

**PRODUKSI BIOETANOL OLEH *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3210
PADA MEDIA MOLASES DENGAN KECEPATAN AGITASI DAN
AERASI YANG BERBEDA**

*Bioethanol Production by Saccharomyces cerevisiae FNCC 3210 in Molasses Media Under
Different Agitation Speed and Aeration Rate*

Jay Jayus¹⁾, Iga Vivin Noorvita¹⁾, Nurhayati Nurhayati^{1)*}

¹⁾Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121

*E-mail: nurhayati.ftp@unej.ac.id

ABSTRACT

*One alternative way to increase the production of bioethanol in molasses is by varying the agitation speed and aeration rate during the fermentation process. The aims of this research were to evaluate the productivity of bioethanol fermentation of *S. cerevisiae* FNCC 3210 under different agitation speed and aeration rate. The research was carried out under aeration rate of 0.1; 0.3; and 0.6 vvm; as well as agitation speed of 100, 200 and 300 rpm. Microbial concentration, reduction sugar content and ethanol production were observed every 4-hour interval during 24 hours fermentation time. The results showed that the aeration rate treatment was significantly affecting the ethanol production, while the agitation speed was not. Fermentation condition of 100 rpm agitation speed and 0.3 vvm aeration rate released the highest ethanol production (5.43%), and microbial concentration of 4.07 g/L.*

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol, agitation speed, aeration rate

PENDAHULUAN

Bioetanol merupakan hasil dari proses fermentasi biomassa dengan bantuan mikroorganisme (Firdausi *et al.*, 2013). Pada umumnya jenis mikroorganisme yang digunakan dalam produksi bioetanol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Hal tersebut dikarenakan *S. cerevisiae* banyak ditemukan di alam, memiliki ketahanan hidup yang tinggi serta mampu menghasilkan alkohol dalam jumlah yang cukup tinggi (Jeffries dan Jin, 2000). Upaya optimasi lingkungan tumbuh mikroba selama fermentasi dapat dilakukan dengan cara mengkondisikan kultur pada kondisi optimum pertumbuhan mikroba dengan menggunakan bioreaktor selama proses fermentasi. Faktor yang mempengaruhi fermentasi bioetanol menggunakan bioreaktor yaitu agitasi dan aerasi. Pada kondisi mikroaerob (0,1; 0,2 dan 0,4 vvm) produksi etanol oleh *Fusarium oxysporum* terjadi lebih cepat

(72 jam) dibandingkan pada kondisi anaerob yang membutuhkan waktu fermentasi 120 jam (Xiros dan Christakopoulos, 2009). Yan *et al.* (2009), melaporkan bahwa produksi etanol menggunakan *S. cerevisiae* pada kondisi fermentasi dengan perlakuan agitasi 200 rpm dan aerasi 4 mg/L dapat menghasilkan etanol yang lebih tinggi yaitu 143,8 g/L dibandingkan dengan kondisi fermentasi tanpa agitasi dan aerasi yaitu 75,8 g/L.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi etanol tertinggi yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae* FNCC 3210 pada media molasses. Perlakuan yang digunakan selama proses produksi etanol adalah pemberian aerasi dan agitasi selama fermentasi dengan menggunakan fermentor.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi fermentor Applikon Biotechnology volume 1 L, *laminar air flow* (LAF) Microtech Model V3, autoclave Study SA-300VL, inkubator (scientific series 2000), oven Scientific series 2000, *hand refractometer* ATAGO, digital pH meter, spektrofotometer Genesis 10 UV dan alat gelas. Bahan penelitian yang digunakan meliputi molasses yang diperoleh dari PTPN XI pabrik pengolahan gula Djatiroto, pupuk urea, Larutan NaOH (PA), Larutan H₂SO₄ pekat, asam fosfat 10%, K₂Cr₂O₇, larutan Na₂CO₃, dan reagen dinitrosalisilic acid (DNS), kultur khamir *Saccharomyces cerevisiae* strain FNCC 3210.

