



## Efek Interaksi Ragi Tape dan Ragi Roti terhadap Kadar Bioetanol Ketela Pohon (*Manihot Utilissima*, Pohl) Varietas Mukibat

### *Interaction effects Tape and Bread Yeast on the Level of Bioethanol Cassava (*Manihot utilissima*, Pohl) Mukibat Varieties*

✉ Tri Budi Kurniawan, Siti Harnina Bintari, R. Susanti

DOI: 10.15294/biosaintifika.v6i2.3783

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang, Indonesia

#### Info Artikel

Diterima Agustus 2014  
Disetujui September 2014  
Dipublikasikan September 2014

#### Keywords:

*Bioethanol, breads yeast, cassava mukibat varieties, tape yeast*

#### Abstrak

Ketela pohon (*Manihot utilissima*, Pohl) varietas Mukibat berpotensi sebagai bahan baku bioetanol. Penelitian bertujuan untuk mengetahui efek interaksi ragi tape dan ragi roti terhadap kadar bioetanol ketela pohon Mukibat dan menentukan interaksi terendah yang efektif menghasilkan bioetanol yang dapat terbakar. Sampel yang digunakan adalah ketela pohon Mukibat umur 7 bulan dengan berat rata-rata 500 gram. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial, yaitu konsentrasi ragi tape (0%, 0,3%, 0,6% dan 0,9%) dan konsentrasi ragi roti (0%, 0,3%, 0,6% dan 0,9%) dengan 3 kali ulangan. Parameter yang diukur meliputi jumlah sel khamir (data pendukung) dan kadar bioetanol (data utama). Data kadar bioetanol yang diperoleh dianalisis menggunakan Anava dua arah dan dilanjutkan uji Duncan (DMRT) pada taraf kesalahan 5%. Hasil penelitian menunjukkan ada pengaruh interaksi ragi tape dan ragi roti terhadap kadar bioetanol ketela pohon Mukibat  $p > 0,05$ . Konsentrasi ragi tape dan ragi roti yang tinggi menghasilkan kadar bioetanol yang tinggi. Interaksi ragi tape 0,6% dan ragi roti 0,3% ( $T_2R_1$ ) merupakan interaksi terendah yang efektif menghasilkan kadar bioetanol yang dapat terbakar (36%). Interaksi ragi tape 0,9% dan ragi roti 0,9% ( $T_3R_3$ ) menghasilkan kadar bioetanol tertinggi dengan rata-rata mencapai 49,8%.

#### Abstract

*Cassava (Manihot utilissima, Pohl) var Mukibat is potential for bioethanol feedstock. The study aimed to determine the effects of the interaction of bread yeast and tape yeast on the concentration of Mukibat cassava bioethanol and to determine the lowest effective interaction can produce flammable bioethanol. The samples used were Mukibat cassava aged 7 months with an average weight of 500 grams. Research design was completely randomized design factorial, tape yeast concentration (0%, 0.3%, 0.6% and 0.9%) and the concentration of yeast bread (0%, 0.3%, 0.6% and 0.9%) with 3 replications. Parameters measured include the number of yeast cells (supporting data) and ethanol concentration (primary data). Bioethanol content data obtained were analyzed using two-way ANOVA and Duncan continued test (DMRT) at the level of 5% error. The results showed that no effect of the interaction of breads yeast and tape yeast on levels of cassava bioethanol  $p > 0.05$ . The concentration of bread yeast and tape yeast yielded in high concentration of ethanol. The interaction of yeast tape 0.6% and 0.3% bread yeast ( $T_2R_1$ ) gave the lowest effective interaction produced 36% ethanol. The interaction of tape yeast 0.9% and 0.9% bread yeast ( $T_3R_3$ ) resulted in the highest ethanol concentration with an average reached 49.8%.*

© 2014 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:

Gedung D6 Lt 1. Kampus Unnes Jl. Raya sekaran Gunungpati, Semarang 50229  
Telp/Fax.8508033 E-mail: gomgoblind@yahoo.co.id

p-ISSN 2085 - 191X  
e-ISSN 2338-7610

## PENDAHULUAN

Pembuatan bioetanol dari bahan baku pangan seperti jagung, tebu, sorgum, nira dan singkong mulai ditinggalkan dan beralih memanfaatkan bahan non pangan dan limbah biomassa. Salah satu bahan non pangan adalah ketela pohon karet dan ketela pohon mukibat. Ketela pohon (*Manihot utilissima*, Pohl.) var. Mukibat merupakan bahan non pangan dengan kandungan pati yang cukup tinggi, yaitu sebesar 36,4% dari berat sampel. Kandungan asam hidrosian pada ketela pohon mukibat dapat menyebabkan gangguan pernapasan hingga kematian (Soetanto 2001). Hal inilah yang menyebabkan ketela pohon mukibat tidak tergolong bahan pangan. Ketela pohon mukibat sangat potensial sebagai bahan baku bioetanol karena kandungan pati yang tinggi dengan harga yang relatif murah.

