

OPTIMASI WAKTU FERMENTASI PRODUKSI BIOETANOL DARI DEDAK SORGHUM MANIS (*SORGHUM BICOLOR L*) MELALUI PROSES ENZIMATIS

Abdullah Bin Arif, Agus Budiyanto, Wahyu Diyono dan Nur Richana

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian
Email: *ab.arif.pascapanen@gmail.com*

(Diterima 21-06-2017, Disetujui 29-09-2017)

ABSTRAK

Salah satu energi baru terbarukan (EBT) yang potensial untuk dikembangkan adalah bioetanol. Bioetanol merupakan salah satu EBT yang banyak dipertimbangkan sebagai bahan bakar pengganti minyak bumi. Sorghum merupakan tanaman yang dapat dijadikan sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol. Tujuan penelitian ini yaitu untuk memperoleh konsentrasi enzim terbaik saat hidrolisis dan waktu fermentasi yang optimum pada produksi bioetanol dari dedak sorgum manis. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor pada bulan Januari-Mei 2016. Bahan-bahan yang digunakan meliputi dedak sorgum manis, enzim amilase, enzim glukoamilase dan *Saccharomyces cerevisiae*. Pada penelitian ini terdapat tiga tahapan kegiatan, yang meliputi: Karakterisasi bahan baku, optimasi hidrolisis enzimatis pada produksi gula dari dedak sorgum, optimasi pengaruh perlakuan penambahan konsentrasi enzim (α -amilase dan glukoamilase) dan lama fermentasi pada produksi bioetanol dari dedak sorgum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dedak sorgum manis dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol dengan waktu fermentasi optimum selama 48 jam dengan penambahan konsentrasi enzim α -amilase : glukoamilase (0,5 : 1,5) ml/kg dengan hasil rendemen sebanyak 20,88%.

Kata kunci: dedak sorgum manis, bioetanol, enzimatis, fermentasi.

ABSTRACT

Abdullah Bin Arif, Agus Budiyanto, Wahyu Diyono dan Nur Richana. 2017. Optimization fermentation period for bioethanol production from sweet sorghum bran with enzymatic process.

One of the renewable energy potential to be developed is bioethanol. Bioethanol is one of the many renewable energy considered as petroleum substitute. Sorghum is a plant that can be used as raw material for bioethanol production. The aim of this research is to obtain the best concentration of enzymes during hydrolysis and optimum fermentation time on bioethanol production from sweet sorghum bran. The study was conducted at the Laboratory of Indonesian Center for Agricultural Postharvest Research and Development, Bogor from January to May 2016. The materials used sweet sorghum bran, amylase enzyme, glucoamylase enzyme and *Saccharomyces cerevisiae*. There are three stages: Characterize of raw materials, optimization of enzymatic hydrolysis for sugar production from sweet sorghum bran, optimizing the effect of enzyme concentration (α -amylase and glucoamylase) and fermentation periods on bioethanol production from sweet sorghum bran. The results showed that sweet sorghum bran can be used as raw material for making bioethanol with optimum fermentation time for 48 hours with added enzyme α -amylase: glucoamylase concentrations (0.5: 1.5) ml / kg that can be produced yield of 20.88%.

Key words: sweet sorghum bran, bioethanol, enzymatic, fermentation

PENDAHULUAN

Energi sangat diperlukan dalam menjalankan aktivitas perekonomian Indonesia, baik untuk kebutuhan konsumsi maupun untuk aktivitas produksi berbagai sektor perekonomian. Sebagai sumberdaya alam, energi harus dimanfaatkan sebesar-besarnya bagi kemakmuran masyarakat dan pengelolaannya harus mengacu pada asas pembangunan berkelanjutan. Dari aspek penyediaan, Indonesia merupakan negara yang kaya

dengan sumberdaya energi baik energi yang bersifat *unrenewable resources* maupun yang bersifat *renewable resources*. Namun demikian, eksplorasi sumberdaya energi lebih banyak difokuskan pada energi fosil yang bersifat *unrenewable resources* sedangkan energi yang bersifat *renewable* (energi baru dan terbarukan) relatif belum banyak dimanfaatkan. Padahal penggunaan bahan bakar fosil dapat menyebabkan peningkatan emisi gas rumah kaca yang sangat berbahaya untuk kehidupan^{1,2}. Sejak tahun 2004 produksi minyak Indonesia lebih

rendah daripada kebutuhan konsumsinya³. Kondisi ini menyebabkan ketersediaan energi fosil, khususnya minyak mentah, semakin langka yang menyebabkan Indonesia saat ini menjadi negara pengimpor bahan bakar minyak dari fosil. Menurut Kementerian ESDM³ menyatakan bahwa cadangan energi minyak mentah Indonesia hanya dapat diproduksi atau akan habis dalam kurun waktu 22,99 tahun, gas selama 58,95 tahun dan batubara selama 82,01 tahun. Hasil perhitungan ini menggunakan asumsi bahwa tidak ditemukan lagi ladang-ladang baru sebagai sumber energi fosil. Salah satu cara untuk mengatasi permasalahan tersebut yaitu eksplorasi sumberdaya energi baru dan terbarukan (EBT).

Salah satu EBT yang potensial untuk dikembangkan adalah penggunaan bioetanol. Bioetanol merupakan salah satu EBT yang banyak dipertimbangkan sebagai bahan bakar substitusi minyak bumi⁴. Penggunaan etanol sebagai bahan bakar substituen akan menurunkan emisi gas berbahaya (CO, NO, dan SO₂) dan menghasilkan gas rumah kaca yang sangat rendah bila dibandingkan dengan pembakaran minyak bumi. Bioetanol diketahui dapat menjadi campuran bensin untuk bahan bakar kendaraan bermotor dengan keunggulan nilai angka oktan dan panas penguapan⁵. Menurut Bustaman⁶ penggunaan etanol mempunyai beberapa keunggulan yaitu: kandungan oksigen yang tinggi mencapai 35% sehingga jika dibakar sangat bersih, ramah lingkungan karena tidak memberikan kontribusi pada akumulasi karbon dioksida di atmosfer dan bersifat terbarukan. Bahan baku bioetanol secara umum dapat berupa bahan yang mengandung gula, pati dan lignoselulosa^{7,8}. Sorgum merupakan tanaman yang dapat menghasilkan ketiga bahan baku bioetanol tersebut. Beberapa penelitian bioetanol dari sorgum sudah banyak dilakukan baik dari bijinya sebagai sumber pati^{9,10}, nira sebagai sumber gula^{11,12,13}, maupun biomasnya sebagai sumber lignoselulosa^{14,15,16}, namun produk samping sorgum yang berupa dedak belum banyak dilakukan sebagai bahan untuk bioetanol.

