

SKRIPSI

Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan



Steven Purnomo

31200353

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2024

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi
Universitas Kristen Duta Wacana

Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan



Steven Purnomo

31200353

Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta

2024

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
SKRIPSI/TESIS/DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Kristen Duta Wacana, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Steven Purnomo
NIM : 31200353
Program Studi : Biologi
Fakultas : Bioteknologi
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Kristen Duta Wacana **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*None-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

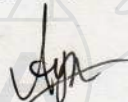
“Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti/Noneksklusif ini Universitas Kristen Duta Wacana berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama kami sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Yogyakarta
Pada Tanggal : 29 Agustus 2024

Yang menyatakan


Steven Purnomo
31200353

HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI

Skripsi dengan judul:

Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*)

Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan

telah diajukan dan dipertahankan oleh:

STEVEN PURNOMO

31200353

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Sarjana Sains pada tanggal 7 Agustus 2024

Nama Dosen

Tanda Tangan

1. Dr. Charis Amarantini, M.Si.

(Ketua Tim Penguji)

2. Tri Yahya Budiarmo, S.Si., M.P.

(Dosen Pembimbing I / Penguji)

3. Catarina Aprilia Ariestanti, S.T.P., M.Sc.

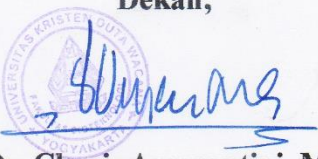
(Dosen Pembimbing II / Penguji)

Yogyakarta, 4 September 2024

Disahkan oleh:

Dekan,

Ketua Program Studi,


Dr. Charis Amarantini, M.Si.


Dwi Adityarini, S.Si., M. Biotech.

HALAMAN PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet
(*Manihot glaziovii*) Menggunakan α -Amilase
dan Ragi Komersial Fermipan
Nama Mahasiswa : Steven Purnomo
Nomor Induk Mahasiswa : 31200353
Hari / Tanggal Ujian : Rabu, 7 Agustus 2024

Disetujui oleh:

Pembimbing I



Tri Yahya Budiarmo, S.Si., M.P.

NIK: 934 E 209

Pembimbing II

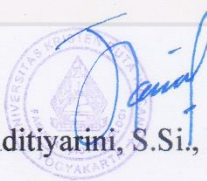


Catarina Aprilia Ariestanti, S.T.P., M.Sc.

NIK: 224 E 590

Ketua Program Studi Biologi

DU TA WACANA



Dwi Aditriyarni, S.Si., M. Biotech.

NIK: 214 E 556

HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Steven Purnomo

NIM : 31200353

Menyatakan dengan benar bahwa skripsi yang berjudul:

**, Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*)
Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan**

merupakan penelitian saya sendiri dan bukan hasil duplikasi maupun plagiasi dari penelitian milik orang lain, kecuali yang secara langsung tertulis dan diacu dalam naskah skripsi ini, serta disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini saya buat dengan sebagaimana mestinya secara sadar dan dipertanggungjawabkan, serta bersedia untuk menerima sanksi apabila terdapat bukti melakukan duplikasi maupun plagiasi terhadap naskah skripsi ataupun jurnal-jurnal ilmiah lainnya yang sudah diterbitkan.

Yogyakarta, 7 Agustus 2024

Steven



NIM: 31200353

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena dengan kasih dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan seluruh rangkaian penelitian dan penyusunan naskah skripsi dengan judul “Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan” sebagai salah satu syarat untuk memenuhi gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta.

Dalam melaksanakan rangkaian penelitian dan penyusunan naskah skripsi ini, penulis mendapatkan banyak arahan dan dorongan dari berbagai pihak. Maka dari itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini, diantaranya:

1. Ibu Dr. Charis Amarantini, M.Si., selaku Dekan dan Dosen Penguji.
2. Bapak Tri Yahya Budiarso, S.Si., M.P. dan Ibu Catarina Aprilia Ariestanti, S.T.P., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing yang sudah memberikan masukan dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.
3. Ibu Dwi Aditiyarini, S.Si., M. Biotech., selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta.
4. Kedua orang tua yang telah memberikan segenap doa, dukungan, motivasi, dan kasih sayang.
5. Seluruh laboran Fakultas Bioteknologi atas kesempatannya untuk mau meluangkan waktu dan bantuannya selama penulis menjalankan penelitian skripsi di laboratorium.
6. Teman-teman angkatan 2020 dan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan motivasi, dukungan, dan doanya selama melaksanakan skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan naskah skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Maka dari itu, penulis bersifat terbuka dalam menerima masukan dan mengharapkan adanya saran serta kritik yang membangun untuk menyempurnakan naskah skripsi ini. Penulis juga berharap bahwa dengan adanya

naskah skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan dapat terus dikembangkan menjadi lebih baik sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 7 Agustus 2024

