**Studi Komparasi: Produksi Bioetanol Nira Batang Kelapa Sawit oleh Flokulan dan Non Flokulan *Saccharomyces cerevisiae***

*A Comparison study: Bioethanol Production from Oil Palm Trunk Sap by Flokulan and Non-Flokulan Saccharomyces cerevisiae*

**Kafidul Ulum1, Indria Purwantiningrum1, Retno Dwi Yustina2, Untung Murdiyatmo1, Aji Sutrisno1, Agustin Krisna Wardani1\***

1Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya,

Jl. Veteran, Malang 65145

2PT. Sampoerna Agro, Tbk, Jl. Basuki Rachmat No.788, Talang Aman, Kemuning, Kota Palembang, Sumatera Selatan 30127

\* Email: agustinwardani@ub.ac.id

**ABSTRAK**.

Nira batang kelapa sawit merupakan limbah dari perkebunan kelapa sawit selama proses peremajaan dengan produksi sekitar 4.420.880 ton nira/tahun. Dibandingkan bahan baku lain, nira ini mempunyai beberapa keunggulan yaitu selain harganya murah karena merupakan limbah, juga mengandung gula (80-100 g/L) yang dapat difermentasi langsung oleh yeast menjadi etanol tanpa *pretreatment*, selain itu juga mengandung asam amino, asam organik, mineral dan vitamin, sehingga merupakan bahan baku yang potensial untuk pembuatan etanol. Penelitian ini menggunakan dua jenis strain *Saccharomyces cerevisiae*, yaitu flokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae*. Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan yeast yang mampu membentuk flok atau gumpalan sel yang mengendap secara cepat dalam medium pertumbuhannya, kemampuan ini berperan penting dalam produksi bioetanol karena mempermudah proses purifikasi yaitu meniadakan proses sentrifugasi sehingga dapat menurunkan biaya produksi. Sumber nitrogen merupakan makronutrien yang dibutuhkan sel untuk sintesis protein, asam nukleat dan koenzim. Sehingga pada penelitian ini ditambahkan urea sebagai sumber nitrogen selama fermentasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan strain *Saccharomyces cerevisiae* dan konsentrasi urea yang tepat untuk memproduksi etanol tertinggi. Konsentrasi urea yang digunakan adalah 0%, 0,1%, 0,2% dan 0,3% b/v. Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol tertinggi yaitu sebesar 4,86% (v/v) diperoleh dari fermentasi nira batang kelapa sawit oleh non flokulan *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7 tanpa adanya penambahan urea dengan yield etanol sebesar 51,8%.

Kata kunci: bioetanol; kelapa sawit; nira; *Saccharomyces cerevisiae*; urea

**ABSTRACT**

Oil palm trunk (OPT) sap is a waste of oil palm plantations for the production process of rejuvenation which produced approximately 4,420,880 million tons of sap/years. Oil palm trunk (OPT) sap has advantages for ethanol production due to its availability, lower cost and contain 80- 100 g/L of sugars that can be directly fermented by yeast into ethanol without pretreatment and contains amino acids, organic acids, minerals and vitamins for yeast growth, as well. This study uses two types of strains of *Saccharomyces cerevisiae*, the flokulan and non-flokulan of *Saccharomyces cerevisiae*. Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* is a yeast that has ability to aggregate into flocks which precipitate rapidly in culture medium. This ability is expected to play an important role for bioethanol production. It reduces the cost of cells recovery as it separate easily from the fermentation medium without centrifugation. The effect of urea as a nitrogen source was also investigated in this study. Some concentrations of urea were added i.e. 0%, 0.1%, 0.2% and 0.3% w/v during fermentation. The purpose of this study is to obtain the best condition based on strain of *Saccharomyces cerevisiae* and urea concentration for the highest ethanol production. Under the best condition, the highest ethanol production was obtained (4.86% (v/v)) from the oil palm trunks sap by *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7 without the addition of urea with ethanol yield was 51.8%.

Keywords: bioethanol, oil palm trunk sap, *Saccharomyces cerevisiae*, urea

**PENDAHULUAN**

Kebutuhan energi dunia akan terus meningkat sejalan dengan pertambahan penduduk dan pertumbuhan ekonomi. Peningkatan kebutuhan bahan energi terutama bahan bakar fosil tersebut telah menyebabkan penurunan cadangan minyak dunia sehingga bahan bakar fosil menjadi langka dan harganya meningkat secara signifikan. Menurut data BPS dalamSinaga (2012), produksi BBM Indonesia berada di bawah jumlah kebutuhan untuk konsumsi nasional. sejak tahun 1996 hingga 2012 produksi minyak mentah Indonesia mengalami penurunan sebesar 57%, sedangkan perkembangan jumlah kendaraan bermotor di Indonesia yang mengalami kenaikan pesat hingga 649%. Hal ini menyebabkan pemerintah harus mengimpor BBM dari luar negeri untuk menutupi defisit kebutuhan nasional tersebut.

Di sisi lain, perkembangan industri berbahan bakar fosil telah menyebabkan dampak lingkungan dan pemanasan global. Salah satu cara mengurangi krisis energi dan dampak yang diakibatkan oleh penggunaan energi berbahan baku fosil adalah pengembangan energi alternatif baru dan terbarukan seperti bioetanol. Selain dapat diperbaharui, bioetanol ini juga dapat mengurangi emisi akibat pembuangan gas-gas rumah kaca sehingga dapat mengurangi dampak pemanasan global (Samejima, 2008). Salah satu bahan yang dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol adalah nira batang kelapa sawit.

Nira batang kelapa sawit mempunyai kandungan total gula sebesar 96,7 g/L (Kosugi *dkk*., 2010) hingga 111 g/L (Mori, 2007). Selain gula, nira ini juga mengandung asam amino, asam organik, vitamin dan mineral. Nira diperoleh dari pengepresan batang kelapa sawit yang ditebang ketika peremajaan. Peremajaan pada area perkebunan kelapa sawit dilakukan jika pohon kelapa sawit sudah berumur 23-25 tahun, karena pada umur tersebut produktivitas pohon kelapa sawit mulai menurun,sehingga perlu ditebang dan diganti dengan bibit kelapa sawit yang baru.

Rata-rata luas areal peremajaan selama kurun waktu tahun 2001 – 2005 diperkirakan mencapai 32.155 ha/tahun. Limbah berupa batang atau kayu sawit akan dihasilkan sebesar 2.257.281 ton per tahun, sedangkan pada kurun waktu tahun 2006 – 2010 ada kenaikan di dalam areal tanaman kelapa sawit yang diremajakan yaitu rata-rata setiap tahunnya seluas 89.965 ha. Pada kurun waktu tersebut batang hasil peremajaan akan mencapai 6.315.543 ton per tahun (Guritno dan Darnoko, 2003). Kandungan gula yang tinggi ,asam amino,asam organic,vitamin dan mineral yang terdapat didalamnya, serta jumlah yang melimpah, hal ini membuat nira batang kelapa sawit sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku etanol.

