



Produksi etanol pada media pyg dengan variasi suhu dan perbandingan media fermentasi menggunakan isolat IS258

Jamas Prameshwari, I Made Mahaputra Wijaya*, Ida Bagus Wayan Gunam

Teknologi Industri Pertanian, Universitas Udayana, Badung, Indonesia

Article history

Diterima:

4 Desember 2022

Diperbaiki:

20 Februari 2023

Disetujui:

20 Februari 2023

Keyword

Ethanol;

Fermentation media;

IS258 isolate;

Temperature variations

ABSTRACT

Bioethanol is produced by the fermentation of glucose (sugar) from natural sources using microorganisms. Prior isolate IS258 was distinguished as a potential yeast to produce bioethanol. This study aimed to determine the optimum fermentation temperature and compare fermentation media using IS258 isolate as a starter to produce ethanol optimally. This study conducted four fermentation temperature treatments (24, 26, 28, and 30 °C) and compared two fermentation media, namely, PYG (Peptone Yeast Glucose) media used in the lab for probed, and coconut sap in traditional fermentation. There are diverse stages that were conducted in this research, namely cell rejuvenation, propagation of the IS258 isolate, fermentation, distillation, and calculation of tested variables. The optimum temperature of fermentation acquires at 28 °C with a difference of total dissolved solids 12,4 °brix, which attains 104,13 ml of accumulated ethanol. During the comparison test of fermentation media, the optimum PYG media produced the highest total ethanol, which was 105,46 ml. The difference in the total yield of ethanol is affected by the differences in the nutrients of carbon (C) and nitrogen (N) elements contained between the media, which was lacking in coconut sap



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

* Penulis korespondensi

Email : mahaputrawijaya@unud.ac.id

DOI 10.21107/agrointek.v18i2.17641

PENDAHULUAN

Bahan bakar fosil memasok lebih dari 75% dari total energi yang dikonsumsi masyarakat (Hall *et al.* 2014). Pada tahun 2018, pangsa permintaan energi fosil terbesar di Indonesia ialah pada sektor transportasi, yaitu untuk pengguna sepeda motor yang mencapai 41%. Hal tersebut dipengaruhi oleh jumlah pengguna sepeda motor yang sudah mencapai lebih dari 118 juta unit (Sekjen DEN, 2019). Oleh sebab itu, dibutuhkan energi alternatif yang dapat membantu dalam menyelesaikan problematika kebutuhan bahan bakar fosil, di mana salah satu energi alternatif tersebut ialah bioenergi.

Bioenergi adalah energi yang diperoleh dari organisme biologis atau bahan organik yang dapat diperbaharui (Dharmawan *et al.* 2018). Biofuel merupakan bioenergi yang paling banyak dikembangkan. Hal tersebut karena biofuel adalah bioenergi yang dapat digunakan untuk mensubstitusi energi fosil yang dimanfaatkan sebagai bahan bakar kendaraan yang persentase penggunaannya paling tinggi. Salah satu biofuel yang dapat dikembangkan ialah bioetanol (Miskat *et al.* 2020).

Bioetanol sebagai salah satu biofuel adalah etanol yang dapat dihasilkan dari proses fermentasi glukosa (gula) dari bahan alam dengan menggunakan mikroorganisme (Sulaiman *et al.* 2021). Bioetanol dapat dimanfaatkan pada sektor transportasi dan sektor industri. Bioetanol dapat diproduksi dari dua jenis bahan baku, yaitu bahan baku padat dan cair (Handayani 2016). Akan tetapi, bioetanol yang diproduksi dari bahan baku cair memiliki kelebihan, yaitu bahan baku cair umumnya banyak mengandung gula dan dapat langsung difermentasi untuk diubah menjadi bioetanol sehingga dapat mempersingkat tahapan produksinya (Manurung *et al.* 2016). Salah satu bahan baku cair yang berpotensi besar dapat diproduksi menjadi bioetanol ialah nira (LIPI 2019).