Pati dari ketela pohon mukibat tidak dapat langsung dikonversi menjadi alkohol oleh *Saccharomyces cerevisiae* atau *Zymomonas mobilis*, sehingga diperlukan proses pemecahan pati menjadi glukosa. Proses pemecahan pati dapat dilakukan dengan penambahan asam (hidrolisis asam) dan penambahan enzim (hidrolisis enzimatis). Pemanfaatan hidrolisis asam dapat menimbulkan pencemaran lingkungan karena bersifat korosif dan susah terdegradasi secara alami. Hidrolisis enzim lebih menguntungkan dibandingkan dengan hidrolisis asam, karena tidak menimbulkan pencemaran lingkungan dan bekerja spesifik terhadap bahan tertentu. Enzim pemecah pati seperti *amylase* dapat diperoleh dari kit enzim komersil yang dijual di toko kimia atau dengan memanfaatkan mikrobia penghasil enzim amilolitik seperti *Aspergillus sp.* dan *Bacillus sp.* Sumber mikrobia di Indonesia yang telah diketahui mampu mendegradasi pati menjadi glukosa adalah ragi tape. Dalam ragi tape terdapat mikrobia yang memproduksi enzim-enzim amilolitik seperti *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.* dan *Bacillus sp.* memproduksi enzim *amylase* dan *Amylomyces rouxii* memproduksi enzim *glukoamilase*. Enzim-enzim amilolitik tersebut akan memutuskan ikatan amilosa ( $\alpha$  1,4 glukosida) dan amilopektin ( $\alpha$  1,6 glukosida) menjadi glukosa (Dwidjoseputro 1998).

Hasil degradasi yang berupa gula sederhana (glukosa) akan dikonversi menjadi etanol dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* atau *Zymomonas mobilis*.

Pemanfaat *Saccharomyces cerevisiae* lebih menguntungkan dibandingkan *Zymomonas mobilis* karena fisiologinya yang lebih mudah dipelihara dengan daya konversi yang tinggi (Purwoko 2007). *Saccharomyces cerevisiae* dapat diperoleh dari ragi roti. Ragi roti mengandung *Saccharomyces cerevisiae* yang telah mengalami seleksi, mutasi atau hibridasi untuk meningkatkan kemampuannya dalam memfermentasi gula dengan baik dalam adonan dan mampu tumbuh dengan cepat (Pelczar dan Chan 1988).

Mikrobia dari ragi tape khususnya yang memproduksi enzim amilolitik (*Amylomyces rouxii*, *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.* dan *Bacillus sp.*) dimaksudkan untuk mendegradasi pati ketela pohon mukibat menjadi glukosa yang kemudian langsung dikonversi menjadi bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* dari ragi roti. Bioetanol yang dihasilkan dapat diukur kadarnya menggunakan alkoholmeter. Sensitivitas alkoholmeter lebih rendah dibandingkan kromatografi gas, tetapi cukup efisien dalam mengukur kadar alkohol pada pembuatan wine dan minuman beralkohol lainnya. Prinsip kerja alkoholmeter adalah perbedaan berat jenis campuran alkohol dan air (Isroi 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek interaksi ragi tape dan roti terhadap kadar bioetanol ketela pohon varietas mukibat dan Menentukan interaksi ragi tape dan roti terendah yang efektif menghasilkan bioetanol yang dapat terbakar.

## METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi D11 lantai 1, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Populasi dalam penelitian ini adalah ketela pohon (*Manihot utilissima* Pohl) var. Mukibat umur 7 bulan dengan berat rata-rata 500 gram setiap ketela pohon mukibat. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 kg ketela pohon mukibat umur 7

bulan dengan berat rata-rata setiap ketela pohon adalah 500 gram.

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dengan 3 kali pengulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi ragi tape (T) dengan 4 taraf perlakuan yaitu 0%, 0,3%, 0,6%, dan 0,9%. Faktor kedua adalah konsentrasi ragi roti (R) yaitu 0%, 0,3%, 0,6%, dan 0,9%. Penentuan konsentrasi ragi yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan hasil observasi, hasil penelitian dan literature pustaka.

Prosedur penelitian diawali dengan pembuatan bubur singkong. Singkong direndam selama satu malam di dalam air setelah dikupas dan dipotong 3X3 cm<sup>2</sup>. Singkong direbus selama 30 menit pada suhu 100°C. Kemudian singkong dihaluskan menggunakan blender, lalu dicampur dengan air dengan perbandingan 1:1 (30 L:30 kg). Selanjutnya bubur dimasak kembali pada suhu 60°C.

Setelah bubur singkong siap, bubur singkong kemudian difermentasi dengan cara 1000 mL bubur singkong dimasukkan pada fermentor dan ditambah aquadest sampai volume 1200 mL. Kemudian menambahkan starter kombinasi ragi tape (0%, 0,3%, 0,6%, dan 0,9%) dan roti (0%, 0,3%, 0,6%, dan 0,9%) ke dalam fermentor sesuai dengan perlakuan. Setelah 7 hari fermentasi, dilakukan penyaringan dan dilanjutkan proses destilasi. Memasukkan masing-masing sampel sebanyak 750 mL dalam labu destilasi. Mengatur suhu destilasi pada skala 78-96 °C, selama 4-6 jam. Lalu, menampung destilat kemudian menghitung kadar bioetanol yang dihasilkan menggunakan alkoholmeter.

Langkah selanjutnya adalah pembuatan medium tumbuh khamir. Membuat cotton plug dan mengisi setiap tabung reaksi dengan 9 mL aquadest. Kemudian, Menimbang kloramfenikol sebanyak 0,5 gram ditambah aquadest sampai 1 L selanjutnya diencerkan sampai menjadi 50 ppm. Membuat 400 mL PDA ( 15,6 gram PDA ditambah larutan kloramfenikol 50 ppm sampai volume 400 mL), dipanaskan sambil diaduk sampai homogen. Lalu Mensterilkan tabung reaksi, petridish, dan medium PDA dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit.