Produksi bioetanol secara efisien dapat diperoleh dengan beberapa cara yaitu seleksi mikroorganisme yang sesuai, bahan baku yang murah dan ketersediaan yang melimpah, dan proses fermentasi yang optimal. Eksplorasi dan seleksi mikrorganisme untuk produksi etanol telah banyak dikaji, namun *Saccharomyces cerevisiae* tetap sebagai mikroorganisme utama penghasil etanol (Bai *dkk.*, 2008). Penggunaan *Saccharomyces cerevisiae* dalam proses fermentasi gula menjadi etanol telah banyak dilakukan, baik dari kelompok *flokulan* maupun *nonflokulan Saccharomyces cerevisiae.*

Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan yeast yang mampu membentuk flok atau gumpalan sel yang mengendap secara cepat dalam medium pertumbuhannya. Hal ini merupakan faktor penting dalam produksi bioetanol karena mempermudah proses purifikasi yaitu meniadakan proses sentrifugasi sehingga dapat menurunkan biaya produksi (Domingues *dkk*, 2000). Sedangkan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* tidak mempunyai kemampuan untuk membentuk flok,sehingga diperlukan proses tambahan untuk purifikasi.

Selain faktor ketersediaan bahan dan jenis strain yang digunakan ada faktor lain yang juga berpengaruh terhadap hasil fermentasi, yaitu sumber nitrogen.Sumber nitrogen yang biasa ditambahkan selama fermentasi yaitu pepton, ammonium sulfat,urea dan ekstrak khamir. Urea dipilih sebagai sumber nitrogen organik yang efektif untuk sintesis protein, asam nukleat dan koenzim (Fardiaz, 1992) yang umumnya ditambahkan pada konsentrasi 1-2 g/L pada medium fermentasi (Waites *dkk*., 2001).

Oleh karena itu dalam penelitian ini menggunakan flokulandan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* untuk memfermentasi nira batang kelapa sawit menjadi etanol serta adanya penambahan sumber nitrogen (urea) dengan konsentrasi yang bervariasi untuk memperoleh kombinasi perlakuan terbaik yang menghasilkan yield etanol tertinggi.

**METODE PENELITIAN**

**Bahan**

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira batang kelapa sawit yang diperoleh dari pengepresan limbah batang kelapa sawit PT. Sampoerna Agro, Tbk, Palembang. Isolat yang digunakan adalah flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) diperoleh dari National Research Institute of Brewing, Hiroshima, Jepang. dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no 7 (NCYC-479) diperoleh dari National Collection of Yeast Cultures, Norwich, United Kingdom. Isolat ditumbuhkan pada media sintetik yang mengandung glukosa, *yeast extract* dan pepton. Bahan kimia yang digunakan yaitu H2SO4 (Sigma), NaOH (Sigma), akuades, 3,5-*dinitrosalisilic acid* (DNS) (Sigma), urea(Merck), KH2PO4 (Sigma), (NH4)2SO4 (Sigma), MgSO4.7H2O (Sigma), Na-K Tartarat (Sigma), fenol kristal (Sigma), Na2SO3 (Sigma), NaCl p.a (Sigma), EDTA (Sigma).

**Alat**

Alat yang digunakan antara lain: sheaker waterbath (Model Memmert WNB 14) autoklaf (Model HL-36 AE, Hirayama Jepang), inkubator (Binder BD 53 Germany), vorteks (Turbo Mixer model LW Scientific), hot plate stirrer (Model IKA RH Basic 2), plate stirrer (Model IKA Big squid star), pH meter (HANNA INSTRUMENT), *laminar air flow* (Magnehelic), timbangan analitik (Mettler Toledo AL 204), mikropipet 1000 µl dan 10-100 µl (Eppendorf), sentrifuse dingin (Thermo scientific),*refrigerator* (Sharp).

**Pengamatan flokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* Menggunakan Mikroskop Cahaya**

Untuk mengetahui bentuk sel, maka dilakukan pembuatan preparat basahflokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae*. Pembuatan preparat basah dilakukan dengan cara mengambil 1 ose inokulum *Saccharomyces cerevisiae* dari media agar miring PGYA kemudian diletakkan dalam gelas preparat yang telah ditambahkan 1 tetes akuades.

**Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae***

Untuk mengetahui kurva pertumbuhan *S. Cerevisiae Kyokai no.7,* maka 5% (v/v) kultur ditumbuhkan pada medium sintetik YPD (glukosa 20 g/L, yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/L)*,* kemudian diamati *Optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 600 nm setiap 4 jam selama 24 jam. Untuk mengetahui kurva pertumbuhan flokulan *S. Cerevisiae,* maka 5% (v/v) kultur ditumbuhkan pada medium sintetik YM (glukosa 10 g/L, yeast extract 3 g/L, pepton 5 g/L, malt extract 3g/L)*,* kemudian diamati *Optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 600 nm setiap 4 jam selama 24 jam.

**Aktivasi dan Pembuatan Stok Kultur**

Aktivasi dilakukan dengan dilakukan dengan menumbuhkan kultur murni S*. cerevisiae* kering kedalam media broth (YPD) dengan komposisi glukosa 20 g/L, yeast extract 10 g/L, pepton 20 g/, diinkubasi pada *shakerwaterbath* suhu 30 °C,150 rpm selama 48 jam.Pembuatan stok kultur dalam gliserol dilakukan dengan memasukkan kultur hasil aktivasi dari media YPD dimasukkan pada *microtube* dan ditambahkan dengan gliserol 60% dengan perbandingan 1:1.Mikrotube diikat dengan benang dan dimasukkan kedalam tabung berisi nitrogen cair selama beberapa detik,kemudian disimpan dalam deepfreezer suhu -80°C.

**Pembuatan Kultur Starter *Saccharomyces cerevisiae***

Kultur starter *S. cerevisiae* dibuat dengan meresuspensikan 5% (v/v) kultur yang telah diremajakan selama 24 jam pada 100ml medium sintetik YPD dalam erlenmeyer 250 ml dan diinkubasi di dalam *shaker waterbath* selama 16 jam untuk flokulan *S. cerevisiae* dan 20 jam untuk *S. cerevisiae* Kyokai no.7.

