

KARAKTERISASI ETANOL HASIL FERMENTASI BERAS MERAH DAN KETAN MERAH DENGAN ANALISIS GC-FID

K. N. T. Putri, A. A. I. A. M. Laksmiwati, dan S. Wahjuni*

Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jimbaran, Bali, Indonesia
*Email: sriwahjuni@unud.ac.id

Article Received on: 20th October 2025

Revised on: 5th January 2026

Accepted on: 21th January 2026

ABSTRAK

Beras merah dan ketan merah memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan etanol secara fermentasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan massa ragi yaitu 5, 7, 9 g serta waktu fermentasi 3, 4, 5 hari terhadap rendemen etanol yang dihasilkan. Metode yang digunakan terdiri dari beberapa tahap yaitu hidrolisis menggunakan enzim α -amilase, kemudian difermentasi. Analisis kadar etanol pada sampel dilakukan menggunakan kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID). Penelitian ini menerapkan dua faktor, yaitu variasi dari massa ragi dan lama waktu fermentasi, masing-masing dilakukan dalam tiga ulangan. Hasil data yang diperoleh dianalisis secara statistik melalui pendekatan analisis varians dua arah (Two-Way ANOVA) dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf signifikansi 5% untuk menentukan perbedaan nyata antar perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik variasi massa ragi maupun waktu fermentasi memberikan pengaruh signifikan terhadap peningkatan rendemen etanol. Rendemen etanol tertinggi pada sampel beras merah dicapai pada perlakuan M1W2 sebesar 14,44% (v/v), sedangkan pada sampel ketan merah nilai rendemen tertinggi diperoleh melalui perlakuan M2W1 sebesar 14,13% (v/v).

Kata kunci: etanol, fermentasi, beras merah, ketan merah, ragi.

ABSTRACT

Red rice and red glutinous rice have a high total carbohydrate content so they can be used as raw materials for making bioethanol by fermentation. This research aimed to determine the effect of adding a yeast mass of 5, 7, 9 g and a fermentation time of 3, 4, 5 days on the yield of ethanol produced. This method involves a series of phases, starting with enzymatic hydrolysis using α -amylase and continuing with fermentation. Determination of ethanol content using gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID). The research used two factors, namely yeast mass and fermentation time with 3 repetitions. The research data were analyzed using the two-way Anova test and the DMRT test (5%) to determine the real effect of each treatment. The results showed that adding variations in yeast mass and fermentation time had a significant effect on ethanol yield. The highest ethanol yield for red rice was in the treatment (M1W2) of 14.44% (v/v), while red sticky rice was in the treatment (M2W1) of 14.13% (v/v).

Keywords: ethanol, fermentation, red rice, red sticky rice, yeast.

PENDAHULUAN

Indonesia adalah salah satu negara yang memiliki kekayaan bahan pangan yang berlimpah dan dapat diolah menjadi etanol melalui proses fermentasi. Etanol adalah bahan penting yang digunakan dalam industri hingga menjadi bahan bakar alternatif, sifat kimia etanol yang mudah larut dalam air dan mudah terbakar membuatnya menjadi komponen yang bisa dicampur sebagai etanol digunakan sebagai komponen pencampur bensin dalam pembuatan bahan bakar alternatif dikenal dengan istilah gasohol (Azhar *et al.*, 2017).

Produksi etanol dapat dilakukan melalui proses fermentasi terhadap bahan-bahan nabati dengan kandungan biomassa seperti komponen gula, baik dalam bentuk pati aupun selulosa (Shah & Sen, 2011).

Beras putih telah menjadi bahan baku yang banyak digunakan dalam penelitian karena ketersediaannya yang melimpah dan kandungan pati yang tinggi. Namun, seiring dengan meningkatnya permintaan dan perlunya sumber bahan baku lain maka perlu mengeksplorasi potensi jenis beras lainnya, termasuk beras merah dan ketan merah, sebagai alternatif yang menjanjikan. Beras merah

dengan kandungan karbohidrat sebesar 79,58% (Ramirez *et al.*, 2022), dan ketan merah dengan kandungan karbohidrat sebesar 78,62% (Pertiwi, 2016). Pembuatan etanol dari beras merah dan ketan merah dapat memainkan peran penting dalam pemanfaatan sumber daya secara lebih efisien dalam konteks keberlanjutan energi.

Tahapan pembuatan etanol meliputi hidrolisis, proses fermentasi dan destilasi. Pada tahap hidrolisis dijalankan secara kimiawi dan enzimatis (Handayani, 2016). Hidrolisis secara enzimatis melibatkan enzim α -amilase dan diketahui lebih efisien dibandingkan dengan penggunaan senyawa asam. Menurut Syadiah & Syamsu (2021) ragi memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan mikroba lain yang dapat memproduksi etanol, seperti lebih mudah beradaptasi dengan lingkungan dan lebih mudah diperoleh. Salah satu variabel penentu yang signifikan terhadap konsentrasi akhir etanol saat peragian adalah volume inokulum ragi yang diaplikasikan. Menurut Muchsin *et al.* (2020), pada fermentasi beras ketan hitam dengan penambahan 5 g ragi diperoleh kadar etanolnya sebesar 5,0%.

Kadar etanol yang dihasilkan tidak hanya bergantung jumlah ragi yang digunakan, sangat dipengaruhi oleh alokasi waktu fermentasi juga. Hal ini selaras dengan penelitian dari Khodijah dan Abtokhi (2015) yang menyebutkan bahwa lama atau singkatnya proses fermentasi adalah penentu utama dalam produksi bioetanol. Menurut Andriani *et al.*, (2015), memperoleh kadar etanol tertinggi dari tape ketan hitam pada waktu fermentasi 5 hari dengan kadar etanol sebesar 7,43%.