Nira adalah cairan yang dihasilkan dari tanaman melalui proses penyadapan (Syafitri 2017). Salah satu nira yang umum dapat digunakan ialah nira kelapa. Hal tersebut karena kandungan gula pada nira kelapa yang cukup tinggi, yakni berkisar antara 13,51–14,77% (Mashud dan Matana, 2014). Tanaman kelapa (*Cocos nucifera* L.) sebagai tanaman penghasil nira merupakan tanaman tropis yang banyak

tumbuh dan telah lama dikenal oleh masyarakat Indonesia (ILO 2013). Tanaman kelapa dapat menghasilkan nira sebanyak 2–4 liter per pohon per harinya (Tamrin and Ta'lin 2013). Bali merupakan salah satu daerah penyebaran tanaman kelapa di Indonesia. Berdasarkan observasi langsung, di Bali, nira kelapa yang difermentasi hanya dimanfaatkan menjadi minuman beralkohol yang dinamakan Arak Bali. Padahal, jika didistilasi lebih lanjut dapat diolah menjadi bioetanol yang lebih bermanfaat.

Simbolon *et al.* (2018) sebelumnya telah mengisolasi isolat khamir potensial penghasil bioetanol di Desa Tri Eka Buana-Karangasem yang merupakan salah satu desa penghasil arak di Bali, yaitu IS258. Dari pengamatan mikroskop, IS258 diperkirakan merupakan khamir bergenus *Saccharomyces* sp. Isolat IS258 dapat memproduksi etanol lebih banyak apabila dibandingkan dengan *yeast* komersial Alcotec. Isolat IS258 dapat memproduksi etanol lebih banyak, yaitu sebesar 10,38% dibandingkan dengan *dry yeast alcotec* (Simbolon *et al.* 2018). Berdasarkan hasil penelitian Wulandari (2019), optimasi media pertumbuhan IS258 memengaruhi etanol yang diproduksi, di mana hasil fermentasi di media Peptone Yeast Glukosa (PYG) dengan konsentrasi 9 dan 5 g/l dapat menghasilkan etanol sebesar 100,6 ml per 1000 ml media. Selain jenis mikroorganisme, faktor lain juga dapat memengaruhi hasil fermentasi bioetanol, seperti suhu dan jenis media fermentasi (Moede *et al.* 2017).

Suhu fermentasi dapat memengaruhi lama fermentasi dan total etanol yang akan dihasilkan. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* memiliki suhu optimum pertumbuhan, yaitu pada suhu 25–30°C (Akhir *et al.* 2015). Sementara itu, *dry yeast Alcotec* kemungkinan lebih optimal bekerja pada suhu rendah, yaitu pada suhu 18–20°C. Dengan demikian, dibutuhkan penelitian mengenai variasi suhu fermentasi menggunakan isolat IS258 guna mengetahui suhu optimal untuk memproduksi etanol. Faktor lainnya yang dapat memengaruhi fermentasi etanol ialah jenis media fermentasi.

Jenis media fermentasi berkaitan dengan nutrisi yang terkandung di dalam media tersebut. Nutrisi pada media berperan penting untuk pertumbuhan dan kinerja mikroba (Wardani and Agustini 2017). Media yang digunakan harus mengandung nutrisi seperti karbohidrat yang merupakan sumber karbon dan protein yang

merupakan nutrisi yang penting dalam mendukung aktivitas dan metabolisme mikroorganisme (Aini and Rahayu 2015). Media PYG (Pepton Yeast Glukosa) merupakan media yang dipilih untuk menguji kinerja isolat IS258 dalam menghasilkan etanol.

Media PYG memiliki kemampuan sebagai sumber nutrisi yang diperlukan oleh khamir secara umum (Kellogg 2016). Penelitian ini melanjutkan hasil penelitian Wulandari (2019) sebelumnya tentang optimasi konsentrasi *Yeast Extract* dan *Peptone* terhadap produksi etanol menggunakan isolat IS258. Selain media PYG, banyak bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai media fermentasi IS258. Salah satunya adalah nira kelapa yang merupakan bahan yang umum digunakan di masyarakat. Nira kelapa mudah untuk ditemukan dan memiliki harga yang terjangkau (Asih 2019). Sehingga penelitian mengenai perbandingan variasi media fermentasi dinilai penting untuk dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat IS258 dalam memproduksi etanol pada media yang berbeda.

Berdasarkan permasalahan di atas, penelitian ini ditujukan untuk mengetahui suhu fermentasi (24, 26, 28 dan 30°C) yang optimal dan perbandingan jenis media fermentasi antara media PYG dan nira kelapa dalam memproduksi etanol dengan isolat IS258. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat memberikan informasi tentang suhu fermentasi dan jenis media fermentasi sehingga dapat memproduksi etanol dengan optimal menggunakan isolat IS258.