Jumlah dedak sorgum dari biji sorgum yang disosoh dapat mencapai 15-20% dari total berat biji sorgum, namun jumlah dedak sorgum tersebut dapat meningkat jika penyosohan biji sorgum dilakukan lebih dari 2 kali penyosohan khususnya jenis sorgum merah. Dedak sorgum banyak mengandung senyawa fenol yang belum banyak dimanfaatkan secara optimum^{17,18}. Oleh karena itu, dedak sorgum sangat potensial untuk dijadikan sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol.

Secara umum produksi bioetanol dari karbohidrat (pati) melalui tiga tahapan yaitu hidrolisis, fermentasi dan destilasi (pemurnian)^{19,20}. Hidrolisis enzimatis

memiliki keuntungan tidak menghasilkan produk samping yang dapat menghambat proses fermentasi^{21,12,23}. Secara umum biasanya hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim-enzim amilolitik seperti α -amilase dan amiloglukosidase untuk menghasilkan gula (glukosa) sebagai substrat fermentasi^{24,25}. Pada proses fermentasi umumnya menggunakan kultur tunggal *Saccharomyces cereviceae*²⁶. Waktu fermentasi sangat mempengaruhi pada produksi bioetanol yang dihasilkan. Tujuan penelitian ini yaitu untuk memperoleh konsentrasi enzim terbaik saat hidrolisis dan waktu fermentasi yang optimum pada produksi bioetanol dari dedak sorgum.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor pada bulan Januari-Mei 2016. Bahan-bahan yang digunakan meliputi dedak sorgum manis varietas Numbu, yeast (*Saccharomyces cereviceae*), standar glukosa, fenol 5%, H₂SO₄ pekat, selenium, n-heksana, larutan Luff Schoorl, Na₂S₂O₃ 0.1N, indikator kanji 1%, H₃BO₄ 4%, indikator Bromokeresol Hijau-Merah Metil (BCG-MM), HCl 0.01M, KI 30%, H₂SO₄ 25 %v/v, KI 10 %b/v, kertas saring, kapas, aquades, enzim α -amilase, enzim glukoamilase, batu didih, dan aluminium foil. Alat-alat yang digunakan meliputi buret, saringan 100 mesh, tanur *Automatic Muffle Furnance* MFP-300N, oven Memmert, spektrofotometer UV-VIS *Agilent Technologies Cary 60*, kuvet, sokhlet Soxtec System HT 1043, *Atomic Nitrogen Determinator*, perangkat destilasi, perangkat dekstruksi, neraca analitik *Precisa* XT 220A, termometer, pH meter *portable* HI 2211/ORP Meter, refraktometer *atago automatic*, dan alkoholmeter.

Pada penelitian ini terdapat tiga tahapan kegiatan, yang meliputi: 1). Karakterisasi bahan baku, 2). Optimasi hidrolisis enzimatis pada produksi gula dari dedak sorgum manis 3). Optimasi pengaruh perlakuan penambahan konsentrasi enzim (α -amilase dan glukoamilase) dan lama fermentasi pada produksi bioetanol dari dedak sorgum.

I. Karakterisasi bahan baku

Pada tahapan ini dedak sorgum diayak terlebih dahulu untuk menghilangkan pengotornya dengan alat penyaring dan dikeringkan dalam alat pengering selama 2 jam pada suhu 60 °C. Dedak sorgum yang sudah dibersihkan selanjutnya dilakukan analisa terhadap beberapa parameter yang meliputi kadar air, kadar lemak, kadar protein, kadar abu dan kadar karbohidrat serta pati²⁷.

II. Optimasi hidrolisis enzimatis terhadap produksi gula dari dedak sorgum

Pada tahapan ini menggunakan rancangan percobaan split plot dengan rancangan lingkungan RKLTL (rancangan kelompok lengkap teracak). Perlakuan penambahan konsentrasi enzim α -amilase sebagai petak utama yang terdiri dari 3 taraf (0,5; 1,0 dan 1,5 ml/kg). Perlakuan penambahan konsentrasi enzim glukoamilase sebagai anak petak yang terdiri dari 3 taraf (0,5; 1,0 dan 1,5 ml/kg). Setiap perlakuan diulang sebanyak 2 ulangan, sehingga diperoleh 18 satuan percobaan. Adapun proses hidrolisis enzimatis dari dedak sorgum manis sebagai berikut: dedak sorgum manis ditimbang sebanyak 400 g setiap satuan percobaan, kemudian ditambahkan air sebanyak 2 liter dan diaduk hingga homogen serta dipanaskan hingga suhu mencapai 100 °C, namun pada saat suhu larutan sudah mencapai 60-70 °C ditambahkan enzim α -amilase sesuai perlakuan (0,5; 1,0; 1,5 ml/kg). Setelah itu larutan disimpan di suhu ruang hingga suhu mencapai 60 °C dan lakukan penambahan enzim glukoamilase sesuai perlakuan (0,5; 1,0; 1,5 ml/kg). Larutan pada point c selanjutnya diinkubasi selama 24 jam, sehingga dihasilkan larutan hasil hidrolisis secara enzimatis. Pengamatan yang dilakukan meliputi total padatan terlarut (TPT), pH dan kadar gula total. Pengamatan TPT menggunakan alat ukur refractometer, pengamatan pH menggunakan pH meter, dan pengukuran kadar gula total menggunakan metode fenol-asam sulfat.

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dan pengukuran selanjutnya dianalisis menggunakan analisis ragam dan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat perlakuan penambahan konsentrasi enzim yang terbaik. Namun jika hasil analisis menunjukkan tidak adanya perbedaan dari semua perlakuan, maka semua perlakuan yang diujicobakan dilanjutkan ke proses selanjutnya yaitu proses fermentasi hingga destilasi (tahapan III) untuk menghasilkan alkohol.

III. Optimasi pengaruh perlakuan penambahan konsentrasi enzim (α -amilase dan glukoamilase) dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol dari dedak sorgum.

Pada tahapan ini menggunakan rancangan percobaan split-split plot dengan rancangan lingkungan RKLTL (rancangan kelompok lengkap teracak). Perlakuan penambahan konsentrasi enzim α -amilase sebagai petak utama yang terdiri dari 3 taraf (0,5; 1,0 dan 1,5 ml/kg). Perlakuan penambahan konsentrasi enzim glukoamilase sebagai anak petak yang terdiri dari 3 taraf (0,5; 1,0 dan

1,5 ml/kg). Perlakuan waktu fermentasi sebagai anak-anak petak yang terdiri dari 3 taraf (24, 48 dan 72 jam). Setiap perlakuan diulang sebanyak 2 ulangan, sehingga diperoleh 54 satuan percobaan. Pada saat proses fermentasi larutan hasil proses hidrolisis enzimatis ditambahkan urea dan *Saccharomyces cereviceae* sebanyak 2 g, hal ini mengikuti hasil penelitian yang diperoleh Arif *et al.*²⁸ dan Arif *et al.*²⁹ yang memperoleh rendemen bioetanol tertinggi dari molases tebu dan tongkol jagung yaitu dengan penambahan urea dan *Saccharomyces cereviceae* sebanyak 2 g. Adapun proses produksi bioetanol dari dedak sorgum manis sebagai berikut: Larutan hasil hidrolisis enzimatis ditambahkan *Saccharomyces cereviceae* sebanyak 2 g dan difermentasi selama 24, 48 dan 72 jam kemudian dilakukan pengukuran TPT dan pH. Larutan hasil fermentasi didestilasi selama 3 jam sehingga dihasilkan bioethanol kemudian dilakukan pengukuran volume bioetanol, kadar alkohol dan rendemen bioetanol.