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, penelitian ini difokuskan proses pembuatan etanol berbasis beras merah dan ketan merah dengan variasi massa ragi (5, 7, dan 9 g) serta waktu untuk fermentasi (3, 4, dan 5 hari). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh kedua parameter tersebut terhadap rendemen etanol serta mengidentifikasi kondisi optimum yang menghasilkan produksi etanol tertinggi.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu beras merah dari Desa Jatiluwih, Tabanan, ketan merah diperoleh dari Desa Pakis, Kab. Pacitan, Malang, Jawa Timur, ragi tape (NKL), enzim α -amilase grade analisis yang diproduksi oleh Shaanxi Fonde Biotech, urea merk Petro yang diproduksi oleh PT. Nitra Kimia, aquades, etanol pa, glukosa anhidrat yang diproduksi oleh PT. Mitalab, reagen

arsenomolibdat dan reagen Nelson Somogyi yang diproduksi oleh PT. Muda Berkah.

Peralatan

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi kain saring, timbangan analitik, microtube merk Onemed, vortex merk Biosan, pipet volume, labu ukur, pipet ukur, pipet tetes, botol fermentasi (botol kaca), kertas saring, ayakan 60 mesh, blender merk Miyako, corong, labu erlenmeyer, batang pengaduk, spatula, botol semprot, seperangkat alat destilasi, aluminium foil, waterbath merk CAPP Laboratory tipe CRWB-30, tabung reaksi, spektrofotometri UV-VIS merk Digital dan GC-FID Agilent Technologies seri 6890N digunakan untuk pengujian.

Cara Kerja

Proses hidrolisis enzimatis beras merah dan ketan merah

Sampel beras merah disortir dari bahan pengotor, kemudian dibuat tepung yang dihaluskan menggunakan blender, kemudian partikel hasilnya dipisahkan melalui penyaringan dengan ayakan berukuran 60 mesh. Tepung yang lolos ayakan ditimbang sebanyak 450 g, kemudian ditambahkan 4500 mL aquades, 25 g urea dan enzim α -amilase 3% (v/v) ke dalam sampel lalu diaduk hingga homogen. Beras merah yang telah tercampur sempurna, dipanaskan dalam waterbath pada suhu 80°C dan diaduk selama 1 jam hingga diperoleh hidrolisat. Proses yang sama dilakukan juga pada ketan merah. Setelah dingin, hidrolisat beras merah dan ketan merah dilakukan pengujian gula reduksi, pH dan difermentasi.

Penentuan kadar gula pereduksi Pembuatan kurva standar glukosa

Pembuatan larutan standar glukosa 100 mg/L dengan melarutkan 0,025 g standar glukosa dalam labu ukur berkapasitas 250 mL dengan penambahan aquades hingga mencapai tanda batas. Selanjutnya, larutan standar glukosa disiapkan dengan tingkat konsentrasi 5, 10, 20, 30, dan 40 mg/L diukur dalam labu ukur 50 mL kemudian diencerkan menggunakan aquades hingga tanda batas.

Sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan standar dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson Somogyi. Campuran tersebut dipanaskan dalam waterbath bersuhu mendidih selama 20 menit, larutan kemudian didinginkan hingga mencapai suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Setelah proses pendinginan, ke dalam masing-masing sampel ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat dan 7 mL aquades, lalu dihomogenkan hingga campuran merata sempurna

dan endapan Cu₂O yang terbentuk larut kembali. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum. Kemudian dibuat kurva kalibrasinya dan ditentukan persamaan garis regresinya.

Penentuan gula pereduksi sampel

Dari setiap sampel beras merah, diambil sebanyak 1 mL filtrat dipipet ke dalam tabung reaksi, kemudian direaksikan dengan 1 mL reagen Nelson hingga terbentuk campuran yang homogen. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam penangas air hingga mencapai kondisi mendidih. Setelah tahap pemanasan selesai, tabung reaksi dipindahkan ke dalam gelas beaker yang berisi air bersuhu rendah sampai suhunya turun menjadi kurang lebih 25°C. Tahap berikutnya, ke dalam campuran ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat serta 7 mL aquades, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex hingga tercapai campuran yang bening dan stabil. Kemudian diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Kadar glukosa kemudian dihitung dengan cara nilai absorbansi diplotkan pada tiap sampel melalui persamaan kurva larutan standar glukosa. Proses yang sama dilakukan juga pada sampel ketan merah.

Proses fermentasi

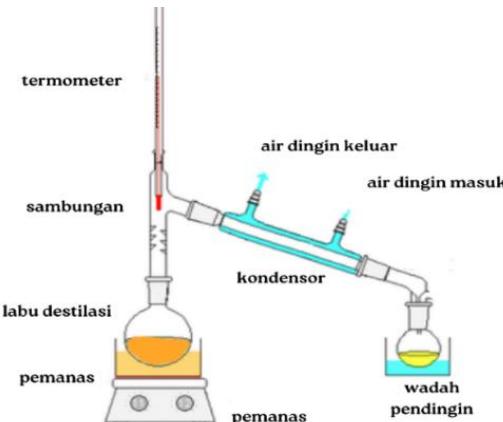
Bubur beras merah dan bubur ketan merah yang telah dibuat seperti poin 3.3.1 dibagi menjadi 27 bagian masing-masing berisi 150 g bubur untuk variasi penambahan massa ragi, waktu fermentasi dan tiga kali ulangan. Masing-masing bagian dimasukkan kedalam botol kaca berukuran 300 mL kemudian ditambahkan ragi tape dengan variasi massa ragi 5,0; 7,0; dan 9,0 g. Fermentasi kemudian dijalankan di bawah kondisi anaerobik dengan variasi waktu 3, 4, dan 5 hari. Masing-masing variasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Setelah waktu fermentasi, dilakukan penyaringan dengan kain saring sehingga diperoleh filtrat berupa etanol dan diukur volume yang dihasilkan. Etanol hasil fermentasi diperkirakan kurang murni, masih ada pelarut lain, sehingga dilakukan permundian dengan didestilasi.

