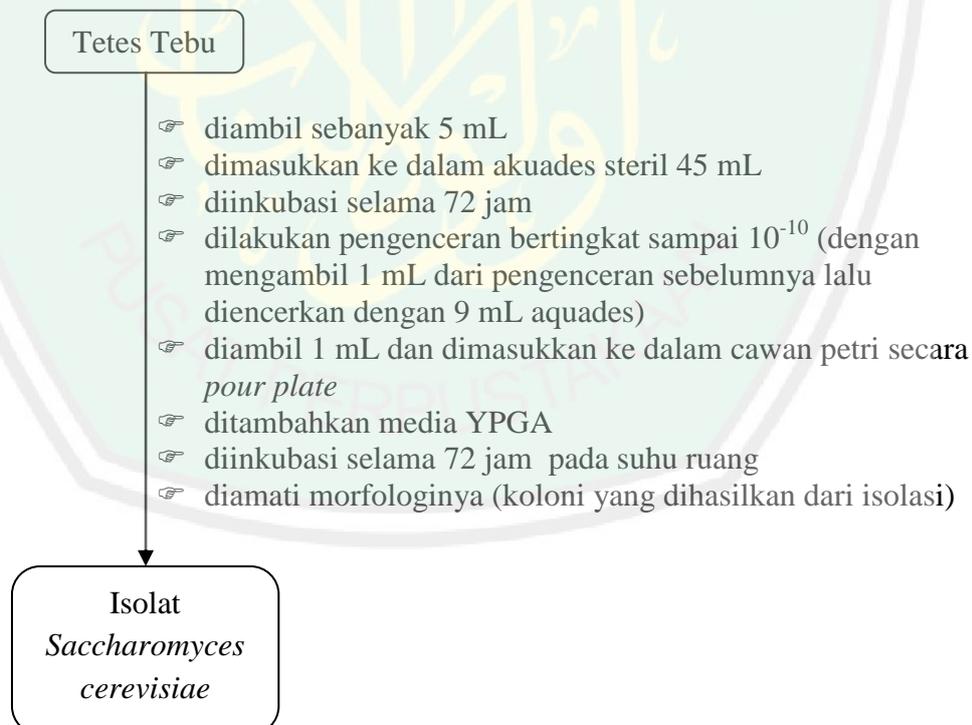
L.2.2.2 *Yeast extract Peptone Glucose Broth* (YPGB) (Thais M, 2006)



L.2.3 Preparasi Sampel

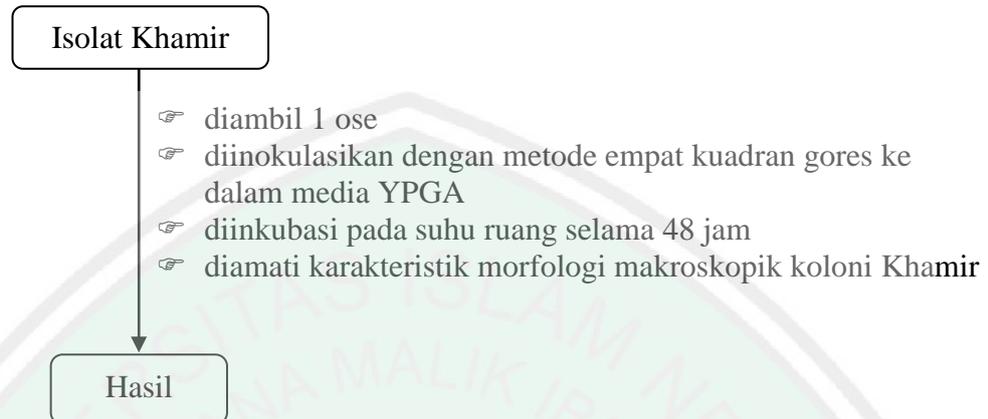


L.2.4 Isolasi Khamir (Guimaraes, 2006)

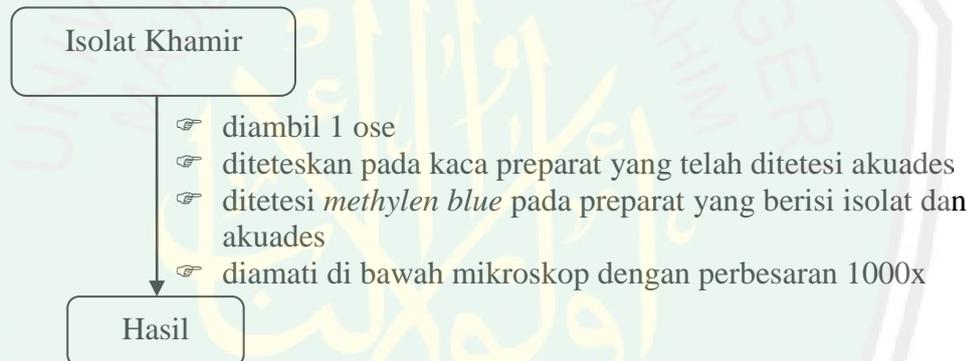


L.2.5 Identifikasi Khamir

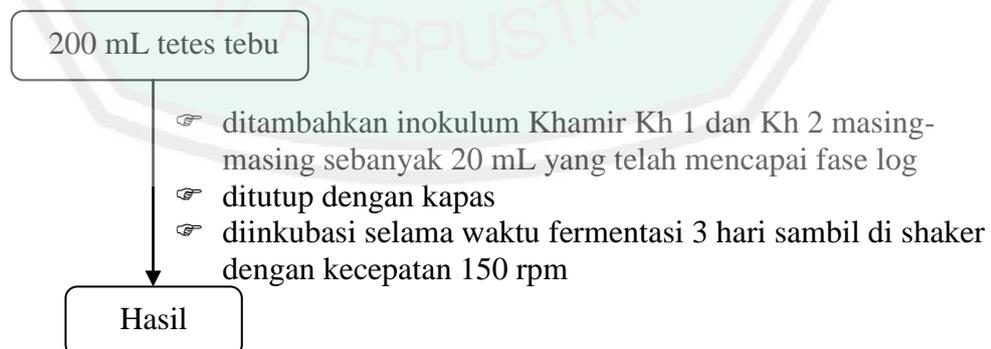
L.2.5.1 Uji Morfologi Koloni



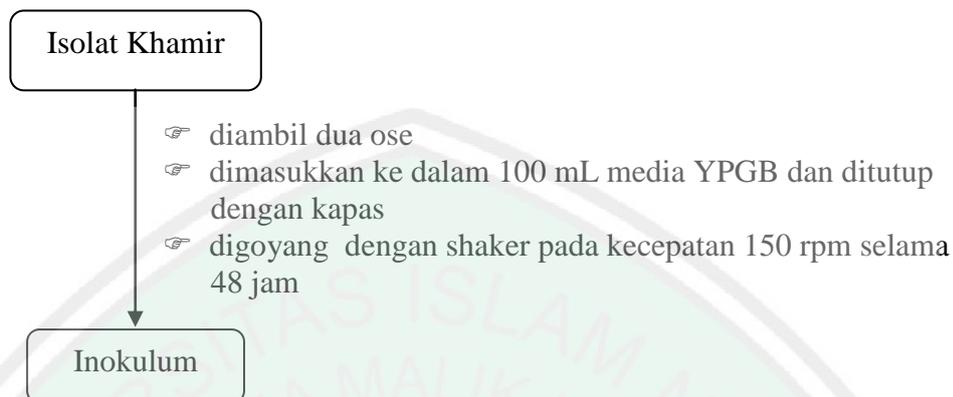
L.2.5.2 Uji Morfologi Sel (Kusmiati, 2007)



