

## PRODUKSI ALKOHOL, NILAI pH, DAN PRODUKSI GAS PADA BIOETANOL DARI SUSU RUSAK DENGAN CAMPURAN LIMBAH CAIR TAPIOKA

A. W. Utama, A. M. Legowo, A. N. Al-Baarri

**ABSTRAK** : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH dan produksi gas selama proses produksi bioetanol dengan susu rusak dan limbah cair tapioka. Penelitian dilaksanakan pada bulan September - Desember 2011 di Laboratorium Teknologi Hasil Ternak, Laboratorium Fisiologi dan Biokimia Ternak serta Laboratorium Ilmu Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro Semarang Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro Semarang. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu rusak yang dibuat dengan cara mendinginkan susu selama 4 jam pada suhu ruang, limbah cair tapioka yang didapat dari industri tepung tapioka di Desa Ngemplak Kabupaten Pati, ragi roti, gula, pewarna makanan, aquades, kapas, aluminium foil, tisu, alkohol 70% dan 95%. Alat yang digunakan pada pembuatan bioetanol adalah *filtering flask*, selang, gelas ukur, nampan, botol, beker gelas, klip, *magnetic stirrer*, inkubator, *autoclave*, timbangan analitik, sendok, piknometer, pH meter, destilator, bunsen, piknometer dan kulkas. Rancangan percobaan yang digunakan dalam mendesain penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 4 ulangan. Variabel yang diamati adalah produksi alkohol, nilai pH dan total gas. Perlakuan yang diterapkan yaitu waktu lama fermentasi 12 jam ( $T_1$ ), lama fermentasi 24 jam ( $T_2$ ), waktu lama fermentasi 36 jam ( $T_3$ ), waktu lama fermentasi 48 jam ( $T_4$ ) waktu lama fermentasi 60 jam ( $T_5$ ). Data hasil pengamatan diolah secara statistik menggunakan analisis ragam pada taraf signifikansi 5% untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Apabila terdapat pengaruh nyata terhadap produksi alkohol, nilai pH, dan total gas, maka dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu fermentasi memberi pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap produksi alkohol, nilai pH, dan total gas, semakin lama waktu fermentasi semakin besar produksi alkohol dan produksi gas yang dihasilkan yaitu sebesar 1,90% dan 23,75 ml. Sementara pada nilai pH semakin lama waktu fermentasi nilai pH semakin menurun dengan nilai 3,78.

Kata Kunci : susu rusak, limbah cair tapioka, produksi alkohol, nilai pH, produksi gas

### PENDAHULUAN

Limbah adalah hasil buangan industri atau rumah tangga yang dapat mencemari lingkungan, oleh karena itu perlu minimalisasi dampak atau dimanfaatkan. Pemanfaatan limbah salah satunya adalah sebagai produksi bioetanol. Limbah yang berpotensi sebagai produksi bioetanol adalah limbah yang masih mengandung karbohidrat. Sumber bioetanol yang memenuhi dua kriteria tersebut diantaranya susu rusak dan limbah cair tapioka.

Susu rusak adalah susu yang kemungkinan telah tercemar oleh bakteri patogen dan akibatnya jika dikonsumsi, akan menimbulkan bahaya bagi yang meminumnya. Susu rusak juga dapat diartikan sebagai susu yang tidak memenuhi persyaratan standar nasional atau standar pengolahan susu sehingga ditolak untuk pemrosesan lebih lanjut di industri pengolahan susu. Kasus terjadinya susu rusak berulang kali terjadi di Jawa Tengah dan selalu

menimbulkan kejadian keracunan. Kejadian keracunan ini terakhir tercatat pada tahun 2010 dan kasus ini selalu terjadi setiap tahun. Pemanfaatan susu rusak sebagai bioetanol adalah memanfaatkan kandungan laktosa yang masih terdapat dalam susu rusak tersebut. Kandungan laktosa susu rusak sekitar 4%. Adanya susu rusak menimbulkan kebingungan bagi para peternak, karena di samping tidak dapat diproses lebih lanjut di Industri Pengolahan Susu (IPS), juga tidak dapat dikonsumsi oleh masyarakat. Hal ini dapat merugikan peternak, oleh karena itu dengan dijadikannya sebagai sumber bioetanol dapat menghindari kerugian dari peternak. Tingkat konversi laktosa menjadi etanol masih rendah, oleh karena itu perlu ditambahkan sumber lain yang dapat meningkatkan kandungan etanol. Salah satu limbah yang dapat dimanfaatkan adalah limbah cair tapioka, karena masih mengandung pati yang cukup tinggi.

Limbah cair tapioka merupakan limbah organik yang masih banyak mengandung pati terlarut, asam hidrosianat (HCN) yang mudah terurai menjadi sianida, nitrogen, fosfor, dan senyawa organik. Limbah cair tapioka apabila dibuang begitu saja sangat merugikan karena dapat menimbulkan pencemaran lingkungan, oleh karena itu perlu dimanfaatkan karena masih mengandung nutrisi yang berpotensi menjadi etanol. Pemanfaatan limbah cair tapioka dapat dijadikan produksi bioetanol karena memanfaatkan kandungan pati

Dikirim tanggal 27 Februari 2013, diterima tanggal 28 Juli 2013. Penulis A. W. Utama adalah dari Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Penulis A. M. Legowo dan A. N. Al-Baarri adalah dari Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang. Kontak langsung dengan penulis: albari@undip.ac.id (A. N. Al-Baarri)

©2013 Indonesian Food Technologist Community  
Available online at [www.journal.ift.or.id](http://www.journal.ift.or.id)

yang terkandung di dalamnya.