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan dan pengukuran selanjutnya dianalisis menggunakan analisis ragam dan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat perlakuan terbaik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

I. Karakterisasi bahan baku

Analisis proksimat dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui kadar air, abu, protein, lemak, karbohidrat dan kadar pati pada sampel dedak sorgum manis. Kadar karbohidrat dedak sorgum sebesar 72,05%, kandungan tersebut sangat memungkinkan untuk dijadikan sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol. Sebayang *et al.*¹⁰ memperoleh kandungan karbohidrat biji sorgum sebesar 73,10%, kandungan tersebut sangat potensial sebagai bahan untuk produksi bioetanol. Kadar pati yang tinggi pada dedak sorgum manis berpotensi untuk pembuatan bioetanol. Selain kadar karbohidrat dan pati, kadar abu merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi terhadap rendemen alkohol yang dihasilkan. Syarat kadar abu suatu bahan baku untuk produksi bioetanol yaitu jika bahan baku tersebut tidak mengandung kadar abu lebih dari 10%³⁰. Kadar abu yang tinggi dapat menghambat proses fermentasi dan menyebabkan kerak pada alat saat proses destilasi³⁰. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar abu dedak sorgum sebesar 2,48% (Tabel 1). Kadar abu dedak sorgum tersebut masih sangat layak untuk dijadikan sebagai bahan baku untuk bioetanol.

Tabel 1. Karakteristik dedak sorgum manis
 Table 1. Characteristic of sweet sorghum bran

Parameter/parameter	Kadar/value (%)
Air/moisture	11,00 ± 0,53
Abu/ash	2,48 ± 0,05
Protein/protein	9,67 ± 0,34
Lemak/lipid	4,80 ± 0,35
Karbohidrat/carbohydrate	72,05 ± 2,31
Pati/starch	55,87 ± 0,14

II. Optimasi hidrolisis enzimatis terhadap produksi gula dari dedak sorgum

Hidrolisis pati adalah proses pemecahan molekul amilum menjadi bagian-bagian penyusun amilum yang lebih sederhana seperti dekstrin, isomaltosa, maltosa dan glukosa. Hidrolisa enzim dilakukan menggunakan

bantuan enzim α -amilase dan enzim glukoamilase (amiloglukosidase). Proses hidrolisis secara enzimatis terbagi menjadi dua proses yaitu liquifikasi dan sakarifikasi. Liquifikasi merupakan proses mengubah pati mejadi gula kompleks (dekstrin). Sedangkan sakarifikasi adalah proses mengubah dekstrin menjadi gula sederhana (glukosa). Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh suhu dan pH lingkungannya, umumnya setiap enzim mempunyai kisaran suhu dan pH optimum yang berbeda-beda³¹. Pada konsentrasi enzim yang rendah, laju hidrolisis pati menjadi glukosa berlangsung lambat. pH optimum enzim berkisar 5,2 – 5,6. Pada penelitian ini pH yang diperoleh pada larutan dedak yang sudah diencerkan berkisar antara 5,18 – 5,75 (Tabel 2), pH tersebut masih termasuk dalam kategori pH optimum agar enzim dapat beraktivitas secara sempurna.

Tabel 2. Total padatan terlarut, gula total dan pH pada larutan dedak sorgum manis hasil dari proses hidrolisis enzimatis
 Table 2. Total soluble solute(TSS), total sugar and pH at sweet sorghum bran substrat result from hydrolysis enzymatic process

Parameter/ parameter	Konsentrasi α -amilase/ α - amylase concentrations (ml/kg)	Konsentrasi Glukoamilase/ Glucoamylase concentration (ml/kg)			Rata-rata/ average
		0,5	1,0	1,5	
TPT/TSS (^o Brix)	0,5	10,53 ^b (B)	10,00 ^c (B)	12,30 ^a (A)	10,94 ^B
	1,0	11,80 ^a (A)	12,00 ^a (A)	10,00 ^b (C)	11,27 ^A
	1,5	12,00 ^a (A)	10,20 ^c (B)	10,93 ^b (B)	11,04 ^B
	Rata-rata/ average	11,44 ^a	10,73 ^b	11,08 ^{ab}	
Gula total/ total sugar (%)	0,5	6,10 ^b (A)	4,69 ^c (B)	6,98 ^a (A)	5,92 ^A
	1,0	3,89 ^b (B)	4,65 ^a (B)	3,94 ^b (B)	4,16 ^B
	1,5	3,99 ^b (B)	6,58 ^a (A)	6,29 ^a (A)	5,62 ^A
	Rata-rata/ Average	4,66 ^c	5,31 ^b	5,74 ^a	
pH/pH	0,5	5,50 ^a (A)	5,24 ^a (A)	5,27 ^a (A)	5,34 ^A
	1,0	5,40 ^a (A)	5,23 ^a (A)	5,75 ^a (A)	5,46 ^A
	1,5	5,60 ^a (A)	5,18 ^a (A)	5,40 ^a (A)	5,39 ^A
	Rata-rata/ average	5,50 ^a	5,22 ^a	5,47 ^a	

Keterangan/remarks: angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris yang sama dan huruf kapital yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% /Means in the same line sharing the same letters or means in the same column sharing the same capital letters did not differ significantly according to Duncan at 0.05 level