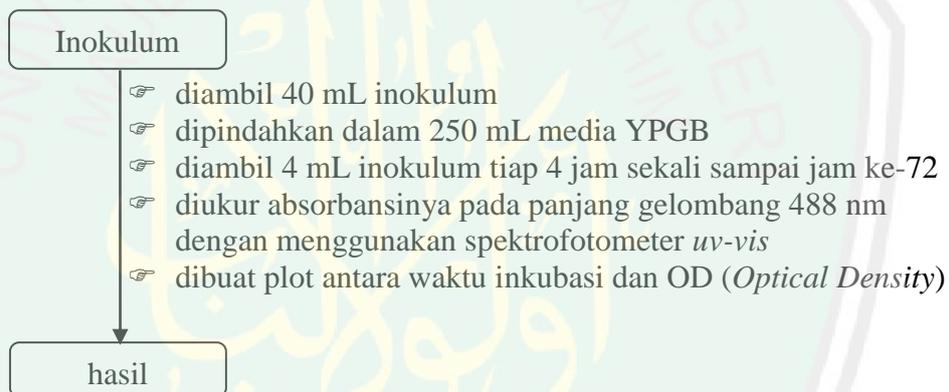
L.2.6 Produksi Etanol dari Tetes Tebu oleh Isolat Khamir Kh 1 dan Kh 2 untuk Menentukan Khamir yang Memiliki Potensi Produksi Etanol Tertinggi



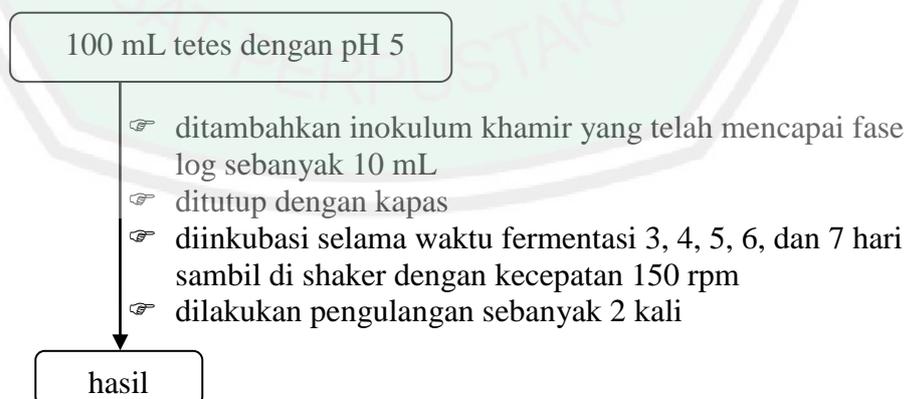
L.2.7 Pembuatan Inokulum



L.2.8 Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir Kh 2



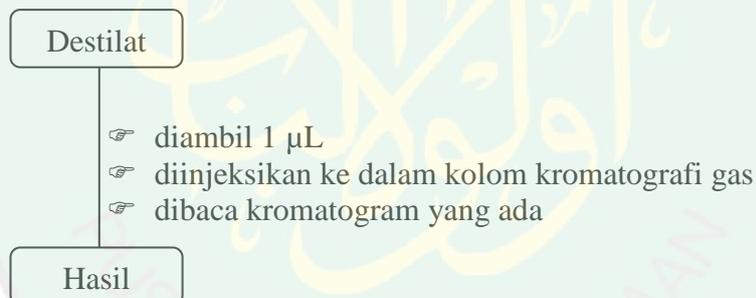
L.2.9 Pengaruh Lama Fermentasi pada Produksi Etanol dari Tetes Tebu Menggunakan Khamir Hasil Isolat (Wahyudi, 1997)



L.2.10 Destilasi Etanol Hasil Fermentasi (Kultsum, 2009)



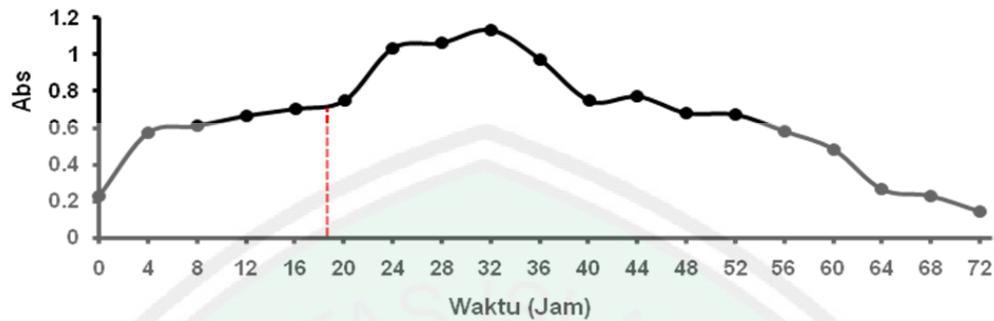
L.2.11 Penentuan Kadar Etanol dengan Metode Kromatografi Gas (GC)



Lampiran 3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Khamir Kh2

Kurva pertumbuhan khamir Kh2 didapatkan dari pengukuran OD (*Optical Density*) yang diukur setiap 4 jam sekali. Adapun kurva pertumbuhan khamir Kh2 dapat dilihat pada Gambar L3.

Gambar L3. Kurva Pertumbuhan Khamir Kh 2



Absorbansi Kurva Pertumbuhan

Tanggal Analisa : 10 Maret 2014

Advanced Reads Report

Report time 3/10/2014 10:37:04 AM
 Method
 Batch name D:\Lu'luul F.A\Absorbansi kurva pertumbuhan (10-03-2014).BAB
 Application Advanced Reads 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 600.0
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

| Read | Abs | nm |
|------|----------|-------|
| Zero | (0.0894) | 600.0 |

Analysis

Collection time 3/10/2014 10:37:04 AM

| Sample | F | Mean | SD | %RSD | Readings |
|-----------|---|--------|--------|------|----------------------------|
| Jam ke-0 | | | | | 0.2289 0.2319 0.2316 |
| | | 0.2308 | 0.0016 | 0.71 | |
| Jam ke-4 | | | | | 0.5750 0.5714 0.5776 |
| | | 0.5747 | 0.0031 | 0.71 | |
| Jam ke-8 | | | | | 0.6116 0.6095 0.6083 |
| | | 0.6098 | 0.0017 | 0.28 | |
| Jam ke-12 | | | | | 0.6649 0.6653 |