Tahapan Penelitian

Preparasi media

Proses preparasi media dimulai dari pengenceran molasses yang diperoleh dari PTPN XI pabrik pengolahan gula Djatiroto. Pengaturan pH molasses dengan menggunakan H₂SO₄ pekat hingga pH molasses menjadi 2-3. Kemudian molasses dipanaskan hingga mencapai suhu 90°C yang bertujuan untuk mempercepat pengendapan padatan yang tidak terlarut. Larutan molasses kemudian disaring untuk memisahkan padatan tidak terlarut pada molasses. Molasses hasil saringan ditambahkan dengan NaOH 0,5 M hingga pH molasses mencapai pH 4,5 yang merupakan pH optimum untuk pertumbuhan khamir. Nutrisi medium fermentasi diperkaya dengan menambahkan urea sebanyak 0,4285 g/L dan asam fosfat 10% sebanyak 0,07 ml/L. Molasses yang telah dipreparasi sejumlah 800 ml dimasukkan bioreaktor dan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan starter

Pembuatan starter dilakukan dengan meremajakan kultur stok *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 pada media agar miring MEA selama 48 jam pada suhu 30°C. Kultur pada media miring sebanyak 1 ose diinokulasikan dalam 10 ml media MEB yang kemudian diinkubasi selama 15 jam pada suhu 30°C sebagai kultur kerja. Kultur kerja sebanyak 10 ml diinokulasikan pada 100 ml molasses (kadar brix 14°) yang telah disterilkan. Molasses kemudian diinkubasi selama 12 jam pada suhu 30°C.

Produksi bioetanol

Proses produksi bioetanol menggunakan media molasses 800 ml yang telah dipreparasi dalam bioreaktor. Starter *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 sebanyak 10% v/v ditambahkan ke dalam bioreaktor dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Produksi bioetanol tahap pertama menggunakan perlakuan kecepatan agitasi 100 rpm dan laju aerasi A1 (0,1 vvm), A2 (0,3 vvm) dan A3 (0,6 vvm). Pada tahap selanjutnya perlakuan laju aerasi terbaik di tahap pertama divariasikan dengan kecepatan agitasi 200 rpm (B1) dan 300 rpm (B2). Parameter yang diamati dalam penelitian ini pada selang waktu 4 jam adalah kadar sel mikroba, kadar gula reduksi, dan kadar etanol.

Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi parameter mikrobiologi dan kimia. Parameter mikrobiologi yaitu konsentrasi mikroba dengan menggunakan metode gravimetri (Choiron *et al.*, 2013). Parameter kimia yaitu kadar gula reduksi dengan menggunakan metode DNS (Miller, 1959) dan parameter kadar etanol dengan menggunakan metode cawan conway (Kartika *et al.*, 1992).

HASIL DAN PEMBAHASAN

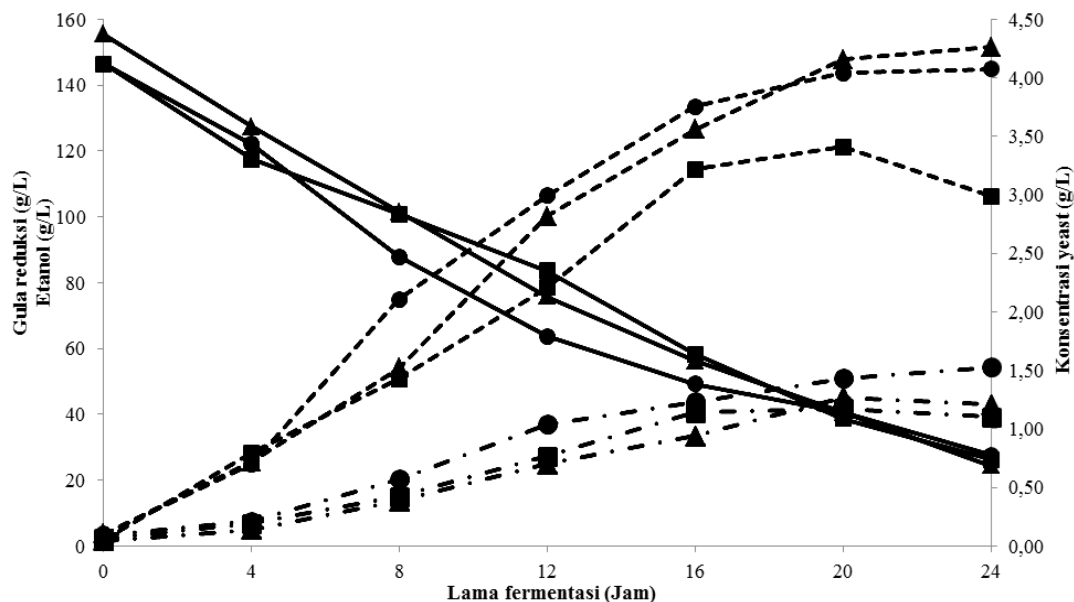
Profil Produksi Bioetanol Pada Kondisi Fermentasi Tahap Pertama