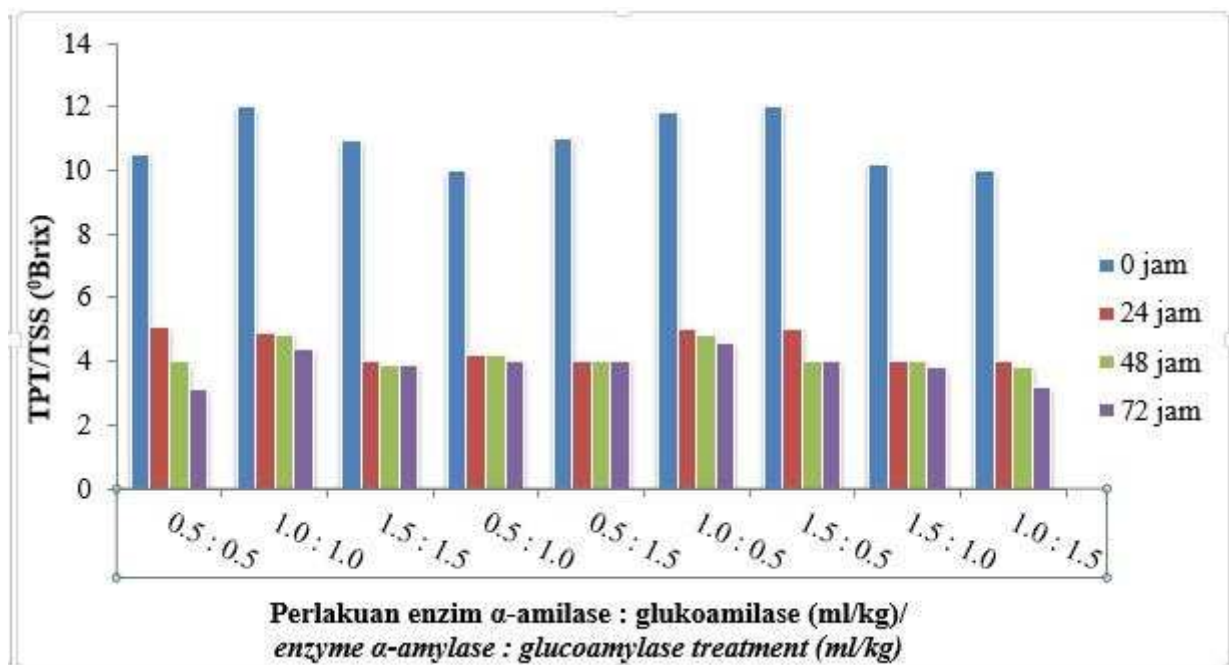
Hasil hidrolisis enzimatis pada larutan dedak sorgum dapat menghasilkan total padatan terlarut (TPT) berkisar antara 10,00 – 12,30 °Brix, dan gula total berkisar antara 3,89 – 6,98 % (Tabel 2). Nilai gula total yang dihasilkan dari proses hidrolisis tersebut masih tergolong rendah, hal ini diduga karena tidak semua bahan dapat terhidrolisis melalui proses enzimatis terutama serat³². Hal tersebut disebabkan oleh kandungan dedak sorgum yang tidak hanya pati (amilosa dan amilopektin) tetapi juga serat (selulosa dan hemiselulosa), sedangkan enzim α -amilase dan glukoamilase hanya mampu mengurai rantai α -1,4 dan α -1,6 glikosida pada amilosa dan amilopektin saja. Dengan demikian glukosa pada selulosa yang terikat pada rantai β -1,4 glikosida tidak dapat terurai. Namun dengan kandungan gula total tersebut dapat dilanjutkan untuk proses produksi bioetanol.

III. Optimasi pengaruh perlakuan penambahan konsentrasi enzim (α -amilase dan glukoamilase) dan lama fermentasi terhadap produksi bioetanol dari dedak sorgum.

Lama fermentasi merupakan faktor penting dalam produksi bioetanol. Hal ini karena *Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan waktu yang cukup untuk dapat menghidrolisis gula menjadi etanol. Lama fermentasi sangat berpengaruh terhadap kadar alkohol/etanol yang

akan dihasilkan^{33,34,35,36}. Semakin lama waktu fermentasi, kemampuan *Saccharomyces cerevisiae* untuk memecah gula/glukosa yang ada menjadi alkohol semakin besar^{37,38}.

Nilai pH mengalami penurunan seiring dengan semakin lamanya proses fermentasi (Gambar 1). Perubahan penurunan pH tersebut berkisar antara 0,3 – 1,76 (Tabel 3). Namun nilai pH yang berkisar antara 3,64 – 5,95 masih termasuk dalam kategori pH optimum untuk proses produksi bioetanol. Penurunan nilai pH ini dikarenakan pada saat proses produksi etanol oleh ragi juga dihasilkan produk samping lainnya seperti asetaldehid dan CO₂ sebagai hasil akhir pemecahan piruvat. Hal senada dinyatakan oleh Cahyani *et al.*³⁹ yang menyatakan bahwa asetaldehid dan karbondioksida yang dihasilkan selama proses produksi etanol dapat menurunkan pH larutan. Ghori *et al.*⁴⁰ menyatakan bahwa penurunan pH selama fermentasi dapat disebabkan oleh ionisasi H⁺. Dalam medium fermentasi akan terdisosiasi menjadi ion NH₄⁺. *Saccharomyces cerevisiae* mengkonsumsi senyawa ini untuk membentuk massa sel dalam bentuk R-NH₃⁺. Pengikatan NH₃⁺ akan melepaskan H⁺ ke lingkungannya, sehingga selama fermentasi, ion H⁺ pada media fermentasi akan semakin banyak dan mengakibatkan penurunan pH selama proses fermentasi.

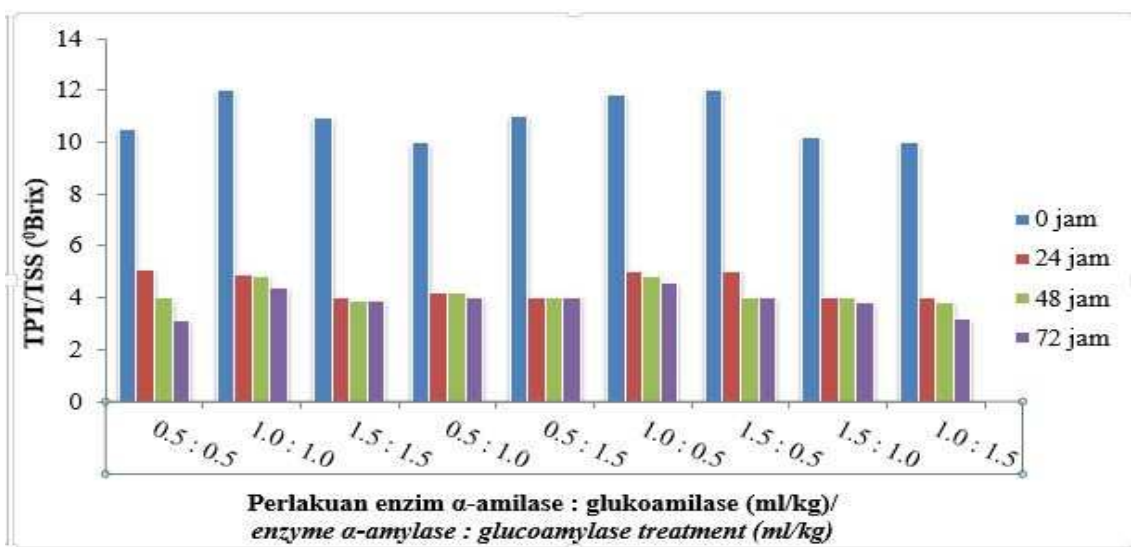


Gambar 1. pH pada beberapa perlakuan penambahan enzim dan lama fermentasi
Figure 1. pH at several addition of enzyme and fermentation period treatments

