

## **NASKAH PUBLIKASI**

### **PENGARUH VARIASI KADAR MOLASE DAN LIMBAH JAMU (BERAS KENCUR) TERHADAP BIOETANOL YANG DIHASILKAN OLEH *Saccharomyces cerevisiae***

Disusun oleh:

Cahyo Adi Laksana

NPM: 11 08 01222



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA  
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
YOGYAKARTA  
2016**

**Pengaruh Variasi Kadar Molase dan Limbah Jamu (Beras Kencur)  
terhadap Penghasilan Bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae***

**The Influence of Molases Concentration and Herbs Waste (Beras Kencur) to  
Bioetanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*.**

Cahyo Adi Laksana<sup>1</sup>, Bernardus Boy Rahardjo Sidharta<sup>1</sup>, Exsupransia Mursyanti<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Jalan Babarsari  
No. 44 Yogyakarta

**ABSTRAK**

Limbah jamu beras kencur merupakan limbah organik yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan bioetanol. Hal ini disebabkan karena kandungan karbohidratnya yang cukup tinggi (4,14 gram pada kencur dan 78,9 gram pada beras). Molase adalah hasil samping pembuatan gula tebu, memiliki kandungan gula yang cukup tinggi (sukrosa 30-40 %, glukosa 4-9 %, dan fruktosa 5-12 %) dapat digunakan sebagai nutrisi tambahan dalam proses fermentasi anaerobik, harganya yang murah dan mudah didapatkan. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui perbandingan konsentrasi pati limbah beras kencur dengan molase yang tepat untuk menghasilkan bioetanol yang maksimum. Produksi etanol menggunakan botol bekas wadah sirup yang bagian atas diberi selang kecil berdiameter 0,5 cm untuk akses keluar CO<sub>2</sub>. Selang diletakkan pada ember yang berisi air untuk melihat terjadinya proses fermentasi dengan indikator adanya gelembung pada air. Variasi molase yang digunakan adalah 10, 20, 30, dan 40 %. Fermentasi bahan-bahan dilakukan 72 jam. Parameter yang diamati yaitu pH, pola pertumbuhan sel khamir, serta kadar etanol yang dihasilkan. Tahapan percobaan yang dilakukan meliputi, isolasi khamir *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), uji kemurnian sel khamir, pembuatan pati limbah beras kencur, pengujian gula dalam pati limbah beras kencur, fermentasi medium, dan analisis presentase kadar etanol yang dihasilkan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANAVA menggunakan SPSS versi 20.0 pada tingkat kepercayaan 95 %. Kadar bioetanol yang maksimum didapat pada pH 4,14 (kontrol), 4,66 (variasi kadar molase 10 %), 5,34 (variasi kadar molase 20 %), 5,21 (variasi kadar molase 30 %), dan 5,56 (variasi kadar molase 40 %). Hasil yang diperoleh dari pengamatan pola pertumbuhan didapatkan bahwa pada jam ke-16 terjadi peningkatan pertumbuhan, pada jam ke-20 hingga 28 memasuki fase stasioner, dan jam ke-32 memiliki penurunan pertumbuhan. Persentase kadar etanol diukur menggunakan kromatografi gas dengan hasil tertinggi pada medium dengan variasi penambahan molase 40 % (10,047 %). Kadar etanol terendah terdapat pada medium dengan variasi penambahan molase 0 % (kontrol) dengan nilai sebesar 4,007 %.

Kata Kunci: limbah jamu, molase, bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*

## **Pendahuluan**

Jamu adalah racikan dari berbagai tanaman obat (Suharmiati dan Handayani, 2006). Indonesia mempunyai tanaman herbal yang sudah banyak dimanfaatkan untuk bahan pembuat jamu seperti jamu beras kencur, jamu kunir asem, pahitan yang sudah banyak dimanfaatkan untuk penunjang kesehatan (Suharmiati dan Handayani, 2006).