Proses destilasi

Etanol hasil fermentasi didestilasi agar diperoleh etanol murni, proses destilasi dipasang seperti pada Gambar 1, perangkat destilasi dirangkai dengan menghubungkan labu destilasi ke kondensor yang telah dipasangi selang pada bagian masuk dan keluarannya air. Pada ujung kondensor dipasang pipa bengkok yang diarahkan ke dalam erlenmeyer sebagai wadah penampung. Labu destilasi berisi

filtrat hasil fermentasi ditutup rapat dengan gabus dan ditempatkan di atas heating mantle untuk pemanasan. Proses pemanasan dilakukan pada suhu sekitar 78°C, yaitu titik didih etanol, proses distilasi dijalankan sampai tidak teramati lagi keluarnya tetesan distilat dari kondensor. Selanjutnya, volume distilat yang terkumpul dalam erlenmeyer diukur. Cairan hasil destilasi disebut sebagai destilat etanol murni. Volume destilat diukur dan kadar etanol dianalisis menggunakan instrumen kromatografi gas dengan deteksi ionisasi nyala (GC-FID). Selanjutnya hasil destilat beras merah dan ketan merah rendemennya dihitung menggunakan rumus berikut ini:

$$\text{Rendemen etanol} = \frac{\text{Volume destilasi (mL)}}{\text{Volume hasil fermentasi (mL)}} \times 100\%$$



Gambar 1. Alat Destilasi

Penentuan kadar etanol melalui analisis kromatografi gas yang dioperasikan dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID)

Perolehan destilat tertinggi dari kedua sampel dilakukan pengujian untuk menentukan kadar etanol yaitu:

Pembuatan kurva standar etanol

Larutan standar etanol 10.000 mg/L dibuat dengan cara mengencerkan etanol absolut (p.a) 789.210 mg/L dengan cara mengambil 1,26 mL kemudian dilakukan pengenceran menggunakan aquades dalam labu ukur berkapasitas 100 mL sampai mencapai volume final. Tahap berikutnya adalah menyiapkan larutan etanol standar dengan rentang konsentrasi 10, 50, 100, 500, 1000, dan 1500 mg/L. Larutan standar disiapkan dengan mengambil stok etanol 10.000 mg/L sebanyak 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; dan 15,0 mL dipipet ke dalam labu ukur berkapasitas 100 mL, kemudian ditambahkan aquades hingga volume akhir mencapai tanda batas yang ditentukan. Larutan standar yang telah dibuat kemudian setelah disiapkan, larutan baku tersebut diinjeksi ke sistem GC-FID melalui injektor dengan volume 1,0 µL.

Penentuan konsentrasi etanol beras merah dan ketan merah

Etanol hasil destilasi dari proses fermentasi selama 3 hari, 4 hari, dan 5 hari ditentukan dengan metode kromatografi gas. Destilat yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan pengenceran sepuluh kali lipat dengan mengambil 100 μL sampel ke dalam microtube, kemudian ditambahkan 900 μL aquades sehingga volume akhirnya menjadi 1000 μL . Selanjutnya hasil pengenceran pertama tersebut dipipet kembali sebanyak 100 μL dan dimasukan dalam microtube kemudian ditambahkan aquades sebanyak 900 μL hingga mencapai volume akhir 1000 μL digunakan untuk menghasilkan pengenceran 1:100. Selanjutnya sampel dipreparasi sebelum diinjeksikan ke dalam kromatografi gas detektor ionisasi nyala menggunakan *syringe*.

Data kromatogram berupa retensi dan area puncak dimanfaatkan untuk membentuk kurva kalibrasi. Nilai area puncak sampel diinput dalam persamaan $y = ax + b$ guna menentukan kadar etanol.

Analisis Data

RAL faktorial diterapkan dengan 2 faktor independen seperti massa ragi dan waktu fermentasi. Data hasil perlakuan kemudian dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 25. Uji lanjutan dilakukan dengan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) ($\alpha = 5\%$) yang bertujuan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dalam perlakuan dari parameter yang diamati.

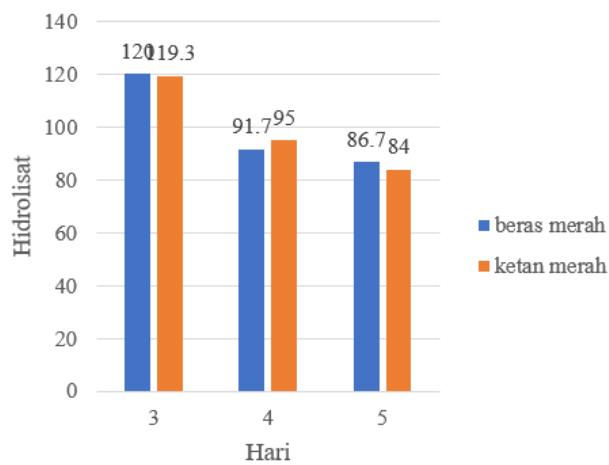
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Two-way anova Pengaruh Perlakuan Penambahan Massa Ragi dan Waktu Fermentasi terhadap Rendemen Etanol

Penelitian ini dilakukan beberapa tahapan yaitu hidrolisis, fermentasi, destilasi, diuji dengan GC-FID untuk mengetahui kadar etanol dan analisis statistik yaitu uji *Two-way anova* dilanjutkan dengan uji DMRT 5%. Penelitian Azis *et al.* (2015) menyebutkan biomassa beras merah memiliki kandungan serat selulosa 0,5% dan 1,5% pada ketan merah. Proses hidrolisis memutus struktur polisakarida selulosa dengan bantuan air sehingga menghasilkan glukosa. Tujuan reaksi pemecahan selulosa oleh air adalah untuk memperoleh glukosa dengan menghasilkan gula sederhana dari hidrolisis, mikroorganisme dapat lebih mudah dan efisien mengonsumsi substrat selama proses fermentasi, sehingga meningkatkan hasil etanol yang diperoleh.

Kedua sampel menghasilkan presentase yang berbeda dimana pada beras merah memperoleh hidrolisat dengan rentang 56,5%-80%, sedangkan ketan merah memperoleh hidrolisat dengan rentang 56%-79,5%. Dari hal itu, bahwa proses hidrolisis sampel beras merah lebih dominan menghasilkan hidrolisat dengan variasi massa ragi maupun waktu fermentasi yang diberikan. Hal tersebut sesuai dengan teori bahwa beras merah memiliki kandungan pati yang lebih tinggi dibandingkan ketan merah. Pati ini terdiri dari amilopektin dan amilosa. Amilopektin lebih mudah dihidrolisis dibandingkan amilosa, sehingga beras merah menghasilkan hidrolisat dengan persentase yang lebih tinggi.