**Produksi Nira Batang Kelapa Sawit**

Nira batang kelapa sawit diperoleh dengan cara mengepres parutan batang kelapa sawit menggunakan alat presshydrolic dengan tekanan 80 mpa.Nira hasil pengepresan disentrifugasi 6000 rpm 15 menit untuk memisahkan nira dengan pengotor. Supernatan hasil sentrifugasi disimpan pada suhu 20°C untuk mencegah penurunan gula (Kosugi, 2010).

**Fermentasi Etanol**

Untuk mengetahui pengaruh dari strain *S. cerevisiae* dan konsentrasi sumber nitrogen (urea) terhadap produksi etanol dari nira batang kelapa sawit, inokulum flokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* masing-masing sebanyak 5% (v/v) diinokulasikan pada medium nira yang telah disiapkan dengan konsentrasi urea 0%, 0,1%, 0,2% dan 0,3% (b/v). Fermentasi dilakukan pada *shaker waterbath* pada suhu 30°C, 120 rpm selama 72 jam, kemudian juga dilakukan analisa *Optical density* (OD) sel, pH, gula reduksi setiap 24 jam, dan analisa kadar etanol pada jam ke-0, 24, 48 dan 72.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Karakteristik Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) dan Non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai 7)**

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroorganisme yang digunakan sebagai inokulum yang berperan mengkonversi sumber karbon dalam nira batang kelapa sawit menjadi etanol. Pada penelitian ini, *Saccharomyces serevisiae* yang digunakan terdiri dari dua strain yang berbeda, yaitu flokulan strain dan non-flokulan strain. Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan yeast yang mempunyai kemampuan membentuk gumpalan sel (flok) kemudian mengendap dengan cepat dalam medium pertumbuhannya (Kida, dkk., 1991), sedangkan non-flokulan tidak mempunyai kemampuan untuk membentuk gumpalan. Gambar flokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media disajikan pada Gambar 1. Pengamatan morfologi *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 dan Kyokai 7 dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x dan untuk mempertajam bentuk *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan pewarnaan dengan safranin.

Gambar 1 flokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* dalam medium sintetik, a) sel yang digunakan di penelitian ini, b) sel yang digunakan pada penelitian Cunha, dkk.(2006)

Penampakan sel *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 dan Kyokai 7 melalui pengamatan di bawah mikroskop cahaya ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2 Pengamatan *Saccharomyces cerevisiae* dengan mikroskop cahaya perbesaran 1000X, (a) NCYC-1195 (flokulan), (b) Kyokai 7 (non-flokulan)

Gambar 2 menunjukkan sel *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 (flokulan) dan Kyokai 7 (non-flokulan) mempunyai morfologi yang sama, yaitu sama-sama berbentuk bulat.hal ini sesuai dengan Hamidah (2003) yang menyebutkan bahwa *Saccharomyces cerevisiae* adalah mikroorganisme yang berbentuk bola atau telur, bersel satu dengan ukuran antara 5 sampai 20 mikron. Lapisan dinding luar dari Saccharomyces cerevisiae terdiri dari polisakarida kompleks dan membran sel yang terletak dibawahnya. *Saccharomyces cerevisiae* juga telah memiliki beberapa organel sel, diantaranya adalah sitoplasma yang mengandung suatu inti yang bebas (*discrete nucleus*) dan vakuola yang berisi sejumlah besar cairan. Pengamatan pada sel Kyokai 7 (non-flokulan) menunjukkan sel berbentuk bulat, berukuran besar dan tidak berhimpitan antar sel (terdapat jarak antar sel), sedangkan pada sel NCYC-1195 (flokulan) sel tampak bulat, berukuran kecil serta membentuk kumpulan sel (flok) yang berdekatan antara satu dengan sel yang lain. Hal ini dikarenakan adanya flokulin yang melekat pada dinding sel glikoprotein akan berikatan dengan α-manan karbohidrat dari sel yang lain (Domingues, 2000).

**Pola Pertumbuhan Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) dan Non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai 7)**

Pola pertumbuhan dapat diketahui dengan cara menumbuhkan flokulan dan non-flokulan Saccharomyces cerevisiae pada medium sintetik YPD yang mengandung 20 g/L glukosa, 20 g/L pepton, dan 10 g/L yeast extract. Pertumbuhan Saccharomyces cerevisiae diamati setiap 4 jam selama 24 jam dengan membaca tingkat kekeruhan (*optical density*, OD) medium pada panjang gelombang 600 nm. Pengamatan pola pertumbuhan ini bertujuan untuk mengetahui puncak fase logaritmik dimana jumlah sel paling maksimum dan kondisi pertumbuhan sel yang optimum. Pada fase ini, akan digunakan sebagai kultur starter karena dapat mempersingkat fase adaptasi mikroba pada medium fermentasi nira batang kelapa sawit sehingga dapat mempercepat proses fermentasi etanol. Kurva pertumbuhan flokulan dan non-flokulan Saccharomyces cerevisiae disajikan pada Gambar 3. Kurva pertumbuhan menunjukkan flokulan dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik yang ditandai dengan meningkatnya nilai OD seiring meningkatnya waktu pertumbuhan pada medium tersebut. Peningkatan nilai OD yang dibaca melalui indikasi turbiditas dari hasil absorbansi menunjukkan peningkatan jumlah sel. Peningkatan jumlah sel ini terjadi akibat adanya pemanfaatan medium yang kaya akan sumber karbon dan nitrogen oleh Saccharomyces cerevisiae. Pada proses fermentasi batch, pertumbuhan mikroorganisme terbagi menjadi empat fase, meliputi fase lag atau fase adaptasi, fase logaritmik (eksponensial), fase stasioner dan fase kematian (Black, 2002).



Gambar 3. Kurva pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* (a) flokulan (NCYC-1195), (b) non-flokulan (Kyokai 7)