Hasil pengamatan proses fermentasi tahap pertama dengan perlakuan kecepatan agitasi 100 rpm dan laju aerasi 0,1 vvm(A1); 0,3 vvm(A2); dan 0,6 vvm(A3) (**Gambar 1**).

Gambar 1 menunjukkan konsentrasi yeast pada perlakuan A2 dan A3 mengalami kenaikan hingga akhir proses fermentasi. Konsentrasi yeast perlakuan A2 dan A3 pada jam ke 24 berturut-turut sebesar $4,07 \pm 0,23$ g/L dan $4,26 \pm 0,70$ g/L. Peningkatan konsentrasi yeast dipengaruhi oleh ketersediaan substrat dan oksigen dalam media fermentasi. Ketersediaan substrat yang masih cukup banyak pada media fermentasi akan digunakan oleh yeast untuk pertumbuhan, sehingga yeast cenderung mengalami peningkatan konsentrasi. Konsentrasi yeast perlakuan A1 mengalami kenaikan hingga fermentasi jam ke 20 dengan konsentrasi yeast sebesar

$3,41 \pm 0,13$ g/L dan mengalami penurunan hingga fermentasi jam ke 24. Penurunan konsentrasi sel diduga akibat terjadinya lisis pada sel. Autolisis pada sel akan menyebabkan mitokondria mengeluarkan enzim yang dapat menghancurkan membran sel sehingga sel mengalami kerusakan dan komponen sel akan hilang serta terdispersi kedalam media (Choiron *et al.*, 2013).

Pada perlakuan A2 jumlah etanol tertinggi dihasilkan pada fermentasi jam ke 24. Hal tersebut disebabkan oleh adanya suplai oksigen sebesar 0,3 vvm yang mendukung peningkatan konsentrasi mikroba hingga akhir proses fermentasi. Perlakuan A1 dan A3 menghasilkan etanol tertinggi pada jam ke 20 dan mengalami penurunan pada fermentasi jam ke 24. Penurunan etanol yang dihasilkan diduga akibat terbentuknya alkohol yang bersifat toksik bagi mikroba serta adanya suplai oksigen sebesar 0,6 vvm yang cenderung mendorong sel mikroba untuk tumbuh dan mempertahankan keberadaan sel. Produksi



Gambar 1. Peningkatan konsentrasi yeast (- -), peningkatan etanol (- . -), dan penurunan gula reduksi (—) selama fermentasi bioetanol pada tahap pertama dengan perlakuan A1 (■), A2 (●) dan A3 (▲)

etanol dengan laju aerasi 0,1 vvm menghasilkan etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan laju aerasi 0,2 dan 0,4 vvm (Xiros dan Christakopoulos, 2009).