METODE

Bahan dan Alat

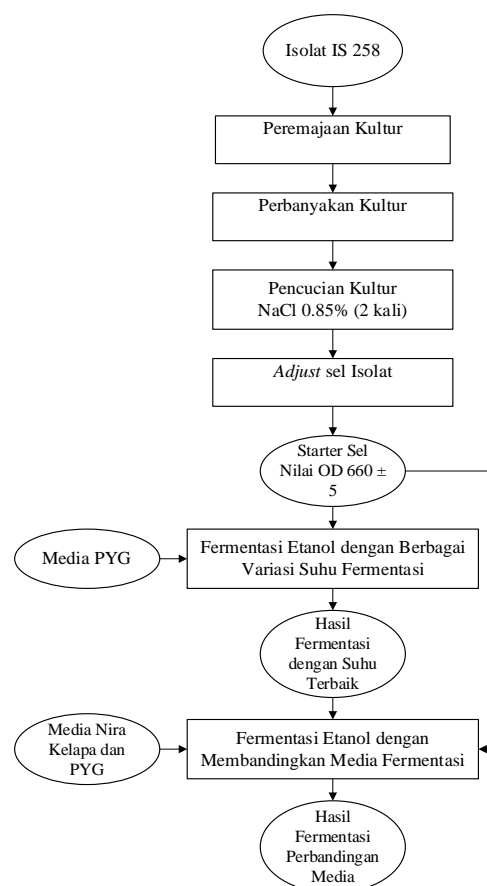
Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat khamir IS258 yang diperoleh dari kultur stok hasil isolasi penelitian Simbolon *et al.* (2018). Media Pepton Yeast Glukosa (PYG) menggunakan *buffered peptone water* (Merck), *yeast extract* (Himedia), glukosa (Brataco), nira kelapa, NaCl 0,85 % (Merck), NaOH, asam sitrat, akuades, natrium metabisulfid, *Lowry solution*, *bovine serum albumin/BSA*, larutan nelson, arsenomolibdat, reagen *Folin*, dan gliserol 40 %.

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi spektrofotometer *UV-visible* (Libra), refraktometer (*manual refractometer Rhb-32atc brix*), alkoholmeter (Aventru), pH meter (Trans), distilator refluks (LabBioin), *centrifuge* (UniCen MR-Herolab GmbH), magnetic stirrer

(MaxBlend), inkubator, *autoclave* (Daihan Scientific), *waterbath shaker* (P Selecta), sterilisator kering (Elitech), *shaker rotator* (Health), timbangan, *vortex* (Thermo Scientific), *laminar air flow* (Wina Instruments), tabung reaksi (Pyrex), erlenmeyer (Iwaki), gelas beker (Pirex-Iwaki), botol kaca (Duran), gelas ukur (Pyrex).

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui tahapan yang ditunjukkan pada diagram alir berikut:



Gambar 1 Diagram alir penelitian produksi etanol pada media PYG dengan variasi suhu dan perbandingan media fermentasi menggunakan isolat IS258 (Wulandari 2019 modifikasi)

Persiapan Kultur IS258

Pelaksanaan penelitian diawali dengan proses pembuatan stok kultur isolat IS258 menggunakan media Peptone Yeast Glukosa (PYG). Tahap pertama pembuatan stok kultur ialah proses peremajaan isolat IS258 menggunakan proses peremajaan bertingkat, di mana isolat IS258 diinokulasi pada media PYG volume 10 ml yang mengandung kadar glukosa yang terus meningkat dari 2–15% setiap harinya.

Isolat IS258 diinkubasi pada suhu 30 °C menggunakan inkubator selama 24 jam. Kemudian, isolat IS258 dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* dengan tambahan gliserol 40 % sebanyak 1:1. Selanjutnya, proses peremajaan isolat IS258 dilakukan kembali pada media PYG 10 ml menggunakan stok kultur hasil dari peremajaan bertingkat. Isolat IS258 diinkubasi pada suhu ruang menggunakan *shaker rotator* dengan kecepatan 100 *rpm* selama 24 jam. Proses tersebut dilanjutkan dengan perbanyakkan kultur IS258 dengan menginokulasikan hasil peremajaan IS258 ke dalam volume media yang lebih besar (1L) dan diinkubasi pada suhu ruang menggunakan *shaker rotator* dengan kecepatan 100 *rpm* selama 24 jam (Wulandari 2019). Hasil dari proses perbanyakkan isolat IS258 kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 *rpm* selama lima menit untuk selanjutnya dilakukan pencucian pelet (sel) dengan larutan NaCl 0,85% sebanyak dua kali. Pelet (sel) yang dihasilkan dari proses pencucian sel disamakan tingkat kekeruhannya (*adjust*) dengan nilai $OD_{660} \pm 5$ menggunakan spektrofotometri (Putra 2014 modifikasi).