Bioetanol adalah salah satu biofuel yang berasal dari bahan nabati yang sebagian besarnya mengandung alkohol (etanol). Semakin tinggi kadar alkohol pada bioetanol semakin tinggi juga grade dari bioetanol tersebut. Proses pembentukan bioetanol berasal dari proses fermentasi. Fermentasi ini dapat dilakukan dengan menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida Pseudotropicalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichosporon*. *Saccharomyces cerevisiae* juga merupakan salah satu jenis ragi yang sering digunakan untuk fermentasi alkohol karena tingkat konversi gula menjadi alkohol yang tinggi dan tahan terhadap kadar gula yang tinggi serta tetap aktif melakukan aktivitasnya pada rentang suhu yang lebar (4 – 32°C)

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia pada substrat organik, baik karbohidrat, protein, lemak atau lainnya melalui kegiatan katalis biokimia yang dikenal sebagai enzim dan dihasilkan oleh jenis mikroba spesifik. Lama fermentasi pada proses produksi bioetanol sangat mempengaruhi kadar bioetanol yang dihasilkan. Semakin lama fermentasi maka semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan sampai akhirnya mencapai pada titik tertentu, apabila fermentasi masih dilanjutkan maka akan terjadi penurunan kadar bioetanol. Oleh sebab itu dibutuhkan lama fermentasi yang tepat untuk proses fermentasi bioetanol agar didapatkan kadar etanol dalam jumlah yang tinggi. Kadar etanol yang terkandung di dalam substrat setelah difermentasi secara tidak langsung akan mempengaruhi pH substrat. Semakin tinggi kadar etanol maka pH substrat akan semakin asam dan semakin rendah kadar etanol maka pH substrat semakin mendekati pH asli substrat. Lama fermentasi juga akan mempengaruhi produksi gas pada proses produksi bioetanol. Proses fermentasi bioetanol pada prinsipnya mengubah 1 molekul gula sederhana (heksosa) menjadi 2 molekul etanol dan 2 molekul CO<sub>2</sub>. Oleh karena itu semakin lama fermentasi maka akan semakin banyak gula yang dikonversi menjadi etanol dan hasil sampingnya adalah gas CO<sub>2</sub>. Berdasarkan kajian dan uraian latar belakang dapat diperoleh hipotesis penelitian semakin lama fermentasi akan meningkatkan kadar alkohol dan total gas sedangkan nilai pH akan turun.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH dan produksi gas selama proses produksi bioetanol dengan susu rusak dan limbah cair tapioka. Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang potensi susu rusak dan limbah cair tapioka sebagai produksi bioetanol.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan September hingga Desember 2011 di Laboratorium Teknologi Hasil Ternak, Laboratorium Fisiologi dan Biokimia Ternak, serta Laboratorium Ilmu Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang.

### Materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu rusak yang dibuat dengan cara mendinginkan susu selama 4 jam pada suhu ruang, limbah cair tapioka yang

didapat dari industri tepung tapioka di Desa Ngemplak, Kecamatan Margoyoso Kabupaten Pati, ragi roti, gula, pewarna makanan, aquades, kapas, aluminium foil, tisu, alkohol 70% dan 95%. Peralatan yang digunakan adalah *filtering flask*, selang, gelas ukur, nampan, botol, piknometer, beker gelas, klip, *magnetic stirrer*, inkubator, *autoclave*, timbangan analitik, sendok, piknometer, pH meter, destilator, bunsen dan kulkas.

### Metode

Penelitian yang telah dilaksanakan meliputi lima langkah, yaitu penentuan rancangan percobaan, penelitian pendahuluan, penelitian utama, variabel penelitian dan analisis data.2

### Rancangan Percobaan

Penelitian yang telah dilaksanakan menggunakan perlakuan monofaktor yaitu lama fermentasi dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan variabel yang diamati yaitu kadar alkohol, pH, dan total gas. Perlakuan yang diberikan dibagi dalam 5 taraf dengan ulangan sebanyak 4 kali. Adapun taraf perlakuan tersebut yaitu:

T1 = lama fermentasi 12 jam

T2 = lama fermentasi 24 jam

T3 = lama fermentasi 36 jam

T4 = lama fermentasi 48 jam

T5 = lama fermentasi 60 jam

Tiap-tiap perlakuan terdiri dari susu rusak dan limbah cair tapioka dengan perbandingan 1:1. Perbandingan ini didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan yang menghasilkan perbandingan susu rusak dan limbah cair tapioka sebesar 1:1. Hasil ini merupakan rasio optimal untuk memberikan total gas tertinggi.

### Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan selama 3 minggu yang bertujuan untuk mengetahui perbandingan susu rusak dan limbah cair tapioka, membuat tabel kadar alkohol, memodifikasi alat, serta mengidentifikasi susu rusak dan limbah cair tapioka.

Perbandingan susu rusak dan limbah cair tapioka.

Penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui perbandingan antara susu rusak dan limbah cair tapioka yang tepat untuk dijadikan substrat adalah dengan mencoba beberapa kombinasi dengan perbandingan antara susu rusak dan limbah cair tapioka sebagai berikut:

Kombinasi 1: 100% susu rusak

Kombinasi 2: 25% susu rusak dan 75% limbah cair tapioka

Kombinasi 3: 50% susu rusak dan 50% limbah cair tapioka

Kombinasi 4: 75% susu rusak dan 25% limbah cair tapioka

Kombinasi 5: 100% limbah cair tapioka

Kombinasi-kombinasi tersebut kemudian difermentasi dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang terkandung dalam fermipan (sebagai starter) selama 60 jam. Proses fermentasi dilakukan selama 60 jam karena selama waktu tersebut bioetanol yang dihasilkan optimal, dan apabila waktu fermentasi dinaikkan maka bioetanol yang dihasilkan dalam proses fermentasi akan

dikonversikan oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi senyawa lain yang salah satunya adalah senyawa ester (Sari *et al.*, 2008). Setelah difermentasi selama 60 jam, hasil yang paling optimal adalah kombinasi 3 yang merupakan perbandingan antara 50% susu rusak dan 50% limbah cair tapioka (susu rusak dan limbah cair tapioka 1:1). Kombinasi 3 disebut sebagai kombinasi yang paling optimal dikarenakan pada kombinasi tersebut memunculkan hasil gas yang tertinggi dibandingkan dengan kombinasi yang lain.