| | | | | |
|-----------|--------|--------|------|----------------------------|
| | 0.6659 | 0.0015 | 0.22 | 0.6676 |
| Jam ke-16 | | | | 0.7015 0.7061 0.7014 |
| | 0.7030 | 0.0027 | 0.38 | |
| Jam ke-20 | | | | 0.7482 0.7496 0.7556 |
| | 0.7511 | 0.0039 | 0.52 | |
| Jam ke-24 | | | | 1.0345 1.0363 1.0356 |
| | 1.0355 | 0.0009 | 0.09 | |
| Jam ke-28 | | | | 1.0637 1.0637 1.0638 |
| | 1.0638 | 0.0001 | 0.01 | |
| Jam ke-32 | | | | 1.1300 1.1320 1.1301 |
| | 1.1307 | 0.0011 | 0.10 | |
| Jam ke-36 | | | | 0.9704 0.9710 0.9718 |
| | 0.9711 | 0.0007 | 0.07 | |
| Jam ke-40 | | | | 0.7533 0.7471 0.7459 |
| | 0.7488 | 0.0040 | 0.53 | |
| Jam ke-44 | | | | 0.7687 0.7706 0.7735 |
| | 0.7709 | 0.0024 | 0.32 | |
| Jam ke-48 | | | | 0.6802 0.6788 0.6804 |
| | 0.6798 | 0.0009 | 0.13 | |
| Jam ke-52 | | | | 0.6686 0.6678 0.6730 |
| | 0.6698 | 0.0028 | 0.41 | |
| Jam ke-56 | | | | 0.5826 0.5806 0.5759 |
| | 0.5797 | 0.0034 | 0.39 | |
| Jam ke-60 | | | | 0.4871 0.4766 0.4878 |
| | 0.4838 | 0.0063 | 0.58 | |
| Jam ke-64 | | | | 0.2636 0.2651 0.2657 |
| | 0.2648 | 0.0011 | 0.11 | |
| Jam ke-68 | | | | 0.2292 0.2300 0.2318 |
| | 0.2303 | 0.0014 | 0.11 | |
| Jam ke-72 | | | | 0.4485 0.4463 0.4436 |
| | 0.1446 | 0.0025 | 0.17 | |

Results Flags Legend

R = Repeat reading

Lampiran 4. Pembuatan Larutan H₂SO₄ 0,1 N

Menghitung Normalitas H₂SO₄ dengan konsentrasi 98 %

$$\text{Normalitas} = \frac{1000 \times \text{BJ} \times \text{C}}{\text{BE}}$$

Ket : BJ : Berat Jenis H₂SO₄ (1,84)

C : Konsentrasi H₂SO₄ p.a (98 %)

BE : Berat Ekuivalen H₂SO₄ (98 x 1/2 = 49)

$$\text{Jadi, Normalitas H}_2\text{SO}_4 = \frac{1000 \times 1,84 \times \frac{98}{100}}{49} = 36,8 \text{ N}$$

Untuk membuat H₂SO₄ dengan konsentrasi 0,1 N maka dapat dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 36,8 \text{ N} \cdot V_1 &= 0,1 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{0,1 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL}}{36,8} = 0,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan H₂SO₄ dengan konsentrasi 0,1 N dibutuhkan 0,2 mL larutan H₂SO₄ 98 % dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 mL

Lampiran 5. Pembuatan Konsentrasi Glukosa Standart 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 mg/L (ppm)

Pembuatan stok glukosa baku dengan konsentrasi 1000 ppm dapat dilakukan sebagai berikut :

$$\text{Stok glukosa baku} = \frac{100 \text{ mg glukosa}}{0,1 \text{ L}} = 1000 \text{ ppm}$$

Untuk membuat larutan glukosa 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm dapat dilakukan dengan pengenceran larutan stok glukosa baku. Pembuatan larutan glukosa tersebut dapat dilakukan sebagai berikut :

a. Konsentrasi 10 ppm :

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

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

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

b. Konsentrasi 20 ppm :

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

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

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

c. Konsentrasi 30 ppm :

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

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

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

d. Konsentrasi 40 ppm :

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

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

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

e. Konsentrasi 50 ppm :

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

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

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

f. Konsentrasi 60 ppm :

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

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 60 \text{ ppm} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 6 \text{ mL}$$

Lampiran 6. Pengenceran Tetes Tebu Sebelum Proses Fermentasi

Rumus Pengenceran: $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$

$$V_2 = \frac{M_1 \cdot V_1}{M_2}$$

Keterangan : M_1 : Konsentrasi Brix awal (sebelum diencerkan)

M_2 : Konsentrasi Brix akhir (setelah diencerkan)

V_1 : Volume sampel awal (sebelum diencerkan)

V_2 : Volume sampel akhir (setelah diencerkan)

$$116 \% \cdot V_1 = 20 \% \cdot 1500 \text{ mL}$$

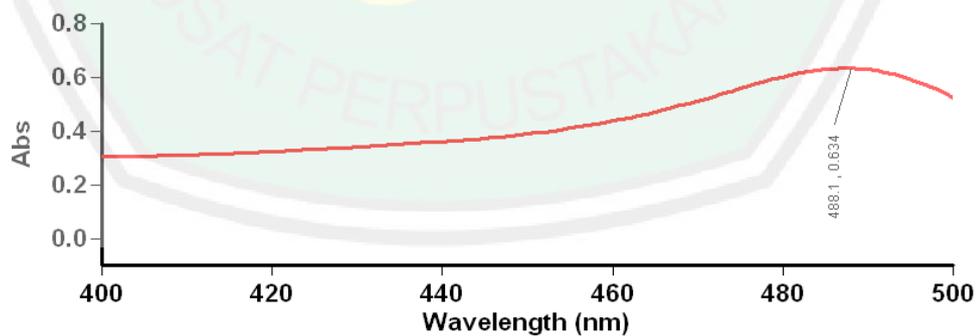
$$V_1 = 258,62 \text{ mL}$$

Jadi untuk mengencerkan tetes tebu menjadi 20 % Brix diambil 258,62 mL tetes, kemudian diencerkan dengan air hingga volume 1500 mL.

Lampiran 7. Data Analisis Panjang Gelombang Maksimum Glukosa Spektrofotometer Uv-Vis

Panjang Gelombang Maksimum Glukosa

Tanggal Analisa : 15 Januari 2014



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 15 Jan 10:37:04 PM 2014
 Method:
 Batch: D:\Lu'luul F.A\lamda max glukosa (15 januari 2014).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: glukosa

Collection Time 1/15/2014 10:37:34 PM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.1nm to 200.1nm

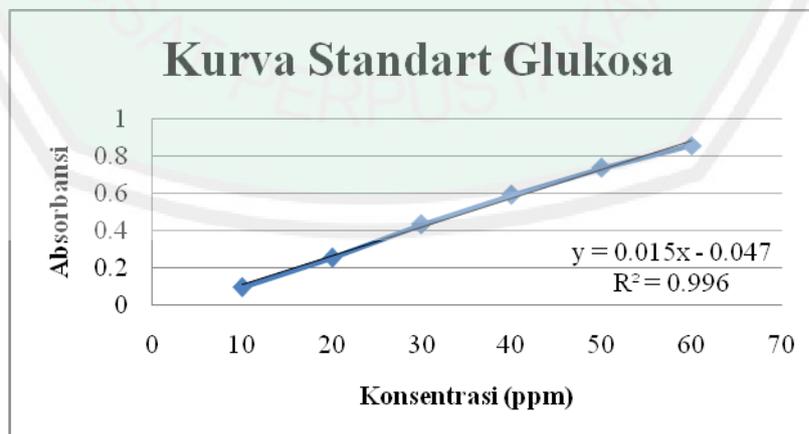
| Wavelength (nm) | Abs |
|-----------------|-------|
| 488.1 | 0.634 |

L.7.1 Kurva Standar Glukosa

Tabel L7.1 Data Absorbansi Glukosa

| Konsentrasi | Absorbansi |
|-------------|------------|
| 10 ppm | 0,0948 |
| 20 ppm | 0,2531 |
| 30 ppm | 0,4335 |
| 40 ppm | 0,5926 |
| 50 ppm | 0,7374 |
| 60 ppm | 0,8578 |