Terjadinya penurunan nilai pH pada saat proses fermentasi disebabkan juga karena aktivitas yeast *S. cereviceae* mengalami fase penyesuaian dimana yeast akan menyesuaikan diri terlebih dahulu dengan lingkungan sekitarnya sehingga menghasilkan enzim yang dapat merombak gula menjadi alkohol. Selain itu, terjadi pula perubahan senyawa kimia dalam larutan substrat, perubahan ini dibantu oleh aktivitas enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi asam amino dan polipeptida lain⁴¹. Fermentasi akan menghasilkan etanol sebagai produk utama. Selain itu akan dihasilkan juga karbondioksida dan asam-asam organik seperti asam piruvat, asam suksinat, asam laktat dan asam-asam lainnya. Asam-asam yang dihasilkan sebagai produk sampingan inilah yang membuat pH larutan semakin rendah.

Pada tahapan ini pengamatan gula diprediksi nilainya melalui kadar TPT, hal ini berdasarkan Tabel 2 yang menunjukkan nilai kadar gula total berbanding lurus dengan kadar TPT. Nilai kadar TPT semakin menurun dengan semakin lamanya waktu fermentasi (Gambar 2). Penurunan kadar TPT tertinggi cenderung terjadi pada perlakuan waktu fermentasi selama 3 hari yaitu berkisar antara 5,60 – 8,00 pada semua perlakuan penambahan konsentrasi enzim (Tabel 4). Hal ini disebabkan oleh kandungan gula dalam substrat dijadikan sebagai salah satu nutrisi yang dibutuhkan oleh *S. cereviceae* sebagai sumber karbonnya (C) untuk produksi etanol. Menurut Azizah *et al.*³³ bahwa *S. cereviceae* dapat mengkonversi gula menjadi etanol karena adanya enzim invertase dan zimase. Dengan adanya enzim-enzim ini, *S. cereviceae*

memiliki kemampuan untuk mengkonversi baik gula dari kelompok monosakarida maupun dari kelompok disakarida. Jika gula yang tersedia dalam substrat merupakan gula disakarida maka enzim invertase akan bekerja menghidrolisis disakarida menjadi monosakarida. Setelah itu, enzim zymase akan mengubah monosakarida tersebut menjadi alkohol dan CO₂. Tinggi rendahnya glukosa juga mempengaruhi kadar alkohol yang dihasilkan. Proses perubahan glukosa menjadi alkohol dalam proses fermentasi dipengaruhi pula oleh aktivitas yeast. Aktivitas yeast banyak dipengaruhi oleh media dan kondisi lingkungan (suhu dan keasaman) dimana panas, konsentrasi ion hidrogen, air dan cahaya mempengaruhi aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Tinggi rendahnya kadar alkohol yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh cepat lambatnya sel yeast yang digunakan dalam fermentasi bahan. Optimalnya pertumbuhan yeast dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya komposisi media yang digunakan sebagai media pengembangbiakan mikroba mulai persiapan sampai fermentasi dapat berjalan optimum ketika pertumbuhan enzim maksimum dan ketersediaan substrat cukup. Menurut Purwoko⁴² kandungan air di dalam lingkungan mikroba juga dapat mempengaruhi sifat pertumbuhan mikroorganisme. Bila kandungan air di sekitar lingkungan tidak cukup, maka cairan di dalam sel mikroba mengalir keluar sehingga sel akan mengalami plasmolisis. Pada waktu plasmolisis metabolisme berhenti dan menyebabkan bahan yang terdapat dalam sel sangat pekat yang akhirnya akan menghambat aktivitas enzim, sehingga pertumbuhan yeast dapat beragam, ada yang cepat dan ada yang lambat.



Gambar 2. TPT pada beberapa perlakuan penambahan enzim dan lama fermentasi
 Figure 2. TSS at several addition of enzyme and fermentation period treatments

Optimasi Waktu fermentasi Produksi Bioetanol dari Dedak Sorghum Manis (*Sorghum Bicolor* L) melalui Proses Enzimatis

Tabel 4. Selisih TPT dedak sorgum manis sebelum dan setelah proses fermentasi
 Table 4. TSS difference of sweet sorghum bran substrat at before and after fermentation process

Konsentrasi α -amilase/ <i>α-amylase</i> concentrations (ml/kg)	Konsentrasi Glukoamilase/ <i>glucoamylase</i> concentrations (ml/kg)	Waktu fermentasi/ <i>fermentation periods</i> (jam/hours)			R a t a - r a t a / <i>average</i>
		24	48	72	
..... ⁰ Brix.....					
0,5	0,5	5,70 ^{b(B)}	6,40 ^{ab(B)}	7,30 ^{a(A)}	6,47 ^B
	1,0	5,00 ^{c(B)}	5,80 ^{b(C)}	6,00 ^{a(C)}	5,60 ^C
	1,5	7,00 ^{a(A)}	7,00 ^{a(A)}	7,00 ^{a(B)}	7,00 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	5,90 ^c	6,40 ^b	6,77 ^a	
1,0	0,5	6,80 ^{c(B)}	7,00 ^{b(A)}	7,20 ^{a(B)}	7,00 ^B
	1,0	7,00 ^{b(A)}	7,15 ^{b(A)}	7,60 ^{a(A)}	7,25 ^A
	1,5	6,00 ^{c(C)}	6,20 ^{b(B)}	6,80 ^{a(C)}	6,33 ^C
	Rata-rata/ <i>average</i>	6,60 ^c	6,78 ^b	7,20 ^a	
1,5	0,5	7,00 ^{b(A)}	8,00 ^{a(A)}	8,00 ^{a(A)}	7,67 ^A
	1,0	6,20 ^{b(B)}	6,20 ^{b(C)}	6,40 ^{a(C)}	6,27 ^C
	1,5	6,90 ^{a(A)}	7,00 ^{a(B)}	7,10 ^{a(B)}	7,00 ^B
	Rata-rata/ <i>average</i>	6,70 ^c	7,07 ^b	7,17 ^a	

Keterangan/remarks: angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris yang sama dan huruf kapital yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% / *Means in the same line sharing the same letters or means in the same column sharing the same capital letters did not differ significantly according to Duncan at 0.05 level*