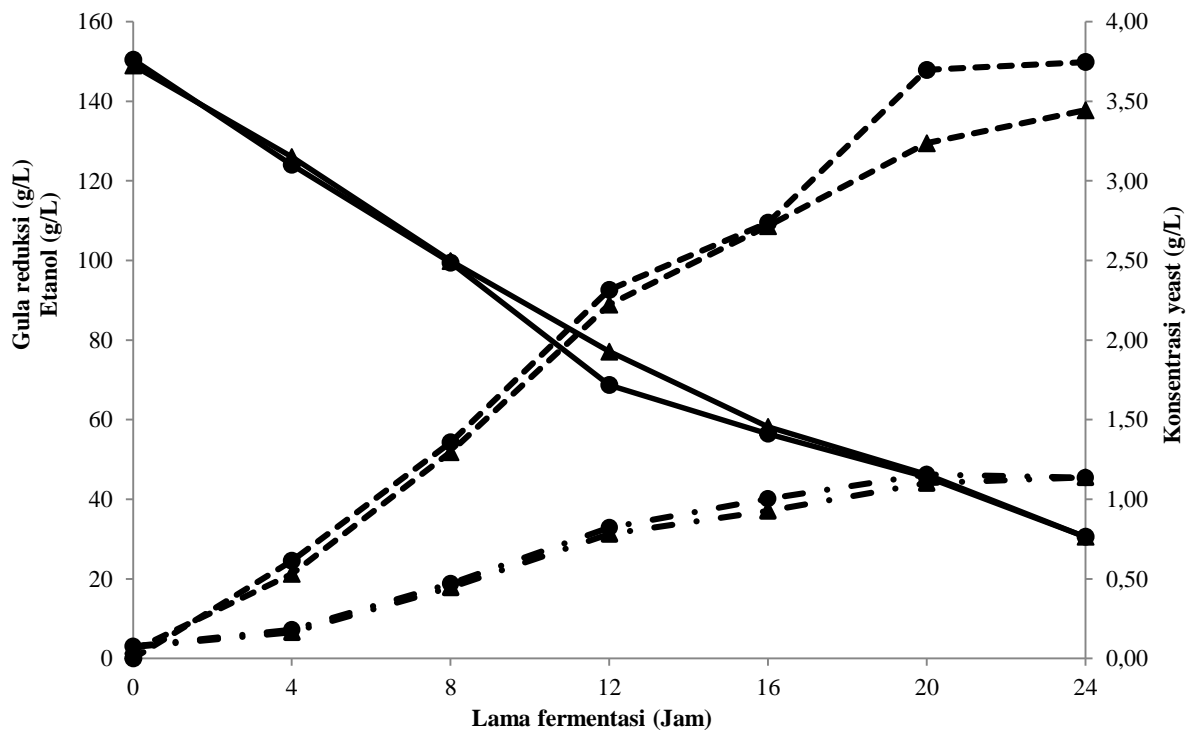
Profil Produksi Bioetanol pada Kondisi Fermentasi Tahap Kedua

Berdasarkan perlakuan tahap pertama, kondisi fermentasi A2 merupakan kondisi fermentasi dengan perlakuan aerasi terbaik yang mendorong yeast untuk menghasilkan etanol dalam jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya. Pada fermentasi tahap ini dilakukan upaya optimalisasi jumlah etanol yang dihasilkan dengan cara melakukan proses fermentasi dengan perlakuan aerasi 0,3 vvm yang divariasikan dengan perlakuan agitasi 200 rpm (B1) dan 300 rpm (B2). Perlakuan agitasi bertujuan

untuk menghomogenkan media fermentasi (Stanburry dan Whitaker, 1990).

Konsentrasi tertinggi yeast pada perlakuan B1 dan B2 dicapai selama 24 jam fermentasi. Peningkatan konsentrasi mikroba berkaitan dengan peningkatan jumlah etanol serta penurunan jumlah gula reduksi. Jumlah gula reduksi pada kedua sampel mengalami penurunan hingga akhir fermentasi. Laju konsumsi gula reduksi pada perlakuan B1 dan B2 tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

Jumlah etanol yang dihasilkan pada sampel B1 dan B2 tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal tersebut diduga akibat perlakuan agitasi sebesar 200 dan 300 rpm tidak terlalu berpengaruh terhadap kadar etanol yang dihasilkan, namun terbentuknya buih selama proses fermentasi akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan yeast sehingga produksi etanol tidak optimal (**Gambar 2**).



Gambar 1. Peningkatan konsentrasi yeast (— · —), peningkatan etanol (— · —), dan penurunan gula reduksi (—) selama fermentasi bioetanol pada tahap pertama dengan perlakuan A1 (■), A2 (●) dan A3 (▲)

Kinetika Produksi Bioetanol oleh *S. cerevisiae* Strain FNCC 3210

Konsentrasi yeast

Konsentrasi tertinggi *S. cerevisiae* FNCC 3210 pada tahap pertama diperoleh pada perlakuan A3 dengan konsentrasi sel sebesar $4,26 \pm 0,70$ g/L. Peningkatan pemberian aerasi pada media selama proses fermentasi akan meningkatkan jumlah populasi yeast. Hal tersebut sesuai dengan **Tabel 1**, pada perlakuan A3 dengan pemberian aerasi 0,6 vvm konsentrasi yeast yang cenderung mengalami kenaikan hingga akhir proses fermentasi.