#### Membuat tabel kadar alkohol

Tabel kadar alkohol dibuat dengan cara membuat larutan alkohol yang mempunyai kadar tertentu. Larutan alkohol dibuat dengan mencampurkan alkohol dan air. Volume alkohol yang dibutuhkan untuk membuat larutan alkohol sesuai dengan kadar alkohol yang akan dibuat. Setelah itu piknometer yang berisi alkohol ditimbang beratnya (a g). Kemudian diukur pula berat alkohol yang berisi air (b g). Perbandingan antara a dan b merupakan nilai yang akan menentukan berapa kadar alkohol dari larutan yang diukur kadar alkoholnya (Hayani, 2005). Tabel standar kadar alkohol dapat dilihat pada Lampiran 4.

#### Modifikasi alat

Modifikasi alat dilakukan agar variabel pengamatan dapat diukur dengan mudah. Modifikasi alat ini terutama dilakukan untuk mempermudah dalam mengukur produksi gas. Prinsip pengukuran produksi gas adalah dengan mengukur volume penurunan air. Alat yang digunakan dalam pengukuran produksi gas terdiri dari *filtering flask* 1000 ml yang dihubungkan dengan gelas ukur 500 ml melalui selang. Gelas ukur terlebih dahulu dilubangi pada bagian bawahnya sesuai dengan besar selang. Gelas ukur diletakkan pada posisi terbalik dan diisi dengan air. Volume air pada kondisi awal ini disebut dengan volume awal (a ml). Setelah beberapa hari akan terjadi penurunan air yang ada di dalam gelas ukur karena adanya gas yang mendorong air keluar dari gelas ukur, volume air pada kondisi ini disebut dengan volume akhir (b ml). Selisih antara volume akhir (b ml) dengan volume awal (a ml) merupakan jumlah produksi gas yang dihasilkan.

#### Identifikasi susu rusak dan limbah cair tapioka

Susu rusak didapatkan dengan mendinginkan susu segar yang diperoleh dari KUD Banyumanik selama 4 jam pada suhu ruang. Susu rusak sebelum digunakan dalam penelitian utama terlebih dahulu diukur pH dan total kadar gulanya. pH susu rusak diukur dengan menggunakan pH meter. Total gula susu rusak diuji dengan metode biuret (Apriyantono, 1989) pengujian dilakukan secara duplo. Hasil uji pH dan kadar total gula dapat dilihat pada Tabel 1.

Sebelum limbah cair tapioka digunakan dalam penelitian utama, terlebih dahulu diuji pH dan total gulanya. Menurut Irfandi (2005), pengujian pH awal bahan yang akan digunakan sebagai substrat fermentasi penting untuk dilakukan agar proses fermentasi optimal.

#### Persiapan substrat

Substrat adalah media pertumbuhan *Saccharomyces*

*cerevisiae*, berbentuk cair yang di dalamnya mengandung nutrisi untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, maka substrat yang digunakan dalam penelitian utama adalah kombinasi antara susu rusak dan limbah cair tapioka dengan perbandingan 1:1. Sebelum dilakukan pencampuran, terlebih dahulu susu rusak dan limbah cair tapioka disterilisasikan dengan cara pemanasan untuk menghilangkan mikroorganisme selain *Saccharomyces cerevisiae*. Setelah itu, susu rusak dan limbah cair tapioka dicampur sampai homogen.

#### Persiapan starter

Starter yang digunakan adalah ragi instan dengan merk fermipan yang ditumbuhkan dalam substrat pertumbuhan. Penyiapan starter adalah: (1) sebanyak 1000 ml aquades yang ditambahkan dengan 100 gram gula pasir (konsentrasi gula 10%) dimasukkan ke dalam gelas beker (Elevri dan Putra 2006 termodifikasi), (2) dihomogenkan terlebih dahulu dengan *magnetic stirrer* kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (3) Substrat ditunggu hingga dingin hingga mencapai suhu 33°C (Kumalasari, 2011), (4) sebanyak 50 gram fermipan dimasukkan ke dalam substrat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam (Elevri dan Putra, 2006).

#### Pembuatan bioetanol

Proses pembuatan bioetanol dimulai dengan mencampurkan 400 ml susu rusak yang telah dipasteurisasi dengan 400 ml limbah cair tapioka yang telah dipasteurisasi ke dalam *filtering flask*. Starter 10% dimasukkan ke dalam substrat pada kondisi aseptis. Metode ini merupakan metode modifikasi yang dilakukan oleh Richana, (2011). Substrat yang telah ditambahkan starter kemudian difermentasi selama 60 jam. Setelah masa fermentasi berakhir, substrat didestilasi untuk memurnikan etanol (Ilustrasi 5).

#### Pengujian Variabel

Variabel yang diamati adalah kadar alkohol, pH, dan total gas. Prosedur penetapan variabel-variabel tersebut dijelaskan lebih lanjut seperti di bawah ini.

#### Prosedur pengujian kadar alkohol

Prosedur ini dilakukan dengan metode piknometer sesuai dengan petunjuk Putri dan Sukandar (2008), pertama-tama sampel sebanyak 100 ml dimasukkan ke dalam labu destilasi Kjeldahl kemudian ditambahkan dengan aquades sebanyak 100 ml. Selanjutnya didestilasi pada suhu 80°C. Destilat ditampung di dalam Erlenmeyer hingga volume 50 ml. Destilat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam piknometer yang telah ditimbang sebelumnya. Destilat dimasukkan hingga memenuhi piknometer. Kelebihan destilat pada puncak pipa kapiler dibersihkan. Piknometer yang berisi destilat ditimbang dan beratnya dicatat. Cara yang sama dilakukan pada aquades sebagai pembanding. Berat jenis alkohol dihitung dari perbandingan berat piknometer destilat dibagi dengan berat aquades. Hasil

penghitungan berat jenis alkohol kemudian dikonversikan dengan menggunakan tabel konversi BJ alkohol yang sudah dibuat sebelumnya untuk mengetahui kadar alkohol.