Bahan baku tanaman herbal yang meningkat dapat dimanfaatkan sebagai bahan utama untuk menanggulangi krisis energi karena pada saat ini, Indonesia juga terancam mengalami krisis energi jika tidak ada antisipasi dari sekarang. Salah satu cara untuk mengantisipasi krisis energi adalah dengan memproduksi bioetanol. Bioetanol adalah suatu bentuk energi alternatif karena dapat diproduksi dari fermentasi bahan yang mengandung amilum, sukrosa, glukosa, maupun fruktosa (Purba, 2009). Selain itu, juga dapat diproduksi dari komponen pati atau selulosa (Hambali dkk., 2007).

Jamu beras kencur adalah jamu yang terbuat dari kombinasi rimpang kencur dan beras. Rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) (Steenis, 1997), mempunyai kandungan pati sebesar 4,14% (Herbie, 2015) sedangkan beras mempunyai kandungan karbohidrat mencapai 78,9 g/ 100 g bahan. Adanya kandungan tersebut, beras dan rimpang dalam jamu beras kencur sangat berpotensi untuk menjadi sumber karbon bagi khamir dalam proses fermentasi. Kandungan pada molase yang dimanfaatkan adalah gula yang nilainya mencapai 48-56 % (Judoatmidjojo dkk., 1992).

## Metode Penelitian

### 1. Alat dan Bahan

Bahan utama dari penelitian ini yaitu limbah jamu beras kencur (produsen jamu rumahan) dan molase, *Saccharomyces cerevisiae* diisolasi dari ragi kering merk Fermipan. Hidrolisis menggunakan HNO<sub>3</sub> 7%. Bahan yang lain berupa medium *Potato Dextrose Agar*, *Potato Dextrose Broth*, alkohol 70%, aquades, NaOH 0,1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%, Urea, *Yeast Extract*, glukosa anhidrat, *methyl blue*, cat Ziehl Nelsen, dan molase.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow* (ESCO Airstream®), autoklaf (HICLAVE™ HVE-50), *petridish*, mikropipet (Scorex), mikrotip, jarum ose, jarum enten, erlenmeyer ukuran (100 ml, 250 ml, 500 ml, dan 1000 ml), tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet ukur 10 ml, pipet ukur 1 ml, *flow pipet*, *magnetic stirrer* (HSO707 V2), timbangan digital (Mettler Toledo AL204), sendok gading, gelas pengaduk, oven (MMM Mendcenter), *microwave* (Panasonic NN-SM209W), gelas ukur 100 ml, lampu spiritus, vortex (Maxi Mix II 37600), gelas beker 100 ml, gelas beker 50 ml, labu ukur 100 ml, tabung Durham, karet penutup tabung reaksi, kapas, pipet tetes, penjepit kayu, kertas payung, *aluminium foil*, plastik *wrap*, hemositometer, gelas benda, gelas penutup, *hair dryer*, mikroskop (Model L-301), botol kaca bekas wadah sirup, selang bening diameter 0,5 cm, Mikroskop (Olympus CX 41), *stopwatch*, *syringe*, tabung sampel, dan Kromatografi gas (Aglient 7890B).

## 2. Tahapan Penelitian

### 1. Persiapan dan Sterilisasi

#### a. Sterilisasi ruang kerja

Bagian dalam *laminar air flow* disemprot dengan alkohol 70 % dan lampu UV dinyalakan selama 30 menit. Lampu kerja dan *blower* dinyalakan ketika akan digunakan.

#### b. Sterilisasi alat dan bahan

Alat-alat laboratorium yang akan digunakan, disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C pada tekanan 1 atm. Alat-alat yang akan digunakan akan disterilisasi selama 20 menit, sedangkan bahan akan disterilisasi selama 15 menit.

### 2. Isolasi *Saccharomyces cerevisiae* dari ragi kering

Sebanyak 1 g Fermipan dilarutkan dengan 99 ml medium alami kentang cair kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. Sebanyak 100µl larutan diambil dan diinokulasikan ke dalam medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan metode *spread plate*. Medium yang sudah berisi inokulum diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C.

Koloni yang tumbuh diinokulasi dengan metode *streak plate* pada medium PDA dan PDA miring. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C.

### 3. Persiapan *Starter*

Inokulum yang sudah terbentuk pada medium PDA dengan metode *streak plate*, diambil 1 ose dan dimasukkan ke dalam medium *Potato*

*Dextrose Broth* (PDB) kemudian dihomogenkan. Medium yang sudah berisi inokulum diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 30 °C dan dishaker dengan kecepatan 120 rpm.