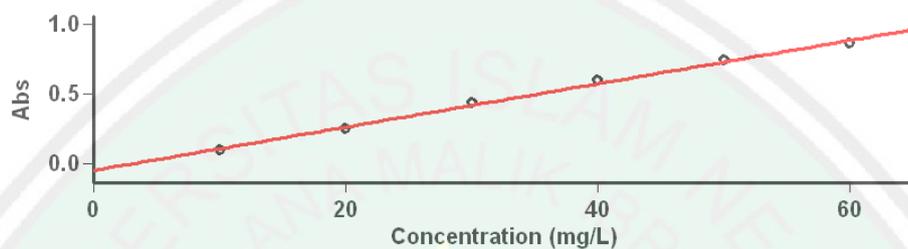
Gambar L7.1 Kurva Standart Glukosa



L.7.2 Data Analysis Kurva Standar Glukosa Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis

Kurva Standar Glukosa

Tanggal Analisa : 15 Januari 2014



Concentration Analysis Report

Report time 1/16/2014 1:52:11 AM
 Method
 Batch name D:\Lu'luul F.A\Kurva Standar Glukosa (15-01-2014).BCN
 Application Concentration 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 488.1
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Standard/Sample averaging OFF
 Weight and volume corrections OFF
 Fit type Linear
 Min R² 0.95000
 Concentration units mg/L

Comments:

Zero Report

| Read | Abs | nm |
|------|----------|-------|
| Zero | (0.3104) | 488.1 |

Calibration

Collection time 1/16/2014 1:52:11 AM

| Standard | Concentration mg/L | F | Mean | SD | %RSD | Readings |
|----------|--------------------|---|--------|--------|------|----------|
| Std 1 | 10.0 | | 0.0948 | 0.0005 | 0.48 | 0.0944 |
| | | | | | | 0.0949 |
| | | | | | | 0.0953 |
| Std 2 | | | | | | 0.2528 |

| | | | | | |
|-------|------|--------|--------|------|--------|
| | | | | | 0.2530 |
| | 20.0 | 0.2531 | 0.0003 | 0.11 | 0.2534 |
| Std 3 | | | | | 0.4326 |
| | | | | | 0.4340 |
| | 30.0 | 0.4335 | 0.0008 | 0.18 | 0.4339 |
| Std 4 | | | | | 0.5929 |
| | | | | | 0.5915 |
| | 40.0 | 0.5926 | 0.0010 | 0.17 | 0.5934 |
| Std 5 | | | | | 0.7385 |
| | | | | | 0.7357 |
| | 50.0 | 0.7374 | 0.0015 | 0.21 | 0.7382 |
| Std 6 | | | | | 0.8605 |
| | | | | | 0.8567 |
| | 60.0 | 0.8578 | 0.0023 | 0.26 | 0.8564 |

Calibration eqn Abs = 0.01551*Conc -0.04784
 Correlation Coefficient 0.99617
 Calibration time 1/16/2014 2:09:01 AM

Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overrange
 N = Not used in calibration R = Repeat reading

Lampiran 8. Analisis Kadar Gula Metode Fenol Sulfat

L8.1. Analisis Kadar Gula Bahan Baku

Analisis kadar total gula bahan baku dianalisis menggunakan metode Fenol Sulfat dan diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 488.1 nm. Data absobansi bahan baku dapat dilihat pada Tabel L8.1.1 :

Tabel L8.1.1 Absorbansi Bahan Baku

| Perlakuan | Hasil Absorbansi | |
|------------|------------------|------------|
| | Ulangan I | Ulangan II |
| Bahan baku | 0,8413 | 0,7568 |

Perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standart glukosa yaitu $y = 0,015x - 0,047$ dengan (y = absorbansi) dan x merupakan variable yang dicari yakni kadar total glukosa bahan baku :

- Kadar Gula Bahan Baku Ulangan I

$$y = 0.015X - 0.047$$

$$0.8413 + 0.047 = 0.015X$$

$$0.8883 = 0.015X$$

$$X = 59.22 \times 10000$$

$$X = 59.22 \times 10000 = 592200 \text{ ppm}$$

➤ Kadar Gula Bahan Baku Ulangan II

$$y = 0.015X - 0.047$$

$$0.7568 + 0.047 = 0.015X$$

$$0.8038 = 0.015X$$

$$X = 53.58 \times 10000$$

$$X = 53.58 \times 10000 = 535800 \text{ ppm}$$

Kadar total gula bahan baku dapat dilihat pada Tabel L8.1.2

Tabel L8.1.2 Kadar Total Gula Bahan Baku

| Perlakuan | Kadar Gula (ppm) | | Total (ppm) | Rata-rata (ppm) | Persen (%) |
|------------|------------------|------------|-------------|-----------------|------------|
| | Ulangan I | Ulangan II | | | |
| Bahan Baku | 592200 | 535800 | 1128000 | 564000 | 56,4 |

Konversi ppm ke persen (%) :
1 ppm adalah $1/10000\% = 0.0001\%$

L8.2 Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis Bahan Baku Molase Sebelum Fermentasi

Absorbansi Bahan Baku Molase Sebelum Fermentasi Ulangan I dan II

Tanggal Analisa : 21 Februari 2014

Advanced Reads Report

Report time 2/21/2014 1:11:16 AM
 Method
 Batch name D:\Lu'luul F.A\Absorbansi sampel glukosa (21-02-2014).BAB
 Application Advanced Reads 3.00(339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 488.1
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

| Read | Abs | nm |
|------|----------|-------|
| Zero | (0.5314) | 488.1 |

Analysis

Collection time 2/21/2014 1:11:16 AM

| Sample | F | Mean | SD | %RSD | Readings |
|-----------|---|--------|--------|------|----------|
| Ulangan 1 | | | | | 0.8421 |
| | | | | | 0.8408 |
| | | 0.8413 | 0.0007 | 0.28 | 0.8410 |
| Ulangan 2 | | | | | 0.7571 |
| | | | | | 0.7569 |
| | | 0.7568 | 0.0003 | 0.12 | 0.7565 |

Results Flags Legend

R = Repeat reading

L.8.3 Analisis Kadar Gula Setelah Fermentasi

Data absorbansi total gula setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel

L8.3.1:

Tabel L8.3.1 Absorbansi Total Gula Setelah Fermentasi

| Perlakuan | Hasil Absorbansi | |
|-----------|------------------|------------|
| | Ulangan I | Ulangan II |
| 3H | 0.1806 | 0.1572 |
| 4H | 0.1486 | 0.1159 |
| 5H | 0.1098 | 0.1578 |
| 6H | 0.1155 | 0.1457 |
| 7H | 0.1357 | 0.2247 |

Perolehan absorbansi selanjutnya diplotkan ke dalam persamaan linier kurva standart glukosa yaitu $y = 0,15x - 0,047$ dengan ($y =$ absorbansi) dan x merupakan variable yang dicari yakni kadar total gula setelah fermentasi :