Fermentasi Etanol dengan Berbagai Variasi Suhu

Proses fermentasi dilakukan pada media *Peptone Yeast Glukosa* (PYG) optimal (Peptone 9 g/L, *Yeast Extract* 5 g/l, dan glukosa 20%) pH 6,0 untuk memproduksi etanol berdasarkan penelitian Wulandari (2019). Media PYG diinokulasikan dengan isolat yang sudah di-*adjust* dengan nilai $OD_{660} \pm 5$ sebanyak 1% dari volume total media PYG (900 ml) yang digunakan sebagai media fermentasi. Fermentasi dilakukan dengan variasi suhu fermentasi 24, 26, 28 dan 30°C selama sepuluh hari serta dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil fermentasi kemudian didistilasi menggunakan distilator refluks pada suhu ± 85 °C dan diukur kadar etanolnya menggunakan alkohol meter, serta total padatan terlarut menggunakan refraktometer (Yuda 2018). Untuk simplifikasi dan lebih menunjukkan perbedaan hasil etanol, total etanol yang didapat dari perhitungan kadar etanol dikalikan dengan volume fermentasi yang digunakan untuk menyajikan data etanol hasil penelitian ini.

Fermentasi Etanol dengan Membandingkan Media Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan pada dua media berbeda, yaitu media *Peptone Yeast Glukosa* (PYG) optimal berdasarkan penelitian Wulandari

(2019) dan media nira kelapa. Media nira kelapa setelah dipanen dari bunga kelapa terlebih dahulu dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit. Pada proses persiapan media nira kelapa, salah satu media nira kelapa diatur pH-nya menjadi pH 6 sesuai dengan media PYG. Kemudian, media fermentasi yang telah siap diinokulasikan dengan isolat yang sudah di-*adjust* dengan nilai $OD_{660} \pm 5$ sebanyak 1% dari volume total media PYG (900ml). Fermentasi dilakukan pada kondisi optimal fermentasi, yaitu pada suhu fermentasi terbaik yang didapat. Hasil fermentasi kemudian didistilasi menggunakan distilator refluks pada suhu ± 85 °C dan diukur kadar etanolnya menggunakan alkohol meter total gula dengan Metode Nelson-Somogyi serta kadar protein dengan Metode Lowry.

Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah total volume etanol (Yuda 2018) dan total padatan terlarut (Magwaza and Opara 2015) untuk penelitian variasi suhu fermentasi yang optimal serta pengujian tambahan total gula dengan Metode Nelson-Somogyi (Haryanti and Mustaufik 2020) dan kadar protein dengan Metode Lowry (Kose *et al.* 2017) untuk penelitian perbandingan media fermentasi etanol dengan IS258.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Variasi Suhu Fermentasi dalam Produksi Etanol

Pada penelitian ini dilakukan empat perlakuan suhu fermentasi, yaitu pada suhu 24 °C, 26 °C, 28 °C dan 30 °C dengan lama fermentasi selama sepuluh hari. Hasil total etanol yang diperoleh dari hasil fermentasi tersebut dan kemudian distilasi ditampilkan pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa variasi suhu fermentasi yang berbeda dalam memproduksi etanol menghasilkan total etanol yang berbeda-beda. Total etanol tertinggi diperoleh dari fermentasi pada suhu 28°C. Pada suhu fermentasi tersebut terjadi penurunan total padatan terlarut sebesar 12,4°brix (°brix adalah representasi generik dari kadar gula) dengan total padatan terlarut awal 19,2°brix yang turun menjadi 6,8°brix dan menghasilkan etanol sebesar 104,13 ml. Sementara itu, total etanol terendah diperoleh dari fermentasi pada suhu 30°C. Pada suhu tersebut terjadi penurunan total padatan terlarut sebesar 10,5°brix dengan total padatan

terlarut awal 19,5°brix yang turun menjadi 9°brix dan menghasilkan etanol sebesar 99,5 ml. Semakin besar nilai penurunan total padatan terlarut, maka semakin besar pula nilai total etanol yang didapatkan (Vacurovic *et al.* 2017).