#### Prosedur pengujian pH

Prosedur ini dilakukan dengan mengukur suhu sampel terlebih dahulu kemudian mengatur suhu pH meter pada suhu terukur. pH meter dihidupkan dan dibiarkan agar stabil selama 1 menit. Elektroda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu. kemudian elektroda dicelupkan pada sampel sampai diperoleh pembacaan skala yang stabil (Richana, 2011).

#### Prosedur pengujian total gas

Uji total gas dilakukan dengan cara menghitung volume penurunan air yang ada di dalam gelas ukur. Alat untuk mengukur volume gas yang keluar selama proses pembuatan bioetanol ini adalah suatu rangkaian yang terdiri dari digester kemudian dihubungkan dengan gelas ukur yang berfungsi untuk pengukur volume gas. Gelas ukur dimasukkan ke dalam wadah yang diisi air, sehingga gelas ukur tersebut terisi air secara keseluruhan. Kemudian penurunan volume air tersebut menunjukkan total gas yang dihasilkan (Datar *et al.*, 2004).

#### Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian kadar alkohol, pH, dan total gas kemudian ditabulasi. Hasil tabulasi diolah dengan menggunakan analisis ragam pada tingkat kepercayaan 95%. Apabila melalui analisis ragam ada pengaruh nyata maka dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda dari Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Dwiloka dan Srigandono, 2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Produksi Alkohol

Berdasarkan hasil analisis ragam, perlakuan lama fermentasi T1, T2, T3, T4 dan T5 berpengaruh nyata ( $P < 0,5$ ) terhadap produksi alkohol (Tabel 2). Analisis lebih lanjut menggunakan Uji Wilayah Ganda Duncan menunjukkan bahwa T1 berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T4 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T2 dan T3. T2 berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T4 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T3 dan T1. T3 Berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T4 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata dengan T1 dan T2. T4 berbeda nyata ( $P > 0,5$ ) dengan T1, T2, dan T3, tetapi tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T5. T5 berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T1, T2, dan T3, tetapi tidak berbeda nyata dengan T4.

Semakin lama waktu fermentasi akan meningkatkan kadar alkohol yang dihasilkan karena laktosa dan pati mampu diubah oleh *Saccharomyces cerevisiae* menjadi alkohol selama proses produksi bioetanol. Menurut pendapat Fardiaz (1992) bahwa *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan untuk mengubah karbohidrat menjadi alkohol/etanol dan karbondioksida. Proses pembentukan alkohol ini bisa terjadi karena adanya enzim yang dihasilkan oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Astawan dan Mita (1991) lama fermentasi yang dibutuhkan adalah 2-3 hari atau 48-72 jam.

Lama fermentasi merupakan faktor penting dalam produksi bioetanol. Hal ini karena *Saccharomyces cerevisiae* harus membutuhkan waktu yang cukup untuk dapat menghidrolisis gula untuk menjadikan etanol. Pada saat fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* terlebih dulu mengalami masa pertumbuhan sebelum siap menghidrolisis gula menjadi alkohol. Pertumbuhan awal ditandai dengan pembesaran volume dan berat sel, kemudian sel-sel membelah secara cepat hingga populasinya besar dan siap untuk menghidrolisis menjadi alkohol. Pertumbuhan ini dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan medium yang digunakan. Semakin lama fermentasi, kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* untuk memecah substrat/glukosa yang ada menjadi alkohol semakin besar. Hal ini sesuai dengan pendapat Kunaepah (2008) bahwa semakin lama waktu fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* berkembang biak dan jumlahnya bertambah sehingga kemampuan untuk memecah substrat/glukosa yang ada menjadi alkohol semakin besar.

Jenis mikroba sangat berpengaruh terhadap lama fermentasi. Dalam fermentasi alkohol pada umumnya digunakan khamir karena sudah terbukti bahwa khamir dapat mengkonversi gula menjadi alkohol secara lebih optimal Menurut Ghali *et al.* (2003), mikroorganisme yang dapat mengubah laktosa menjadi bioetanol umumnya adalah jenis khamir. Penelitian ini menggunakan jenis *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* adalah khamir yang biasa digunakan dalam fermentasi alkohol. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan mikroba lain yang juga dapat membentuk alkohol. *Kluyveromyces fragilis* juga merupakan khamir yang dapat memproduksi alkohol. tetapi, *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengkonversi gula lebih cepat daripada *Kluyveromyces fragilis*. Menurut O'leary *et al.* (2004), dalam 72 jam *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghasilkan alkohol hingga 2% sedangkan *Kluyveromyces fragilis* membutuhkan waktu hingga 1 minggu untuk dapat memproduksi etanol hingga 2%. Penelitian yang hampir sama juga dilakukan oleh Zizah *et al.* (2012), dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada medium whey dan kulit nanas mampu memproduksi etanol sebesar 2,2% selama 60 jam. Namun, *Saccharomyces cerevisiae* tidak dapat memanfaatkan galaktosa. Hal tersebut juga diungkapkan oleh Rubio dan Texeira (2005), *Saccharomyces cerevisiae* akan menggunakan glukosa sebagai sumber karbonnya daripada galaktosa

Susu rusak masih mengandung total gula 4,20% (Tabel 1.). Laktosa terlebih dulu akan dirubah menjadi glukosa dan galaktosa, kemudian dilanjutkan fermentasi glukosa menjadi alkohol. Laktosa dirubah menjadi glukosa dan galaktosa menggunakan enzim  $\beta$ -galactosidase. Setelah itu galaktosa dirubah menjadi galaktosa-1-p kemudian dirubah menjadi glukosa-1-p dengan bantuan UTP. Glukosa dengan bantuan ATP dirubah menjadi glukosa-1-p. Glukosa -1-p melalui proses glikolisis dirubah menjadi asam piruvat. Asam piruvat kemudian dirubah menjadi asam asetat dan CO<sub>2</sub>, pada peristiwa ini terjadi pelepasan energi. Kemudian asam asetat dirubah menjadi etanol. Hal ini sesuai dengan pendapat Sumardjo (2004) bahwa secara struktruk  $\beta$ -galactosidase

akan memecah laktosa menjadi galaktosa dengan glukosa. Yuniarsih (2009) menyatakan bahwa fermentasi alkohol beberapa mikroba melibatkan peristiwa pembebasan energi oleh karena asam piruvat diubah menjadi asam asetat dan CO<sub>2</sub>, kemudian selanjutnya asam asetat diubah menjadi alkohol.