Hasil hidrolisat dari kedua sampel mengalami penurunan drastis, karena disini proses hidrolisis dilakukan secara enzimatis. Enzim α -amilase yang digunakan tidak dapat bekerja dengan baik, aktivitas enzimnya terganggu bahkan terhenti, struktur enzim mengalami denaturasi yaitu perubahan bentuk dan kerusakan struktural yang mengakibatkan kehilangan aktivitas katalitiknya. Dengan kata lain, enzim kehilangan kemampuan untuk mengikat dan memecah substrat (Wahyuni, 2017). Hasil uji yang didapatkan terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hidrolisat Beras Merah dan Ketan Merah

Kadar gula reduksi yang terkandung pada kedua sampel mengalami penurunan yang dilakukan hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim α -amilase. Penelitian lain yang memperlihatkan keterkaitan dengan data yang diperoleh dalam penelitian ini sebagaimana disajikan pada Tabel 1 adalah penelitian oleh Ariandi (2016) penurunan nilai absorbansi seiring bertambahnya waktu aktivitas enzim amilase menunjukkan terjadinya penurunan kadar glukosa, meskipun perubahan tersebut bersifat fluktuatif. Kadar gula reduksi beras merah dan ketan merah mengalami penurunan

seiring dengan bertambahnya massa ragi dan waktu fermentasi yang diberikan. Hal ini dikarenakan konsumsi gula reduksi oleh ragi untuk menghasilkan energi melalui proses fermentasi.

Tabel 1. Nilai Rata-Rata Tingkat Gula Reduksi Beras Merah dan Ketan Merah

Perlakuan	Rata-Rata Kadar Gula Reduksi (%)	
	Beras Merah	Ketan Merah
M1W1	0,00142	0,00136
M2W1	0,00167	0,00257
M3W1	0,00153	0,00393
M1W2	0,00178	0,00143
M2W2	0,00146	0,00165
M3W2	0,00154	0,00248
M1W3	0,00157	0,00297
M2W3	0,00149	0,00301
M3W3	0,00182	0,00291

Keterangan:

M1 = massa ragi 5 gram

M2 = massa ragi 7 gram

M3 = massa ragi 9 gram

W1 = waktu fermentasi 3 hari

W2 = waktu fermentasi 4 hari

W3 = waktu fermentasi 5 hari

Penelitian yang dilakukan oleh Gayatri & Herawati (2021), tentang pembuatan etanol dengan ragi 0,8 g; 1,6 g; 2,4 g; dan 3,2 g serta waktu fermentasi yaitu 0 hari sampai 7 hari menunjukkan bahwa semakin bertambahnya ragi dan waktu fermentasi yang digunakan maka gula reduksi yang terbentuk semakin sedikit. Hal ini dikarenakan ketika massa ragi bertambah, menunjukkan aktivitas metabolisme yang tinggi, dimana banyak gula dikonsumsi, semakin tinggi pemberian massa ragi maka cenderung menurunkan kandungan gula reduksi yang dihasilkan, hal tersebut dipertegas oleh penelitian Nirmalasari (2018), jumlah mikroba perombak dalam sampel lebih banyak, sehingga semakin banyak glukosa yang dirombak menjadi etanol dan akibatnya kandungan gula reduksi menurun. Penambahan hari memiliki potensi cenderung menurunkan kandungan gula pereduksi. Hasil rata-rata kadar gula reduksi yang didapatkan pada kedua sampel merujuk pada Tabel 1.

Tabel 2 menunjukkan nilai rendemen etanol dari setiap kombinasi massa ragi dan waktu fermentasi yang kemudian analisis statistik dilakukan dengan ANOVA dua arah setelah data memenuhi asumsi homogenitas dan distribusi normal melalui uji normalitas.

Rendemen etanol tertinggi beras merah pada perlakuan (M1W2) sebesar 14,4% sedangkan rendemen etanol terendah terdapat pada perlakuan (M3W3) yaitu 8,7%. Rendemen etanol tertinggi

ketan merah pada perlakuan (M2W1) sebesar 14,1% sedangkan rendemen etanol terendah terdapat pada perlakuan (M3W3) yaitu 8,2%. Penambahan ragi dalam jumlah lebih besar berkontribusi pada penurunan rendemen etanol, dan penurunan tersebut mulai tampak pada fermentasi hari kelima.

Tabel 2. Rendemen Etanol Beras Merah dan Ketan Merah dari Beberapa Perlakuan

Perlakuan	Rendemen Etanol (%)	
	Beras merah	Ketan merah
M1W1	12.7% d \pm 0,67	13.8% f \pm 1,54
M2W1	13.6% e \pm 0,38	13.0% e \pm 0,33
M3W1	13.7% f \pm 0,34	10.7% c \pm 0,58
M1W2	14.4% f* \pm 0,39	12.9% e \pm 1,02
M2W2	11.9% c \pm 0,70	11.9% c \pm 1,65
M3W2	9.6% b \pm 0,69	8.8% a \pm 1,84
M1W3	11.0% c \pm 0,33	14.0% f* \pm 0,67
M2W3	10.0% b \pm 0,67	12.8% d \pm 0,51
M3W3	8,7% a \pm 0,58	9,4% b \pm 1,90

Keterangan:

M1 = massa ragi 5 gram

M2 = massa ragi 7 gram

M3 = massa ragi 9 gram

W1 = waktu fermentasi 3 hari

W2 = waktu fermentasi 4 hari

W3 = waktu fermentasi 5 hari

Hasil penelitian ini mendukung studi Subagyo *et al.* (2020) yang menunjukkan bahwa penambahan ragi mampu meningkatkan rendemen etanol hingga batas tertentu sebelum terjadi penurunan pada fase stasioner. Penurunan kadar etanol terbentuk disebabkan oleh berkurangnya kestabilan aktivitas enzimatik mikroorganisme dalam mengkatalisis konversi karbohidrat menjadi etanol. Selama proses fermentasi, selain menghasilkan etanol sebagai produk utama, juga terjadi pembentukan senyawa asam organik sebagai produk samping. Terbentuknya senyawa asam tersebut kemungkinan besar dipicu oleh adanya oksigen terlarut yang terperangkap di dalam sistem fermentasi, sehingga sebagian jalur metabolismik mikroba beralih dari jalur fermentatif menjadi jalur oksidatif. Pergeseran kondisi ini menurunkan efisiensi konversi gula menjadi etanol secara keseluruhan. Penambahan massa ragi dapat menurunkan rendemen etanol, dimana jumlah nutrisi yang tersedia tidak sebanding dengan jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang lebih banyak, sehingga menyebabkan kekurangan makanan yang mengakibatkan kinerjanya menurun dan etanol yang dihasilkan menurun juga.

Memasuki waktu fermentasi lebih dari 3 hari, rendemen etanol beras merah dan ketan merah masih mengalami penurunan drastis, sampel beras

merah pada perlakuan waktu fermentasi 4 hari dengan 9 g ragi (M3W2) diperoleh sebesar 9,5% dan sampel ketan merah. Pada perlakuan fermentasi 5 hari dengan 5 g ragi (M1W3) diperoleh rendemen etanol sebesar 11,01%. Kondisi ini diperkirakan terjadi karena mikroba memasuki fase stasioner, di mana ketersediaan substrat mulai menurun dan akumulasi produk sampingan menghambat proses fermentasi. Anggareni (2018) melaporkan bahwa produksi etanol menurun pada hari ke-7 fermentasi akibat penurunan aktivitas pertumbuhan mikroba serta berkurangnya ketersediaan nutrisi. Dengan demikian, durasi fermentasi yang terlalu lama justru berpengaruh negatif terhadap rendemen etanol.

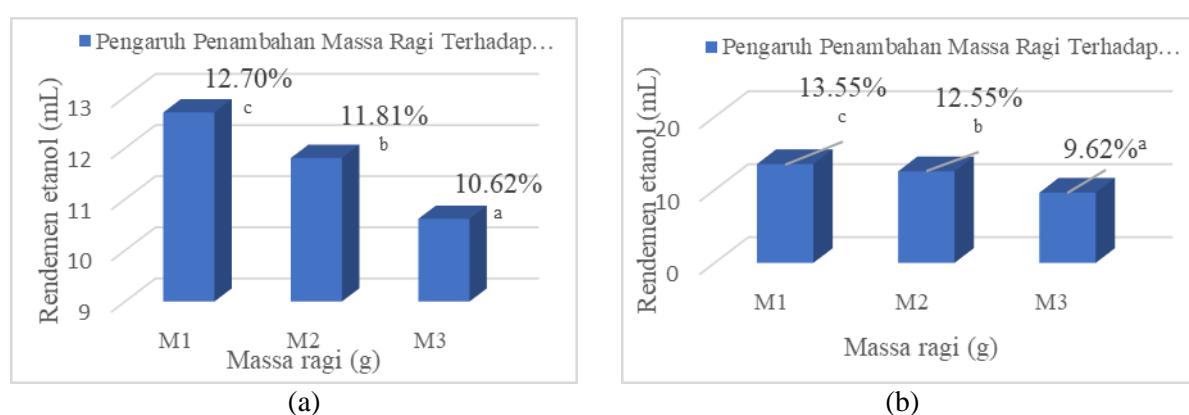
Uji DMRT Pengaruh Variasi Massa Ragi Pada Rendemen Etanol

Uji *Duncan Multiple Range Test* digunakan untuk menilai pengaruh variasi massa ragi (5, 7, 9 g) terhadap rendemen etanol beras merah dan ketan merah. Notasi huruf pada hasil menunjukkan perlakuan yang berbeda secara signifikan, sehingga mempermudah penentuan kondisi fermentasi yang optimal. Sampel beras merah dan ketan merah sama-sama memperoleh rendemen etanol tertinggi pada penambahan massa ragi 5 g masing-masing

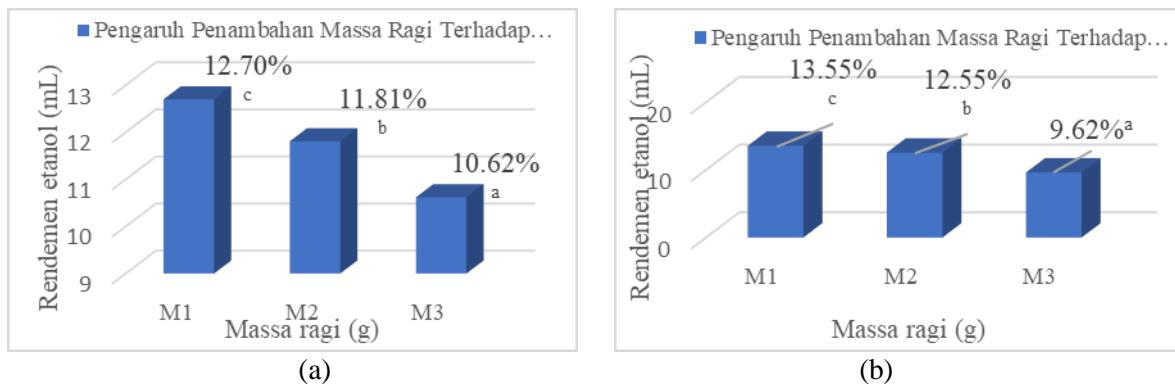
diperoleh sebesar 12,70% dan 13,55%. Pada penambahan massa ragi 5 g sampai 9 g terus mengalami penurunan. Interaksi yang kompleks antara komponen-komponen yang terlibat dalam fermentasi (gula, nutrien, ragi) dapat menghasilkan respons yang tidak sama terhadap penambahan massa ragi. Hal ini dapat mengakibatkan penurunan rendemen etanol meskipun massa ragi ditambahkan dalam jumlah yang lebih besar.