➤ Kadar Total Gula Setelah Fermentasi Ulangan I

1. Lama Fermentasi 3 hari

$$y = 0.015 X - 0.047$$

$$0.1806 + 0.047 = 0.015 X$$

$$0.2276 = 0.015 X$$

$$X = 15.17 \text{ x fp}$$

$$X = 15.17 \text{ x } 10000 = 151700 \text{ ppm}$$

2. Lama Fermentasi 4 hari

$$y = 0.015 X - 0.047$$

$$0.1486 + 0.047 = 0.015 X$$

$$0.1956 = 0.015 X$$

$$X = 13.04 \text{ x fp}$$

$$X = 13.04 \text{ x } 10000 = 130400 \text{ ppm}$$

3. Lama Fermentasi 5 hari

$$y = 0.015 X - 0.047$$

$$0.1098 + 0.047 = 0.015 X$$

$$0.1568 = 0.015 X$$

$$X = 10.45 \text{ x fp}$$

$$X = 10.45 \text{ x } 10000 = 104500 \text{ ppm}$$

4. Lama Fermentasi 6 hari

$$y = 0.015 X - 0.047$$

$$0.1155 + 0.047 = 0.015 X$$

$$0.1625 = 0.015 X$$

$$X = 10.83 \text{ x fp}$$

$$X = 10.83 \text{ x } 10000 = 108300 \text{ ppm}$$

5. Lama Fermentasi 7 hari

$$y = 0.015 X - 0.047$$

$$0.1357 + 0.047 = 0.015 X$$

$$0.1827 = 0.015 X$$

$$X = 12.18 \text{ x fp}$$

$$X = 12.18 \times 10000 = 121800 \text{ ppm}$$

Kadar total gula setelah fermentasi dapat dilihat pada Tabel L8.3.2

Tabel L8.3.2 Kadar Total Gula Setelah Fermentasi

| Perlakuan | Kadar Gula (ppm) | | Total (ppm) | Rata-rata (ppm) | Persen (%) |
|-----------|------------------|------------|-------------|-----------------|------------|
| | Ulangan I | Ulangan II | | | |
| 3H | 151700 | 136100 | 287800 | 143900 | 14,39 |
| 4H | 130400 | 108600 | 239000 | 119500 | 11,95 |
| 5H | 104500 | 136500 | 241000 | 120500 | 12,05 |
| 6H | 108300 | 128400 | 236700 | 118350 | 11,83 |
| 7H | 121800 | 181100 | 302900 | 151450 | 15,14 |

L8.4 Data Analisis Spektrofotometer Uv-Vis Kadar Gula Setelah Fermentasi

Absorbansi Bahan Baku Molase Setelah Fermentasi Ulangan I dan II

Tanggal Analisa : 5 Maret 2014

Advanced Reads Report

Report time 3/5/2014 3:17:03 AM
 Method
 Batch name D:\Lu'luul F.A\Absorbansi sampel glukosa (05-03-2014).BAB
 Application Advanced Reads 3.00 (339)
 Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
 Instrument version no. 3.00
 Wavelength (nm) 488.1
 Ordinate Mode Abs
 Ave Time (sec) 0.1000
 Replicates 3
 Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

| Read | Abs | nm |
|------|----------|-------|
| Zero | (0.5629) | 488.1 |

Analysis

Collection time 3/5/2014 3:17:03 AM

| Sample | F | Mean | SD | %RSD | Readings |
|--------|---|------|----|------|----------|
|--------|---|------|----|------|----------|

| | | | | |
|------|--------|--------|------|----------------------------|
| 3HU1 | | | | 0.1807 0.1806 0.1804 |
| | 0.1806 | 0.0002 | 0.08 | |
| 3HU2 | | | | 0.1572 0.1571 0.1572 |
| | 0.1572 | 0.0001 | 0.03 | |
| 4HU1 | | | | 0.1488 0.1485 0.1486 |
| | 0.1486 | 0.0002 | 0.10 | |
| 4HU2 | | | | 0.1161 0.1159 0.1158 |
| | 0.1159 | 0.0001 | 0.12 | |
| 5HU1 | | | | 0.1100 0.1097 0.1097 |
| | 0.1098 | 0.0002 | 0.14 | |
| 5HU2 | | | | 0.1577 0.1577 0.1579 |
| | 0.1578 | 0.0001 | 0.06 | |
| 6HU1 | | | | 0.1157 0.1153 0.1153 |
| | 0.1155 | 0.0002 | 0.20 | |
| 6HU2 | | | | 0.1456 0.1458 0.1458 |
| | 0.1457 | 0.0001 | 0.09 | |
| 7HU1 | | | | 0.1359 0.1357 0.1356 |
| | 0.1357 | 0.0001 | 0.11 | |
| 7HU2 | | | | 0.2247 0.2249 0.2244 |
| | 0.2247 | 0.0002 | 0.09 | |

Results Flags Legend

R = Repeat reading

L.8.5 Analisis Kadar Gula Terpakai Pada Proses Fermentasi

Analisis kadar gula setelah proses fermentasi dapat diketahui dari pengurangan kadar total gula awal sebelum fermentasi dengan kadar gula setelah fermentasi. Perolehan kadar gula yang terpakai pada proses fermentasi ditunjukkan pada Tabel L8.5.1

Tabel L8.5.1 Kadar Gula Terpakai pada Proses Fermentasi

| Perlakuan | Kadar Gula Sebelum Fermentasi (ppm) | Kadar Gula Sesudah Fermentasi (ppm) | Kadar Gula Terpakai (ppm) |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 3H | 564000 | 143900 | 420100 |
| 4H | 564000 | 119500 | 444500 |
| 5H | 564000 | 120500 | 443500 |
| 6H | 564000 | 118350 | 445650 |
| 7H | 564000 | 151450 | 412550 |

Lampiran 9. Analisis Kadar Etanol Hasil Fermentasi Tetes Tebu Menggunakan Kromatografi Gas

Hasil analisis bioetanol dengan kromatografi gas dapat dilihat pada Tabel L9.1

Tabel L9.1 Data Analisis Bioetanol dengan Kromatografi Gas

| No. | Nama Sampel | Berat (gr) | | Area | |
|-----|-------------|------------|--------|-----------|------------|
| | | Sampel | CAN | Etanol | CAN |
| 1 | 3HU1 | 0,2504 | 0,0802 | 159304,39 | 521301,15 |
| 2 | 4HU1 | 0,2690 | 0,0710 | 344596,73 | 1231376,49 |
| 3 | 5HU1 | 0,2466 | 0,0798 | 465303,47 | 826820,70 |
| 4 | 6HU1 | 0,2058 | 0,0724 | 734373,17 | 892172,42 |
| 5 | 7HU1 | 0,3389 | 0,0756 | 269962,49 | 964826,83 |
| 6 | 3HU2 | 0,2341 | 0,0679 | 211521,23 | 1068733,96 |
| 7 | 4HU2 | 0,2561 | 0,0849 | 205653,28 | 1377440,07 |
| 8 | 5HU2 | 0,2663 | 0,0777 | 425243,73 | 1177915,79 |
| 9 | 6HU2 | 0,1679 | 0,0793 | 530327,64 | 773687,83 |
| 10 | 7HU2 | 0,2304 | 0,0688 | 311172,93 | 118677,06 |

% kadar bioetanol hasil destilasi dapat dihitung dengan rumus :

a. Berat terukur:

$$y = ax + b$$

dimana kurva standar yang didapat adalah: $y = 0,706x$

sehingga didapat rumus :

$$\frac{\text{Luas Area Etanol}}{\text{Luas Area ACN}} = 0,706x$$

b. Kadar etanol:

$$\% = \frac{\text{Luas Etanol}}{a \times \text{Berat Sampel} \times \text{Luas ACN}} \times \text{Berat Standar} \times 100\%$$

Misalnya :