Pati di dalam limbah cair tapioka akan dirubah menjadi gula sederhana terlebih dahulu melalui proses hidrolisis. Hidrolisis pati menjadi glukosa dapat menggunakan cara hidrolisa asam maupun enzimatis. Hidrolisis secara asam dapat menghasilkan derajat konversi pati menjadi glukosa lebih tinggi dibandingkan dengan cara enzimatis, namun dengan cara enzimatis dapat secara bersamaan melakukan fermentasi. Oleh karena itu, penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengubah pati menjadi glukosa secara enzimatis oleh enzim glukamilase yang dihasilkan, akan tetapi proses hidrolisa pati secara enzimatis membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menghasilkan alkohol. Pada proses hidrolisa enzimatis, glukosa yang terbentuk akan secara otomatis langsung masuk dalam proses glikolisis menghasilkan asam piruvat yang kemudian secara anaerobik diubah menjadi asam laktat, etanol, asam asetat, dan CO<sub>2</sub>. Hal ini sesuai dengan pendapat Richana (2011) bahwa hidrolisa pati dapat dilakukan dengan cara hidrolisa asam dan enzimatis. Menurut Prihardana (2007) waktu yang dibutuhkan untuk menghidrolisa pati menjadi glukosa secara enzimatis maksimal 48 jam.

Kadar alkohol yang dihasilkan selama 60 jam dalam penelitian ini adalah 1,90% (Tabel 3). Penelitian ini tidak berbeda jauh jika dibandingkan dengan pendapat Wright *et al.* (1988) yang menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* mampu menghidrolisis semua gula menjadi etanol dengan persentase kurang dari 50% dari total gula yang terkandung. Kandungan total gula berdasar uji laboratorium dari susu rusak adalah 4,20 % (Tabel 1) dan limbah cair tapioka adalah 1,80 % (Tabel 2). Maka jika digabung adalah 6%, sehingga kandungan etanol yang dapat dihasilkan kurang dari 3%. Menurut Richana (2011) Etanol merupakan racun bagi *Saccharomyces cerevisiae*. Produksi etanol terhenti pada konsentrasi etanol sekitar 11%-18%.

#### Nilai pH

Berdasarkan hasil analisis ragam pada Lampiran 2, perlakuan lama fermentasi T1, T2, T3, T4 dan T5 berpengaruh nyata (P<0,5) terhadap nilai pH pada proses

produksi bioetanol. Analisis lebih lanjut menggunakan Uji Wilayah Ganda Duncan menunjukkan bahwa T1 berbeda nyata (P<0,5) dengan T3, T4 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata (P<0,5) dengan T2. T2 berbeda nyata (P<0,5) dengan T4 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata dengan T1 dan T3. T3 berbeda nyata (P<0,5) dengan T1 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata (P<0,5) dengan T2 dan T4. T4 berbeda nyata (P<0,5) dengan T1, T2 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata (P<0,5) T3. T5 berbeda nyata (P<0,5) dengan T1, T2, T3, dan T4.

Semakin lama waktu fermentasi maka semakin turun nilai pH. Hal ini disebabkan karena proses fermentasi akan mengalami proses biosintesis piruvat yang menghasilkan produk asam, seperti asam butirat, asam asetat, aseton, asetaldehid dan alkohol. Maka dari itu semakin lama waktu fermentasi semakin tinggi kandungan produk tersebut sehingga membuat pH semakin rendah atau asam. Hal ini sesuai dengan pendapat Yuniarsih (2009) bahwa hasil dari proses fermentasi secara anaerob adalah asam piruvat yang kemudian akan dirubah menjadi asam asetat, etanol dan CO<sub>2</sub>. Penurunan nilai pH diikuti dengan peningkatan produksi gas. Hal ini dapat dilihat pada akhir fermentasi yaitu pada jam ke-60, nilai pH nya paling rendah. Ini membuktikan bahwa produksi gas juga berkontribusi terhadap nilai pH. Sesuai dengan pendapat Kartohardjono *et al.* (2007), bahwa gas CO<sub>2</sub> sering disebut gas asam karena gas CO<sub>2</sub> memiliki sifat asam. Oleh karena itu gas CO<sub>2</sub> juga berkontribusi terhadap nilai pH.

Nilai pH merupakan salah satu faktor penting yang perlu untuk diperhatikan pada saat proses fermentasi. pH mempengaruhi pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Oleh karena itu, pada awal pelaksanaan penelitian, substrat yang akan dipakai terlebih dahulu diuji pH nya. Berdasarkan hasil uji pH, pH susu rusak dan limbah cair tapioka masing-masing adalah 4,50 dan 4,20. Menurut Roukas (1994), bahwa kisaran pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah pada pH 3,5-6,5. Pada kondisi basa, *Saccharomyces cerevisiae* tidak dapat tumbuh. Disebutkan oleh Elevri dan Putra (2006), bahwa produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* maksimal dapat dicapai pada pH 4,5.