Penulis

Steven Purnomo



DAFTAR ISI

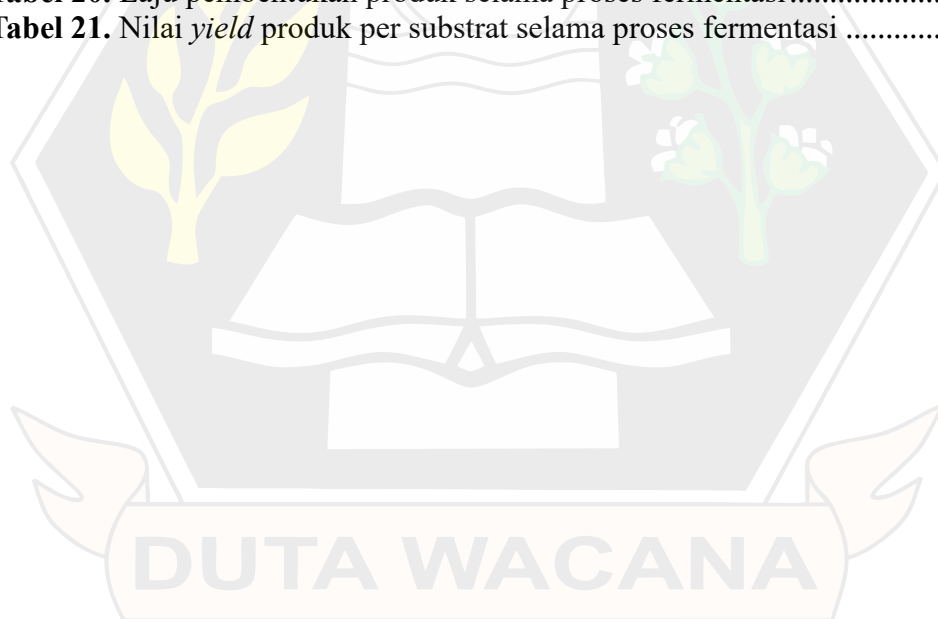
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI	iii
HALAMAN PERSETUJUAN NASKAH SKRIPSI	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Pati Singkong Karet	3
2.1.1 Struktur dan Karakteristik Pati Singkong.....	3
2.1.2 Hidrolisis Pati oleh Enzim α -Amilase	4
2.2 Imobilisasi Enzim α -Amilase dan Sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.3 Fermentasi Etanol dengan Metode <i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i> (SHF) serta Faktor yang Mempengaruhi.....	6
2.4 Proses Reaksi dari Hidrolisis Pati dan Fermentasi Gula menjadi Produk Etanol	9
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	11
3.2 Bahan.....	11
3.3 Alat.....	11
3.4 Desain Penelitian.....	12
3.5 Cara Kerja	13
3.5.1 Ekstraksi Pati.....	13
3.5.2 Imobilisasi Enzim.....	13
3.5.3 Imobilisasi Sel	14
3.5.4 Pembuatan <i>Starter</i> untuk Medium Fermentasi.....	14
3.5.5 Hidrolisis Pati.....	14
3.5.5.1 Gelatinisasi	14
3.5.5.2 Likuifaksi	14
3.5.6 Analisis Kadar Pati dengan Metode Iodin.....	14
3.5.7 Uji Kadar Gula dengan Metode DNS.....	15
3.5.8 Pembuatan Medium Fermentasi	15
3.5.9 Mekanisme Fermentasi.....	15
3.5.10 Analisis Kadar Etanol dengan Metode Nicloux	16

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Hidrolisis Pati oleh Enzim α -amilase Bebas dan Amobil	17
4.2 Fermentasi Gula menjadi Etanol oleh Sel Bebas dan Amobil	22
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	30
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN.....	37



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Desain penelitian selama hidrolisis pati pada dua jenis perlakuan.....	12
Tabel 2. Desain penelitian selama fermentasi gula pada dua jenis perlakuan.....	13
Tabel 3. Analisis data hidrolisis pati pada perlakuan pertama (EB).....	20
Tabel 4. Analisis data hidrolisis pati pada perlakuan kedua (EB)	21
Tabel 5. Analisis data hidrolisis pati pada perlakuan ketiga (EA).....	21
Tabel 6. Analisis data hidrolisis pati pada perlakuan keempat (EA).....	21
Tabel 7. Analisis data fermentasi gula pada perlakuan pertama (SB)	25
Tabel 8. Analisis data fermentasi gula pada perlakuan kedua (SA)	26
Tabel 9. Analisis data fermentasi gula pada perlakuan ketiga (SB)	26
Tabel 10. Analisis data fermentasi gula pada perlakuan keempat (SA)	27
Tabel 11. Kadar pati (%) selama hidrolisis pati.....	39
Tabel 12. Kadar gula (%) yang terbentuk selama hidrolisis pati.....	40
Tabel 13. Kadar sisa gula (%) selama proses fermentasi	40
Tabel 14. Kadar etanol (%) yang terbentuk selama proses fermentasi.....	41
Tabel 15. Pengujian pH selama proses fermentasi	41
Tabel 16. Laju pengurangan substrat pada hidrolisis pati	42
Tabel 17. Laju pembentukan produk pada hidrolisis pati.....	42
Tabel 18. Nilai <i>yield</i> produk per substrat pada hidrolisis pati	42
Tabel 19. Laju pengurangan substrat selama proses fermentasi.....	42
Tabel 20. Laju pembentukan produk selama proses fermentasi.....	43
Tabel 21. Nilai <i>yield</i> produk per substrat selama proses fermentasi	43