Perhitungan jumlah sel khamir diawali dengan penanaman sel khamir pada medium. Melakukan pengenceran seri pada setiap sampel sampai 10<sup>-6</sup> secara aseptis, hasil pengenceran seri terakhir ditampung pada botol flakon dan diberi label. Menuangkan 15 mL medium PDA pada setiap petridish secara aseptis. Kemudian menginokulasi 1 mL hasil pengenceran seri kedalam petridish secara aseptis dengan teknik taburan (*pour plate method*). Lalu menunggu medium sampai padat, kemudian dibungkus dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah 48 jam, dilakukan enumerasi dengan colony counter.

Data yang diperoleh dari penelitian ini merupakan data kuantitatif yang diperoleh dari hasil analisis yang meliputi parameter jumlah sel khamir dan kada bioetanol. Jumlah sel khamir dihitung ketika hari pertama, hari ketiga, hari kelima dan hari terakhir dari proses fermentasi. Masing-masing sampel diambil mL dengan mikropipet kemudian dilakukan pengenceran seri sampai 10<sup>-6</sup> selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam. Setelah 48 jam dilakukan perhitungan menggunakan *Colony counter* (Gandjar, 2009).

$$\begin{aligned} \text{jumlah sel per mL} &= \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{faktor pengenceran}} \\ &= \frac{\text{jumlah koloni}}{1} \end{aligned}$$

Kadar bioetanol diperoleh dan diukur setelah proses destilasi dengan menggunakan alkoholmeter. Destilat yang diperoleh dimasukkan kedalam gelas ukur 100 mL kemudian diukur menggunakan alkoholmeter dengan cara memasukkan alkoholmeter ke dalam gelas ukur yang berisi destilat. Skala yang ditunjukkan dicatat sebagai data kadar bioetanol (Isroi 2008).

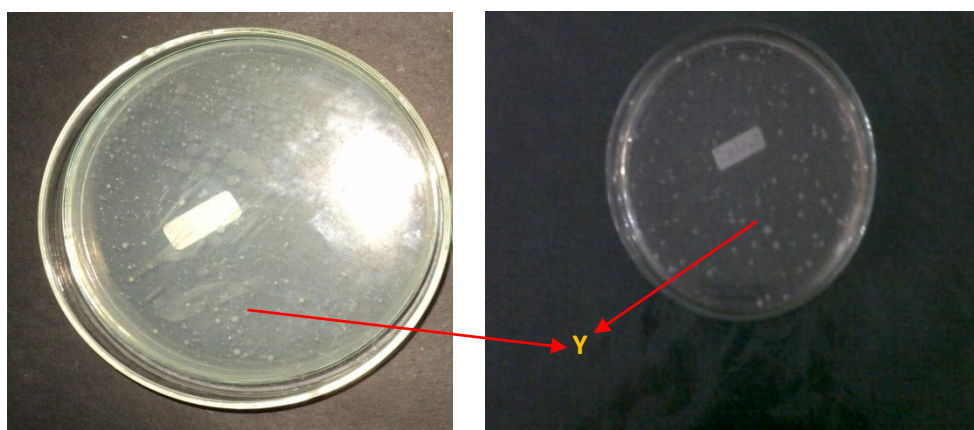
Data jumlah sel khamir tidak dianalisis statistika *Anava*, data jumlah sel khamir merupakan data pendukung untuk menggambarkan sukseksi yang terjadi selama fermentasi dan pembentukan bioetanol. Data kadar bioetanol merupakan data utama yang selanjutnya dilakukan analisis secara deskriptif kuantitatif dalam bentuk statistik *Anava* dengan menggunakan *SPSS 16.0*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Jumlah Sel Khamir

Data penelitian interaksi ragi tape dan ragi roti terhadap rata-rata jumlah sel khamir selama *fermentasi* menunjukkan adanya peningkatan dan penurunan jumlah sel khamir. Pada awal *fermentasi* (24 jam) dan hari ketiga (72 jam) menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ragi tape dan ragi roti yang digunakan maka semakin tinggi rata-rata jumlah sel khamir. Pada hari berikutnya (120 jam sampai 168 jam) menunjukkan pola yang berbeda, mulai terlihat fluktuasi jumlah sel khamir. Hari kelima (120 jam), peningkatan jumlah sel khamir hanya terjadi pada beberapa interaksi, sedangkan interaksi lainnya menunjukkan pola naik dan turun. Pada waktu 168 jam, menunjukkan penurunan jumlah sel khamir seiring dengan tingginya konsentrasi interaksi ragi

tape dan ragi roti yang digunakan. Perbedaan pola pertumbuhan mungkin dikarenakan adanya faktor waktu dan metabolit yang dihasilkan. Semakin lama waktu *fermentasi* maka semakin menurun jumlah sel khamirnya, kecuali pada T<sub>0</sub>R<sub>0</sub> dan T<sub>0</sub>R<sub>1</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>R<sub>0</sub> dan T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> yang menunjukkan peningkatan jumlah sel khamir dari 24 jam sampai 168 jam dibandingkan interaksi lainnya. Interaksi T<sub>0</sub>R<sub>0</sub> dan T<sub>0</sub>R<sub>1</sub> mengalami peningkatan jumlah sel khamir dari rentang waktu 24 jam sampai 168 jam, sedangkan interaksi T<sub>0</sub>R<sub>2</sub>, T<sub>1</sub>R<sub>0</sub> dan T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> menunjukkan peningkatan jumlah sel khamir dari 24 jam sampai 120 jam dibandingkan perlakuan lainnya. Interaksi ragi tape dan ragi roti menunjukkan perbedaan jumlah sel khamir selama *fermentasi* pada waktu 24, 72, 120 dan 168 jam. Data yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1. Contoh hasil inkubasi sel khamir selama fermentasi terlihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Hasil inkubasi sel khamir (Y) interaksi ragi tape dan ragi roti