Berdasarkan Gambar 3 dapat diketahui bahwa flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) mengalami fase lag pada jam ke-0 sampai jam ke-2 dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai 7) pada jam ke-0 sampai jam ke-4. Fase lag merupakan fase adaptasi mikroba terhadap substrat dan lingkungan di sekitarnya. Lamanya fase lag dipengaruhi oleh medium, kondisi lingkungan, jenis dan strain mikroorganisme serta jumlah inokulum yang ditambahkan (Fardiaz, 1998). Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* kemudian mengalami fase log pada jam ke-2 sampai jam ke-16 dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* pada jam ke-4 sampai jam ke-20, dimana sel mengalami pertumbuhan sangat cepat dan jumlah sel bertambah mengikuti kurva logaritmik karena terjadi katabolisme substrat dalam jumlah besar yang digunakan untuk pertumbuhan, sintesa enzim dan sintesa senyawa lainnya. Menurut Fardiaz (1998), kecepatan pertumbuhan sel sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembapan udara. Sel mikroba membutuhkan energi yang lebih banyak daripada fase lainnya dan sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungan. Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) mengalami stasioner pada jam ke-16 hingga ke-24 dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai 7) pada jam 20 hingga ke-28, dimana jumlah sel tidak mengalami peningkatan bahkan cenderung konstan karena terbatasnya jumlah substrat sehingga sel hidup sama dengan sel yang mati. Menurut Khongsey dkk. (2010), fase stasioner *Saccharomyces cerevisiae* terjadi pada jam ke-12 hingga jam ke-24 tergantung pada konsentrasi awal sel. Konsentrasi awal sel tertinggi adalah pada saat awal fase stasioner atau puncak fase logaritmik. Oleh karena itu, pada penelitian ini kultur starter yang digunakan untuk fermentasi etanol dari nira batang kelapa sawit adalah floccculant *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) yang berumur 16 jam dan non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai 7) yang berumur 20 jam, dimana konsentrasi sel paling maksimal. Sehingga pada tahap proses fermentasi diharapkan berjalan lebih cepat karena fase adaptasi sel terhadap medium fermentasi bisa dipersingkat.

**Produksi Etanol dari Nira Batang Kelapa Sawit oleh Flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC-1195) dan Non-flokulan *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai 7)**

Gaur (2006) menyatakan produksi etanol yang efisien membutuhkan empat komponen utama, yaitu karbohidrat yang bisa difermentasi, strain yeast yang efisien, beberapa nutrisi, dan kondisi kultur yang sederhana. Quintero dkk. (2006), menyatakan bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi hasil fermentasi antara lain mikroba yang digunakan, jumlah inokulum, komposisi medium fermentasi, dan kondisi fermentasi seperti pH, suhu,dan aerasi. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dikaji strain *Saccharomyces cerevisiae* dan konsentrasi urea yang ditambahkan terhadap etanol yang dihasilkan. Flokulan strain (NCYC1195) dan non-flokulan strain (Kyokai 7) digunakan sebagai inokulum yang berperan mengubah gula dalam nira batang kelapa sawit menjadi etanol. Penambahan urea dalam berbagai konsentrasi (0%, 0,1%, 0,2% dan 0,3% b/v) digunakan sebagai sumber nitrogen untuk pertumbuhan sel Saccharomyces cerevisiae yang digunakan. Fermentasi etanol dilakukan menggunakan shaker waterbath suhu 30˚C 120 rpm selama 72 jam dan dilakukan sampling setiap 24 jam untuk mengetahui pertumbuhan sel, berat kering sel, perubahan pH, konsentrasi gula dan konsentrasi etanol yang dihasilkan.

**Pengaruh Penambahan Urea Terhadap Konsumsi Gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 dan Kyokai 7**

Mikroba memerlukan nutrisi untuk pertumbuhannya dan memecah substrat menjadi produk. Nutrisi makro yang diperlukan mikroba terdiri dari unsur C dan N. Unsur C diperoleh dari glukosa yang terkandung dalam nira batang kelapa sawit, sedangkan unsur N diperoleh dari penambahan urea. Menurut Hermawan dkk. (2000) konsentrasi dan jenis sumber nitrogen akan mempengaruhi nilai pH medium, pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi. Dalam penelitian ini, digunakan 4 macam konsentrasi urea yang berbeda (0%; 0,1%; 0,2% dan 0,3% (b/v)) dan profil konsumsi gula yang dipengaruhi keempat macam konsentrasi urea tersebut yang ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh penambahan urea terhadap konsumsi gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* (a) flokulan (NCYC-1195), (b) nonflokulan (Kyokai 7)

Pada Gambar 4 bisa diketahui bahwa dari semua konsentrasi urea yang ditambahkan (0,1%; 0,2% dan 0,3%) pada medium fermentasi nira mempunyai tren konsumsi gula yang sama terhadap medium fermentasi tanpa diperkaya urea (0%). Konsentrasi urea yang ditambahkan sebagai sumber nitrogen tidak terlalu berpengaruh terhadap konsumsi gula pada *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7 (non-flokulan) dan NCYC-1195 (flokulan). Pada kedua grafik diatas, jika dibandingkan terjadi perbedaan tren konsumsi gula, tetapi bukan dipengaruhi oleh penambahan urea, melainkan karena perbedaan strain *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan. Walaupun kedua strain sama-sama dari spesies *Saccharomyces*, tetapi keduanya mempunyai kemampuan adaptasi, konsumsi gula, toleransi terhadap lingkungan yang berbeda. Gaur (2006) menyatakan produksi etanol yang efisien membutuhkan empat komponen utama, yaitu karbohidrat yang bisa difermentasi, beberapa nutrisi tambahan, kondisi kultur yang sederhana dan strain yeast yang efisien. Pada Saccharomyces cerevisiae Kyokai 7 (non-flokulan), medium nira batang kelapa sawit mengalami penurunan gula secara drastis selama awal fermentasi hingga fermentasi ke 24 jam dan pada jam 24 hingga jam 72 konsumsi gula tetap berlangsung walaupun sedikit. Sedangkan pada *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 (flokulan), penurunan gula secara drastis terjadi pada awal fermentasi hingga fermentasi 24 jam. Penurunan gula tetap berlangsung hingga jam ke 48 dan mulai konstan pada fermentasi jam ke 48 hingga jam ke 72. Pada waktu awal fermentasi terlihat penurunan konsentrasi gula yang cukup drastis. Hal tersebut terjadi karena pada awal fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae* membutuhkan substrat dalam jumlah banyak untuk pertumbuhan, baik memperbanyak maupun mempertahankan hidup sel, dan ketika kondisi fermentasi anaerob, gula akan dirombak menjadi etanol. Respon penambahan urea 0%; 0,1%; 0,2% dan 0,3% terhadap konsumsi gula oleh Saccharomyces cerevisiae Kyokai 7 (non-flokulan) secara berturut-turut sebesar 9,39%; 9,29%; 9,09% dan 9,24%. Sedangkan pada Saccharomyces cerevisiae NCYC-1195 (flokulan) , konsumsi gula secara berturut-turut sebesar 8,77%; 8,91%; 8,94% dan 9,45%. Perbedaan fenomena yang terjadi antara dua strain yang digunakan diduga disebabkan oleh perbedaan adaptasi kedua strain terhadap media fermentasi nira dan perbedaan kemampuan memanfaatkan gula-gula yang terdapat pada nira batang kelapa sawit. Nira batang kelapa sawit mengandung glukosa, sukrosa, fruktosa, galaktosa, xilosa, rhamnosa dan gula lainnya yang dapat dimanfaatkan sebagai substrat fermentasi (Kosugi, 2010). Pada grafik diatas bisa diketahui bahwa dalam medium nira batang kelapa sawit tidak semua gula dapat terfermentasi, baik yang difermentasi Kyokai 7 maupun NCYC-1195, hal ini diduga terjadi karena pada nira batang kelapa sawit terdapat gula C-5 yang tidak bisa dimanfaatkan oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Carl dkk. (2000) menyatakan *Saccharomyces cerevisiae* mampu memfermentasi berbagai jenis gula yaitu heksosa atau D-glukosa, D-fruktosa, dan D-manosa. Sukrosa, maltosa, dan D-galaktosa juga dapat difermentasi, tetapi gula dalam bentuk L dan gula C-5 seperti xilosa dan arabinosa tidak dapat difermentasi. Penurunan gula selama proses fermentasi terjadi karena gula digunakan sebagai substrat utama oleh *Saccharomyces cerevisiae* untuk sintesis massa sel, pemeliharaan sel, dan produksi berbagai macam metabolit seperti etanol, gliserol, asam asetat, asam laktat, dan asam suksinat (Carl dkk., 2000). *Saccharomyces cerevisiae* memproduksi etanol dari glukosa melalui jalur Embden Meyerhof Parnas (EMP), dimana satu molekul glukosa dimetabolisme, dan dua molekul piruvat dihasilkan (Madigan dkk., 2000).