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Pemecahan amilosa menjadi maltodekstrin pada tahap likuifaksi	5
Gambar 2. Reaksi likuifaksi pati menjadi glukosa dengan enzim α -amilase	9
Gambar 3. Reaksi konversi gula menjadi piruvat selama tahap glikolisis	10
Gambar 4. Reaksi pembentukan produk etanol dan CO ₂ dari piruvat.....	10
Gambar 5. Reaksi konversi gula menjadi etanol dan gas CO ₂	10
Gambar 6. Metodologi penelitian dalam bentuk diagram <i>fishbone</i>	12
Gambar 7. Hidrolisis pati oleh enzim α -amilase menjadi gula.....	18
Gambar 8. Fermentasi gula oleh sel ragi menjadi etanol selama 84 jam	23
Gambar 9. Nilai pH fermentasi pada empat perlakuan yang berbeda	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Kurva standar pati	38
Lampiran 2. Kurva standar glukosa	38
Lampiran 3. Kurva standar etanol	39
Lampiran 4. Pati yang diekstraksi dari singkong karet	44
Lampiran 5. Warna larutan pati yang diberi akuades biasa.....	44
Lampiran 6. Warna larutan pati yang diberi akuades panas	44
Lampiran 7. Proses gelatinisasi larutan pati yang dipanaskan pada suhu 90°C ...	45
Lampiran 8. Pengukuran pH larutan pati sebelum dihidrolisis	45
Lampiran 9. Pengukuran pH medium fermentasi sebelum diberi ragi instan fermipan.....	45
Lampiran 10. Pengujian kadar pati (%) dari salah satu perlakuan pada beberapa sampel.....	46
Lampiran 11. Pengujian kadar gula reduksi (%) dari salah satu perlakuan pada beberapa sampel	46
Lampiran 12. Pengujian kadar etanol (%) dari salah satu perlakuan pada beberapa sampel.....	46
Lampiran 13. Butiran manik-manik Ca-alginat pada sel amobil	47
Lampiran 14. Butiran manik-manik Ca-alginat pada enzim amobil	47
Lampiran 15. <i>Starter</i> ragi instan fermipan yang ditumbuhkan dalam medium PGY steril	47
Lampiran 16. Medium fermentasi pada perlakuan pertama: sel bebas (SB)	48
Lampiran 17. Medium fermentasi pada perlakuan kedua: sel amobil (SA).....	48
Lampiran 18. Medium fermentasi pada perlakuan ketiga: sel bebas (SB).....	48
Lampiran 19. Medium fermentasi pada perlakuan keempat: sel amobil (SA).....	49

ABSTRAK

Fermentasi Etanol dari Pati Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) Menggunakan α -Amilase dan Ragi Komersial Fermipan

STEVEN PURNOMO

Singkong karet (*Manihot glaziovii*) kurang diminati manusia karena memiliki kandungan utama yang terdiri dari senyawa HCN, kemudian diikuti dengan protein, lipid, dan karbohidrat berupa pati, sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku alternatif untuk produksi etanol. Proses produksi etanol secara umum meliputi hidrolisis pati oleh enzim dan fermentasi gula oleh sel ragi. Penelitian yang dilakukan menggunakan enzim dan sel amobil. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh enzim amobil selama hidrolisis pati serta pengaruh sel amobil saat fermentasi gula 84 jam. Variasi perlakuan yang dipakai antara enzim bebas (EB) dan amobil (EA) yaitu P1: EB, P2: EB, P3: EA, dan P4: EA, serta sel bebas (SB) dan amobil (SA) berupa P1: SB, P2: SA, P3: SB, dan P4: SA. Metode *entrapment* dipakai dalam membuat enzim dan sel amobil menggunakan Na-alginat dan CaCl_2 . Metode iodin digunakan untuk mengukur kadar pati; Metode DNS untuk mengukur kadar gula, pengukuran pH secara digital, dan kadar etanol dengan metode Nicloux. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim bebas (EB) di P1 mampu mendegradasi 100% pati selama 30 menit pada kadar pati awal 6.50%. Sel amobil (SA) di P2 mampu mengkonversi 4.62% gula untuk menghasilkan 5.23% etanol di jam ke-84 pada pH 7.07. Enzim amobil (EA) dan sel amobil (SA) memiliki potensi untuk digunakan kembali, baik dalam proses hidrolisis pati maupun pada proses fermentasi.