Hasil akhir nilai pH pada penelitian ini adalah 3,78 yang menghasilkan kadar alkohol sebesar 1,90%. Hal ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan peneliti Richana (2011) yang menggunakan medium singkong yang menghasilkan nilai pH sebesar 5 dan mampu menghasilkan

Tabel 1. Hasil Uji pH dan Total Gula Susu Rusak dan Limbah Cair Tapioka

Bahan	Nilai pH	Total Gula
Susu Rusak	4,50	4,21 %
Limbah Cair Tapioka	4,20	1,80 %

Tabel 2. Data Kadar Alkohol, Nilai pH, dan Total Gas pada Proses Produksi Bioetanol dari Campuran Susu Rusak dan Limbah Cair Tapioka

Perlakuan Lama Fermentasi	Kadar Alkohol (%)	Nilai pH	Total Gas (ml)
12 Jam	0,29±0,25 <sup>b</sup>	4,20±0,06 <sup>a</sup>	7,5±8,66 <sup>b</sup>
24 Jam	0,71±0,34 <sup>b</sup>	4,16±0,07 <sup>ab</sup>	13,75±4,78 <sup>ab</sup>
36 Jam	0,52±0,30 <sup>b</sup>	4,01±0,04 <sup>bc</sup>	16,25±6,29 <sup>ab</sup>
48 Jam	1,59±0,88 <sup>a</sup>	3,94±0,13 <sup>c</sup>	18,75±6,29 <sup>a</sup>
60 Jam	1,90±0,66 <sup>a</sup>	3,78±0,06 <sup>d</sup>	23,75±4,78 <sup>a</sup>

Keterangan : Superskrip huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

kadar alkohol sebesar 18%. Untuk menghasilkan kadar etanol yang tinggi nilai pH harus dijaga agar tetap stabil di sekitar 5 untuk memberikan kesempatan pada *Saccharomyces cerevisiae* untuk berkembang dengan cepat sehingga dapat segera memecah karbohidrat. Nilai pH awal fermentasi merupakan indikator penting dalam produksi alkohol karena akan berpengaruh terhadap perkembangan khamir. Semakin lama waktu fermentasi maka pH akan cenderung turun karena hasil-hasil produk fermentasi yang bersifat asam. Asam sendiri merupakan racun bagi khamir sehingga semakin tinggi kandungan asam akan menghambat pertumbuhan khamir. Penelitian yang dilakukan Kargi dan Ozmihei (2005) membuktikan dengan substrat laktosa dengan rentang pH 3,0-4,0 hanya mampu menghasilkan 1,08% etanol. Pada rentang pH 5,0-6,0 mampu menghasilkan kadar etanol sebesar 1,88%. Oleh karena itu perlu penambahan zat kimia guna mempertahankan nilai pH agar stabil di pH 5. Zat kimia tersebut bisa berupa Urea, NaOH, dan SP36.

Standar kualitas mutu bioetanol memiliki pH 6,5. Oleh karena itu perlu proses lebih lanjut untuk meningkatkan mutu bioetanol. Proses destilasi merupakan proses penting dalam menghasilkan mutu bioetanol yang baik. Destilasi akan memisahkan etanol dengan komponen-komponen yang lain sehingga komponen yang bersifat asam akan hilang. Hal ini sesuai dengan pendapat Richana (2011) bahwa standar mutu kualitas bioetanol sebagai bahan bakar salah satunya adalah memiliki pH 6,5. Menurut Mc Cabe *et al.* (1993) destilasi adalah metode pemisahan berdasarkan perbedaan titik didih. Destilasi akan memisahkan komponen-komponen yang mudah menguap pada suatu campuran cair dengan cara menguapkannya (*separating agentnya* panas), yang diikuti dengan kondensasi uap yang terbentuk dan menampung kondensat yang dihasilkan.

#### Total Gas

Proses produksi bioetanol tidak hanya menghasilkan etanol tetapi juga menghasilkan gas CO<sub>2</sub>. Seiring meningkatnya lama fermentasi, produksi gas CO<sub>2</sub> juga semakin bertambah (Ilustrasi 5). Berdasarkan hasil analisis ragam pada Lampiran 3, perlakuan lama fermentasi T1, T2, T3, T4 dan T5 berpengaruh nyata ( $P < 0,5$ ) terhadap total gas pada bioetanol. Analisis lebih lanjut menggunakan Uji Wilayah Ganda Duncan menunjukkan bahwa T1 berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T4 dan T5, tetapi tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T2 dan T3. T2 tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T1, T3, T4, dan T5. T3 tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T1, T2, T4, dan T5. T4 berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T1, tetapi tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T2, T3 dan T5. T5 berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T1, tetapi tidak berbeda nyata ( $P < 0,5$ ) dengan T2, T3, dan T4.

Semakin lama waktu fermentasi semakin besar total gas yang dihasilkan. Hal ini disebabkan karena selama waktu fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* akan mengalami biosintesis piruvat yang selanjutnya akan menghasilkan gas, sehingga semakin lama waktu fermentasi semakin banyak gas yang diproduksi. Gas yang diproduksi dari proses fermentasi adalah CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, dan O<sub>2</sub>. Penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* akan membentuk gas CO<sub>2</sub> karena

*Saccharomyces cerevisiae* cenderung memanfaatkan gula untuk menghasilkan etanol dan CO<sub>2</sub>. Hal ini sesuai dengan pendapat Fardiaz (1992) *Saccharomyces cerevisiae* yang memiliki kemampuan untuk mengubah karbohidrat menjadi alkohol/etanol dan karbondioksida. Menurut Hambali *et al* (2008), pada waktu fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* mengubah 1 mol glukosa menjadi 2 mol alkohol dan 2 mol gas CO<sub>2</sub>.

Pembentukan gas CO<sub>2</sub> bergantung dari biosintesis piruvat. Semakin banyak terbentuknya asam asetat semakin banyak gas CO<sub>2</sub> yang terbentuk. Pada proses pembentukan asetaldehid gas CO<sub>2</sub> juga dihasilkan sehingga dalam biosintesis piruvat sendiri akan menghasilkan gas CO<sub>2</sub>. Berbeda dengan terbentuknya gas yang lain seperti metana (CH<sub>4</sub>). Selain membutuhkan bakteri yang spesifik yaitu bakteri metanogenesis, juga membutuhkan waktu yang lama untuk menghasilkan gas metana ini. Pada proses fermentasi alkohol sendiri dimungkinkan juga akan terbentuk gas metana tetapi membutuhkan waktu fermentasi yang lebih lama. Hal ini disebabkan karena kandungan dari susu rusak dan limbah cair tapioka sendiri yang mudah membusuk. Menurut Widiawati *et al.* (2011), pada proses fermentasi akan dihasilkan gas CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>, dan O<sub>2</sub>. Proporsi dari masing-masing gas sangat tergantung dari jenis bakteri dan substrat yang digunakan. Semua bahan organik yang mengalami pembusukan secara anaerob pasti menghasilkan gas metana. Menurut Richana (2011) pada semua jalur biosintesis piruvat pasti menghasilkan gas CO<sub>2</sub>.