**Tabel 6.** Interaksi ragi tape dan ragi roti terhadap rata-rata jumlah sel khamir selama *fermentasi*

Waktu	Rata-rata jumlah sel khamir ( $10^7$ sel/mL)				
	Ragi tape Ragi roti	T <sub>0</sub> (0%)	T <sub>1</sub> (0,3%)	T <sub>2</sub> (0,6%)	T <sub>3</sub> (0,9%)
24 Jam	R <sub>0</sub> (0%)	3.4	9.2	9.7	15.8
	R <sub>1</sub> (0,3%)	4.9	11.8	13.7	19.1
	R <sub>2</sub> (0,6%)	9.7	13.4	19.5	19.8
	R <sub>3</sub> (0,9%)	10.1	20.2	20.3	22.0
72 Jam	R <sub>0</sub> (0%)	11.2	13.6	18.1	20.6
	R <sub>1</sub> (0,3%)	11	17.7	19.6	21.5
	R <sub>2</sub> (0,6%)	13.7	18.8	21.2	24.4
	R <sub>3</sub> (0,9%)	17.2	20.3	22.6	28.7
120 Jam	R <sub>0</sub> (0%)	12.8	15.1	15.3	18.6
	R <sub>1</sub> (0,3%)	14.8	18.6	16.4	16.5
	R <sub>2</sub> (0,6%)	16	16.2	17.4	15.7

	R <sub>3</sub> (0,9%)	16.4	16.8	19.3	19.5
168 jam	R <sub>0</sub> (0%)	15.4	13.5	10.1	10.1
	R <sub>1</sub> (0,3%)	16.2	12.9	11.1	9.4
	R <sub>2</sub> (0,6%)	15.9	12.9	10.4	9.1
	R <sub>3</sub> (0,9%)	11.5	13.6	11.2	8.0

Keterangan:

T<sub>0</sub> = Konsentrasi ragi tape 0%

T<sub>1</sub> = Konsentrasi ragi tape 0,3%

T<sub>2</sub> = Konsentrasi ragi tape 0,6%

T<sub>3</sub> = Konsentrasi ragi tape 0,9%

R<sub>0</sub> = Konsentrasi ragi roti 0%

R<sub>1</sub> = Konsentrasi ragi roti 0,3%

R<sub>2</sub> = Konsentrasi ragi roti 0,6%

R<sub>3</sub> = Konsentrasi ragi roti 0,9%

Jumlah sel khamir yang terhitung pada interaksi ragi tape dan ragi roti (Tabel 1) menunjuk peningkatan dan penurunan jumlah sel. Hal dipengaruhi oleh substrat, jenis starter dan faktor lingkungan. Substrat yang digunakan pada penelitian ini berupa pati ketela pohon mukibat. Starter yang digunakan adalah campuran antara ragi tape dan ragi roti. Penelitian tentang mikrobia pada ragi tape telah banyak dilakukan, diantaranya Saono *et al.* (1977) dan Bintari (1992) menyatakan bahwa mikrobia yang terdapat dalam ragi tape terdiri dari kapang (*Amylomyces sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*), khamir (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula sp.*, *Hyphopichia burtonii*, *Debaromyces vanriji var. vanriji*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Endomycopsis sp.*, dan *Candida*) dan bakteri (*Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.* dan *Enterobacteriaceae*). Pada ragi roti hanya terdiri *Saccharomyces cerevisiae* (Banati *et al.* 2007).

Metode yang digunakan dalam perhitungan jumlah sel khamir adalah Prosedur Angka Kapang Khamir dan *Total Plate Count*. Sampel dari masing-masing fermentor diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pengenceran seri untuk mendapatkan koloni yang terpisah. Hasil pengenceran seri selanjutnya diinokulasikan pada medium PDKA (*Potato Dextrose Kloramfenikol Agar*) 50 ppm. Kloramfenikol yang ditambahkan pada medium tumbuh bersifat anti bakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri selama inkubasi sampai enumerasi. Perhitungan jumlah sel khamir menggunakan *Colony counter* dilakukan setelah inkubasi selama 48 jam (Gandjar *et al.*, 2009).

Jumlah sel khamir yang terhitung pada fermentasi menunjukkan adanya aktifitas mikrobia pada ragi tape dan ragi roti dalam menggunakan substrat untuk proses pertumbuhannya. Substrat yang berupa pati akan diubah menjadi glukosa

oleh mikrobia pada ragi tape pada awal fermentasi (24 jam). Proses pemecahan pati menjadi glukosa oleh mikrobia ragi tape disebut *sakarifikasi*. Hasil *sakarifikasi* berupa glukosa akan digunakan sebagai sumber energi untuk proses pertumbuhan bagi mikrobia pada ragi tape dan ragi roti. Menurut Muhiddin *et al.* (2000) dan Lestari *et al.* (2001), *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.* dan *Bacillus sp.* menghasilkan enzim *amylase* yang akan memutus ikatan  $\alpha$  1-4, *glikosida* pada pati singkong menjadi dekstrin-dekstrin seperti maltose, maltotriosa, dan glukosa. *Amylomyces rouxii* memproduksi enzim *glukoamilase* yang mampu memutuskan ikatan  $\alpha$  1-4, *glikosida* dan  $\alpha$  1-6, *glikosida* menjadi glukosa (Dwidjoseputro 1998). Glukosa hasil *sakarifikasi* akan digunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk proses metabolisme menghasilkan alkohol dan asam-asam organik sebagai hasil metabolitnya. *Saccharomyces cerevisiae* memproduksi enzim *zimase* dan *invertase* yang berperan dalam konversi glukosa menjadi alkohol.