Kata kunci: α -amilase, Amobil, Etanol, *Manihot glaziovii*, Fermipan

ABSTRACT

Ethanol Fermentation from Rubber Cassava Starch (*Manihot glaziovii*) Using α -Amylase and Fermipan Commercial Yeast

STEVEN PURNOMO

Rubber cassava (*Manihot glaziovii*) is less attractive to humans because it has a main content consisting of HCN compounds, followed by proteins, lipids, and carbohydrates in the form of starch, so it can be used as an alternative raw material for ethanol production. The ethanol production process generally includes starch hydrolysis by enzymes and sugar fermentation by yeast cells. This study used immobilized enzymes and cells. This study aims to determine the effect of immobilized enzymes during starch hydrolysis and the effect of immobilized cells during 84 hours sugar fermentation. The treatment variations used between free (FE) and immobilized enzymes (IE) were T1: FE; T2: FE; T3: IE and T4: IE, as well as free (FC) and immobilized cells (IC) in the form of T1: FC; T2: IC; T3: FC and T4: IC. Entrapment method was used in making immobilized enzymes and cells using Na-alginate and CaCl_2 . Iodine method was used to measure starch content; DNS method was used to measure sugar content, digital pH measurement, and ethanol content using Nicloux method. The results showed that the free enzymes (FE) in T1 was able to degrade 100% starch for 30 minutes at an initial starch content of 6.50%. The immobilized cells (IC) in T2 was able to convert 4.62% sugar to produce 5.23% ethanol in the 84 hours at pH 7.07. The immobilized enzymes (IE) and immobilized cells (IC) have the potential to be reused, both in the starch hydrolysis and in the fermentation process.

Keywords: α -amylase; Immobilized; Ethanol; *Manihot glaziovii*; Fermipan

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Banyaknya isu-isu global selama beberapa tahun belakangan ini menimbulkan kekhawatiran bagi masyarakat dunia, khususnya Indonesia dan salah satu permasalahan yang paling besar serta banyak dibicarakan yaitu mengenai krisis energi pada bahan bakar fosil di masa sekarang dan masa yang akan mendatang (Ghadge *et al.*, 2020). Pemerintah Indonesia dengan PT. Pertamina saat ini bekerja sama untuk mewujudkan transisi energi pada penggunaan bioetanol dalam rangka menggantikan bahan bakar fosil menjadi energi yang berkelanjutan (CNBC Indonesia, 2024).

Umumnya, bioetanol diperoleh dari bahan baku tanaman-tanaman yang seringkali dijadikan sebagai sumber pangan dan kaya akan karbohidratnya yang tinggi, sehingga disebut sebagai generasi pertama (Sebayang *et al.*, 2017). Singkong karet (*Manihot glaziovii*) dinilai mampu untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan etanol karena memiliki beberapa kandungan seperti protein (0.7-1.3%), lipid (0.1%), dan karbohidrat berupa pati yang tergolong tinggi (75.38%) (Morgan & Choct, 2016). Selain itu, singkong karet juga mudah ditemukan di kebun, dan kurang diminati oleh manusia (Muiruri *et al.*, 2021). Hal ini disebabkan oleh adanya kandungan senyawa asam sianida (HCN) yang tinggi (75-80%) dan beracun (Mellicha *et al.*, 2021). Selain itu, proses produksi etanol dari singkong karet juga lebih ekonomis dibandingkan dengan tanaman jagung, tebu, dan molasse karena memiliki jejak karbon, jejak air, dan indeks stress air (tingkat kerawanan air) yang lebih rendah (Machado *et al.*, 2017; Pingmuanglek *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2017).

Hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dipilih karena sifatnya yang termotabil, tidak menimbulkan toksisitas bagi lingkungan, dan kemampuannya sebagai katalitik dalam mencapai sisi aktif antara substrat pati dengan enzim lebih cepat (Cruz-Casas *et al.*, 2021). Setelah pati

dihidrolisis oleh enzim, maka tahap selanjutnya adalah fermentasi gula. Fermentasi menggunakan ragi instan komersial fermipan yang komposisinya berupa *Saccharomyces cerevisiae* dan emulsifier (*sorbitan monostearate* E491) mampu bekerja lebih efisien dan lebih cepat bereaksi ketika sudah dilarutkan dengan campuran media yang mengandung nutrisi penting untuk pertumbuhannya (Parapouli *et al.*, 2020).