Dalam penelitian ini, apabila suhu fermentasi yang lebih rendah maupun lebih tinggi, maka nilai total etanol yang didapatkan menjadi lebih kecil. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Torija *et al.* (2021) tentang pengaruh suhu fermentasi terhadap kinerja khamir *Saccharomyces sp.* dalam memproduksi etanol. Dalam suhu rendah khamir akan memperlambat laju fermentasi sehingga membuat gula lebih cepat habis di awal fermentasi sehingga total etanol yang dihasilkan sedikit.

Sementara itu, pada suhu tinggi, khamir lebih cepat mencapai populasi maksimal lebih awal dan membuat produksi etanol serta pertumbuhan khamir menjadi kurang optimal. Ketahanan khamir terhadap suhu tertentu dalam memproduksi etanol juga berhubungan dengan kondisi alami dari asal khamir tersebut ditemukan (Unal *et al.* 2022).

Perbandingan Berbagai Media Fermentasi dalam Produksi Etanol

Pada penelitian ini dilakukan perbandingan media fermentasi, yakni perbandingan media PYG dan media nira kelapa. Hasil total etanol yang diperoleh dari hasil distilasi perbandingan media fermentasi ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 1 Total etanol hasil distilasi variasi suhu fermentasi

Suhu Fermentasi (°C)	Padatan Terlarut Awal (°brix)	Padatan Terlarut Akhir (°brix)	Selisih total Padatan Terlarut (Δ °brix)	Total Etanol (ml)			Rerata Total Etanol
				1	2	3	
24	19,60	8,80	10,80	98,50	99,00	101,60	99,70
26	19,20	11,40	7,80	99,32	100,10	101,30	100,24
28*	19,20	6,80	12,40	99,50	104,00	108,90	104,13
30	19,50	9,00	10,50	102,80	97,20	98,50	99,50

Tabel 2 Total etanol hasil distilasi perbandingan media fermentasi

Media Fermentasi	Total Etanol (ml)			Rerata Total Etanol
	1	2	3	
Media PYG*	101,00	104,62	110,77	105,46
Nira Kelapa Asli	9,23	11,09	19,58	13,30
Nira Kelapa pH 6	10,50	7,74	8,00	8,75

Tabel 3 Total gula media fermentasi

Media Fermentasi	Total Gula Awal (%)	Total Gula Akhir (%)	Selisih Total Gula (Δ %)
Media PYG*	18,92	4,27	14,65
Nira Kelapa	14,07	10,83	3,24
Nira Kelapa pH 6	13,94	11,43	2,51

Tabel 4 Kadar protein media fermentasi

Media Fermentasi	Total Protein Awal (%)	Total Protein Akhir (%)	Selisih Total Protein (Δ %)
Media PYG*	0,39	0,20	0,19
Nira Kelapa	0,15	0,13	0,02
Nira Kelapa pH 6	0,16	0,10	0,06

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa fermentasi yang dilakukan pada media PYG mendapatkan total etanol tertinggi, yaitu sebesar 105,46 ml. Media yang menghasilkan total etanol terendah ialah media nira kelapa dengan pH 6, yaitu sebesar 8,75 ml. Hal tersebut diperkirakan karena kandungan nutrisi yang terdapat dalam masing-masing media yang jumlahnya berbeda. Dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangbiakan khamir diperlukan unsur nutrisi seperti karbon (C), nitrogen (N), fosfor (P), mineral dan vitamin (Sa'adah, 2018). Kandungan nutrisi yang kurang atau berlebih akan mengganggu pertumbuhan dan kemampuan khamir dalam memproduksi etanol (Wulandari, 2019). Pada penelitian ini dilakukan pengujian total gula yang dimiliki dan yang tersisa pada media sebelum dan sesudah fermentasi. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kecukupan nutrisi yang terkandung dalam media fermentasi.