Pada waktu 24 jam, mikrobia pada ragi tape (kapang, khamir dan bakteri) dan ragi roti (khamir *Saccharomyces cerevisiae*) melakukan adaptasi singkat terhadap lingkungan fermentor (*fase lag*). Adaptasi ini antara lain dengan memproduksi enzim yang sesuai dengan substrat. Menurut Lestari *et al.* (2001), pada waktu 24 jam, *Bacillus sp.* menghasilkan enzim  $\alpha$ -*amilase* yang memecah pati ubi kayu menjadi dekstrin, maltotriosa, dan glukosa. Elevri dan Putra (2006) menyatakan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* melakukan adaptasi (*fase lag*) dalam waktu 20 jam pertama saat pertumbuhannya.

Jumlah sel khamir terbanyak pada waktu 24 jam (*fase lag*) diperoleh dari interaksi T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> dengan rata-rata mencapai 22.10<sup>7</sup> sel/mL, sedangkan

jumlah sel khamir terendah pada interaksi T<sub>0</sub>R<sub>0</sub> dengan rata-rata mencapai 3,4.10<sup>7</sup> sel/mL. Interaksi T<sub>0</sub>R<sub>0</sub> merupakan kontrol dimana tidak ada penambahan ragi tape dan ragi roti, sehingga proses *sakarifikasi* dan *fermentasi* berjalan lambat. Mikrobia alami yang tumbuh belum mampu memecah pati menjadi glukosa sehingga belum ada sumber energi untuk mendukung pertumbuhannya. Interaksi T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> merupakan campuran ragi tape dan ragi roti tertinggi dengan jumlah sel khamir terbanyak, sehingga proses *sakarifikasi* pati singkong mukibat oleh mikrobia amilolitik dari ragi tape menjadi glukosa berjalan optimal. Interaksi T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> merupakan perlakuan terbaik pada penelitian ini, akan tetapi masih dimungkinkan mendapatkan jumlah sel khamir lebih banyak apabila interaksi diperbanyak lagi. Menurut Setyohadi (2006) semakin banyak jumlah ragi tape yang ditambahkan, maka semakin banyak khamir, kapang, dan bakteri pada tape ubi jalar sehingga produksi *enzim amylase*, *zimase*, dan *invertase* yang dihasilkan semakin meningkat. Produksi enzim yang tinggi menyebabkan proses *sakarifikasi* pati menjadi glukosa dan konversi glukosa menjadi alkohol semakin cepat.

Rentang waktu 24 jam sampai 72 jam, sel khamir berada pada *fase eksponensial*. Sel khamir mengalami peningkatan jumlah sel dan mulai terbentuk alkohol dan senyawa lain sebagai hasil metabolitnya. *Fermentasi* nira siwalan secara spontan menunjukkan pertumbuhan yang cepat dari mikroflora nira siwalan pada waktu *fermentasi* 48 jam sampai 72 jam (Ristiarini *et al.* 2001). Menurut Purwoko (2007), pada fase perbanyak, sel melakukan konsumsi substrat dan proses fisiologi lainnya. Pada fase itu produk senyawa yang diinginkan manusia terbentuk, antara lain etanol, asam laktat, dan asam organik lainnya.

Rentang waktu 72 sampai 120 jam, interaksi ragi tape dan roti menunjukkan *fase stasioner*. Pada fase ini terjadi perubahan kimiawi, kadar gula semakin menurun karena substrat telah diubah menjadi alkohol dan asam-asam organik. Asam-asam organik yang terbentuk menyebabkan pH semakin rendah. Hal ini menyebabkan jumlah sel khamir ikut menurun. Interaksi T<sub>0</sub>R<sub>0</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>1</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> dan T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> masih menunjukkan *fase eksponensial*. Hal ini mungkin disebabkan rendahnya jumlah

mikrobia amilolitik yang memecah pati menjadi glukosa sehingga sumber energi yang terbentuk berjalan lambat. Perubahan kimiawi dan produksi alkohol belum terlalu berpengaruh terhadap pertumbuhan sel khamir pada interaksi T<sub>0</sub>R<sub>0</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>1</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> dan T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> sehingga masih menunjukkan peningkatan jumlah sel khamir. Gozan *et al* (2007) menyatakan bahwa fase stasioner terjadi pada rentang 72 jam hingga 96 jam, sel khamir sudah tidak bekerja secara optimal. Kadar gula semakin rendah dan mulai terbentuk produk sampingan *fermentasi* yang berupa asam-asam organik yang menurunkan pH lingkungan. Bakteri asam laktat dalam ragi tape berperan mengoksidasi asam-asam hingga pH lingkungan menurun (Buckle *et al.* 1987). Menurut Ristiarini *et al* (2001), selama 72 jam *fermentasi* terjadi penurunan kadar gula reduksi dan pH lingkungan. Hal ini disebabkan karena gula nira telah digunakan sebagai substrat oleh khamir dan bakteri asam laktat untuk aktifitasnya menghasilkan alkohol dan asam-asam organik.