Teknik imobilisasi enzim dan sel sudah banyak digunakan selama hidrolisis substrat dan fermentasi gula untuk meningkatkan hasil dari kadar etanol, mengurangi biaya produksi, dan mengontrol proses hidrolisis maupun fermentasinya (Genisheva *et al.*, 2012). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan kajian lebih dalam mengenai proses produksi etanol dengan bahan baku singkong karet (*Manihot glaziovii*) melalui hidrolisis pati oleh enzim α -amilase dan fermentasi menggunakan ragi komersial fermipan pada dua jenis perlakuan, yaitu bebas dan amobil.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana pengaruh penambahan enzim α -amilase amobil dalam proses hidrolisis pati menjadi gula sederhana jika dibandingkan dengan enzim bebas?
- 1.2.2 Bagaimana pengaruh penggunaan sel amobil dalam pembentukan etanol selama fermentasi jika dibandingkan dengan sel bebas?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Mengetahui pengaruh penambahan enzim α -amilase amobil pada proses hidrolisis pati singkong menjadi gula sederhana.
- 1.3.2 Mengetahui pengaruh sel amobil pada proses fermentasi gula menjadi etanol.

1.4 Manfaat Penelitian

- 1.4.1 Enzim dan sel amobil mudah dipisahkan dan digunakan kembali pada siklus berikutnya sehingga mampu mengurangi biaya proses produksi.
- 1.4.2 Etanol yang dihasilkan dapat digunakan untuk alternatif pengganti bahan bakar fosil dengan memanfaatkan singkong karet sebagai bahan baku utamanya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Enzim bebas (EB) dengan konsentrasi 1.2143 U/mL mampu mendegradasi 100% pati singkong karet (*Manihot glaziovii*) pada kadar pati 6.50% selama 30 menit, sedangkan enzim amobil (EA) dengan konsentrasi enzim yang sama dapat mampu mendegradasi 4.57-4.58% pati selama 30 menit.
- 5.1.2 Penggunaan ragi fermipan yang di amobilisasi menggunakan alginat 3% mampu menggunakan 4.62% gula untuk menghasilkan 5.23% etanol, sedangkan sel bebas (SB) mampu menggunakan lebih banyak gula dengan kadar 6.23% untuk menghasilkan 5.02% etanol.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut tentang penggunaan kembali enzim maupun sel amobil selama beberapa siklus, tingkat efisiensi fermentasi, dan jumlah biomassa sel yang terbentuk selama rentang waktu fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbemafle, R. (2019). Proximate, Starch, Sugar Compositions and Functional Properties of Cassava Flour. *Journal of Food Security*. 7(2), 40-46. DOI:10.12691/jfs-7-2-3
- 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 Report* 10. 52-61. doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003
- Bertoft, E. (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy*, 7, 56, 1-29. doi.org/10.3390/agronomy7030056
- Budiarti, G. I., Sumardiono, S., & Kusmiyati. (2016). Studi Konversi Pati Ubi Kayu (*Cassava Starch*) menjadi Glukosa secara Enzimatik. *Chemica*. 3(1), 7-16. dx.doi.org/10.26555/chemica.v3i1.4306
- Chakraborty, I., Pooja, N., Mal, S. S., Paul, U. C., Rahman, Md. H., & Mazumder, N. (2022). An Insight into the Gelatinization Properties Influencing the Modified Starches Used in Food Industry: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 15:1195-1223. doi.org/10.1007/s11947-022-02761-z
- Chisenga, S. M., Workneh, T. S., Bultosa, G., & Alimi, B. A. (2019). Progress in Research and Applications of Cassava Flour and Starch: A Review. *J Food Sci Technol*. 56(6): 2799-2813. doi.org/10.1007/s13197-019-03814-6
- Choo, B. C., Ismail, K. S. K., & Ma'Radzi, A. H. (2021). Scaling-Up and Techno-Economics of Ethanol Production from Cassava Starch via Separate Hydrolysis and Fermentation. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 765, 012004. doi:10.1088/1755-1315/765/1/012004
- Consumer News and Business Channel Indonesia. Pertamina Disebut Lagi Proses Akuisisi Perusahaan Bioetanol di Brasil, <https://www.cnbcindonesia.com/news/20240610181245-545424/pertamina-disebut-lagi-proses-akuisisi-perusahaan-bioetanol-di-brasil> (diakses 9 Januari 2024).
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic Hydrolysis and Microbial Fermentation: The Most Favorable Biotechnological Methods for The Release of Bioactive Peptides. *Food chemistry. Molecular Sciences*, 3, 100047. doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047.
- Da Silva Fernandes, F., de Souza, É. S., Carneiro, L. M., Alves Silva, J. P., de Souza, J. V. B., & da Silva Batista, J. (2022). Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Microbiology*, 2022, 7878830. doi.org/10.1155/2022/7878830
- Duarte, J. C., Rodrigues, J. A., Moran, P. J., Valença, G. P., & Nunhez, J. R. (2013). Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. *AMB Express*, 3(1), 31. doi.org/10.1186/2191-0855-3-31
- Fathoni, A., Hartati, N. S., Fitriani, W. H., Rahman, N., Harmoko, R., & Perwitasari, U. (2020). Characterization of Cassava Starch and Its Potential for