Adapun hasil pengujian total gula ditampilkan pada Tabel 3. Hasil fermentasi dengan media PYG memiliki penurunan total gula paling tinggi, yaitu dengan selisih total gula 14,65 % dari total gula awal 18,92 % menjadi 4,27 %. Sementara itu, penurunan total gula paling rendah terjadi pada media fermentasi nira kelapa dengan pH 6 dengan selisih total gula 2,51 % dari total gula awal 13,94 % menjadi 11,43 %. Berbagai jenis media fermentasi tersebut memiliki kandungan gula yang cukup untuk fermentasi bioetanol. Menurut Silaban *et al.* (2017), kandungan gula yang mencapai 10–20 % sangat baik jika digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Gula menjadi sumber utama karbon (C) yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan kemampuan mikroorganisme dalam melakukan proses fermentasi (Sopandi dan Wardah, 2017). Perbedaan hasil total etanol yang didapat diperkirakan terjadi karena nutrisi lain yang dibutuhkan untuk mendukung proses fermentasi tidak mencukupi pada media fermentasi. Karena hal tersebut dibutuhkan pengujian kandungan nutrisi lainnya yang terdapat di dalam media, yaitu pengujian kadar protein media fermentasi yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa media PYG memiliki kadar protein awal yang lebih tinggi dibandingkan dengan nira kelapa, yaitu 0,39 %. Protein merupakan salah satu sumber nitrogen (N) organik (Teguh 2017). Sumber nitrogen digunakan oleh mikroba untuk mempercepat pertumbuhan sel dalam fermentasi (Pangestu

2022). Dengan demikian, melalui selisih kadar protein pada masing-masing media fermentasi tersebut, dapat diperkirakan kandungan proteinlah yang menyebabkan hasil fermentasi etanol dengan media PYG dan nira kelapa sangat berbeda.

Menurut penelitian Barahona *et al.* (2019), ketika tidak ada sumber nitrogen yang ditambahkan ke media fermentasi, maka populasi khamir *S. cerevisiae* hanya mengalami peningkatan pertumbuhan yang rendah sehingga menyebabkan tingkat konsumsi glukosa yang rendah, yaitu mulai dari 7% hingga 12% dari total glukosa. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan yang didapat pada penelitian ini, di mana kemungkinan populasi isolat IS258 tidak banyak tumbuh dan berkembang dalam mengubah gula untuk menghasilkan etanol sehingga total etanol yang didapat menjadi rendah seperti yang tercantum pada Tabel 2 dan Tabel 3. Kekurangan sumber nitrogen kemungkinan menyebabkan khamir cepat memasuki tahap kondisi kelaparan sel, di mana sel khamir berhenti atau menghindari dalam melakukan pembelahan sel untuk mempertahankan kelangsungan hidup khamir dalam kondisi nutrisi yang terbatas atau kematian sel khamir tidak dapat dihindari (Suzuki 2013).

Rendahnya kandungan protein pada nira kelapa menjadikan opsi untuk menambahkan sumber protein tambahan pada nira ketika melakukan fermentasi nira. Hal ini ditujukan agar khamir IS258 maupun starter lainnya yang digunakan dapat mengonsumsi gula yang terkandung dalam nira dengan optimal dan mendapatkan jumlah etanol yang maksimal sebagai alternatif yang fisibel untuk dicoba. Walaupun jumlah protein yang tepat dan sumber protein yang sesuai untuk ditambahkan ke dalam nira dalam memaksimalkan hasil etanol masih harus dipelajari dan membutuhkan penelitian lebih lanjut di masa depan dalam rangka mewujudkan etanol dari nira kelapa sebagai biofuel maupun produk turunan yang lebih bermanfaat di masa depan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa suhu fermentasi optimal dalam memproduksi etanol dengan isolat IS258 adalah pada suhu 28 °C yang dapat menghasilkan etanol sebesar 104,13 ml. Produksi etanol dengan isolat IS258 pada media nira kelapa belum optimal, yaitu 13,30 ml per 900 ml media nira dibandingkan dengan media PYG. Hal ini