Jika dilihat dari penurunan kadar gula reduksi dengan aktivitas enzim α -amilase yang menghambat pemecahan pati, mengurangi ketersediaan gula untuk fermentasi oleh ragi sehingga mengurangi rendemen etanol melalui kombinasi faktor-faktor seperti kondisi fermentasi yang tidak optimal dan efektivitas yang kurang baik dari enzim α -amilase.

Penelitian yang dilakukan oleh Syauqiah (2015) menyatakan bahwa produksi etanol mengalami penurunan seiring dengan semakin banyak massa ragi yang digunakan yaitu 5 g dan 6 g ragi. Hal ini dikarenakan telah menuju fase kematian sehingga pada ragi ada penurunan aktivitas metabolism sel dalam proses biokonversi gula menjadi etanol mengakibatkan berkurangnya akumulasi etanol pada medium fermentasi.



Gambar 3. Pengaruh Penambahan Massa Ragi terhadap Rendemen Etanol:
(a) Beras Merah, (b) Ketan Merah



Gambar 4. Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Rendemen Etanol: (a) Beras Merah, (b) Ketan Merah

Menurut Azhar *et al.* (2017), menyatakan bahwa ragi memiliki metabolisme yang sangat cepat dan efisien artinya, ragi dapat mengubah gula menjadi etanol dengan kecepatan yang tinggi dan menghasilkan sedikit produk sampingan yang tidak diinginkan. Pernyataan tersebut juga sesuai dengan penelitian oleh Moede *et al.* (2017), ragi menunjukkan ketahanan yang tinggi terhadap etanol, sehingga dimanfaatkan secara luas dalam proses fermentasi. Ragi NKL menjadi salah satu ragi komersil yang mudah untuk diperoleh karena banyak dipasaran dan telah banyak digunakan dalam membantu proses fermentasi.

Uji DMRT Pengaruh Penambahan Variasi Waktu Proses Fermentasi Rendemen Etanol

Rendemen etanol dari fermentasi 3–5 hari dianalisis dengan Duncan Multiple Range Test ($\alpha = 5\%$) dan disajikan untuk kedua sampel pada diagram Gambar 4.

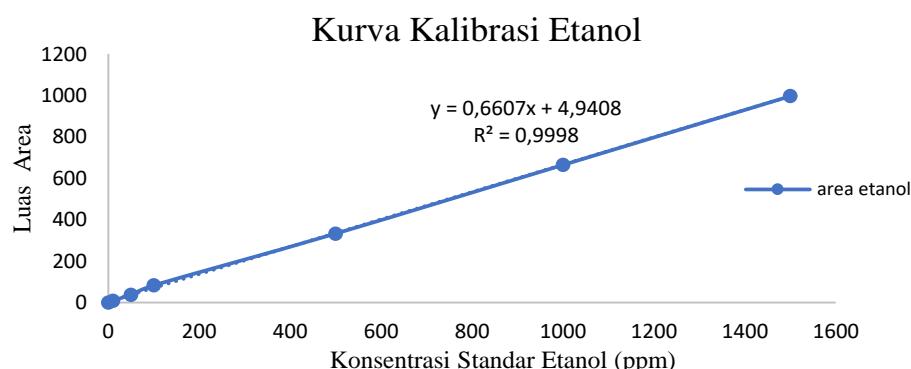
Rendemen etanol terendah yang didapatkan pada beras merah yaitu variasi waktu perlakuan fermentasi selama lima hari yang menunjukkan tingkat rendemen etanol 9,88%, pada ketan merah pada perlakuan waktu fermentasi 5 hari dengan rendemen etanol yang dihasilkan sebesar 11,18%. Nilai rendemen etanol yang dihasilkan menunjukkan penurunan (Gambar 4) seiring dengan waktu fermentasi yang meningkat. Proses fermentasi yang berlangsung mengakibatkan terjadinya proses biokimia oksidatif yang mengubah etanol menjadi senyawa asam organik sebagai hasil akhir reaksi sehingga proses dari fermentasi terhambat dan dapat menyebabkan kematian pada mikroba (Ahmad, 2010). Menurut Anggareni (2018), penurunan rendemen etanol seiring berlangsungnya proses fermentasi disebabkan oleh melambatnya laju pertumbuhan mikroorganisme pada tahap akhir fermentasi serta menurunnya

ketersediaan nutrien dalam medium. Semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi sel mikroba cenderung menurun karena memasuki fase penurunan (*decline phase*), yang dipicu oleh akumulasi etanol dalam sistem serta kurangnya sumber nutrisi sebagai substrat pertumbuhan. Kondisi tersebut menyebabkan sebagian etanol yang telah terbentuk mengalami oksidasi lebih lanjut menjadi asam asetat.

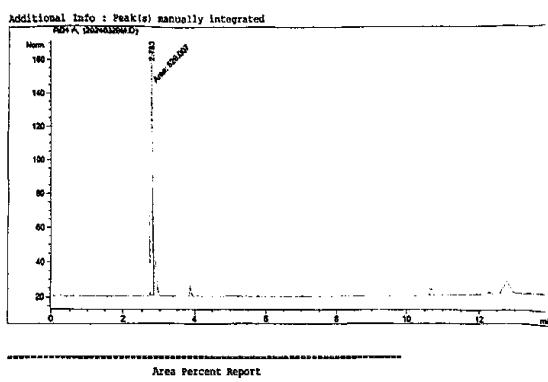
Hasil uji DMRT pada kedua sampel menunjukkan penurunan setelah waktu fermentasi ke-4 hari. Rendemen etanol pada hari ke-4 fermentasi belum mencapai tingkat optimal karena mikroba masih berada pada fase pertumbuhan eksponensial, sehingga laju pertumbuhan mulai melambat akibat terbatasnya gula dan nutrisi. Pada hari ke-5, rendemen menurun lebih lanjut seiring mikroba memasuki fase kematian. Temuan ini konsisten dengan penelitian Suaniti (2015), yang menunjukkan bahwa fermentasi tape ketan putih selama 3 hari menghasilkan etanol tertinggi sebesar 3,50%, menegaskan pengaruh signifikan durasi fermentasi dari kadar etanol.