**Pengaruh Penambahan Urea Terhadap Pertumbuhan Sel oleh *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 dan Kyokai 7**

Pertumbuhan mikroorganisme memerlukan senyawa nitrogen baik dalam bentuk organik maupun anorganik. Garam organik yang digunakan dalam penelitian ini adalah urea yang merupakan salah satu sumber nitrogen yang efektif dan merupakan sumber nitrogen organik yang mudah dimanfaatkan oleh mikroba dalam pertumbuhannya. Urea juga memberikan sumber asimilasi nitrogen yang baik. Grafik pengaruh penambahan urea terhadap profil pertumbuhan sel pada Saccharomyces cerevisiae bisa dilihat pada Gambar 4.5. Berdasarkan Gambar 5, konsentrasi urea yang ditambahkan sebagai sumber nitrogen tidak terlalu berpengaruh terhadap pertumbuhan sel baik *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 (flokulan) maupun *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7. Pada Gambar 5 bisa dilihat bahwa dari semua konsentrasi urea yang ditambahkan (0,1%; 0,2% dan 0,3%) pada medium fermentasi nira mempunyai tren pertumbuhan sel yang sama terhadap medium fermentasi tanpa penambahan urea ( 0%).



Gambar 5. Pengaruh penambahan urea terhadap pertumbuhan sel *Saccharomyces cerevisiae* (a) flokulan (NCYC-1195), (b) non-flokulan (Kyokai 7)

*Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 (flokulan) dan Kyokai 7 mengalami pertumbuhan secara signifikan selama fermentasi 24 jam kemudian sel mengalami fase stasioner pada fermentasi 24 jam hingga 72 jam. Selama fase eksponensial, sel tumbuh sangat cepat dan jumlah sel bertambah mengikuti kurva logaritmik karena terjadi katabolisme substrat dalam jumlah besar yang digunakan untuk pertumbuhan, sintesa enzim dan sintesa senyawa lainnya. Menurut Fardiaz (1998), kecepatan pertumbuhan sel sangat dipengaruhi oleh medium tempat tumbuhnya seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembapan udara. Sel mikroba membutuhkan energi yang lebih banyak daripada fase lainnya dan sel paling sensitif terhadap keadaan lingkungan. Sel yeast mengubah gula dari medium pertumbuhannya menjadi biomassa yang menunjukkan pertumbuhan sel yang intensif. Bersamaan dengan proses ini, etanol dan CO2 diproduksi. Pada fase anaerobik sel yeast menggunakan gula untuk sintesis etanol (Rankovic dkk., 2009). Meskipun kedua strain mempunyai tren pola pertumbuhan sel yang sama, tetapi pertumbuhan jumlah sel selama proses fermentasi antara NCYC-1195 (flokulan) dan Kyokai 7 (non-flokulan) berbeda, padahal keduanya dikontrol dengan jumlah sel yang sama diawal fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah sel pada kultur starter kedua strain disamakan dan diatur menjadi ± 1x107 cfu/ml. Pada *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 (flokulan), jumlah sel paling maksimal diperoleh setelah fermentasi selama 72 jam, yaitu sebesar 1,6 x 109 cfu/ml pada perlakuan urea 0,3%. Jumlah sel lebih rendah dihasilkan pada medium fermentasi yang ditambah urea sebanyak 0,1% dan 0,2% dengan jumlah sel sebesar 1,5 x 109 cfu/ml. Jumlah sel paling minimum dihasilkan oleh medium nira tanpa ada penambahan urea (0%) dengan jumlah sel sebesar 1,4 x 109 cfu/ml. Pada *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7, jumlah sel paling maksimal juga diperoleh setelah fermentasi selama 72 jam,yaitu sebesar 4,2 x 108 cfu/ml pada perlakuan urea 0,2%.Jumlah sel lebih rendah dihasilkan pada medium fermentasi yang ditambah urea sebanyak 0,1% dan 0,3% dengan jumlah sel masing-masing sebesar 3,9 x 108 cfu/ml dan 3,8 x 108 cfu/ml. Jumlah sel paling minimum dihasilkan oleh medium nira tanpa ada penambahan urea (0%) dengan jumlah sel sebesar 3,7 x 108 cfu/ml. Pertumbuhan sel flokulan selama proses fermentasi lebih tinggi jika dibandingan dengan pertumbuhan sel non-flokulan. Meskipun jumlah sel nonflokulan (Kyokai 7) terpaut jauh dengan jumlah sel flokulan (NCYC-1195), tetapi keduanya mempunyai berat kering sel yang hampir sama jika dibandingkan satu dengan lainnya. Grafik berat kering sel selama proses fermentasi disajikan pada Gambar 6.