kemungkinan disebabkan oleh kurangnya nutrisi pada nira sebagai media fermentasi yang mempengaruhi hasil fermentasi etanol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Udayana yang mendukung pembiayaan penelitian ini melalui skema PUU ke pada IMMW dan IBWG.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, N., Rahayu, T., 2015. Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS. 861–866.
- Akhir, Y.M., Chairul, Drastinawati., 2015. Pembuatan Bioetanol dari Fermentasi Nira Aren (*Arenga pinnata*) Menggunakan Yeast *Saccharomyces cerevisiae* dengan Pengaruh Variasi Konsentrasi Nutrisi dan Waktu Fermentasi. *Jom Fteknik*, 2(1), 1–5.
- Asih, M.D.A., 2019. Pengukuran Kadar Sukrosa Nira Kelapa pada Berbagai Umur Tanaman. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Jurusan Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, Jember, Jawa Timur.
- Barahona, P.P., Ramos, P.M., Gill, J.M., and Briones, A., 2019. Assessment of The Effect of Nitrogen Concentration on Fermentation and Selection of a Highly Competitive *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Efficient Ethanol Production. *Energies*. 12(13), 1–12. doi.org/10.3390/en12132614
- Dharmawan, A.H., Nuva, Sudaryanti, D.A., Prameswari, A.A., Amalia, R., and Dermawan, A., 2018. Pengembangan Bioenergi di Indonesia. Paper CIFOR. http://www.cifor.org/publications/pdf_files/WPapers/WP242Dharmawan.pdf.
- Hall, C.A.S., Lambert, J.G., and Balogh, S.B., 2014. EROI of Different and The Implications for Society. *Energy Policy*. 64, 141–152. doi.org/10.1016/j.enpol.2013.05.049.
- Handayani, G., 2016. Pengaruh Suhu dan Volume Starter dalam Pembuatan Bioetanol dari Nira Aren (*Arenga pinnata* Merr). Skripsi. Tidak Dipublikasi. Fakultas Teknik, Universitas Sumatera Utara, Medan-Sumatera Utara.
- Haryanti, Mustaufik., 2020. Evaluasi Mutu Gula Kelapa Kristal (Gula Semut) di Kawasan Home Industri Gula Kelapa Kabupaten Banyumas. *J. Agrotek*. 5(1), 48–61.
- ILO., 2013. Kajian Kelapa dengan Pendekatan Rantai Nilai dan Iklim Usaha di Kabupaten Sarmi. Kajian Rantai Nilai Kelapa dan Iklim Investasi Sarmi. https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---asia/---ro-bangkok/---ilo-jakarta/documents/publication/wcms_342734.pdf.
- Kellogg, C., 2016. Phenotypic Studies of *pho13* in *Saccharomyces cerevisiae*. Theses. Rochester Institute of Technology, New York, United States.
- Kose, A., Ozen, M.O., Elibol, M., and Oncel, S.S., 2017. Investigation of In Vitro Digestibility of Dietary Microalga *Chlorella vulgaris* and *Cyanobacterium Spirulina platensis* as a Nutritional Supplement. *Biotech*. 7(3), 170. doi: 10.1007/s13205-017-0832-4.
- LIPI., 2019. Perkembangan Bioetanol G2: Teknologi dan Perspektif. LIPI Press, Jakarta.
- Magwaza, L.S., Opara U.L., 2015. Analytical Methods for Determination of Sugar and Sweetness of Horticultural Products. *Sci. Hortic*. 184, 179–192. doi.org/10.1016/j.scienta.2015.01.001.
- Manurung, M.M., Handayani, G., and Herlina, N., 2016. Pembuatan Bioetanol dari Nira Aren (*Arenga pinnata* Merr) Menggunakan *Sacharomyces cerevisiae*. *Jurnal Teknik Kimia*. 5(4), 21–25.
- Mashud, N., Matana, Y.R., 2014. Produktivitas Nira Beberapa Aksesi Kelapa Genjah. *Jurnal Palma*. 15(2), 110–114.
- Miskat, M.I., Ahmed, A., Chowdhury, H., Chowdhury, T., Chowdhury, P., Sait, S.M., and Park, Y.K., 2020. Assessing the Theoretical Prospects of Bioethanol Production as a Biofuel from Agricultural Residues in Bangladesh. *Journal Sustainability*. 12(20), 1–18, doi.org/10.3390/su12208583.
- Moede, F.K., Gonggo, S.T., and Ratman, R., 2017. Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol dari Pati Ubi Jalar Kuning (*Ipomes batata* L). *Jurnal Akademika Kimia*. 6(2), 86–91. doi: 10.22487/j24775185.2017.v6.i2.9238.