Tabel 1. Konsentrasi yeast selama fermentasi tahap pertama

Lama fermentasi (Jam)	Populasi Yeast (g/L)		
	A1	A2	A3
0	$0,05 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,14$	$0,10 \pm 0,14$
4	$0,80 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,21$
8	$1,43 \pm 0,04$	$2,11 \pm 0,15$	$1,52 \pm 0,10$
12	$2,21 \pm 0,11$	$3,00 \pm 0,82$	$2,82 \pm 0,02$
16	$3,22 \pm 0,37$	$3,75 \pm 0,06$	$3,56 \pm 0,27$
20	$3,41 \pm 0,13$	$4,04 \pm 0,04$	$4,16 \pm 0,20$
24	$2,99 \pm 0,08$	$4,07 \pm 0,23$	$4,26 \pm 0,70$

Perlakuan tahap kedua dilakukan dengan menggunakan aerasi 0,3 vvm yang merupakan perlakuan aerasi terbaik berdasarkan fermentasi tahap pertama. Berdasarkan perlakuan aerasi terbaik tersebut, kemudian dilakukan produksi bioetanol tahap kedua dengan variasi peningkatan perlakuan agitasi yaitu 200 rpm (B1) dan 300 rpm (B2). Konsentrasi yeast pada kedua perlakuan tersebut mengalami kenaikan hingga akhir proses fermentasi. Berdasarkan **Tabel 2** konsentrasi tertinggi yeast pada tahap 2 diperoleh dengan perlakuan B1 sebesar $3,75 \pm 0,03$ g/L.

Tabel 2. Konsentrasi yeast selama fermentasi tahap kedua

Lama fermentasi (Jam)	Populasi Yeast (g/L)	
	B1	B2
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,07$
4	$0,61 \pm 0,20$	$0,53 \pm 0,13$
8	$1,36 \pm 0,19$	$1,30 \pm 0,20$
12	$2,32 \pm 0,30$	$2,22 \pm 0,01$
16	$2,74 \pm 0,16$	$2,72 \pm 0,09$
20	$3,70 \pm 0,60$	$3,24 \pm 0,20$
24	$3,75 \pm 0,03$	$3,44 \pm 0,29$

Konsumsi gula reduksi

Jumlah gula reduksi pada masing-masing perlakuan fermentasi mengalami penurunan seiring dengan lama fermentasi (**Tabel 3**). Konsumsi gula reduksi pada perlakuan A3 merupakan konsumsi gula reduksi yang paling tinggi. Hal tersebut dikarenakan pada perlakuan A3 dialirkan serasi sebesar 0,6 vvm yang akan cenderung mendukung pertumbuhan yeast. Laju konsumsi gula reduksi pada perlakuan A1, A2 dan A3 hingga akhir fermentasi berturut-turut sebesar $5,01 \pm 0,04$ g/L/jam; $4,96 \pm 0,02$ g/L/jam dan $5,46 \pm 0,19$ g/L/jam. Laju konsumsi gula reduksi hingga mencapai populasi yeast tertinggi pada kondisi A3 lebih tinggi dibandingkan kondisi A2 dan A3.

Tabel 3. Konsumsi gula reduksi selama fermentasi tahap pertama

Lama fermentasi (Jam)	ΔS (g/L)		
	A1	A2	A3
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
4	$29,04 \pm 0,04$	$24,44 \pm 0,01$	$28,12 \pm 0,01$
8	$45,73 \pm 0,12$	$58,61 \pm 0,08$	$54,01 \pm 0,05$
12	$62,81 \pm 0,16$	$82,79 \pm 0,13$	$79,63 \pm 0,08$
16	$88,17 \pm 0,12$	$97,24 \pm 0,02$	$99,212 \pm 0,04$
20	$107,75 \pm 0,00$	$105,91 \pm 0,01$	$114,85 \pm 0,04$
24	$120,24 \pm 0,01$	$118,92 \pm 0,01$	$131,01 \pm 0,05$

Konsumsi gula reduksi pada fermentasi tahap kedua tidak berbeda signifikan yaitu sebesar $119,84 \pm 0,00$ g/L pada perlakuan B1 dan sebesar $118,40 \pm 0,01$ g/L pada perlakuan B2 (**Tabel 4**). Laju konsumsi gula reduksi pada perlakuan B1 dan B2 cenderung lebih rendah dibandingkan dengan laju konsumsi gula reduksi pada perlakuan A2. Hal tersebut dikarenakan pada kondisi fermentasi B1 dan B2 dihasilkan foam yang lebih banyak dibandingkan dengan kondisi fermentasi A2, sehingga diduga menghambat proses pertumbuhan *yeast*.