- Fermentable Sugar Production. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 439, 012024. doi:10.1088/1755-1315/439/1/012024
- Galaction, A. I., Kloetzer, L., Turnea, M., Webb, C., Vlysidis, A., & Caşcaval, D. (2012). Succinic Acid Fermentation in a Stationary-Basket Bioreactor with a Packed Bed of Immobilized *Actinobacillus succinogenes*: 1. Influence of Internal Diffusion on Substrate Mass Transfer and Consumption Rate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(6), 877-888. doi.org/10.1007/s10295-012-1095-z
- Genisheva, Z., Macedo, S., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., & Oliveira, J. M. (2012). Production of White Wine by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Grape Pomace. *Journal of the Institute of Brewing & Distilling*, 118(2), 163-173. doi.org/10.1002/jib.29
- Ghadge, A., van der Werf, S., Er Kara, M., Goswami, M., Kumar, P., & Bourlakis, M. (2020). Modelling the Impact of Climate Change Risk on Bioethanol Supply Chains. *Technological Forecasting and Social Change*, 160, 120227. doi:10.1016/j.techfore.2020.120227
- Gomar-Alba, M., Morcillo-Parra, M. Á., & Olmo, M. L. (2015). Response of Yeast Cells to High Glucose Involves Molecular and Physiological Differences when Compared to Other Osmostress Conditions. *FEMS yeast research*, 15(5), fov039. doi.org/10.1093/femsyr/fov039
- Hadiyanto, Dessy, A., Apsari, P. A., Desiyantri, S. P. (2014). Optimization of Ethanol Production from Whey through Fed-Batch Fermentation using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Procedia*. 47:108-112. doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.203
- Hemamalini, V., Saraswathy, S. G. E., Hema, C., Geetha, S. (2012). Comparative Study of Continuous Ethanol Fermentation from Molasses by using *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Int. J. Curr. Sci.* 1:219-228.
- Hussain, A., Kangwa, M., & Fernandez-Lahore, M. (2017). Comparative Analysis of Stirred Catalytic Basket Bio-reactor for the Production of Bio-ethanol using Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *AMB Express*, 7(1), 158. doi.org/10.1186/s13568-017-0460-8
- Hussain, A., Kangwa, M., Yumnam, N., & Fernandez-Lahore, M. (2015). Operational Parameters and Their Influence on Particle-side Mass Transfer Resistance in a Packed Bed Bioreactor. *AMB Express*, 5(1), 138. doi.org/10.1186/s13568-015-0138-z
- Jayus, Nurhayati, Mayzuhroh, A., Arindhani, S., & Caroenchai, C. (2016). Studies on Bioethanol Production of Commercial Baker's and Alcohol Yeast under Aerated Culture Using Sugarcane Molasses as The Media. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 493-499. doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.168
- Khoja, A. H., Ali, E., Zafar, K., Ansari, A. A., Nawar, A., & Qayyum, M. (2015). Comparative Study of Bioethanol Production from Sugarcane Molasses by using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 14, 2455-2462. doi.org/10.5897/AJB2015.14569