#### 4. Pengujian Gula dalam Pati Limbah Jamu Beras Kencur

Hasil hidrolisi pati sebanyak 1 ml diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan reagen Nelson sebanyak 1 ml. Larutan dipanaskan selama 20 menit, dan ditunggu hingga dingin. Larutan yang sudah dingin ditambahkan arsenomolibdat sebanyak 1 ml dan aquadess sebanyak 7 ml. Larutan dihomogenisasi menggunakan vortex.

Langkah selanjutnya adalah uji kuantitatif gula sampel yang terkandung menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sampel diukur absorbansinya dengan panjang gelombang  $\lambda$  540 nm. Setelah didapat nilai absrobansi kemudian dimasukkan ke dalam kurva standar dan rumus sebagai berikut:

$$Y = 0,0059 + 5,275 \times 0,336 \text{ (Lampiran)}$$

Sampel yang didapat memiliki satuan mg/ml

#### 5. Pembuatan Medium Fermentasi

Alat yang digunakan untuk produksi biotenaol adalah botol kaca bekas wadah sirup. Tutup botol dilubangi dan dipasang selang dengan tujuan agar ada saluran pembuangan gas selama fermentasi. Selang yang sudah terpasang diletakkan ke dalam ember yang berisi air agar nantinya dapat diketahui ada atau tidaknya gas yang keluar.

## 6. Pengukuran Pola Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* pada Medium Fermentasi

Pengukuran menggunakan metode perhitungan langsung (*counting chamber*). Sampel dari masing-masing variasi diambil sebanyak 100  $\mu$ l dan diteteskan ke dalam hemositometer kaca penghitung (*Petroff-Hausser Chamber*) kemudian ditambah dengan *methylene blue* sebanyak 10  $\mu$ l. Sampel diamati selama 4 jam sekali (selama 72 jam) menggunakan mikroskop perbesaran 10 $\times$ 45.

$$\text{Rata-rata jumlah sel} \times 25 \times 50 \times 10^3 \times \frac{1}{\text{faktor pengeceran}}$$

(Madigan dkk., 2012)

## 7. Pengukuran pH

pH meter dihidupkan selama 15-30 menit agar stabil. Elektroda dibilas menggunakan aquades dan dikeringkan menggunakan tissue. Elektroda dicelupkan pada sampel yang akan diukur sampai skala yang terdapat pada layar stabil.

## 8. Pengukuran Persentase Alkohol

Pengukuran persentase alkohol dilakukan menggunakan alat GC (*Gas Chromatography*) 2010 Shimadzu yang dimiliki oleh Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Sampel bioetanol diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 ml. Sampel disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 1 $\mu$ l dan diinjeksi ke GC Agilent 7890B. Larutan EtOH disiapkan dengan konsentrasi 0,75; 1,5; 12,5; 25; dan 50 %. Masing-masing larutan diinjeksikan ke GC dan

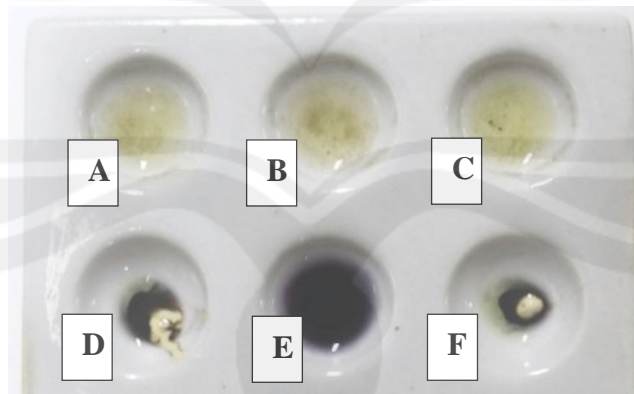
dikondisikan dengan detektor FID, metode etanol D. gcm, kolom HP-5, suhu 40 °C ditahan 5 menit dinaikkan 10 °C/menit sampai 120 °C.