Setelah dilakukan proses fermentasi maka dilanjutkan proses destilasi. Destilasi dilakukan untuk memisahkan etanol. Destilasi merupakan pemisahan komponen berdasarkan titik didihnya. Titik didih etanol murni adalah 78°C sedangkan air adalah 100°C (kondisi standar). Dengan memanaskan larutan pada suhu rentang 78 – 100 °C akan mengakibatkan sebagian besar etanol menguap, dan melalui unit kondensasi akan bisa dihasilkan etanol. Jumlah dan kadar alkohol yang dihasilkan dari proses destilasi sangat dipengaruhi oleh suhu dan alat yang digunakan. Volume alkohol yang dihasilkan berbanding terbalik dengan kadar alkohol hasil proses destilasi tahap I (Tabel 5 dan Tabel 6). Alkohol yang dihasilkan merupakan hasil dari aktivitas dari *Saccharomyces cerevisiae* yang menggunakan gula sederhana menjadi alkohol. Perbedaan kadar dan

volume alkohol yang dihasilkan tersebut diduga terdapat perbedaan pada temperatur alat destilasi yang digunakan. Semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi bioetanol yang dihasilkan juga semakin tinggi, akan tetapi setelah kondisi optimum tercapai, konsentrasi bioetanol yang diperoleh cenderung mengalami penurunan. Hal ini terlihat pada Tabel 5 yang menunjukkan bahwa lama fermentasi 2 hari menghasilkan kadar alkohol yang cenderung lebih tinggi dan mengalami penurunan saat lama fermentasi 3 hari pada semua perlakuan penambahan konsentrasi enzim. Adanya penurunan konsentrasi bioetanol diduga disebabkan karena bioetanol yang dihasilkan terkonversi menjadi asam-asam organik seperti asam asetat, asam cuka dan ester.

Tabel 5. Kadar alkohol hasil proses destilasi pertama

Table 5. Alcohol content result of first distillation

Konsentrasi α -amilase/ <i>α- amylase</i> concentrations (ml/ kg)	Konsentrasi Glukoamilase/ <i>glucoamylase</i> concentrations (ml/ kg)	Waktu fermentasi/ <i>fermentation periods</i> (jam/hours)			Rata-rata/ <i>average</i>
		24	48	72	
	%.....			
0,5	0,5	18,00 ^{a(A)}	21,50 ^{a(B)}	16,50 ^{a(B)}	18,67 ^B
	1,0	21,00 ^{b(A)}	37,00 ^{a(AB)}	35,50 ^{ab(AB)}	31,17 ^{AB}
	1,5	40,50 ^{a(A)}	42,50 ^{a(A)}	40,00 ^{a(A)}	41,00 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	26,50 ^b	33,67 ^a	30,67 ^a	
1,0	0,5	42,00 ^{c(A)}	49,50 ^{a(AB)}	46,00 ^{b(A)}	45,83 ^A
	1,0	52,50 ^{a(A)}	59,00 ^{a(A)}	53,00 ^{a(A)}	54,83 ^A
	1,5	40,00 ^{b(A)}	43,00 ^{a(B)}	39,50 ^{b(A)}	40,83 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	44,83 ^b	50,50 ^a	46,17 ^b	
1,5	0,5	35,00 ^{c(A)}	41,00 ^{a(A)}	38,00 ^{b(A)}	38,00 ^A
	1,0	37,50 ^{b(A)}	42,50 ^{a(A)}	38,50 ^{b(A)}	39,50 ^A
	1,5	41,00 ^{a(A)}	44,00 ^{a(A)}	38,00 ^{a(A)}	41,00 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	37,83 ^b	42,50 ^a	38,17 ^b	

Keterangan/remarks: angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris yang sama dan huruf kapital yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* pada taraf 5% / *Means in the same line sharing the same letters or means in the same column sharing the same capital letters did not differ significantly according to Duncan at 0.05 level*

Tabel 6. Volume bioetanol hasil proses destilasi pertama

Table 6. Bioethanol volume result of first distillation

Konsentrasi α -amilase/ <i>α- amylase</i> concentrations (ml/ kg)	Konsentrasi Glukoamilase/ <i>glucoamylase</i> concentrations (ml/ kg)	Waktu fermentasi/ <i>fermentation periods</i> (jam/hours)			Rata-rata/ <i>average</i>
		24	48	72	
	ml.....			
0,5	0,5	296,50 ^{a(A)}	160,00 ^{a(A)}	186,00 ^{a(A)}	214,17 ^A
	1,0	152,50 ^{b(A)}	218,00 ^{ab(A)}	237,00 ^{a(A)}	202,50 ^A
	1,5	203,00 ^{a(A)}	195,00 ^{a(A)}	201,00 ^{a(A)}	199,67 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	217,33 ^a	191,00 ^a	208,00 ^a	
1,0	0,5	181,00 ^{a(A)}	155,00 ^{b(B)}	156,00 ^{b(A)}	164,00 ^A
	1,0	85,00 ^{a(B)}	79,50 ^{a(C)}	104,50 ^{a(B)}	89,67 ^B
	1,5	161,00 ^{ab(A)}	175,00 ^{a(A)}	143,00 ^{b(A)}	159,67 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	142,33 ^a	134,50 ^a	136,50 ^a	
1,5	0,5	166,00 ^{b(A)}	177,00 ^{ab(B)}	196,00 ^{a(B)}	179,67 ^A
	1,0	193,00 ^{a(A)}	181,00 ^{a(A)}	198,00 ^{a(B)}	190,67 ^A
	1,5	180,00 ^{a(A)}	178,00 ^{a(AB)}	211,00 ^{a(A)}	189,67 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	179,67 ^b	178,67 ^b	201,67 ^a	

Keterangan/remarks: angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris yang sama dan huruf kapital yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* pada taraf 5% / *Means in the same line sharing the same letters or means in the same column sharing the same capital letters did not differ significantly according to Duncan at 0.05 level*

Optimasi Waktu fermentasi Produksi Bioetanol dari Dedak Sorghum Manis (*Sorghum Bicolor* L) melalui Proses Enzimatis

Rendemen alkohol yang dihasilkan diperoleh dari perhitungan volume alkohol yang dihasilkan pada kadar alkohol 99% dibagi dengan berat bahan baku (dedak sorgum sebanyak 400 g) yang digunakan. Perlakuan lama waktu fermentasi 48 jam cenderung menghasilkan rendemen alkohol yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lama waktu fermentasi yang lainnya (Tabel 7 dan Tabel 8). Semakin tinggi konsentrasi glukoamilase maka semakin tinggi pula rendemen alkohol yang dihasilkan kecuali pada perlakuan penambahan konsentrasi α -amilase 1,0 ml/kg (Tabel 8).

Secara umum volume dan rendemen alkohol tertinggi dihasilkan oleh perlakuan penambahan konsentrasi enzim α -amilase : glukoamilase (0,5 : 1,5 ml/kg) dengan lama waktu fermentasi selama 48 jam dengan yaitu 83,48 ml dan 20,88% (Tabel 7 dan Tabel 8). Produksi etanol dipengaruhi oleh konsumsi gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* pembentuk flok dan pertumbuhan inokulum selama fermentasi. Tinggi atau rendahnya produksi etanol dapat dilihat berdasarkan besarnya konsumsi gula dan pertumbuhan yeast selama fermentasi.