Kadar Etanol 3HU1:

$$\% = \frac{159304,39}{0,706 \times 0,2504 \times 521301,15} \times 0,0802 \times 100\%$$

$$= \frac{12776,212}{92156,868} \times 100\%$$

$$= 0,1386 \times 100\% = 13,86\%$$

Tabel L9.2 Kadar Etanol Hasil Fermentasi

| Lama Fermentasi | Kadar Etanol (%) | | Total (%) | Rata-rata (%) |
|-----------------|------------------|------------|-----------|---------------|
| | Ulangan I | Ulangan II | | |
| 3H | 13,86 | 8,13 | 21,99 | 10,995 |
| 4H | 10,46 | 7,01 | 17,47 | 8,735 |
| 5H | 25,79 | 14,92 | 40,71 | 20,355 |
| 6H | 41,01 | 45,86 | 86,87 | 43,435 |
| 7H | 8,84 | 11,09 | 19,93 | 9,965 |

Lampiran 10. Kromatogram Standar etanol dan acrylonitril

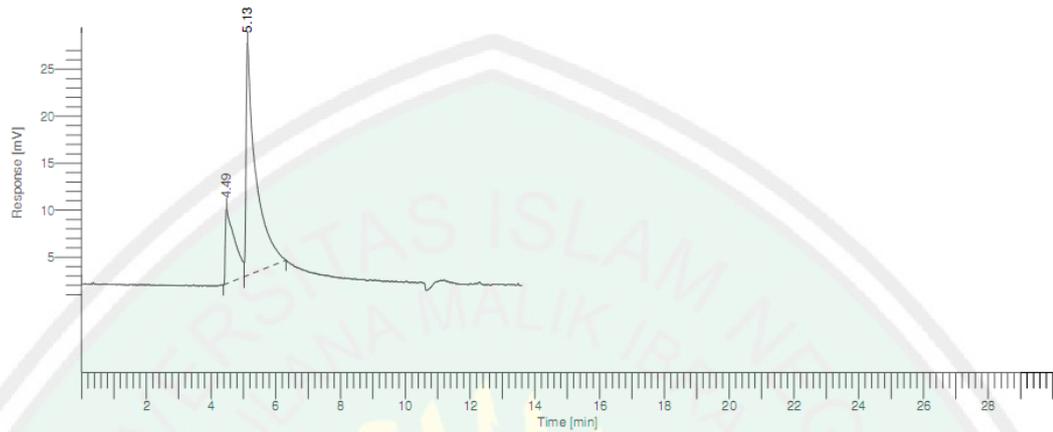


REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [uV*sec] | Height [uV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------|-------------|----------|
| 1 | 4.725 | 197382.04 | 29717.76 | 37.75 |
| 2 | 5.900 | 325517.44 | 51975.76 | 62.25 |
| | | 522899.48 | 81693.52 | 100.00 |

Lampiran 11. Kromatogram Sampel

➤ Sampel 3HU1



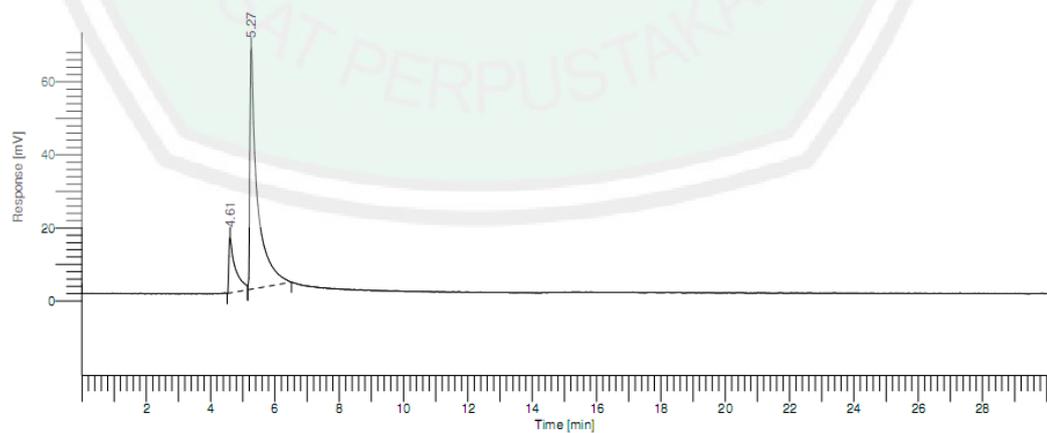
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [uV*sec] | Height [uV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------|-------------|----------|
| 1 | 4.486 | 159304.39 | 7985.10 | 23.41 |
| 2 | 5.128 | 521301.15 | 25249.13 | 76.59 |
| | | 680605.54 | 33234.24 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ Sampel 3HU2



REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$] | Height [μV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 4.607 | 211521.23 | 15315.69 | 16.52 |
| 2 | 5.266 | 1068733.96 | 66118.37 | 83.48 |
| | | 1280255.19 | 81434.05 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ Sampel 4HU1



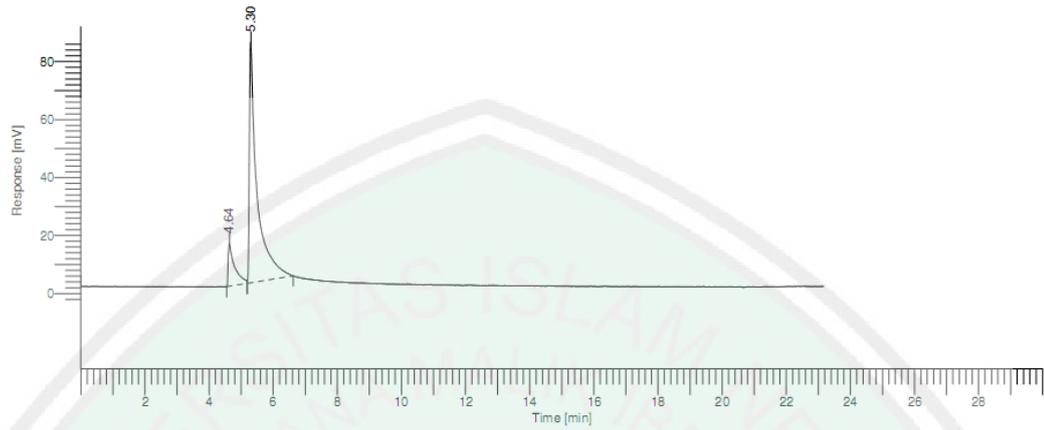
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$] | Height [μV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 4.426 | 344596.73 | 17620.34 | 21.87 |
| 2 | 5.068 | 1231376.49 | 52691.69 | 78.13 |
| | | 1575973.22 | 70312.03 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ **Sampel 4HU2**



REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [uV*sec] | Height [uV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------|-------------|----------|
| 1 | 4.637 | 205653.28 | 14767.29 | 12.99 |
| 2 | 5.302 | 1377440.07 | 83218.74 | 87.01 |
| | | 1583093.35 | 97986.04 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ **Sampel 5HU1**