Kadar Etanol

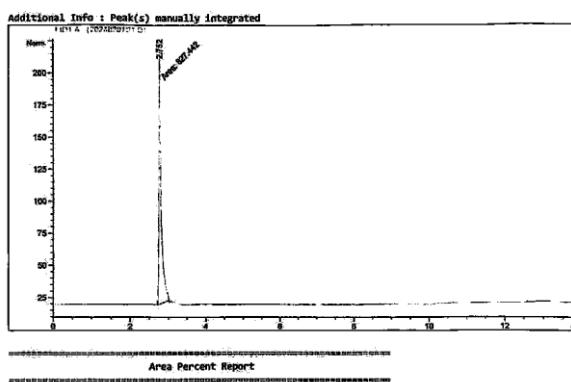
Analisis kadar etanol pada beras merah dan ketan merah diperoleh rendemen tertinggi dan ditentukan menggunakan teknik gas kromatografi berbasis deteksi ionisasi nyala (GC-FID). Fase diam yang digunakan adalah polietilen glikol dan fase gerak yang berfungsi sebagai gas pembawa digunakan helium dengan laju aliran 25 mL/menit. Selama proses analisis berlangsung suhu injektor sebesar 220°C dan suhu detektor adalah 250°C sedangkan suhu oven saat awal penginjeksian sampel sebesar 50°C dengan tekanan 10,06 psi. Kurva kalibrasi standar etanol bisa dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Etanol



(a)



(b)

Gambar 6. Kromatogram Etanol: (a) Beras Merah, (b) Ketan Merah

Berdasarkan pada Gambar 5 hasil analisis diperoleh hubungan linier antara nilai absorbansi dan konsentrasi yang dinyatakan melalui persamaan regresi $y = 0,6607x + 4,9408$ dengan koefisien regresi sebesar 0,9998 yang berarti data tersebut termasuk teliti. Kadar etanol hasil fermentasi yang telah dimurnikan ditentukan kadarnya menggunakan perhitungan pada kadar etanol dengan menganalisis rasio luas puncak antara sampel dan standar sebagai dasar perhitungan konsentrasi. Kadar etanol hasil GC-FID dengan hasil rendemen tertinggi pada sampel beras merah diperoleh di hari ke-4 dengan massa ragi 5 g sebesar 7,89% dan ketan merah diperoleh di hari ke-3 dengan massa ragi 7 g sebesar 12,45%. Ketan merah memiliki kandungan pati yang lebih tinggi dibandingkan dengan beras merah. Kandungan pati yang lebih tinggi dapat menyediakan lebih banyak sumber gula yang dapat difermentasi menjadi etanol.

Hasil dari analisis dengan kromatografi gas detektor ionisasi nyala berupa hasil perolehan waktu retensi, pada hasil penyutikan sampel harus sama atau berdekatan dengan waktu retensi baku etanol. Kromatogram kedua sampel dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil puncak retensi muncul pada waktu retensi yaitu 2,7 menit dengan kondisi analis yang sama antara sampel dengan puncak baku standar etanol yang masih dalam rentang waktu yang dapat diterima dari baku puncak etanol.

Hasil analisis pada kedua sampel memperlihatkan bahwa proses hidrolisis dengan katalis enzim α -amilase menghasilkan gula reduksi dalam jumlah lebih rendah, sehingga etanol yang terbentuk juga lebih sedikit. Kadar etanol yang rendah ini dapat dipengaruhi oleh kondisi campuran etanol dan air yang mencapai titik azeotrop, sehingga pemisahannya melalui destilasi menjadi tidak efektif. Krell (2002) menjelaskan bahwa campuran azeotrop memiliki titik didih uap yang sama dengan fase cair ketika dipanaskan. Etanol dan air memperlihatkan perbedaan titik didih, yakni 78,4°C untuk etanol dan 100°C untuk air, namun

pada kondisi azeotrop campurannya mendidih pada suhu sekitar 78,2°C pada tekanan atmosfer, sehingga keduanya menguap bersama dan sulit dipisahkan sempurna. Akibatnya, destilasi tidak mampu menghasilkan etanol dengan kemurnian 100%.

Etanol dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar apabila memiliki persentase minimal 10% (Zulnazri *et al.*, 2022). Kadar etanol pada fermentasi ketan merah melebihi batas minimal yaitu sebesar 12,45%, diharapkan kedepannya dapat digunakan sebagai bahan dasar pengganti bahan bakar. Susilo (2017) melaporkan bahwa etanol dapat dimanfaatkan sebagai komponen pencampur dalam formulasi bahan bakar apabila memiliki kemurnian lebih dari 99,5%, yang dikenal sebagai (FGE) etanol dengan standar mutu bahan bakar. Kemurnian di bawah standar tersebut berpotensi menimbulkan korosi pada komponen mesin kendaraan.

SIMPULAN

Simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu:

- Perbedaan jumlah ragi yang digunakan bersama durasi fermentasi memberikan pengaruh signifikan terhadap jumlah etanol yang dihasilkan dari beras merah maupun ketan merah. Rendemen etanol tertinggi dan terendah yang dihasilkan pada beras merah yaitu sebesar 14,44% (M1W2) dan 8,7% (M3W3), sedangkan rendemen etanol tertinggi dan terendah yang dihasilkan pada ketan merah sebesar 14,13% (M2W1) dan 8,2% (M3W3).
- Variasi massa ragi memberikan pengaruh signifikan terhadap rendemen etanol yang diperoleh. Peningkatan jumlah ragi yang digunakan cenderung menurunkan efisiensi produksi etanol. Rendemen etanol tertinggi pada beras merah dicapai pada penambahan ragi sebesar 5 g dengan nilai 12,70%, sedangkan pada ketan merah, rendemen maksimum