## Hasil dan Pembahasan

### A. Isolasi dan Uji Kemurnian *Saccharomyces cerevisiae*

Langkah awal dalam penelitian ini isolasi *S. cerevisiae* dari ragi komersial Fermipan, setelah itu dilanjutkan dengan uji kemurnian *S. cerevisiae* (Tabel 1). Bahan utama yang dipakai untuk dimanfaatkan patinya adalah ampas jamu beras kencur. Ampas jamu sebelum diproses diambil patinya terlebih dahulu dengan metode ekstraksi alkali.

Hasil hidrolisis dapat diketahui dengan meneteskan larutan iod ke dalam hasil hidrolisis. Warna biru menunjukkan keberadaan pati sedangkan warna coklat menunjukkan bahwa hidrolisis sempurna yaitu perubahan pati menjadi maltase. Hasil dari uji ini terdapat pada Gambar 1.



Gambar 1. Perbandingan Uji Iod Hasil Hidrolisis Pati dan Pati.  
Keterangan : A,B dan C Hasil Hidrolisis Pati ditambah Iod.  
D, E dan F Pati ditambah Iod.



Tabel 1. Uji Kemurnian *Saccharomyces cerevisiae*

No	Parameter Pengamatan	Hasil Penelitian	Menurut Pustaka
1	Morfologi	Tumbuh di atas permukaan, <i>Circular</i> , Licin, <i>Convex</i> , <i>Entire</i> , Putih, Bau khas tapai	Tumbuh di atas permukaan, <i>Circular</i> , Licin, <i>Convex</i> , <i>Entire</i> , Putih, Bau khas tapai (Jumiyati dkk., 2012)
2	Uji Karbohidrat	Dextrosa : (+) Glukosa : (+) Sukrosa : (+) Maltosa : (+) Laktosa : (-)	Dextrosa : (+) Glukosa : (+) Sukrosa : (+) Maltosa : (+) Laktosa : (-) (Looder, 1970) dan (Webster dan Weber 2007)
3	Uji Nitrat	(-)	(-) (Webster dan Weber, 2007)
4	Pengecatan <i>Methlen Blue</i>	Oval	Oval (Webster dan Weber, 2007)
5	Pengecatan <i>Ziehl Nielsen</i>	Terdapat spora	Terdapat spora (Purves dan Sadava, 2003)

Keterangan : Tanda (+) menunjukkan hasil uji positif, tanda (-) menunjukkan hasil uji negatif.

#### B. Medium dan Alat Fermentasi

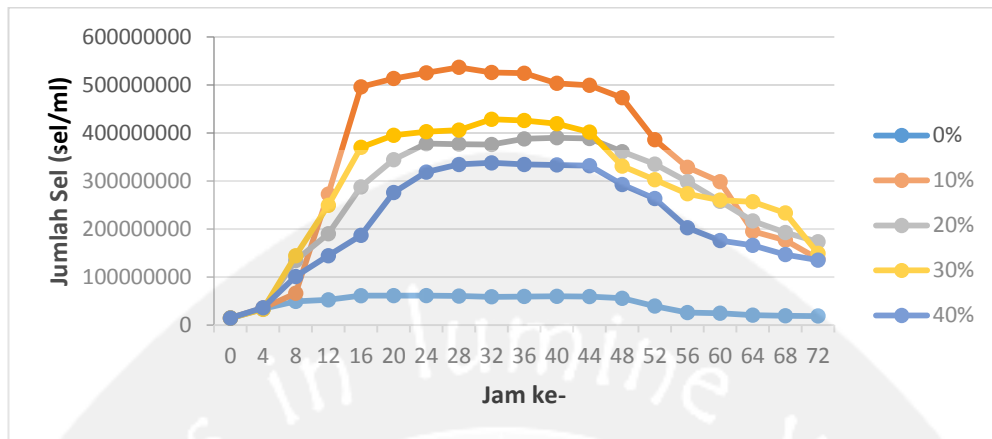
Medium yang sudah dibuat dimasukkan ke dalam botol fermentasi sebanyak 1/3 bagian botol. Walaupun *S. cerevisiae* melakukan fermentasi dalam keadaan anaerob namun tetap harus diberi ruang untuk udara berada di dalam botol. Menurut Kavanagh (2011), *Saccharomyces cerevisiae* bersifat fakultatif aerob, sehingga tetap membutuhkan oksigen dalam siklus hidupnya. Setelah oksigen di dalam botol habis untuk berkembang biak maka dimulailah proses fermentasi secara anaerob.