Tabel 7. Volume bioetanol hasil konversi dengan kadar alkohol 99%

Table 7. Bioethanol volume of alcohol content 99% conversion result

Konsentrasi α -amilase/ <i>α-amylase</i> concentrations (ml/ kg)	Konsentrasi Glukoamilase/ <i>glucoamylase</i> concentrations (ml/ kg)	Waktu fermentasi/ <i>fermentation periods</i> (jam/hours)			Rata-rata/ <i>average</i>
		24	48	72	
	ml.....			
0,5	0,5	37,60 ^{a(B)}	27,88 ^{ab(B)}	18,06 ^{b(B)}	27,85 ^C
	1,0	32,22 ^{b(B)}	79,86 ^{a(A)}	82,93 ^{a(A)}	65,00 ^B
	1,5	82,96 ^{a(A)}	83,48 ^{a(A)}	80,44 ^{b(A)}	82,29 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	50,92 ^c	63,74 ^a	60,48 ^b	
1,0	0,5	76,60 ^{a(A)}	77,43 ^{a(A)}	72,36 ^{b(A)}	75,46 ^A
	1,0	43,80 ^{a(C)}	46,99 ^{a(B)}	55,92 ^{a(A)}	48,90 ^C
	1,5	65,06 ^{b(B)}	75,96 ^{a(A)}	56,95 ^{b(A)}	65,99 ^B
	Rata-rata/ <i>average</i>	61,82 ^a	66,79 ^a	61,74 ^a	
1,5	0,5	58,26 ^{b(B)}	73,10 ^{a(A)}	74,87 ^{a(B)}	68,74 ^B
	1,0	72,78 ^{c(A)}	77,60 ^{a(A)}	76,87 ^{b(AB)}	75,75 ^A
	1,5	73,24 ^{a(A)}	78,99 ^{a(A)}	80,81 ^{a(A)}	77,68 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	68,09 ^b	76,56 ^a	77,52 ^a	

Keterangan/*remarks*: angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris yang sama dan huruf kapital yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% / *Means in the same line sharing the same letters or means in the same column sharing the same capital letters did not differ significantly according to Duncan at 0.05 level*

Tabel 8. Rendemen bioetanol dengan kadar alkohol 99%

Table 8. Bioethanol yield with alcohol content 99%

Konsentrasi α -amilase/ α -amylase concentrations (ml/ kg)	Konsentrasi Glukoamilase/ glucoamylase concentrations (ml/ kg)	Waktu fermentasi/ <i>fermentation periods</i> (jam/hours)			Rata-rata/ <i>average</i>
		24	48	72	
0,5	0,5	9,40 ^{a(B)}	6,97 ^{ab(B)}	4,52 ^{b(B)}	6,96 ^C
	1,0	8,06 ^{b(B)}	19,97 ^{a(A)}	20,74 ^{a(A)}	16,25 ^B
	1,5	20,74 ^{a(A)}	20,88 ^{a(A)}	20,11 ^{b(A)}	20,58 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	12,73 ^c	15,94 ^a	15,12 ^b	
1,0	0,5	19,15 ^{a(A)}	19,36 ^{a(A)}	18,09 ^{b(A)}	18,87 ^A
	1,0	10,95 ^{a(C)}	11,75 ^{a(B)}	13,98 ^{a(A)}	12,23 ^C
	1,5	16,27 ^{b(B)}	18,99 ^{a(A)}	14,24 ^{b(A)}	16,50 ^B
	Rata-rata/ <i>average</i>	15,46 ^a	16,70 ^a	15,44 ^a	
1,5	0,5	14,57 ^{b(B)}	18,28 ^{a(B)}	18,72 ^{a(B)}	17,19 ^B
	1,0	18,20 ^{a(A)}	18,78 ^{a(AB)}	19,22 ^{a(AB)}	18,73 ^A
	1,5	18,31 ^{a(A)}	19,75 ^{a(A)}	20,21 ^{a(A)}	19,42 ^A
	Rata-rata/ <i>average</i>	17,02 ^b	18,93 ^a	19,38 ^a	

Keterangan/*remarks*: angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris yang sama dan huruf kapital yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% / *Means in the same line sharing the same letters or means in the same column sharing the same capital letters did not differ significantly according to Duncan at 0.05 level*

KESIMPULAN

Dedak sorgum manis dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol dengan waktu fermentasi optimum selama 48 jam dengan penambahan enzim α -amilase : glukoamilase dengan konsentrasi 0,5 : 1,5 ml/kg dapat menghasilkan rendemen sebanyak 20,88%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada bapak/ibu teknisi Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian dan Andina Herlin (Alumni program D3 IPB) yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian dan tersusunnya makalah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Dharma S, Masjuki HH, Ong HC, Sebayang AH, Silitonga AS, Kusumo F, Mahlia TMI. Optimization of biodiesel production process for mixed *Jatropha curcas*-*Ceiba pentandra* biodiesel using response surface methodology. *Energy Conversion and Management*. 2016; 115: 178–190.
- Wang M, Chen Y, Xia X, Li J, Liu J. Energy efficiency and environmental performance of bioethanol production from sweet sorghum stem based on lifecycle analysis. *Bioresource Technology*. 2014; 163: 74–81.
- Kementerian ESDM. 2015. Rencana Strategis 2015-2019 Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral Direktorat Jenderal Minyak dan gas Bumi. <http://www.migas.esdm.go.id/public/images/uploads/posts/renstramigas-2015-2019.pdf>
- Zabed H, Sahu JN, Suelly H, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017; 71: 475-501.
- Chen H, Qiu W. Key Technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*. 2010; 28: 556-562.
- Bustaman S. Kebijakan Pengembangan Bahan Bakar Nabati (Bioetanol) Di Maluku. *J. Ekon. dan Pembang.* 2008; 17: 89-106.
- Schlafle S, Senn T, Gschwind P, Kohlus R. Feasibility and energetic evaluation of air stripping for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2017; 109-115.
- Sebayang AH, Masjuki HH, Ong HC, Dharma S, Silitonga AS, Mahlia TMI, Aditya HB. A perspective on bioethanol production from biomass as alternative fuel for spark ignition engine. *RSC Advances*. 2016; 6: 14964–14992.
- Zhang k, Zheng G, Saul K, Jiao Y, Xin Z. Evaluation of the multi seeded (msd) mutant of sorghum for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2017; 97 : 345-353.
- Sebayang AH, Masjuki HH, Ong HC, Dharma S, Silitonga

Optimasi Waktu fermentasi Produksi Bioetanol dari Dedak Sorghum Manis (*Sorghum Bicolor* L) melalui Proses Enzimatis