- diperoleh pada kondisi penambahan ragi yang sama, yaitu 5 g, dengan nilai 13,55%.
3. Lamanya proses fermentasi menunjukkan dampak signifikan terhadap jumlah etanol yang dihasilkan, yang terlihat dari penurunan rendemen secara mencolok pada beras merah mulai hari ketiga hingga hari kelima, nilai rendemen etanol beras merah 13,29%; 11,96; dan 9,88%, sedangkan pada ketan merah memperoleh hasil sebesar 12,48%; 12,07% dan 11,18%.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, W. A., Darmawati, D., Wulandari, S. W. 2015. Kajian Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol Tape Ketan Hitam (*Oryza sativa Glutinosa*) sebagai Pengembangan Lembar Kerja Siswa Pada Konsep Bioteknologi Konvensional Kelas XII SMA. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Riau*. 2(2): 1-12.
- Ariandi. 2016. Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan Reaksi Enzimatisnya Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa. *Jurnal Dinamika*. 7(1): 74-82.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. 2017. Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A Review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10(2): 52-61.
- Azis, A., Izzati, M., Haryanti, S. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Nilai Gizi dari Beberapa Jenis Beras dan Millet sebagai Bahan Pangan Fungsional Indonesia. *Jurnal Akademika Biologi*. 4(1): 45-61.
- Bria, Patrisius Maryanto., Kolo, Sefrinus Maria Dolfi. 2023. Sintesis Bioetanol dari Rumput Laut Coklat (*Sargassum sp*) Asal Pulau Timor Sebagai Energi Terbarukan. *Jurnal Ilmiah Teknik Kimia*. 20(3): 1-6.
- Gayatri, N. P., Herawati, D. A. 2021. Pengaruh Variasi Massa *Saccharomyces cerevisiae* dan Waktu Fermentasi pada Pembuatan Bioetanol dari Limbah Padat Pati Aren Metode Simultaneous of Saccarification and Fermentation. *Jurnal Kimia dan Rekayasa*. 1(2): 61-69.
- Handayani, S. S., Hadi, S., Patmala, H. 2016. Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Buah Kumbi untuk Bahan Baku Bioetanol. *Jurnal Pijar Mipa*. 11(1): 28-33.
- Khodijah, A. Abtokhi. 2015. Analisis Pengaruh Variasi Persentase Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dan Waktu pada Proses Fermentasi Dalam Pemanfaatan Duckweed (*Lemna minor*) sebagai Bioetanol. *Jurnal Neutrini*. 7(2): 71-76.
- Kiay, Nancy., Abdullah, Sofyan., Abdullah, Fadhil., Riastutik, Desak Nyoman., Ruslan. 2024. Karakteristik Fisikokimia dan Organoleptik Produk Flakes Berbahan Baku Beras Ketan Merah, Hitam dan Putih. *Gorontalo Agriculture Technology Journal*. 7(1): 26-37.
- Krell. 2002. *Handbook of Laboratory Destillation*. Elsevier.
- Moede, F. H., Gonggo, S. T., Ratman, R. 2017. Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol dari Pati Ubi Jalar Kuning (*Ipomea batata L*). *Jurnal Akademika Kimia*. 6(2):86-91.
- Muchsin, Subagyo R, Pristiwanto A. E. 2020. Studi Eksperimental Pembuatan Bioetanol Hasil Fermentasi Beras Ketan Putih, Beras Ketan Hitam dan Singkong. *Jurnal Ilmu Teknik Mesin*.11(2): 84–93.
- Nirmalasari, R. 2018. Pengaruh Dosis Pemberian Ragi Terhadap Hasil Fermentasi Tape Singkong *Manihot utilissima*. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*. 9(18): 8-18.
- Ramirez, I., Sandra, Y., Arifandi, F. 2022. Perbandingan Kadar Pati pada Beras Merah Dibandingkan dengan Beras Putih Menggunakan Uji Iodida. *Jurnal Ilmiah Indonesia*. 2(12): 1076-1080.
- Shah, Y. R., Sen, D. J. 2011. Bioalcohol As Green Energy - A Review. *International Journal of Current Science Research*. 1(2): 57–62.
- Siskayanti, Rini., Muliaati, Lia., Abdan, M. F., Jamilah, R. N., Wathonil, G. M. F. 2023. Pembuatan Bioetanol Dari Kulit Nanas Menggunakan *Saccaromyces cerevisiae* Terimobilisasi Butiran Alginate. *Jurnal Redoks*. 8(1): 70-80.
- Suaniti, N. M. 2015. Kadar Etanol Dalam Tape sebagai Hasil Fermentasi Beras Ketan (*Oryza sativa glutinosa*) dengan *Saccaromyces cerevisiae*. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Dan Sains*. 1(1): 16-19.
- Subagyo, R. Eko, Pristiwanto, A. 2020. Studi Eksperimental Pembuatan Bioetanol Hasil Fermentasi Beras Ketan Putih, Beras Ketan Hitam dan Singkong. *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin*. 11(2): 84-93.
- Susilo, B. S. H. S. 2017. Pemurnian Bioetanol Menggunakan Proses Distilasi Dan Adsorpsi Dengan Penambahan Asam Sulfat (H_2SO_4) Pada Aktivasi Zeolit Alam Sebagai Adsorben. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*. 5(1):19–26.
- Syadiah, E. A., Syamsu, K. 2021. Produksi Bioetanol Dari Bagas Sorgum Manis Melalui

- Sakarifikasi Dan Fermentasi Simultan (SSF) Konvensional Menggunakan *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Edufortech.* 6(2): 70-75.
- Syauqiah, I. 2015. Pengaruh Waktu Fermentasi dan Persentase Starter Pada Nira Aren (*Arenga Pinnata*) Terhadap Bioetanol Yang Dihasilkan. *Info-Teknik.* 16(2): 217-226.
- Wahyuni, S., Marpaung, M. P. 2020. Penentuan Kadar Alkaloid Total Ekstrak Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca Miers*) berdasarkan Perbedaan Konsentrasi Etanol dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Pendidikan Kimia dan Ilmu Kimia.* 3(2): 52-61.
- Zulnazri, Delfi, R., Dewi, R., Sylvia, N., Bahri, S. 2022. Pemanfaatan Limbah Kulit Nanas menjadi Bioetanol dengan Menggunakan Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*). *Chemical Engineering Journal Storage.* 2(5): 147-160.