Tabel 4. Konsumsi gula reduksi selama fermentasi tahap kedua

Lama fermentasi (Jam)	ΔS (g/L)	
	B1	B2
0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$
4	$26,41 \pm 0,02$	$23,00 \pm 0,02$
8	$50,99 \pm 0,04$	$49,15 \pm 0,03$
12	$81,73 \pm 0,01$	$71,88 \pm 0,04$
16	$93,96 \pm 0,01$	$90,80 \pm 0,01$
20	$104,86 \pm 0,01$	$102,76 \pm 0,01$
24	$119,84 \pm 0,00$	$118,40 \pm 0,01$

Growth yield

Nilai *growth yield* pada proses fermentasi tahap pertama dengan perlakuan A1, A2 dan A3 hingga mencapai konsentrasi yeast tertinggi berturut-turut sebesar $0,031 \pm 0,002$; $0,033 \pm 0,003$ dan $0,032 \pm 0,005$. Kondisi fermentasi A2 memiliki nilai *growth yield* yang paling tinggi dibandingkan kondisi A1 dan A3. Nilai *growth yield* tertinggi masing-masing perlakuan diperoleh pada fermentasi jam ke 16-20. Hal tersebut dikarenakan jumlah substrat pada media masih melimpah yang mendukung peningkatan pertumbuhan yeast menjadi lebih pesat dibandingkan dengan fermentasi jam ke 24. *S. cerevisiae* dapat memfermentasi molases dengan kadar gula 170 g/L sehingga menghasilkan nilai *growth yield* sebesar 0,24 yang akan terus mengalami penurunan hingga 0,019

di akhir proses fermentasi akibat adanya reaksi inhibisi oleh produk (Echegaray *et al.*, 2000).

Proses fermentasi tahap kedua dilakukan berdasarkan perlakuan terbaik dari tahap pertama (A2). Nilai *growth yield* dengan kondisi fermentasi B1 dan B2 hingga mencapai konsentrasi sel tertinggi berturut-turut sebesar $0,031 \pm 0,000$ dan $0,029 \pm 0,003$. Proses fermentasi dengan perlakuan B2 tidak memiliki perbedaan nilai *growth yield* yang signifikan dengan proses fermentasi perlakuan B1. Hal tersebut diduga karena pada perlakuan agitasi sebesar 200 dan 300 rpm terbentuk buih selama proses fermentasi berlangsung, sehingga pertumbuhan yeast tidak optimal.

Jumlah Etanol dan Produktivitas Etanol

Fermentasi bioetanol tergolong dalam tipe fermentasi pertumbuhan terpadu yaitu peningkatan jumlah populasi berjalan seiring dengan peningkatan jumlah produk (**Tabel 5** dan **6**). Pada perlakuan A1 dan A3 etanol mengalami kenaikan hingga hingga fermentasi jam ke 20 sebesar $4,18 \pm 0,47\%$ dan $4,52 \pm 0,45\%$, kemudian menurun hingga akhir proses fermentasi. Penurunan tersebut dikarenakan ketersediaan substrat yang semakin menipis serta keberadaan etanol yang bersifat toksik yang menyebabkan kerja yeast tidak optimal. Pada perlakuan A2 etanol yang dihasilkan sebesar $5,43 \pm 0,37\%$. Perlakuan A2 merupakan perlakuan terbaik pada tahap pertama yang mampu mendorong yeast untuk memproduksi etanol. Produktivitas etanol tertinggi yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae* strain FNCC 3210 dengan kondisi A1, A2 dan A3 berturut-turut yaitu $2,39 \pm 0,57$ g/L/jam; $2,83 \pm 0,05$ g/L/jam dan $2,18 \pm 0,20$ g/L/jam.