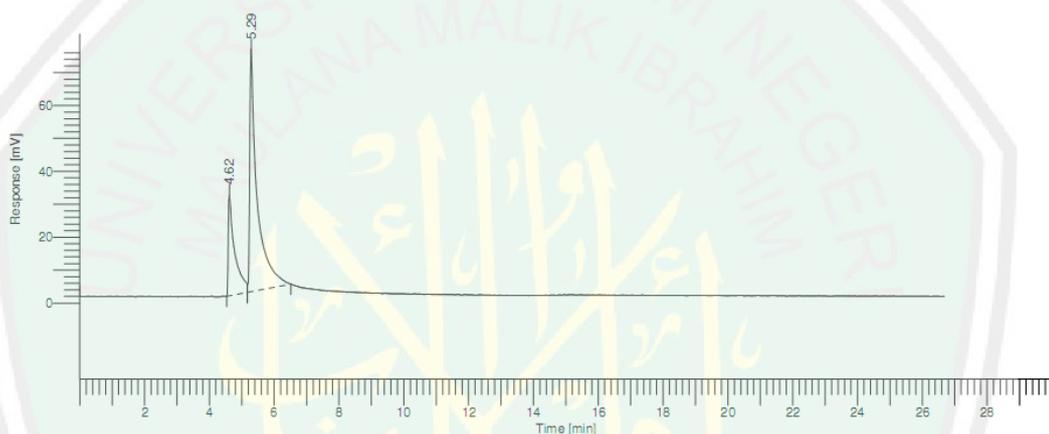
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$] | Height [μV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 5.158 | 465303.47 | 33669.33 | 36.01 |
| 2 | 5.904 | 826820.70 | 51764.65 | 63.99 |
| | | 1292124.17 | 85433.97 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ Sampel 5HU2



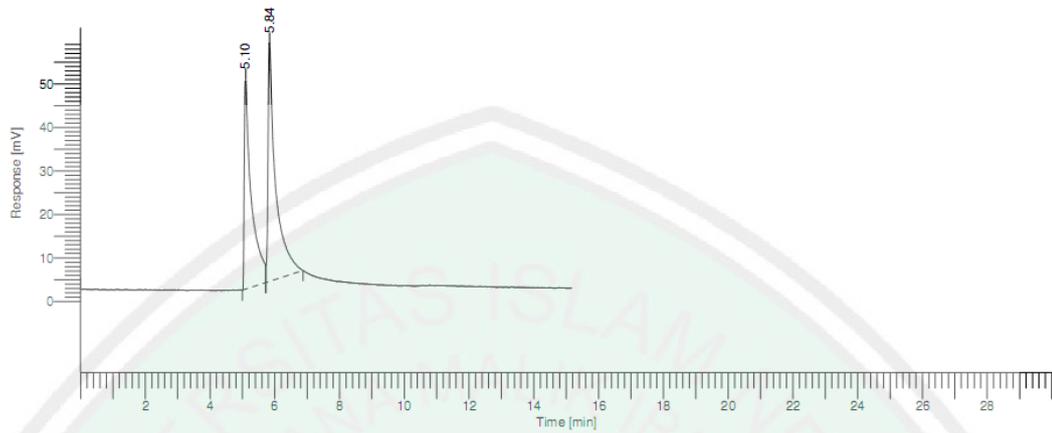
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$] | Height [μV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 4.622 | 425243.73 | 30798.26 | 26.53 |
| 2 | 5.291 | 1177915.79 | 74212.82 | 73.47 |
| | | 1603159.52 | 105011.07 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ **Sampel 6HU1**



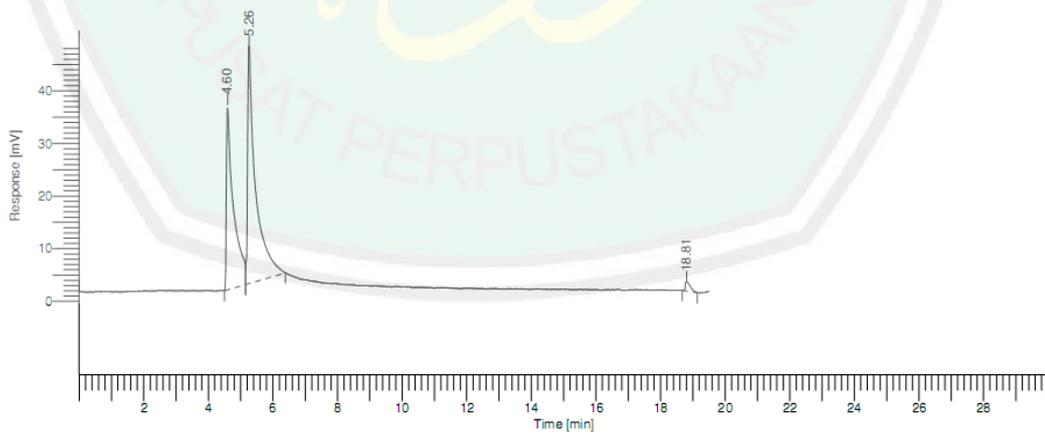
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [uV*sec] | Height [uV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------|-------------|----------|
| 1 | 5.100 | 734373.17 | 48139.98 | 45.15 |
| 2 | 5.839 | 892172.42 | 54836.85 | 54.85 |
| | | 1626545.59 | 102976.82 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ **Sampel 6HU2**



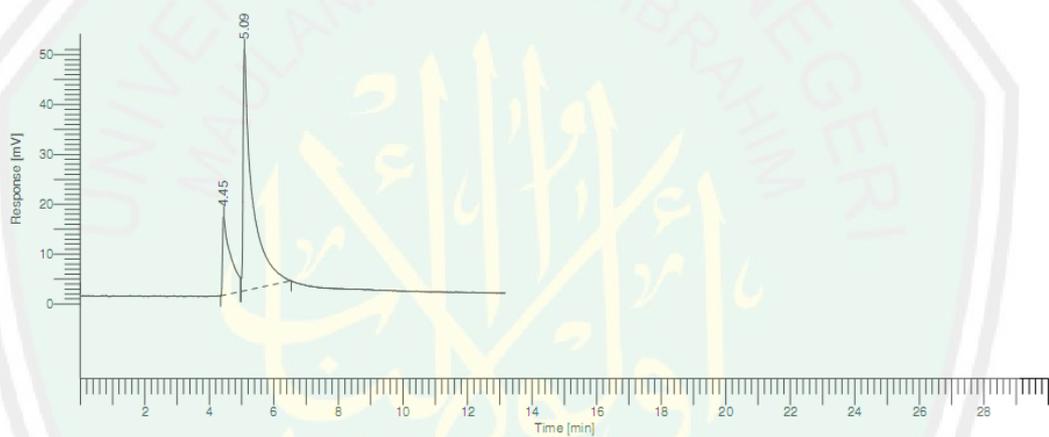
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$] | Height [μV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 4.596 | 530327.64 | 35735.61 | 40.07 |
| 2 | 5.262 | 773687.83 | 46132.61 | 58.45 |
| 3 | 18.807 | 19585.76 | 1834.88 | 1.48 |
| | | 1323601.24 | 83703.09 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ **Sampel 7HU1**