Pada hari berikutnya, 120 jam sampai 168 jam menunjukkan penurunan jumlah sel khamir. Sel khamir mengalami *fase kematian*, substrat yang ada telah habis diubah menjadi alkohol dan asam-asam organik sebagai metabolit sekunder. Meningkatnya akumulasi alkohol pada fermentor menyebabkan kematian sel khamir (autotoksin). Semakin lama waktu *fermentasi* maka semakin menurun jumlah sel khamirnya, kecuali pada T<sub>0</sub>R<sub>0</sub> dan T<sub>0</sub>R<sub>1</sub>. Hal ini mungkin dikarenakan pada awal *fermentasi* sampai akhir *fermentasi* proses *sakarifikasi* dan *fermentasinya* berjalan lambat, sehingga substrat yang digunakan masih mencukupi untuk mendukung proses pertumbuhannya. Menurut Kunaepah (2008), semakin lama waktu *fermentasi* maka jumlah mikrobia semakin menurun dan menuju *fase kematian*. Ini disebabkan alkohol yang semakin meningkat dan substrat yang ada semakin berkurang. Pada umumnya produk yang dihasilkan dari metabolisme disekresikan keluar sel, sehingga dapat meracuni sel prokariota. Akumulasi etanol dan asam organik dalam media dapat membunuh prokariota secara tidak langsung (Purwoko 2007).

### Kadar Bioetanol

Setelah *fermentasi* selama 7 hari (168 jam) dilanjutkan proses destilasi selama 4-6 jam pada suhu 78-96 °C dan diperoleh destilat sebanyak 100mL. Destilat ditampung dan diukur menggunakan alkoholmeter. Dari hasil penelitian interaksi ragi tape dan ragi roti terhadap kadar bioetanol, diperoleh data peningkatan jumlah sel khamir (24 jam) dan kadar bioetanol seiring dengan tingginya konsentrasi interaksi ragi tape

dan ragi roti yang digunakan. T<sub>0</sub>R<sub>0</sub> menghasilkan kadar bioetanol dan jumlah sel khamir terendah dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> menghasilkan kadar bioetanol tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil uji pembakaran menunjukkan kadar bioetanol terendah yang dapat terbakar adalah 36%, yang diperoleh pada interaksi T<sub>2</sub>R<sub>1</sub>. Data hasil pengukuran kadar bioetanol dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Interaksi ragi tape dan roti terhadap rata-rata kadar bioetanol

Ragi roti	Rata-rata kadar bioetanol (%) pada Ragi tape			
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
R <sub>0</sub>	8.9	21.2	24.8	27.8
R <sub>1</sub>	21.6	27.8	36.0*	40.4*
R <sub>2</sub>	27.1	32.2	39.7*	47.4*
R <sub>3</sub>	31.6	42.8*	45.1*	49.8*

\*kadar bioetanol yang dapat terbakar

Produksi bioetanol (Tabel 2) menunjukkan adanya peningkatan kadar bioetanol seiring dengan tingginya konsentrasi ragi tape dan ragi roti yang digunakan. Hal ini berkaitan dengan substrat, mikrobial yang digunakan, dan proses pembuatannya. Pada penelitian ini digunakan substrat berupa ketela pohon varietas mukibat (bahan berpati), starter berupa ragi tape (kapang, khamir dan bakteri) dan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*). Proses pemasakan berfungsi untuk memecah ikatan pati menjadi dekstrin dengan suhu tinggi (hidrolisis mekanik), sedangkan pemblenderan berfungsi untuk memperluas bidang sentuh sehingga laju reaksi pemecahan pati menjadi glukosa semakin cepat. Menurut Apriyantono *et al.* (1989), pemasakan polisakarida seperti pati, khususnya dalam media yang banyak air justru menguntungkan karena pati akan diubah menjadi molekul yang lebih kecil. Pada proses pemasakan singkong, sebagian besar pati diubah menjadi maltosa sehingga menyebabkan rasa manis pada singkong.

Setelah proses persiapan bahan baku, selanjutnya dilakukan *sakarifikasi* dan *fermentasi*. *Sakarifikasi* merupakan proses pemecahan pati menjadi glukosa oleh mikrobial amilolitik pada ragi tape (*Amylomyces sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.* dan *Bacillus sp.*). Menurut Bintari (1992), semua kapang (*Rhizopus sp.*, *Mucor sp.* dan

*Aspergillus sp.*) dan bakteri (*Bacillus sp.* dan *Streptococcus sp.*) dari ragi tape bersifat amilolitik kuat. Hidrolisis atau *sakarifikasi* pati menggunakan enzim lebih menguntungkan dan ramah lingkungan dibandingkan dengan penggunaan asam (Anindyawati 2009). Glukosa hasil *sakarifikasi* akan langsung difermentasikan oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan memproduksi enzim *invertase* dan *zimase* untuk mengkonversi glukosa menjadi etanol. *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim *invertase* dan *zimase*. Enzim *zimase* mampu memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, enzim *invertase* berperan dalam merubah glukosa menjadi bioetanol.