Tabel 5. Produksi etanol selama fermentasi tahap pertama

Lama fermentasi (Jam)	Etanol (%)		
	A1	A2	A3
0	2,23 ± 0,06	3,01 ± 0,05	0,15 ± 0,05
4	0,69 ± 0,05	0,76 ± 0,07	0,50 ± 0,13
8	1,50 ± 0,09	2,02 ± 0,52	1,37 ± 0,39
12	2,73 ± 0,27	3,70 ± 0,11	2,48 ± 0,30
16	4,06 ± 0,85	4,38 ± 0,34	3,34 ± 0,44
20	4,18 ± 0,47	5,10 ± 0,35	4,52 ± 0,45
24	3,92 ± 0,40	5,43 ± 0,37	4,29 ± 0,53

Pada fermentasi bioetanol tahap kedua dengan kondisi B1 dan B2 mampu dihasilkan etanol hingga sebesar $4,62 \pm 0,15$ % dan $4,55 \pm 0,25$ %. Etanol yang dihasilkan pada perlakuan B1 dan B2 tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal tersebut diduga karena adanya perlakuan agitasi yang tinggi sebesar 200 dan 300 rpm selama proses fermentasi pada media molases dapat menghambat pertumbuhan yeast sehingga produksi metabolit berupa etanol juga menurun.

Tabel 6. Produksi etanol selama fermentasi tahap kedua

Lama fermentasi (Jam)	Etanol (%)	
	B1	B2
0	0,31 ± 0,09	0,29 ± 0,01
4	0,72 ± 0,12	0,66 ± 0,01
8	1,88 ± 0,61	1,78 ± 0,73
12	3,29 ± 0,42	3,12 ± 0,11
16	4,01 ± 0,44	3,71 ± 0,35
20	4,62 ± 0,15	4,41 ± 0,34
24	4,54 ± 0,06	4,55 ± 0,25

KESIMPULAN

Etanol tertinggi dihasilkan oleh *S. cerevisiae* FNCC 3210 selama fermentasi pada tahap pertama dengan variasi perlakuan aerasi A2 (0,3 vvm) yaitu sebesar 5,43 %. Etanol tertinggi pada tahap

kedua dihasilkan oleh *S. cerevisiae* FNCC 3210 dengan variasi perlakuan agitasi B1 yaitu sebesar $4,62 \pm 0,15$ %.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, K.W., dan Fenty, N.E.P. 2013. Produksi etanol dari tetes tebu oleh *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok (NRRL-Y 265). *Jurnal Agritech*, 33 (2).
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribealarea, J.L., Goma, C., Molina-Jouve, C., dan Guillouet, S.E. 2004. Aeration strategy: A Need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology Biotechnology*, 63: 537–542.
- Bailey., James, E., dan David, F.O. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., Singapura.
- Christakopoulos, P., Xiros, C. 2009. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnology for Biofuels*, 2 (4).
- Choiron, M., Jayus., dan Sony. S. 2013. Pengaruh ketersediaan oksigen pada produksi epiglukan oleh *Epicoccum nigrum* menggunakan media molases . *Jurnal Agrotek*, 7 (1).
- Desrosier. 1989. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Penerjemah M. Muljohardjo. UI-Press, Jakarta.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Firdausi, Z.N., Samodra, B.N., dan Hargono. 2013. "Pemanfaatan Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Untuk Produksi Bioetanol Fuel Grade Melalui Proses Disriliasi Dehidrasi Menggunakan Zerolit Alam". Skripsi. (<http://www.e-jurnal.com/2013/10/pemanfaatan-pati-singkong-karet-manihot.html>) (Diakses tanggal 25 September 2014).