- AS, Kusumo F, Milano J. Optimization of bioethanol production from sorghum grains using artificial neural networks integrated with ant colony. *Industrial Crops and Products*. 2017; 97 : 146-155.
11. Phukoetphim N, Salakkam A, Laopaiboon P, Laopaiboon L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed batch fermentations: effects of sugar levels, nitrogen supplementation and feeding regimes. *Elektron. J. of Biotechnol.* 2017; 26: 84-92.
 12. Khalil SRA, Abdelhafez AA, Amer EAM. Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. *Annals of Agricultural Science*. 2015; 60(2): 317-324
 13. Gomez FJD, Hernandez CC, Carillo EP, Rooney WL, Saldivar SOS. Evaluation of bioethanol production from five different varieties of sweet and forage sorghums (*Sorghum bicolor* L Moench). *Industrial Crops and Products*. 2011; 33 : 611-616.
 14. Akanksha K, Sukumaran RK, Pandey A, Rao SS, Binod P. Material balance studies for the conversion of sorghum stover to bioethanol. *Biomass dan Bioenergy*. 2016; 85: 48-52.
 15. Rigdon AR, Jumpponen A, Vadlani PV, Maier DE. Impact of various storage conditions on enzymatic activity, biomass components and conversion to ethanol yield from sorghum biomass used as a bioenergy crop. *Bioresource Technology*. 2013; 132: 269-275.
 16. Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ. Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*. *Industrial Crops and Products*. 2011; 34 : 1219-1225.
 17. Awika JM, Rooney LW. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health (review). *Phytochemistry*. 2004; 65: 1199-1221.
 18. Dewi JR, Estiasih T, Murtini ES. Aktivitas antioksidan dedak sorgum lokal varietas coklat (*Sorghum bicolor*) hasil ekstraksi berbagai pelarut. *J. Teknologi Pertan.* 2007; 8(3): 188-197.
 19. Arnata IW, Setyaningsih D, Richana N. Produksi bioetanol dari hidrolisat asam tepung ubi kayu dengan kultur campuran *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cereviceae*. *Agritech*. 2015; 35(4): 396-405.
 20. Ubalua AO. Cassava waste: treatment options and value addition alternatives. *African J. of Biotechnol.* 2007; 6: 2065-2073.
 21. Wood IP, Cook NM, Wilson DR, Ryden P, Robertson JA, Waldron KW. Ethanol from a biorefinery waste stream: saccharification of amylase, protease and xylanase treated wheat bran. *Food Chemistry*. 2016; 198: 125-131
 22. Nair RB, Lundin M, Brandberg T, Lennartsson PR. Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. *Industrial Crops and Products*. 2015; 69: 314-323.
 23. Dogaris I, Karapati S, Mamma D, Kalogeris E, Kekos D. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. *Bioresource Technology*. 2009; 100: 6543-6549.
 24. Favaro L, Basaglia M, Casella S. Processing wheat bran into ethanol using mild treatments and highly fermentative yeasts. *Biomass and Bioenergy*. 2012; 46: 605-617.
 25. Aro SO. Improvement in the nutritive quality of cassava and its by products through microbial fermentation. *African J. of Biotechnol.* 2008; 7: 4789-4797.
 26. Subashini D, Ejinlane J, Radha A, Jayasri MA, Suthindiran K. Ethanol production from sago waste using *Saccharomyces cerevisiae* Vits-M1. *Biological Science*. 2011; 3: 42-51.
 27. AOAC [Association of Official Analytical Chemist]. Official Methods of Analytical of The Association of Official Analytical Chemist. Washington, DC: AOAC. 2006.
 28. Arif AB, Diyono W, Budiyanto A, Richana N. Analisis rancangan faktorial tiga faktor untuk optimalisasi produksi bioetanol dari molases tebu. *J. Informatika Pertan.* 2016; 25(1):145-154.
 29. Arif AB, Budiyanto A, Diyono W, Hayuningtyas M, Marwati T, Richana N. Pengaruh konsentrasi NaOH dan enzim selulase:xilanase terhadap produksi bioetanol dari tongkol jagung. *J. Penelit. Pascapanen Pertan.* 2016; 13(3): 107-114.
 30. Wardani AK, Pertiwi FNE. Produksi etanol dari tetes tebu oleh *Saccharomyces cereviceae* pembentuk flok (NRRI-Y265). *Agritech*. 2013; 33(2): 131-139.
 31. Nkomba EY, Resburg EV, Chimpango AFA, Gorgens JF. The influence of sorghum grain decortications on bioethanol production and quality of the distillers dried grain with soluble using cold and conventional warm starch processing. *Bioresource Technology*. 2016; 203: 181-189.
 32. Susmiati Y, Setyaningsih D, Sunarti TC. Rekayasa proses hidrolisis pati dan serat ubi kayu untuk produksi bioetanol. *Agritech*. 2011; 31(4): 384-390.
 33. Azizah N, Al-Baarri AN, Mulyani S. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH dan produksi gas pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. *JAplikasi Teknologi Pangan*. 2012; 1(2): 72-77.
 34. Hasanah H, Jannah A, Fasya AG. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol tape singkong. *Alchemy*. 2012; 2(1): 68-79.
 35. Usmana AS, Rianda S, Novia. Pengaruh volume enzim dan waktu fermentasi terhadap kadar etanol (bahan baku tandan kosong kelapa sawit dengan pretreatment alkali). *J. Teknik Kimia*. 2012; 18(2): 17-25.
 36. Hawusiwa ES, Wardani AK, Ningtyas DW. Pengaruh konsentrasi pasta singkong dan lama fermentasi pada proses pembuatan minuman wine singkong. *J. Pangan dan*

- Agroindustri. 2015; 3(1): 147-155.
37. Utama AM, Legowo AW, Al-Baarri AN. Produksi alkohol, nilai pH, dan produksi gas pada bioetanol dari susu rusak dengan campuran limbah cair tapioka. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2013; 2(2): 93-100.
38. Raudah, Ernawati. Pemanfaatan kulit kopi arabika dan proses pulping untuk pembuatan bioetanol. *Jurnal Reaksi*. 2012; 10(21): 12-21.
39. Cahyani A, Hendrawan Y, Yulianingsih R. Pengaruh volume enzim terhadap kadar alkohol dan nilai kalor dari bioetanol berbahan baku umbi gadung. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*. 2015; 3(1): 61-66.
40. Ghoris MI, Sibtain A, Muhammad AM, Amer J. Corn stover enhanced cellulose production by aspergillus niger NRRL 567. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10: 5878-5886.
41. Yumas M, Rosniati. Pengaruh konsentrasi starter dan lama fermentasi pulp kakao terhadap konsentrasi etanol. *Biopropal Industri*. 2014; 5(1): 13-22.
42. Azizah NAN, Baarri A, Mulyani S. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH dan produksi gas pada proses fermentasi bioetanol dari whey dengan substitusi kulit nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2012; 1(2): 72-77.
43. Purwoko T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: PT. Umi Aksara.