Untuk mengetahui adanya pengaruh interaksi antara ragi tape dan ragi roti terhadap kadar bioetanol, perlu dilakukan uji statistik menggunakan Anova dua arah pola faktorial pada taraf kesalahan 5%. Hasil uji anava dua arah pola faktorial terhadap kadar bioetanol menunjukkan adanya pengaruh yang nyata dari konsentrasi ragi tape, ragi roti, dan interaksinya terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan. Berdasarkan hasil perhitungan statistik *Analysis of Variance* (anova) pada taraf signifikansi 95 % ( $p = 0,05$ ) diketahui adanya perbedaan yang signifikan pada semua variabel yang diuji secara simultan ( $p < 0.05$ ). Hasil uji anava yang signifikan kemudian dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil uji Duncan menunjukkan adanya perbedaan pada interaksi ragi tape dan ragi roti terhadap kadar bioetanol, hanya beberapa interaksi yang menunjukkan tidak berbeda nyata. Interaksi T<sub>0</sub>R<sub>1</sub> dan T<sub>1</sub>R<sub>0</sub> menunjukkan selisih yang kecil sehingga tidak ada perbedaan antara perlakuan tersebut. Hal yang sama juga terlihat pada T<sub>0</sub>R<sub>2</sub> dengan T<sub>1</sub>R<sub>1</sub> dan T<sub>3</sub>R<sub>0</sub>, T<sub>0</sub>R<sub>3</sub> dengan T<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, dan T<sub>2</sub>R<sub>2</sub> dengan T<sub>3</sub>R<sub>1</sub>. Interaksi dengan kadar bioetanol tertinggi pada penelitian ini diperoleh pada T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> dengan rata-rata kadar bioetanol mencapai 49,8%.

Perbedaan konsentrasi ragi tape dan roti berpengaruh secara nyata terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan serta uji lanjut DMRT pada taraf kesalahan 5% menunjukkan perbedaan yang signifikan pada setiap perlakuan. Interaksi ragi tape dan roti terbaik dalam menghasilkan bioetanol adalah T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, sedangkan interaksi ragi tape dan roti terendah yang efisien untuk menghasilkan kadar bioetanol terendah yang dapat terbakar adalah T<sub>2</sub>R<sub>1</sub>. Interaksi ragi tape dan ragi roti T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> menunjukkan kadar bioetanol tertinggi (49,8%) dibandingkan interaksi lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa pada interaksi ragi tape dan roti terjadi simbiosis antara mikrobia amilolitik (*Amylomyces sp*, *Aspergillus sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp* dan *Bacillus sp*) pada ragi tape dengan sel khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) dari ragi roti. Semakin tinggi konsentrasi ragi tape yang digunakan maka semakin banyak mikrobia yang menghasilkan enzim amilolitik, sehingga proses *sakarifikasi* semakin cepat. Muhiddin *et al* (2000) menyatakan bahwa *Aspergillus sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp* dan *Bacillus sp* menghasilkan enzim *amylase* yang akan memecah ikatan *1,4-glukosida* (Amilosa) menjadi maltose, maltotriosa dan dekstrin. *Amylomyces sp* menghasilkan enzim *glukoamilase* yang akan memecah ikatan *1,4-glukosida* dan *1,6-glukosida* (Amilopektin) menjadi glukosa. Glukosa hasil *sakarifikasi* selanjutnya akan dikonversi menjadi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Sebayang (2006), semakin cepat *sakarifikasi* maka akan memberikan waktu *fermentasi* yang lebih lama bagi *Saccharomyces cerevisiae* sehingga akumulasi bioetanol semakin meningkat. Semakin banyak fermipan yang digunakan semakin banyak jumlah

*Saccharomyces cerevisiae* yang bekerja merombak gula menjadi etanol (Simanjuntak 2009).

Selama penelitian, *Saccharomyces cerevisiae* hidup baik dalam kondisi lingkungan kurang oksigen. Dalam keadaan anaerob, asam piruvat yang dihasilkan oleh proses glikolisis akan diubah menjadi asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Selanjutnya, asam asetat diubah menjadi etanol. Proses perubahan asam asetat menjadi etanol tersebut diikuti pula dengan perubahan NADH menjadi NAD<sup>+</sup>. Dengan terbentuknya NAD<sup>+</sup>, peristiwa glikolisis dapat terjadi lagi. Dalam *fermentasi* etanol ini, dari satu mol glukosa hanya dapat dihasilkan 2 molekul ATP (Purwoko 2007).

Pengukuran kadar bioetanol dengan alkoholmeter dari proses destilasi sederhana hanya dilakukan pada hari terakhir fermentasi (168 jam). Hal ini untuk menjaga kondisi fermentasi tetap pada anaerob fakultatif dan volume untuk destilasi mencukupi. Pengukuran kadar alkohol cairan destilat menggunakan alkoholmeter dibutuhkan minimal 100 mL destilat sehingga tidak dimungkinkan untuk mengukur kadar alkohol pada 24 jam, 72 jam dan 120 jam. Untuk mendapatkan 100 mL destilat yang akan diukur dengan alkoholmeter dibutuhkan cairan fermentasi lebih dari 500 mL sehingga sehingga pengukuran kadar bioetanol hanya dilakukan pada 168 jam. Penggunaan alat destilasi sederhana hanya mampu menghasilkan alkohol dengan kadar 40-50%, sedangkan penggunaan alat destilasi fraksionasi dapat menghasilkan alkohol dengan kemurnian mencapai 82-90% (Suryanto *et al.* 2008). Dari hasil pengujian bioetanol hasil destilasi, ternyata pada interaksi ragi tape 0,6% dan ragi roti 0,3% (interaksi starter di bawah 1%) mampu menghasilkan kadar bioetanol rata-rata 36% yang dapat terbakar dengan nyala api biru. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar bioetanol terendah yang dapat dijadikan bahan bakar adalah 36%. Menurut Komarayati *et al.* (2011), kadar bioetanol 30-50% merupakan kadar terendah yang dapat dijadikan bahan bakar kompor. Hasil perhitungan kadar bioetanol dengan kromatografi gas mungkin akan menunjukkan angka yang berbeda. Prinsip kerja kromatografi gas berdasarkan fase diam (air) dan fase bergerak (alkohol yang menguap) sedangkan alkoholmeter berdasarkan berat jenis campuran air dan alkohol.