Selama 60 jam dihasilkan total gas sebesar 23,75ml (Tabel 3) atau sekitar 40% dari total gula yang terkandung. Hal ini berbeda dari hasil peneliti Richana (2011) yang menyatakan pada proses fermentasi bioetanol, CO<sub>2</sub> yang diproduksi sebanyak 46,6 kg per 100 kg gula terfermentasi atau sekitar 47%. Hal ini karena kondisi fermentasi yang berbeda seperti kondisi pH yang dijaga pada pH 5 agar *Saccharomyces cerevisiae* mampu berkembang biak lebih optimum sehingga hasil produksi yang dihasilkan juga lebih besar.

Gas yang dihasilkan pada proses fermentasi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dapat menghambat aktivitas dari *Saccharomyces cerevisiae* itu sendiri. Semakin lama proses fermentasi maka gas CO<sub>2</sub> yang terbentuk juga akan semakin banyak. Kondisi ini tidak baik untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dan juga untuk proses fermentasi bioetanol. Menurut Datar *et al.* (2004), dengan adanya produksi gas selama proses fermentasi maka pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* akan berhenti meskipun *Saccharomyces cerevisiae* masih dalam keadaan hidup. Kemudian akan mulai menghasilkan alkohol kembali jika gas CO<sub>2</sub> dihilangkan. Oleh karena itu gas CO<sub>2</sub> sendiri harus dimanfaatkan. Menurut Richana (2011) karbondioksida sendiri bisa dimanfaatkan dalam minuman soda karbonat, liquid CO<sub>2</sub>, dry ice, dan digunakan dalam menumbuhkan algae yang bisa menghasilkan minyak yang digunakan pada biodiesel

*Starter* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ragi roti komersil dengan merk Fermipan. Ragi roti merupakan khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* tipe tertentu yang umumnya cepat tumbuh di dalam adonan roti.

Di dalam adonan roti *Saccharomyces cerevisiae* memetabolisme sumber gula dan salah satu hasil metabolismenya adalah gas CO<sub>2</sub> yang dapat mengembangkan adonan roti. Proses ini terjadi pada kondisi aerob. Di dalam kondisi anaerob ragi roti tetap menghasilkan gas CO<sub>2</sub>, meskipun tidak secepat dalam kondisi aerob. Menurut Pelczar dan Chan (1988), menyatakan bahwa ragi roti merupakan khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* yang telah diseleksi sebelumnya untuk tujuan komersil. *Saccharomyces cerevisiae* yang dipilih adalah *Saccharomyces cerevisiae* yang memiliki kemampuan memfermentasi gula dengan baik di dalam adonan dan dapat tumbuh dengan cepat. Karbondioksida yang dihasilkan dari proses fermentasi inilah yang membuat adonan roti mengembang. Oleh karena itu, ragi roti umumnya terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae* terpilih yang cepat dalam menghasilkan karbondioksida untuk tujuan pengembangan roti.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasi kadar alkohol semakin meningkat, nilai pH menurun, dan kandungan total gas meningkat. Hasil terbaik diperoleh pada jam ke 60 dengan produksi alkohol sebesar 1,90 %, nilai pH 3,78 dan total gas sebesar 23,75 ml.

### Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk memberikan senyawa tambahan seperti fosfat buffer menstabilkan nilai pH agar lebih dari 4 agar *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh optimal dan dilakukan kontrol terhadap suhu untuk mengoptimalkan perkembangan *Saccharomyces cerevisiae*. Penambahan substrat sumber gula guna meningkatkan kandungan alkohol yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Baarri, A.N., M. Ogawa, T. Visalsok, S. Hayakawa. 2012. Lactoperoxidase Immobilized Onto Various Beads For Producing Natural Preservatives Solution. *Journal Indonesian Food Technologist*. 1 (1): 4-6
- Astawan, M. dan W. Mita. 1991. *Teknologi Pengolahan Pangan Nabati Tepat Guna*. Akademika Pressindo. Jakarta
- Azizah, N., Al-Barri A.N., Mulyani S. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, Dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. *Journal Indonesian Food Technologist*. 2 (1) *in press*
- Buckle, K.A., R. A. Edwards, E. H. Fleet dan M. Wootton, 1987. *Ilmu Pangan*. Penerjemah H. Purnomo dan Adiono. UI-Press. Jakarta
- Chentya, V.M., Legowo A.M., Al-Baarri A.N. 2012 Keasamaan Susu Pasteurisasi Dengan Penambahan Ekstrak Daun Aileru. *Journal Indonesia Food Technologist* 1 (1): 7-11
- Datar, R. P., R. M. Shenkman, B. G. Cateni, R. L. Huhnke, R. S. Lewis. 2004. Fermentation of Biomass-Generated Producer Gas to Ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* 86 (5):587-594.
- Dominggues, L., Jose, A.T., Guimaraes., Pedro, M.R. 2010. Fermentation of lactose to bioetanol by yeast as part of intergrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology advances* 1: 1-10
- Elevri, P. A. dan S. R. Putra. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang Diamobilisasi dengan Agar Batang. *Akta Kamindo* 1 (2): 105-114.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ghaly, A.E., M.A. Kamal and A. Avery, 2003. Influence of Temperature Rise on Kinetic Parameters during Batch Propagation of *Kluyveromyces fragilis* in Cheese Whey under Ambient Conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 741-749.
- Hambali, E., S. Mujdalipah, A. H. Tambunan, A. W. Pattiwiri dan R. Hendroko, 2008. *Teknologi Bioenergi*. Agro Media, Jakarta.
- Hamilton, R., 2011. *The Manufacture of Ethanol From Whey. Dairy Ethanol from Whey. III-H.Wonsburg* Diambil dari <http://www.nzic.org.nz/ChemProcesses/dairy/3H.pdf> . Diakses tanggal 16 Juni 2011 pukul 14:15 WIB
- Hanifah, T. A., Christine, J., Dan Titania, T. N. 2001. *Pengolahan Limbah Cair Tapioka Dengan Teknologi EM (Effective Mikroorganisms)*. *Jurnal Natur Indonesia* 3: 95-103
- Hidayat, S., M. C. Padaga, S. Suhartini. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit AND irabaya.
- Istianah, Y. 2011. Pemanfaat .limbah Kulit Nanas sebagai Bahan Pembuat Bioetanol. Fakultas Peternakan Universitas Sumatera Utara, Sumatera Utara (Skripsi Sarjana Peternakan)
- Irfandi. 2005. Karakteristik Morfologi Lima Populasi Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor (Skripsi Sarjana Pertanian).
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme* Jilid 2. CV. Yrama Widya, Bandung.
- Kargi, F, and Serphil Omzihei. 2005. Utilization of Cheese Whey Powder (CWP) for Ethanol Fermentations. *Enzym and Microbioal Technology Review* 38: 711-718
- Kartika, B., A.D. Guritno, D. Purwadi, D. Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta
- Kartohardjono, S., Anggara, Subihi, dan Yuliusman. 2007. Absorpsi CO<sub>2</sub> dari campurannya dengan CH<sub>4</sub> atau N<sub>2</sub> melalui kontaktor membran serat berongga menggunakan pelarut air. *Jurnal Teknologi* 11 (2): 97-102.
- Kumalasari, I. J. 2011. Pengaruh Variasi Suhu Inkubasi terhadap Kadar Etanol Hasil Fermentasi Kulit dan Bonggol Nanas (*Ananas sativus*). Fakultas Teknik. Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang (Skripsi Sarjana Teknik).
- Kunaepah, U. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi dan

- Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah. Universitas Diponegoro, Semarang (Tesis Magister Gizi Masyarakat)
- Legowo, A.M., Kusrahayu., Mulyani S. 2009. Ilmu dan Teknologi Susu. BP UNDIP. Semarang
- McCabe, W. L, J. C. Smith, and P. Harriot. 1993. Operasi Teknik Kimia. Erlangga, Jakarta
- Mulyohardjo, M. 1987. Teknologi Pengolahan Pati, UGM Muhammad. Yogyakarta
- Nevoigt, E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72 (3): 379-412.
- Nurdianti, F. 2007. Evaluasi Aktivitas Enzim Glukoamilase dari *Aspergillus oryzae* Dengan Ubi Jalar dan Ubi Kayu Sebagai Substrat Fakultas Sains dan Teknik. UNSOED, Purwokerto (Skripsi Sarjana Teknik)
- O'Leary V. S., R. Green, B. C. Sullivan, V. H. Holsinger. 2004. Alcohol Production by Selected Yeast Strains in Lactase-Hydrolyzed Acid Whey. *Biotechnol Bioeng* 19 (10): 19–35.
- Prasetyana., D. S, 2009. Skripsi : Kualitas Bioetanol Limbah Tapioka Padat Kering Dihaluskan (Tepung) Dengan Penambahan Ragi dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Pada Lama Fermentasi Yang Berbeda
- Prihadana, R. 2007. Bioetanol Ubi kayu Bahan Bakar Masa Depan. Agromedia. Jakarta
- Purwanto, Agung. 2012. Pembuatan Bioetanol dari Tepung Biji Nangka dengan Proses Sakarifikasi Fermentasi Fungi *Aspergillus Niger* dilanjutkan dengan Fermentasi Yeast *Saccharomyces Cereviceae*. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro, Semarang (Skripsi Sarjana Teknik)
- Richana, N. 2011. Bioetanol: Bahan Baku, Teknologi, Produksi dan Pengendalian Mutu. Penerbit Nuansa, Bandung.
- Rubio dan M. A. Texeira. 2005. Comparative analysis of the gal genetic switch between Not-So-Distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 5: 1115-1128
- Said, G. 1987. Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi Edisi 1. Mediatama Sarana Perkasa, Jakarta.
- Saleh, E. 2004. Teknologi Pengolahan Susu dan Hasil Ikutan Ternak. Program Studi Produksi Ternak Fakultas Pertanian Universitas Sumatra Utara. Diambil dari <http://www.repository.usu.ac.id/bitstream/.../ternak-eniza.pdf> Diakses tanggal 16 juni 2011 pukul 14:12 WIB
- Sumardjo, D. 2004. Pengantar Kimia. Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran Dan Program S1 Fakultas Bioeksata. Kedokteran EGC. Jakarta
- Winarno, F.G. 1993. Kimia Pangan dan Gizi. Gramedia. Jakarta
- Sumiyati, 2009. Kualitas Nata De Cassava Limbah Cair Tapioka Dengan Penambahan Gula Pasir Dan Lama Fermentasi yang berbeda. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta (Skripsi Sarjana Pendidikan)
- Trifosa, D. 2007. Konversi Pati Jagung Menjadi Bioetanol. Program Studi Kimia FMIPA ITB. Bandung (Skripsi Sarjana Kimia)
- Wahyuni, S. 2008. Biogas. Penebar Swadaya, Jakarta
- Widodo. 2002. Bioteknologi Industri Susu. Lacticia Press, Yogyakarta
- Widiawati Y., M. Winugroho, P., Mahyuddin. 2010. Estimasi Produksi Gas Metana Dari Rumput Dan Tanaman Leguminosa Yang Diukur Secara Invitro. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Wirahadikusuma, 1995. Biokimia Metabolisme Energi karbohidrat dan Lipid. ITB, Bandung.
- Wright JD, CE Wymen and K. Grohman K. 1988. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulose. *Appl. Biochem Biotechnol.* (18) : 75-90.
- Yuniarsih, F.N., 2009. Pembuatan Bioetanol Dari Dekstrin Dan Sirup Glukosa Sagu (*Metroxylon* sp.) Menggunakan *Sacchomyceas Cerevesae* var. *Ellipsoideus*. Departemen Teknologi Industri Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor (Skripsi Sarjana Pertanian)