- Pangestu, Edy., 2022. Pengaruh Konsentrasi Ragi Roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Urea Terhadap Kadar dan Volumen Bioetanol Subtrat Limbah Buah Pisang. Thesis. Tidak Dipublikasi. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, Jawa Timur.
- Putra, D.T.A., 2014. Rancang Bangun Alat Distilasi Oli Bekas (Perawatan dan Perbaikan. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Politeknik Negeri Sriwijaya, Palembang, Sumatera Selatan.
- Sa'adah, N., 2018. Pembiakan Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan Uji Antagonis Terhadap *Gleosporium* sp. Penyebab Penyakit Busuk Buah pada Apel. Skripsi. Tidak dipublikasi. Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.
- Sekjen DEN., 2019. Outlook Energi Indonesia 2019. National Energy Council, Jakarta.
- Silaban, B.M.J., Yuwono, L.F., and Widjaja, T., 2017. Optimasi Fermentasi Produksi Etanol dari Nira Siwalan (*Borassus flabellifer*) Menggunakan Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipites* dengan Response Surface Methodology. Skripsi. Tidak dipublikasi. Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya, Jawa Timur.
- Simbolon, N.C., Wijaya, I.M.M., Gunam, I.B.W., 2018. Isolasi dan Karakterisasi Khamir Potensial Penghasil Bioetanol dari Industri Arak di Karangasem Bali. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 6(4), 316-326.
- Sopandi, T., Wardah, A., 2017. Ethanol Production and Sugar Consumption of Co-Culture *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 with *Candida tropicalis* FNCC 3033 in Media Containing Inhibitor Fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 7(2), 160–167. doi: 10.15414/jmbfs.2017.7.2.160-167.
- Sulaiman, D., Syahdan, St., and Ulva, S.M., 2021. Characteristics of Bioethanol from *Musa salaccensis* ZOLL. *International Journal of Science and Society*. 3(4), 16–23. doi.org/10.54783/ijssoc.v3i4.389
- Suzuki, K., 2013. Selective Autophagy in Budding Yeast. *Cell Death and Differentiation*. 20, 43–48. doi: 10.1038/cdd.2012.73.
- Syafitri, P.R., 2017. Sifat Mikro-Kimiawi Gula Semut Kelapa dengan Penambahan Ekstrak Bunga Kecombrang pada Nira Kelapa. Skripsi. Tidak Dipublikasi. Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang, Jawa Tengah.
- Tamrin, Ta'lin., 2013. Modifikasi dan Perbaikan Kinerja Alat Pengiris Mayang Kelapa untuk Menyadap Nira. *Agritech*. 33(4), 477–482.
- Teguh, S., 2017. Klasifikasi Makhhluk Hidup: Buku Pengayaan Biologi. Azka Pressindo, Solo.
- Toriya, M.J., Mas, A., Sengun, I.Y., and Beltran, G., 2021. Wine Yeast: Physiology and Growth Factors. 1st ed. CRC Press, Florida.
- Unal, M.U., Chowdhury, G., and Sener, A., 2022. Effect of Temperature and Nitrogen Supplementation on Bioethanol Production from Waste Bread, Watermelon and Muskmelon by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*. 13(4), 395-399 doi.org/10.1080/17597269.2020.1724440.
- Vucurovic, V.M., Puskas, V.S., and Miljic, U.D., 2018. Bioethanol Production from Sugar Beet Molasses and Thick Juice by Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*. 125(1), 134–142. doi.org/10.1002/jib.536.
- Wardani, R.Y., Rudiana, A., 2017. Pengaruh Konsentrasi Yeast Hydrolysate Enzymatic (YHE) Sebagai Suplemen Media Kultur untuk Pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Chemistry*. 6(1), 25–31.
- Wulandari, I.A.E.P., 2019. Optimasi Konsentrasi Yeast Extract dan Peptone pada Media Tumbuh Khamir Potensial Isolat IS258 Menggunakan Response Surface Methodology. Skripsi. Tidak Dipublikasi. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Denpasar, Bali.
- Yuda, I.G.Y.W., 2018. Pengaruh pH Awal Media dan Konsentrasi Substrat pada Proses Fermentasi Terhadap Produksi Bioetanol dari Tepung Biji Kluwih dengan Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Skripsi. Tidak Dipublikasi. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Denpasar, Bali.