Gambar 6 Grafik pengaruh penambahan urea terhadap Berat Kering Sel Saccharomyces cerevisiae (a) flokulan (NCYC-1195), (b) nonflokulan (Kyokai 7)

Berdasarkan Gambar 6 dapat diketahui bahwa sel flokulan dan non-flokulan selama proses fermentasi mempunyai berat kering sel yang hampir sama, meskipun pertumbuhan jumlah sel antar kedua sel terpaut jauh. Sehingga bisa dikatakan bahwa sel flokulan (NCYC-1195) mempunyai berat kering sel yang lebih rendah jika dibandingkan dengan sel non-flokulan (Kyokai 7). Hal ini bisa dikonfirmasi dengan hasil pengamatan sel flokulan dan non-flokulan menggunakan mikroskop cahaya (Gambar 2), dimana pada pengamatan tersebut terdapat perbedaan morfologi yang jelas yaitu diketahui sel flokulan mempunyai bentuk yang lebih kecil jika dibandingkan dengan sel non-flokulan. Ukuran yang kecil inilah kemungkinan yang menyebabkan berat sel flokulan lebih ringan, sehingga walaupun pertumbuhan jumlah sel flokulan lebih tinggi daripada sel non-flokulan, berat kering sel flokulan tidak terpaut jauh dengan berat kering sel non-flokulan yang mempunyai jumlah sel lebih sedikit.

**Pengaruh Penambahan Urea Terhadap Produksi Etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 dan Kyokai 7**

Nitrogen merupakan komponen utama protein dan asam nukleat, yaitu sebesar lebih kurang 10 persen dari berat kering sel bakteri. Nitrogen mungkin disuplai dalam bentuk yang berbeda, dan mikroorganisme beragam kemampuannya untuk mengasimilasi nitrogen. Respon produksi etanol oleh Saccharomyces cerevisiae NCYC-1195 (flokulan) dan Kyokai 7 (non-flokulan) terhadap urea yang ditambahkan ditunjukkan pada Gambar 7.

Gambar 7. Grafik pengaruh penambahan urea terhadap Produksi Etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* (a) flokulan (NCYC-1195), (b) nonflokulan (Kyokai 7)

Pada grafik tersebut bisa diketahui bahwa dari semua konsentrasi urea yang ditambahkan (0,1% ;0,2% dan 0,3%) pada medium fermentasi nira, baik yang difermentasi oleh Saccharomyces cerevisiae NCYC-1195 maupun Kyokai 7 mempunyai tren produksi etanol yang sama terhadap medium fermentasi tanpa diperkaya urea ( 0%). Pada konsentrasi urea yang rendah maupun konsentrasi urea yang tinggi, kadar etanol yang dihasilkan sama-sama tinggi. Fenomena kadar etanol yang tinggi dari poin minimum dan poin maksimum dari kajian konsentrasi urea mengindikasikan bahwa konsentrasi urea tidak berpengaruh terhadap produksi etanol. Tidak adanya pengaruh pada penelitian ini diduga kebutuhan nitrogen untuk pertumbuhan sel sudah terpenuhi oleh asam amino yang terdapat pada nira batang kelapa sawit, dan sel Saccharomyces cerevisiae diduga lebih mengutamakan penggunaan nitogen yang terdapat dalam nira dari pada nitrogen pada urea yang ditambahkan. Kosugi (2010) melaporkan nira batang kelapa sawit tidak hanya kaya gula, tetapi juga mengandung asam amino, asam organik, vitamin dan mineral. Total asam amino pada nira ini mencapai 198,3 (μg/g nira) dengan serin, alanin, asam glutamat dan asam aspartat sebagai asam amino yang dominan. Pada akhir fermentasi nira batang kelapa sawit oleh inokulum Saccharomyces cerevisiae NCYC-1195 (flokulan) etanol tertinggi diperoleh sebesar 1,44 % yang dihasilkan oleh kontrol atau fermentasi nira tanpa adanya penambahan urea (0%) dan diikuti oleh perlakuan penambahan urea konsentrasi 0,3% ; 0,2% dan 0,1% dihasilkan etanol berturut-turut yaitu 1,40%, 1,28%, dan 1,21%. Hal serupa juga terjadi pada akhir fermentasi nira batang kelapa sawit oleh Saccharomyces cerevisiae Kyokai 7 (non-flokulan). Pada penggunaan strain ini produksi etanol tertinggi sebesar 4,86% yang dihasilkan oleh fermentasi nira tanpa adanya penambahan urea (0%) dan diikuti oleh perlakuan penambahan urea dengan konsentrasi 0,3%; 0,2% dan 0,1% dengan hasil etanol berturut-turut sebesar 4,70%, 4,50% dan 4,37%. Pada hasil tersebut peningkatan konsentrasi urea yang ditambahkan dalam medium nira menunjukkan adanya penurunan kadar etanol yang dihasilkan. Hal ini disebabkan penambahan urea yang lebih tinggi pada medium fermentasi dapat berefek negatif terhadap pembentukan etanol karena bersifat inhibitor. Hasil penelitian sejalan dengan pendapat dari Garraway dan Evans (1984) yang menyatakan pada penambahan konsentrasi urea yang lebih tinggi urea di dalam fermentasi akan diurai menjadi amonia dan karbondioksida. Amonia yang dihasilkan akan digunakan oleh mikroorganisme untuk pembentukan sel mereka. Hendriksen dan Ahrig (1991) menambahkan, produksi amonia dari urea mempunyai kecepatan empat kali lebih besar dari pembentukan sel mikroorganisme sehingga konsentrasi amonia akan tinggi yang selanjutnya bersifat toksik untuk proses fermentasi itu sendiri. Penyebab penurunan produksi etanol tidak hanya disebabkan oleh ammonia intoxiication, melainkan juga bisa terjadi karena tidak stabilnya pH selama proses fermentasi. Hermawan, dkk (2000) menyebutkan bahwa konsentrasi dan sumber nitrogen akan mempengaruhi nilai pH medium, pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi. Penurunan pH yang telalu tajam dapat menghambat jalannya fermentasi, hal ini disebabkan oleh enzim–enzim pembentuk etanol hanya dapat bekerja pada interval pH tertentu. Utami dkk., (2000) mengemukakan bahwa penambahan sumber nitrogen yang berlebih akan berakibat penurunan produksi etanol karena bersifat sebagai inhibitor. Penelitian Okti (2009) memperlihatkan penurunan kadar etanol yang dihasilkan setelah melampaui kondisi optimum. Penurunan tersebut dikarenakan sebagian sel mati akibat tingginya konsentrasi nitrogen yang menyebabkan protein sel terdenaturasi. Jika terjadi denaturasi sel maka produktivitas enzim pun mengalami penurunan sehingga etanol yang dihasilkan lebih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa urea sebagai sumber nitrogen cenderung digunakan untuk pembentukkan biomassa. Respon penambahan urea terhadap produksi etanol untuk masingmasing strain yang digunakan menunjukkan hasil yang sama, tetapi jika respon produksi etanol kedua strain dibandingkan akan tampak berbeda. Secara keseluruhan produksi etanol oleh strain Saccharomyces cerevisiae Kyokai 7 (non-flokulan) lebih tinggi jika dibandingkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1195 (flokulan). Perbedaan respon dimungkinkan bisa terjadi karena kedua strain mempunyai perbedaan kemampuan asimilasi nitrogen, toleransi terhadap lingkungan fermentasi dan ketahanan terhadap etanol. Rendahnya etanol pada fermentasi nira oleh NCYC-1195 (flokulan) bisa dipengaruhi beberapa faktor, salah satunya adalah jumlah sel yang ditambahkan pada awal fermentasi yaitu ± 1x107 cfu/ml terhitung tinggi untuk strain ini, akibatnya gula pada nira sebagian besar habis digunakan untuk pertumbuhan sel dan sisanya dirombak menjadi etanol. Hal ini bisa dikonfirmasi dengan melihat Gambar 4 dan 5, pada Gambar tersebut tampak tren konsumsi gula NCYC-1195 (flokulan) sama dengan tren konsumsi gula pada Kyokai 7 (non-flokulan), tetapi petumbuhan jumlah sel keduanya berbeda, yaitu pada NCYC-1195 (flokulan) jumlah sel yang dihasilkan jauh lebih besar jika dibandingkan dengan Kyokai 7 (non-flokulan). Khongsey dkk. (2010) menyatakan jumlah sel yang besar pada awal fermentasi mengakibatkan terjadinya kompetisi substrat untuk pertumbuhan sel sehingga jumlah sumber karbon yang tersedia untuk dikonversi menjadi etanol lebih sedikit atau bahkan sudah habis dan etanol yang dihasilkan menjadi lebih rendah. Mukhtar dkk. (2010) menambahkan bahwa dalam pembuatan etanol, inokulasi yeast yang terlalu tinggi menyebabkan proses melemah lebih cepat dan menurunkan viabilitas sel setelah fase pertumbuhan. Kondisi pertumbuhan dan metabolisme pada populasi sel yang tinggi tidak diharapkan karena mengganggu akses nutrisi, keterbatasan ruang, dan interaksi antar sel.