### C. Pola Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dan pH selama Proses Fermentasi

Tahap fermentasi berlangsung selama 72 jam dengan pengukuran parameter setiap 4 jam. Parameter yang diamati selama proses fermentasi berlangsung adalah pola pertumbuhan khamir dengan mengukur jumlah sel menggunakan metode perhitungan langsung untuk mengetahui fase (lag, log, stasioner, dan kematian) selama proses fermentasi berlangsung.

Berdasarkan grafik pola pertumbuhan *S. cerevisiae*, fase adaptasi berada pada jam ke-0 hingga jam ke-8. Pertumbuhan mulai meningkat pada jam ke-8 hingga jam ke-16. Tahap ini biasa disebut dengan fase log. Pada jam ke-16 hingga jam ke-48 terjadi pertumbuhan yang konstan atau biasa disebut dengan fase stasioner.

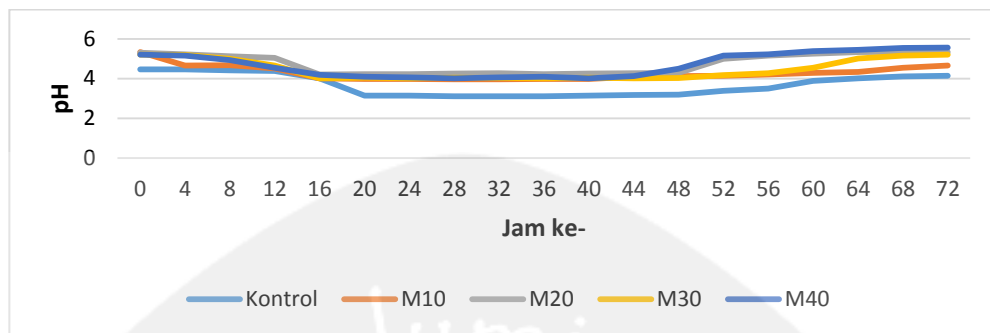
Pada jam ke-48 hingga jam ke-72 terjadi penurunan pertumbuhan atau biasa disebut dengan fase kematian. Peningkatan pertumbuhan sel terjadi pada jam ke-16, setelah itu pada jam ke-20 hingga 28 memasuki fase stasioner. Setelah memasuki fase stasioner, pada jam ke-32 terjadi penurunan pertumbuhan dan statis hingga akhir (Bailey dan Ollis, 1986). Fadiaz 1992, mengatakan bahwa banyaknya sel mikroorganisme (*S. cerevisiae*) merupakan indikasi mulainya proses fermentasi. Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan proses fermentasi mulai berjalan pada jam ke-16.



Gambar 2. Pola Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* selama 72 jam Fermentasi pada medium fermentasi variasi molase 0, 10, 20, 30, dan 40%

Keterangan : M10 = Variasi Penambahan Molase 10%  
M20 = Variasi Penambahan Molase 20%  
M30 = Variasi Penambahan Molase 30%  
M40 = Variasi Penambahan Molase 40%

Parameter selanjutnya adalah nilai pH. *S. cerevisiae* mempunyai pH pertumbuhan optimum pada (3-6) (Fardiaz, 1992). Grafik pH menunjukkan garis naik yang menandakan nilai pH meningkat. Casida (1968) menyatakan bahwa pada pH tinggi, fase lag akan berkurang dan aktivitas fermentasi naik. pH yang naik dapat disebabkan oleh hilangnya gas CO<sub>2</sub> karena terdapat selang pembuangan gas pada botol fermentasi. Menurut Kartohardjono dkk., (2007), gas CO<sub>2</sub> disebut dengan gas asam (*acid whey*) karena gas CO<sub>2</sub> memiliki sifat asam sehingga dapat memengaruhi nilai pH.