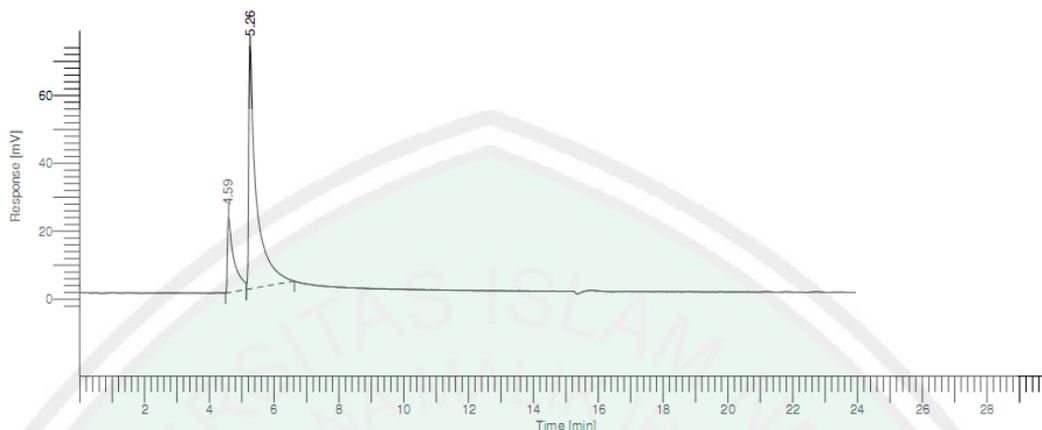
REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [$\mu\text{V}\cdot\text{sec}$] | Height [μV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------------------------------|--------------------------|----------|
| 1 | 4.450 | 269962.49 | 15610.68 | 21.86 |
| 2 | 5.091 | 964826.83 | 48916.06 | 78.14 |
| | | 1234789.33 | 64526.74 | 100.00 |

Missing Component Report
 Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

➤ **Sampel 7HU2**



REKAPITULASI HASIL

| Peak # | Time [min] | Area [uV*sec] | Height [uV] | Area [%] |
|--------|------------|---------------|-------------|----------|
| 1 | 4.595 | 311172.93 | 23029.82 | 20.77 |
| 2 | 5.259 | 1186777.06 | 72241.67 | 79.23 |
| | | 1497949.99 | 95271.50 | 100.00 |

Missing Component Report
Component Expected Retention (Calibration File)

All components were found

Lampiran 12. Perhitungan *Yield* Etanol

Yield etanol merupakan banyaknya sampel yang dikonversikan menjadi etanol dalam satuan (%). Nilai *yield* dipengaruhi oleh kadar gula terpakai pada proses fermentasi, semakin rendah kadar gula terpakai pada proses fermentasi dan semakin tinggi kadar etanol yang dihasilkan, maka nilai *yield* akan semakin tinggi. *Yield* etanol dihitung pada masing-masing perlakuan menggunakan rumus (Crueger dan Crueger (1984) dalam Purwantari., dkk (2004)) :

$$\% \text{ yield etanol} = \frac{\text{konsentrasi etanol hasil analisis (\%)}}{\text{gula terpakai (\%)}} \times 100\%$$

➤ *Yield* etanol perlakuan 3 hari

$$\% \text{ yield etanol} = \frac{10,995 \%}{42,01 \%} \times 100\%$$

$$\% \text{ yield etanol} = 26,17 \%$$

- *Yield* etanol perlakuan 4 hari

$$\% \text{ yield etanol} = \frac{8,735 \%}{44,45 \%} \times 100\%$$

$$\% \text{ yield etanol} = 19,65 \%$$

- *Yield* etanol perlakuan 5 hari

$$\% \text{ yield etanol} = \frac{20,355 \%}{44,35 \%} \times 100\%$$

$$\% \text{ yield etanol} = 45,89 \%$$

- *Yield* etanol perlakuan 6 hari

$$\% \text{ yield etanol} = \frac{43,435 \%}{44,56 \%} \times 100\%$$

$$\% \text{ yield etanol} = 97,47 \%$$

- *Yield* etanol perlakuan 7 hari

$$\% \text{ yield etanol} = \frac{9,965 \%}{41,25 \%} \times 100\%$$

$$\% \text{ yield etanol} = 24,15 \%$$

Tabel L12. Yield Etanol

| Perlakuan | Yield etanol |
|-----------|--------------|
| 3 Hari | 26,17 % |
| 4 Hari | 19,65 % |
| 5 Hari | 45,89 % |
| 6 Hari | 97,47 % |
| 7 Hari | 24,15 % |

Lampiran 13. Menghitung Efisiensi Fermentasi

Contoh perhitungan efisiensi fermentasi tetes tebu pada perlakuan 3HU1

Diketahui: Gula awal = 564000 ppm = 56,4 %

Volume awal sampel = 1500 mL

$$\text{Brix} = 20 \%$$

$$\text{Berat jenis larutan gula} = 1,35 \text{ g.mL}^{-1}$$

$$\text{Kadar etanol murni} = 99,9 \%$$

$$\text{Etanol absolut} = 0,511$$

Berat jenis dicari berdasarkan pembacaan skala nilai brix awal dikonversikan dengan tabel hubungan antara brix dan berat jenis larutan gula murni pada suhu kamar.

$$\begin{aligned} \text{Gram glukosa} &= \text{Berat jenis glukosa} \times \text{gula awal} \times \text{volume awal sampel} \\ &= 1,35 \text{ g.mL}^{-1} \times 56,4 \% \times 1500 \text{ mL} \\ &= 1142,1 \text{ gr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Gram etanol teoritis} &= \text{etanol absolut} \times \text{kadar etanol murni} \times \text{gram glukosa} \\ &= 0,511 \times 99,9 \% \times 1142,1 \text{ gr} \\ &= 583,029 \text{ gr} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar etanol teoritis} &= \frac{\text{gram etanol teoritis}}{\text{BJ etanol} \times \text{volume sampel awal}} \times 100 \% \\ &= \frac{583,029 \text{ gr}}{0,789 \times 1500 \text{ mL}} \times 100\% \\ &= 49,26 \% \end{aligned}$$

$$\text{Efisiensi fermentasi} = \frac{\text{kadar etanol hasil}}{\text{kadar etanol teoritis}} \times 100 \%$$

➤ Perlakuan Lama Fermentasi 3 hari

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi fermentasi} &= \frac{10,995 \%}{49,26 \%} \times 100\% \\ &= 22,32 \% \end{aligned}$$

- Perlakuan Lama Fermentasi 4 hari

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi fermentasi} &= \frac{8,735 \%}{49,26 \%} \times 100\% \\ &= 17,73 \% \end{aligned}$$

- Perlakuan Lama Fermentasi 5 hari

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi fermentasi} &= \frac{20,355 \%}{49,26 \%} \times 100\% \\ &= 41,32 \% \end{aligned}$$

- Perlakuan Lama Fermentasi 6 hari

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi fermentasi} &= \frac{43,435 \%}{49,26 \%} \times 100\% \\ &= 88,17 \% \end{aligned}$$

- Perlakuan Lama Fermentasi 7 hari

$$\begin{aligned} \text{Efisiensi fermentasi} &= \frac{9,965 \%}{49,26 \%} \times 100\% \\ &= 20,22 \% \end{aligned}$$

Tabel L13. Efisiensi Fermentasi

| No | Perlakuan | Efisiensi Fermentasi (%) |
|----|-----------|--------------------------|
| 1 | 3 Hari | 22,32 |
| 2 | 4 Hari | 17,73 |
| 3 | 5 Hari | 41,32 |
| 4 | 6 Hari | 88,17 |
| 5 | 7 Hari | 20,22 |

Lampiran 14. Dokumentasi Penelitian



Sebelum sterilisasi



sterilisasi media



molase + akuades



molase setelah inkubasi



pembuatan YPGA



pembuatan YPGB



pengenceran bertingkat



penuangan YPGA



proses inkubasi



isolat Kh 1



isolat Kh 2



media molase



Media inokulum



penambahan inokulum



inokulum Kh 1 & Kh 2



Pengambilan isolat dari Media miring



pengamatan dengan mikroskop



autoclave



Pengambilan isolat dari cawan



isolat pada preparat



molase setelah fermentasi



Proses destilasi



shaker inkubator



Etanol Kh1



Etanol Kh2