**KESIMPULAN**

Nira batang kelapa sawit sebagai limbah hasil perkebunan kelapa sawit berpotensi sebagai substrat alternatif untuk memproduksi etanol. Produksi etanol tertinggi yaitu 4,86% (b/v) diperoleh pada fermentasi nira batang kelapa sawit dengan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai 7 tanpa adanya penambahan urea. Fermentasi etanol berjalan dengan efisien karena yield etanol yang dihasilkan sebesar 51,8%.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

 Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Sampoerna Agro, Tbk dan Fakultas Teknologi Pertanian atas kontribusinya berupa bantuan pendanaan penelitian.

**DAFTAR PUSTAKA**

Ain,Nurul.2010. **Study on Bioethanol Productionfrom Oil Palm Trunk Sap.** Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering. Universiti Malaysia Pahang.Malaysia.

Aisyah, S.N dan K.C, Sembiring, 2009.**Bioproses dan Teknologi Pembuatan Bioetanol**. Berita IPTEK LIPI. Tahun ke-47(1): 64-71

Anonymous. 2013. **Ethanol Fuel**. <http://en.wikipedia.org>. Diakses tanggal 16 Agustus 2018.

Apriyantono, A., D. Fardiaz, N. L. Puspitasari, Sedarnawati dan Budiyanto.1989. **Analisa Pangan***.* PAU Pangan dan Gizi. IPB. Bogor

Badan Pusat Statistik. **Produksi Minyak Bumi dan Gas Alam**, 1996-2012. [www.bps.go.id](http://www.bps.go.id). Diakses tanggal 23 oktober 2018.

Badan Pusat Statistik. **Perkembangan Jumlah Kendaraan Bermotor menurut Jenis tahun 1987-2012**. [www.bps.go.id](http://www.bps.go.id). Diakses tanggal 23 oktober 2018.

Bai.F.W , W.A. Anderson , M. Moo-Young. 2008. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. Biotechnology Advances. Vol. 26:89–105.

Baig MMV, Mane VP, More DR, Shinde LP, Baig MIA. 2003. **Utilization of**
**Agricultural Waste of Banana: Production of Cellulases by Soil fungi**, J. Environ. Biol. 24:173 -176.

Black, Jacquelyn G. 2002. **Microbiology**. John Wiley & Sons, Inc.

Budiman.A dan S. Setyawan. 2009. **Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi Dan Ph Dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase Dengan Menggunakan Media Jerami Padi**. Skripsi. Jurusan Teknik Kimia. Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro.

Domingues.L, A.A Vicente, N. Lima, J.A Teixeira. 2000. **Applications of yeast flocculation in biotechnological processes**. Biotechnol. Bioprocess Eng. Vol.5: 288-305.

Demain, A.L., Newcomb, M., and Wu, J.H.D. 2005. **Cellulase, Clostridia, and**
**Ethanol. Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 69: 124-154

Eqiustar. 2003. **Ethyl Alcohol Handbook**. 6th Edition.Equistar Chemicals. Texas. U.S.A.

Erten H., H. Tanguler, T. Cabaroglu., A. Canbas. 2006. **The Influence of Inoculum Level on Fermentation and Flavour Compounds of White Wines Made from cv**. Emir. *J. Inst. Brew*. 112(3):232-236

Fardiaz, S. 1998. **Mikrobiologi Pangan 1**. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Forgacs, E. And Cserhati, T. 2003. **Gas Chromatography**. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. New York

Gancedo, J.M. 1998. **Yeast Carbon Catabolite Repression**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 62(2): 334-361.

Guritno P, Darnoko D. 2003. **Teknologi Pemanfaatan Limbah Dari Peremajaan Perkebunan Kelapa Sawit.** Seminar Nasional : Mengantisipasi Regenerasi Pertama Perkebunan Kelapa Sawit di Indonesia 9 – 10 April 2003. Bali : Max Havelaar Indonesia Foundation.

Garraway, M.O. and R.C. Evans. 1984. *Fungal Nutrition and Physiology*. John Willey and Sons, New York

Gaur, K. 2006. **Process Optimization for The Production of Ethanol via Fermentation. Dissertation (Master of Science).** Department of Biotechnology and Env. Science. Thapar Institute of Engg and Technology. Patiala.

Harris, Sjamsjul Anam, dan Syarifuddin Mahmudsyah.2013. **Studi Pemanfaatan Limbah Padat dari Perkebunan Kelapa Sawit pada PLTU 6 MW di Bangka Belitung**. Jurnal Teknik Pomits Vol. 2, No. 1, (2013) ISSN: 2337-3539.