Gambar 3. pH Medium selama 72 jam Fermentasi pada medium fermentasi variasi molase 0, 10, 20, 30, dan 40%

Keterangan : M10 = Variasi Penambahan Molase 10%  
M20 = Variasi Penambahan Molase 20%  
M30 = Variasi Penambahan Molase 30%  
M40 = Variasi Penambahan Molase 40%

#### D. Penghasilan Bioetanol

Berdasarkan hasil analisis, penambahan molase dengan konsentrasi 40% menghasilkan volume bioetanol yang paling tinggi yakni sebesar 10,047%. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Olbrich (1973) dan Sebayang (2006) bahwa molase akan memberikan tambahan nutrisi berupa sumber karbohidrat dan nitrogen yang berfungsi sebagai nutrisi makro dalam pertumbuhan *S. cerevisiae*.

Tabel 2. Kadar Bioetanol antara Kontrol dengan Variasi Molase 10, 20, 30, dan 40 % pada Fermentasi Limbah Jamu Beras Kencur Pada Inkubasi 72 jam

Konsentrasi	Bioetanol ( %)
10 %	4,007 <sup>a</sup>
20 %	5,127 <sup>a</sup>
30 %	10,013 <sup>b</sup>
40 %	10,047 <sup>b</sup>
Kontrol	1,103 <sup>c</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. Kontrol terdiri dari 100% pati limbah jamu beras kencur, urea,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , *yeast extract*, dan aquades. Angka 10, 20, 30, 40% adalah variasi volume molase yang ditambahkan pada fermentasi pati limbah jamu.

Parameter selanjutnya adalah pengukuran prosentase sel hidup dari starter yang akan digunakan untuk fermentasi. Terdapat rata-rata 62 sel yang hidup tanpa adanya kematian sehingga didapat presentase kehidupan sel *S.cerevisiae* pada starter sebesar 100 %. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa starter yang digunakan tergolong baik untuk diaplikasikan sebagai awal proses produksi bioetanol.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, J. E. dan Ollis, E.L. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> edition. McGraw-Hill. New York.
- Casida, Jr, L. E. 1968. *Industrial Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Hambali, E., Mujdalipah, S., Tambunan, H., Pattiwiri, W.A., dan Hendroko, R. 2007. *Teknologi Bioenergi*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Herbie, T. 2015. *Kitab Tanaman Berkhasiat Obat: 226 Tumbuhan Obat Penyembuh Penyakit dan Kebugaran Tubuh*. Octopus Publishing House. Yogyakarta.
- Judoamidjojo, R.M., Sa'id, E.G. dan Hartoto, L. 1989. *Biokonversi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Insitut Pertanian Bogor. Bogor.
- Jumiyati. Bintari, S. H., dan Mubarak, I. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika*. 4 (1). Halaman 27-35.
- Kartohardjono, S., Anggara, S., dan Yuliusman. 2007. Absrobsi CO<sub>2</sub> dari Campurannya dengan CH<sub>4</sub> atau N<sub>2</sub> Melalui Kontraktor Membran Serat Berongga Menggunakan Pelarut Air. *Jurnal Teknologi*. 11(2): 97-102.
- Kavanagh, K. 2011. *Fungi: Biology and Application Second Edition*. John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken.
- Looder, J. 1970. *The Yeast: A Taxonomy Study Second Revised and Enlarged Edition*. The Netherland, Northolland Publishing.co. Amsterdam.
- Olbrich, H. 1973. *Molasses In : Priciples of Sugar Technology, Vol. III. Elsevier Publisher Bencamin Cummings Publishing Company*. Subs of Addison Wesley Longman Inc.

- Purba, R. P. 2009. Produksi Etanol Dengan Variasi Inokulum Dan Kadar Pati Jagung Pada Kultur Sekali Unduh. *Naskah Skripsi S-1*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta.
- Purves, B. dan Sadava, D. 2003. *Life The Science of Biology Seventh Edition*. Sinauer Associates Inc. New York.
- Sebayang, F. 2006. Pembuatan Etanol dari Molase secara Fermentasi menggunakan Sel *Saccharomyces cerevisiae* yang Termobilisasi pada Kalsium Alginat. *Jurnal Teknologi Proses*. Medan.
- Steenis, V. 1988. *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. PT Pradnya Paramita. Jakarta.
- Suharmiati dan Handayani, L. 2006. *Cara Benar Meracik Obat Tradisional*. Agro Media Pustaka. Depok.
- Webster, J., dan Weber, R. 2007. *Introduction to Fungi Third Edition*. Cambridge University Press. New York. Halaman 265.