Hal ini menyebabkan perbedaan tingkat sensitifitas dan keakuratan data yang diperoleh (Khamdiyah 2010).

## SIMPULAN

Penelitian menunjukkan bahwa Interaksi ragi tape dan ragi roti berpengaruh terhadap kadar bioetanol ketela pohon mukibat. Konsentrasi ragi tape dan ragi roti yang tinggi menghasilkan kadar bioetanol yang tinggi, serta Interaksi ragi tape 0,6% dan ragi roti 0,3% (T<sub>2</sub>R<sub>1</sub>) merupakan interaksi terendah yang efektif menghasilkan kadar bioetanol yang dapat terbakar (36,0%). Interaksi ragi tape 0,9% dan ragi roti 0,9% (T<sub>3</sub>R<sub>3</sub>) menghasilkan kadar bioetanol tertinggi dengan rata-rata mencapai 49,8%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anindyawati, T. (2009). Prospek enzim dan limbah lignoselulosa untuk produksi bioetanol. *Berita Selulosa* 44 (1), 49- 56.
- Apriyantono, A., Fardias, D., Puspitasari, N., Sedarnawati & Budiyanto, S. (1989). *Analisis Pangan*. Bogor: IPB-Press.
- Banati, F. S., Zulaika, E. & Nurhidayati, T. (2007). Pengaruh penambahan enzim  $\alpha$ -Amilase pada fermentasi karbohidrat ekstrak *Ulva fasciata* dari Balekambang, Malang menggunakan ragi roti Fermipan. *Brawijaya Smart Shcool*, (1):2-7.
- Bintari, S. H. (1992). Penggunaan isolate murni dari ragi tape pada fermentasi pembuatan brem padat. *Tesis*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Buckle, K.A., Edwards, R.A. & Fleet, G.H. (1987). *Ilmu Pangan*. Universitas Indonesia Press: Jakarta.
- Dwidjoseputro, D. (1998). *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djembatan.
- Elevri, P. A. & Putra, S.R. (2006). Produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang diamobilisasi dengan agar batang. *Akta Kimindo* 1(2): 105-114.
- Gandjar, I., Sjamsuridzal, W. & Oetari, A. (2009). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gozan, M., Samsuri, M., Siti, H.F., Bambang, P. & Nasikin, M. (2007). Sakarifikasi dan fermentasi bagas menjadi ethanol menggunakan enzim selulase dan enzim sellobiase. *Jurnal Teknologi*, 3: 209-215.
- Isroi. (2008). Mengukur kadar bioetanol. *On line at <http://isroi.com/2008/12/19/mengukur-kadar-bioetanol/>* [diakses tanggal 15 Mei 2012].
- Khamdiyah, N. (2010). Pembuatan etanol dari alga merah jenis *Eucheuma spinosum* dengan sakarifikasi dan tanpa sakarifikasi pada variasi lama fermentasi. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Malang.
- Komarayati, S, Ina, W. & Djarwanto. (2011). *Pembuatan bioetanol dari empulur sagu (Metroxylon sp.) dengan menggunakan enzim*. Bogor: Puslitbang Keteknikan dan Pengolah Hasil Hutan.
- Lestari, P., Darwis, A. A., Nurrichana & Damardjati, DS. (2001). Analisis gula reduksi hasil hidrolisis enzimatik pati ubi kayu oleh  $\alpha$ -amilase thermostabil dari *Bacillus stearothermophilus* TII<sub>12</sub>. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 6(1): 23-26.
- Muhiddin, N. H., Nuryati, J. & Aryantha, I.N.P. (2000). Peningkatan kandungan protein kulit umbi kayu melalui proses fermentasi. *Jurnal Matematika dan Sains*, 6 (1):1-12.
- Pelczar, M. & Chan. (1988). *Dasar- Dasar Mikrobiologi Jilid 1*. Terjemahan RS Hadioetomo, T Imas, SS Tjitrosomo dan SL Angka. Jakarta: UI Press.
- Purwoko, T. (2007). *Fisiologi Mikrobia*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Ristiarini, S., Indah, K., Adikaryo, M.I.L. & Wahyuni, M. (2001). Pola suksepsi mikroflora alami pada fermentasi nira swalan dan pemanfaatan dalam minuman fermentasi. *Biota*, 6 (1): 1-8.
- Saono, S., Rasuki, T. & Sastraatmadja, D. D. (1977). Indonesian ragi. Dalam: *Symposium of Indogeneos Fermented Food*. Bangkok, 21-27 November 1977.
- Sebayang, F. (2006). Pembuatan etanol dari molase secara fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* yang terimmobilisasi pada kalsium alginat. *Jurnal Teknik Proses* 5 (2): 68-74.
- Setyohadi. (2006). *Proses Mikrobiologi Pangan*. Medan: USU-Press.
- Simanjuntak, R. (2009). Studi Pembuatan Etanol dari Limbah Gula (Molase). *Skripsi*. Medan: USU.
- Soetanto, E. (2001). *Membuat Patilo dan Krupuk Ketela*. Yogyakarta: Kanisius.