- Echegaray, O.E., Carvalho, J.C.M., Fernandes, A.N.R., Sato, S., Aquarone, E., and Vitolo, M. (2000). Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: Invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. *Journal of Biomass and Bioenergy*, 19 (1): 39-50.
- Gross, T., Faul, J., Ketteridge, S., and Springham, D. 1995. *Introductory Microbiology I*. Chapman and Hill Boundry Row, London.
- Hemamalini, V., Saraswathy, S.G.E., Hema, C., dan Geetha, S. 2012. Comparative study of continous ethanol fermentation from molasses by using *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Research Article*. ISSN 2250-1770.
- Hidayat, N.M. dan Suhartini .2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi, Jakarta.
- Jeffries, T.W. and Jin, Y.S. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv. Appl. Microbiology*, 47: 221-268.
- Judoamidjojo, M., Darwis, A.A., dan Sa'id, E.G. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Press, Jakarta.
- Juwita, Ratna. 2012. "Studi Produksi Alkohol Dari Tetes Tebu (*Saccharum officinarum* L.) selama Proses Fermentasi". Skripsi. (<http://www.repository.unhas.ac.id/bitstream/handle/.../1563/skripsi...> P DF) [Diakses tanggal 26 September 2014].
- Kartika, B., Guritno, A.D., Purwadi, D., dan Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Khongsay, Laopaiboon, Jaisil, dan Laopiboon, P. 2012. Optimization of agitation and aeration for very high gravity ethanol fermentation from sweet sorghum juice by *Sacchamycetes cerevisiae* using an orthogonal array design. *Journal of Energies*, 5: 561-576.
- Kurniawan, Juhanda, Syamsudin dan Lukman. 2011. "Pengaruh Jenis Pengaduk pada Fermentasi Etanol SEcara Sinambung dalam Bioreaktor Tangki Berpengaduk Sel Tertambat". Fakultas Teknologi Itenas Bandung, Bandung.
- Liu, R., Mei. X., Shen F dan Wu. H. 2009. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from stalk juice of sweet sorgum by immobilized yeast using reponse surface methodology. *Energy and Fuels*, 23(1): 487-491.
- Miller, G.L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination of Reducing Sugar". Dalam Mayzuhroh, A. 2015. "Produksi Bioetanol Menggunakan Starter Komersial dengan dan Tanpa Pemberian Aerasi dan Agitasi Pada Media Molases". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Jember.
- Patrascu, E., Rapeanu, G., Bonciu, C dan Hopulele, T. 2009. bioethanol production from molasses by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 20(2): 199-204.
- Savitri, D. A. 2010. "Pemanfaatan Limbah Cair Pulp Buah Kakao Sebagai Bahan Baku Produksi Bioetanol". Skripsi. THP FTP Universitas Jember, Jember.
- Schlegel, H.G. 1994. *Mikrobiologi Umum*. UGM Press, Yogyakarta.
- Sener, A., Chambas. A., and Onal, O. 2007. Effect of Fermentation Temperature of Kinetic Growth Sacchoromycsess *cerevisiae*. University of Cukurova Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering, Balcali, Adana-Turkey.
- Siregar, Slamet, Riyadi, dan Laeli. 1992. *Pengolahan dan Pemasaran Cokelat*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Stanburry, P. F. and Whitaker, A. 1990. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press, Oxford.

- Suliantari dan Rahayu, W.P. 1990. *Teknologi Fermentasi Umbi- Umbian dan Biji-Bijian*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
- Suwasono, S., Fauzi, M., Lindriati, T. 2002. *Teknologi Fermentasi*. Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember, Jember.
- Walker, G. M. 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Willey & Son. Chicester NY Weinheim Brisbane Toronto.
- Wasito. 2005. Proses pembuatan etanol. (<http://www.suaramerdeka.co.id>) [Diakses tanggal 25 September 2014].
- Winarno, F.G. dan Fardiaz, S. 1984. *Biofermentasi dan Biosintesa Protein*. Angkasa, Bandung.
- Xin, Yongfei, Zouying dan Zouygui. 2003. The Effect of Effect of Different Substrate Concentration on Ethanol Fermentation. *Fd Fermen Indus*,29:21-23.
- Yan, L., Tiansheng, Q., Naikun, S., Mingzhe, G., Yanling, G., dan Hai, Z. 2009. Improvement of ethanol concentration and yield by initial aeration and agitation culture in very high gravity fermentation. *Chin J Appl Environ Biol.*, 15 (4): 563-567.
- Yingling, B., Zongcheng, Y., Honglin, W., dan Li, C. 2011. Optimization of bioethanol production during simultaneous saccharification and fermentation in very high gravity cassava mash. *Springer Science+Business Media Antonie Van Leeuwenhoek*, 99: 329-339.
- Zayet, G.Z.A. dan Foley, J. 1987. The Influence of fermentation conditions on ethanol yields from sugar beet molasses and fodder beet juice using *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Irish Journal Food Science and Technology*, 11: 119-133.