Hendriksen, H.V. and Ahring, B.K. 1991. Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria. *FEMS Microbila Ecology*. 85: 241-246

Hermawan, D. R. W. A., Utami., T. dan Cahyanto, M. N., 2000. **Fermentasi**
**Etanol dari Buah Semu Jambu Mete (Anacardium occidentale L.)**
**oleh *Saccharomyces cereviseae* FNCC 3015 Menggunakan**
**Ammonium Sulfat dan Urea Sebagai Sumber Nitrogen**. Agritech. 20(2) : 93 – 98.

Indartono, Y. 2005. **Bioetanol Alternatif Energi Terbarukan: Kajian Prestasi Mesin dan Implementasi di Lapangan**. [www.energi.lipi.go.id](http://www.energi.lipi.go.id). Diakses tanggal 26 september 2018.

Jennifer, C.B. 2005. **Characteristics of Flo11-dependent Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae***. *FEMS Yeast Res*. 5 (2005) 1151–1156.

Kida, K., Morimura S., Kume K., Suruga K., and Sonoda Y. 1991. **Repeated**
**batch ethanol fermentation by a flocculating yeast Saccharomyces**
**cerevisiae IR-2**. J. Ferment Bioeng. 71:340–344.

Khongsay, N., Lakkana,L. And Pattana, L. 2010. **Growth and Batch Ethanol**
**Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on Sweet Sorghum Stem**
**Juice under Normal and Very High Gravity Condition**. Biotechnol. 9(1): 9-16

Kosugi,A.,Tanaka,R.,Magara,K.,Murata,Y., dkk.,.2010. **Ethanol and lactic acid production using sap squeezed from oil palm trunks felled for replanting**,Journal of Bioscience and Bioengineering,vol. 110, no. 3, pp. 322- 325, 2010.

Lin, Y.H, W.S Chien, K.J Duan, and P.R Chang. 2011. **Effect of Aeration Timing and Interval During Very High Gravity Ethanol Fermentation**. Process Biochemistry. Vol. 46:1025-1028.

Madigan, M.T, Martinko, J.M, and Parker, J. 2000. **Nutirition and metabolism Brock biology of microbiology**. 9th. ed. NJ: prentice-Hall.

Maurice, M. L. 2011. **Factors Effecting Ethanol Fermentation Via Simultaneous Saccharification and Fermentation**. Major Qualifying Project for the Gegree of Bachelor Science.Worcester Polytechnic Science.

Maiorella. 1985. **Ethanol**. Comprehensive Biotechnology. Vol.3 Pergamon.

Michael, H. L., W. R. James., L. O Joe., T. H. Mark, *and* F.O. Rene. 2006. **The Economics of Ethanol from Sweet Sorghum Using the MixAlco Process**. <http://www.afpc.tamu.edu/pubs/2/446/RR%2006-2.pdf>. Tanggal akses 20 Agustus 2014.

Miki, B.L.A., Poon, N.H., James, A.P., Seligy, V.L.. 1982. **Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in Saccharomyces cerevisiae**. J Bacteriol 150,878–889

Miller, G.L. 1959. **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. *Anal Chem.* 31: 426.

Mori,Yutaka.2007. **Old Oil Palm Trunks as Promising Feedstock for Biofuel and Bioplastics**. University of Science Malaysia and Forest Research Institute Malaysia. 4th BMWS 2007.

Mukhtar, K., M. Asgher, S. Afghan, K. Hussain, and S. Zia-ul-Hussnain. 2010.
**Comparative Study on Two Commercial Strains of Saccharomyces**
**cerevisiae for Optimum Ethanol Production on Industrial Scale**. J. Biomed. Biotechnol. 2010: 5

Muspahaji, M. 2007. **Mengganti BBM dengan Bioetanol**. <http://www.suaramerdeka.com>. Tanggal akses 22 Agustus 2018.

Naik, S.N., V.V. Goud, P.K. Rout., A.K. Dalai. 2010. **Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 14: 578-597.

Nofemele, Z, Pratyoosh Shukla, Arthur Trussler, Kugen Permaul, and Suren Sigh. 2012. **Improvement of Ethanol Production from Sugarcane Molasses through enhanched nutrient Supplementation using Saccharomyces cerevisiae**. *Journal of Brewing and Distillatilling* 3(2): 29-35.

Quintero, J.A., V. 2006. **Palm sugar: the Indigeneous Sweetness**. ILEIA Newslett. 13(2): 19

Richana, Nur dan Suarni. 2008. **Teknologi Pengolahan Jagung**. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca Panen. Bogor.

Samejima, M. 2008. **Scenario of Technical Innovation for Production of Ethanol as Automobile Fuel from Cellulosic Biomass in Japan**. Proceedings International Symposium on Wood Scienceand Technology. Harbin, China, 27-29 Sep 2008. Harbin: Iternational Association of Wood Products Societies.

Sardjoko. 1991. **Bioteknologi-Latar Belakang dan Beberapa Penerapannya**. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Setiyadani, SO. 2009. **Optimasi media fermentasi untuk produksi etanol berbasis sorgum (*Sorghum bicolor*) oleh *Zymomonas mobilis* ZM4 (kajian kadar glukosa dan urea)**. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya.

Sinaga, C. 2012. **Analisis Respon Masyarakat Terhadap Rencana Kenaikan Harga Bbm Jenis Premium (Kasus: Pengendara Mobil Pribadi Di Bogor**). Skripsi Departemen Ilmu Ekonomi Fakultas Ekonomi Dan Manajemen Institut Pertanian Bogor.

Soares, E.V. 2010. **Flocculation of Saccharomyces cerevisiae : a Review**. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. Vol.110: 1-18.

Sukumaran,R.K., *dkk*. 2008. **Cellulase Production Using Biomassa Feed Stock and Its Application in Lignocellulosa Saccharification for Bioethanol Production**. *Renewable Energy.*Vol. 30: 1-4.

Suriyachai N., K. Weerasaia, N. Laosiripojana, V. Champreda, 2013. **Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by Saccharomyces cerevisiae and Scheffersomyces stipitis co-culture using design of experiments**. Bioresource technology 142: 171-178.

Tohari, A. 2012. **Sekali lagi: Etanol dari Tebu**. P3GI. Pasuruan.

Wahyuni. A. 2008. **Rekayasa bioproses pembuatan bioetanol dari sirup glukosa ubi jalar (*Ipomoea batatas* L) dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae***.Thesis.Sekolah pasca Sarjana.IPB. Bogor.

Waites, MJ, Morgan, NL, John, SR, Gary, H. 2001*.* **Industrial Microbiology an Introduction.** Blackwell Publishing Company, Victoria Australia.

Wyman, C.E. 1999**. Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass: overview**. CRC Press. Inc. Cleceland Ohio. Chapter 1:1-18