- Klaewkla, R., Arend, M., & Hoelderich, W. F. (2011). A Review of Mass Transfer Controlling the Reaction Rate in Heterogeneous Catalytic Systems. *InTech*. doi: 10.5772/22962
- Krajang, M., Malairuang, K., Sukna, J., Rattanapradit, K., & Chamsart, S. (2021). Single-Step Ethanol Production from Raw Cassava Starch Using a Combination of Raw Starch Hydrolysis and Fermentation, Scale-Up from 5-L Laboratory and 200-L Pilot Plant to 3000-L Industrial Fermenters. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 68. doi.org/10.1186/s13068-021-01903-3
- Li, E., Dhital, S., & Hasjim, J. (2014). Effects of Grain Milling on Starch Structures and Flour or Starch Properties. *Starch-starke*, 66, 15-27. doi.org/10.1002/star.201200224
- Li, Z., Liu, W., Gu, Z., Li, C., Hong, Y., & Cheng, L. (2015). The Effect of Starch Concentration on the Gelatinization and Liquefaction of Corn Starch. *Food Hydrocolloids*, 48, 189-196. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.030
- Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting Ethanol Fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*, 47, 395-401. doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.019
- Ma'aruf, A. G., & Abdul, H. R. (2020). Efficient Processing of Cassava Starch: Physicochemical Characterization at Different Processing Parameters. *Food Research*. 4(1): 143-151. doi.org/10.26656/fr.2017.4(1).235
- Machado, K. S., Seleme, R., Maceno, M. M. C., & Zattar, I. C. (2017). Carbon Footprint in the Ethanol Feedstocks Cultivation: Agricultural CO₂ Emission Assessment. *Agricultural Systems*. 157, 140-145. doi.org/10.1016/j.agsy.2017.07.015
- Mellicha, S. V., Gunam, I. B. W., Antara, N. S., & Arnata, I. W. (2021). Production of Bioethanol from Wild Cassava Crude Starch (*Manihot glaziovii* Muell. Arg) using Different Microbial Types and Fermentation Times. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 913, 012032. doi:10.1088/1755-1315/913/1/012032
- Morgan, N. K., & Choct, M. (2016). Cassava: Nutrient Composition and Nutritive Value in Poultry Diets. *Animal Nutrition*, 2(4), 253-261. doi.org/10.1016/j.aninu.2016.08.010
- Muiruri, S. K., Ntui, V. O., Tripathi, L., & Tripathi, J. (2021). Mechanisms and Approaches Towards Enhanced Drought Tolerance in Cassava (*Manihot esculenta*). *Current Plant Biology*, 28, 100227, 1-7. doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100227
- Mustafa, A. (2015). Analisis Proses Pembuatan Pati Ubi Kayu (Tapioka) Berbasis Neraca Massa. *Agrointek*, 9(2), 127-133. doi.org/10.21107/agrointek.v9i2.2143
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Conver. Technol.* 26(6): 157-163. doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157
- Nikolić, S., Mojović, L., Pejin, D., Rakin, M., & Vukašinović, M. (2010). Production of Bioethanol from Corn Meal Hydrolyzates by Free and

- Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*. *Biomass and Bioenergy*, 34(10), 1449-1456. doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.04.008
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1–31. doi.org/10.3934/microbiol.2020001
- Pele, G. I., Bolade, M. K., Enujiugha, V. N., Sanni, D. M., & Ogunsua, A. O. (2018). Effect of pH and Temperature on the Activities of Alpha-Amylase in Cassava Starch Liquefaction. *African Journal of Food Science and Technology*. 9(2), 37-42. doi.org/10.14303/ajfst.2018.233
- Pervez, S., Aman, A., Iqbal, S., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U. (2014). Saccharification and Liquefaction of Cassava Starch: An Alternative Source for the Production of Bioethanol using Amylolytic Enzymes by Double Fermentation Process. *BMC Biotechnology*. 14, 49. doi.org/10.1186/1472-6750-14-49
- Pingmuanglek, P., Jakrawatana, N., & Gheewala, S.H. (2017). Freshwater Use Analysis of Cassava for Food Feed Fuel in the Mun River Basin, Thailand. *Int. J. Life Cycle Assess.* 22, 1705–1717. doi.org/10.1007/s11367-017-1286-y
- Qi, X., & Tester, R. F. (2016). Effect of Native Starch Granule Size on Susceptibility to Amylase Hydrolysis. *Starch: Wiley*, 807-810. doi.org/10.1002/star.201500360
- Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2007). A New Insight into the Gelatinization Process of Native Starches. *Carbohydrate Polymers*, 67, 511-529. doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.025
- Rolland-Sabaté, A., Sanchez, T., Buléon, A., Colonna, P., Ceballos, H., Zhao, S. S., Zhang, P., & Dufour, D. (2013). Molecular and Supra-molecular Structure of Waxy Starches Developed from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1451-1462. doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.048
- Samaranayake, M. D. W., De Silva, A. B. G. C. J., Fernando, W. R. D., Gunawardhane, K. V. T., & Herath, H. M. T. (2017). Optimization of Liquefaction and Saccharification Times for Laboratory Scale Production of Glucose Syrup from Cassava Starch and Scaling Up Process of Optimized Conditions at Pilot Scale. *Research Journal of Chemical Sciences*. 7(7), 16-25. ISSN 2231-606X
- Sebayang, A. H., Hassan, M. B., Ong, H., Dharma, S., Silitonga, A. S., Kusumo, F., Mahlia, T. M., & Bahar, A. H. (2017). Optimization of Reducing Sugar Production from *Manihot glaziovii* Starch Using Response Surface Methodology. *Energies*, 10, 35. doi.org/10.3390/en10010035
- Sousa-Dias, M. L., Paula, V. B., Dias, L. G., & Estevinho, L. M. (2021). Mead Production Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*: Reuse of Sodium Alginate Beads. *Processes*, 9(4), 724, 1-16. doi.org/10.3390/pr9040724
- Soustelle, M. (2011). *An Introduction to Chemical Kinetics*. Wiley. DOI:10.1002/9781118604243

- Souto, L. R. F., Caliari, M., Júnior, M. S., Fiorda, F. A., & Garcia, M. C. (2016). Utilization of Residue from Cassava Starch Processing for Production of Fermentable Sugar by Enzymatic Hydrolysis. *Food Science and Technology International*, 37(1), 19-24. doi.org/10.1590/1678-457X.0023
- Stewart, G., G. (2018). *Brewing and Distilling Yeasts. The Yeast Handbook*. Springer. doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8
- Subroto, E., Jeanette, G., Meiyanasari, Y., Luwinsky, I., & Baraddiaz, S. (2020). Review on the Analysis Methods of Starch, Amylose, Amylopectin Food and Agricultural Products. *International Journal of Emerging Trends in Engineering Research*. 8(7), 3519-3524. doi.org/10.30534/ijeter/2020/103872020
- Sumardiono, S., Budiarti, G., & Kusmiyati. (2018). Conversion of Cassava Starch to Produce Glucose and Fructose by Enzymatic Process Using Microwave Heating. *MATEC Web of Conferences*. 156, 01024. doi.org/10.1051/mateconf/201815601024
- Sumbhate, S., Nayak, S., Goupale, D., Tiwari, A., & Jadon, R. S. (2012). Colorimetric Method for the Estimation of Ethanol in Alcoholic-Drinks. *Journal of Analytical Techniques*. 1, 1-6. ISSN: 0222-0XXX
- Talekar, S., & Chavare, S. (2012). Optimization of Immobilization of α -Amylase in Alginate Gel and Its Comparative Biochemical Studies with Free α -Amylase. *Recent Research in Science and Technology*, 4(2), 01-05. ISSN: 2076-5061
- Tiefenbacher, K. F. (2019). *Glossary of Terms in Wafers, Waffles and Adjuncts*. The Technology of Wafers and Waffles II, 325-411. doi.org/10.1016/B978-0-12-809437-2.00010-1
- Triwahyuni, E., Sudiyani, Y., & Abimanyu, H. (2015). The Effect of Substrate Loading on Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for Bioethanol Production from Oil Palm Empty Fruit Bunches. *Energy Procedia*. 68 138-146. doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.242
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. (2021). Production of Bioethanol-A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation*, 7, 268. doi.org/10.3390/fermentation7040268
- Tupe, M., Pawar, A., & Pawar, N. (2018). Estimation of Alcohol by Different Evaluative Methods and Comparisons in Estimated Results of Various Methods. *International Research Journal of Engineering and Technology*. 5(6), 2899-2902. e-ISSN: 2395-0056
- Uzun, U., & Akatin, M. Y. (2019). Immobilization and Some Application of α -Amylase Purified from *Rhizoctonia solani* AG-4 Strain ZB-34. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(3), 397-407. doi.org/10.1515/tjb-2018-0240
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*. 2(4), 30. doi.org/10.3390/beverages2040030
- Waterschoot, J., Gomand, S. V., Fierens, E., & Delcour, J. A. (2014). Production, Structure, Physicochemical and Functional Properties of Maize, Cassava, Wheat, Potato and Rice Starches. *Starch – Stärke Special Issue: General Reviews*, 67(1-2), 14-29. doi.org/10.1002/star.201300238

- William, O. A., Selina, O. K., & Orua, A. O. (2023). Investigation into Optimal Conditions for Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch to Glucose by Amylase from Rice. *American Journal of Smart Technology and Solutions*. 2(2), 1-9. doi.org/10.54536/ajsts.v2i2.1763
- Wu, Y., Li, B., Miao, B., Xie, C., & Tang, Y. Q. (2022). *Saccharomyces cerevisiae* Employs Complex Regulation Strategies to Tolerate Low pH Stress during Ethanol Production. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 247. doi.org/10.1186/s12934-022-01974-3
- Xie, X., Zhang, T., Wang, L., & Huang, Z. (2017). Regional Water Footprints of Potential Biofuel Production in China. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 95. doi.org/10.1186/s13068-017-0778-0
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R. A., Boyce, N. (2014). Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice, The *Scientific World Journal*, 2014, 957102. doi.org/10.1155/2014/957102
- Zusfahair, Ningsih, D. R., Kartika, D., Kurniasih, M., Nofiani, R., & Fatoni, A. (2020). Improved Reuse and Affinity of Enzyme using Immobilized Amylase on Alginate Matrix. *Journal of Physics: Conference Series*. 1494, 012028. doi:10.1088/1742-6596/1494/1/012028

