

PRODUKSI BIOETANOL DARI NIRA NIPAH SKALA 50 LITER DENGAN PENAMBAHAN TWEEN 80 DAN ERGOSTEROL PADA PROSES FERMENTASI MENGGUNAKAN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Prio Widodo, Chairul, Silvia Reni Yenti

Laboratorium Teknologi Bioproses
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Riau
Kampus Bina Widya Km 12,5 Simpang Baru, Panam, Pekanbaru 28293
Email : prio.idx@gmail.com

ABSTRACT

Currently, supply of ethanol was produced globally from sugar and starch. Sugar crops contributed about 61% of total ethanol production while 39% from starch. Nypa sap is one of potential material to be processed to bioethanol. The availability of nypa land is sufficient widely in Indonesia as well as a fairly high sugar content (15-20%) make nypa sap has the potential to be processed into bioethanol as a renewable energy. The aimed of this study was to observe the effect of fermentation time nypa sap with the addition of tween 80 and ergosterol to bioethanol yield on a scale of 50 liters. Fermentation was carried out in a 70 liter fermenter with a variation of fermentation time about 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 108 hours, variations of tween 80 addition about 250 ml and ergosterol as much as 25 grams and without the addition of tween 80 and ergosterol. Effect of addition ergosterol can increase stress tolerance of yeast to osmotic pressure and high bioethanol tolerance in yeast cells. While the effect of the addition tween 80 can increase the absorption of ergosterol in plasma membrane and enzymatic accessibility and increasing the level of consumption of glucose in the final stages of fermentation. Fermentation of nypa sap produced the best conditions on the addition of 250 ml tween 80 and ergosterol 25 grams on the fermentation time 96 hours with bioethanol concentration about 16.22% (v/v) or 127.99 mg/ml

Keywords: Bioethanol, Ergosterol, Nypa Sap, *Saccharomyces Cerevisiae*, Tween 80

I. PENDAHULUAN

Saat ini pasokan etanol global diproduksi terutama dari bahan baku gula dan pati. Tanaman gula menyumbang 61% dari total produksi etanol sedangkan 39% berasal dari bahan baku pati. Bahan baku utama untuk etanol saat ini adalah air tebu di Brazil, dan pati jagung di AS. Akan tetapi, pertumbuhan bioetanol dari bahan baku ini sangat bergantung pada bahan bakar fosil yang tidak terbarukan dan eksploitasi lahan hutan yang memiliki dampak buruk terhadap lingkungan dan sosial (Tamunaidu *et al.*, 2013). Salah satu sumber energi terbarukan adalah Nipah (*Nypa fruticans*). Nipah adalah sejenis palem (palma) yang tumbuh di lingkungan hutan bakau atau daerah pasang surut dekat

tepi laut. Nipah tersebar luas di daerah Asia Tenggara dimana yang terbesar terdapat di Indonesia sekitar 700.000 ha, Papua Nugini 500.000 ha, Malaysia 200.000 ha dan di Philipina 8000 ha (Tamunaidu *et al.*, 2013).

Di Indonesia, khususnya Provinsi Riau tanaman nipah belum dimanfaatkan secara maksimal. Sebagian masyarakat di Kabupaten Rokan Hilir memanfaatkan nira nipah untuk pembuatan asam cuka, sedangkan daun nipah yang dikeringkan dimanfaatkan secara tradisional sebagai bahan pembuat atap. Nipah memiliki kegunaan lain yang lebih memiliki nilai ekonomis selain untuk kegunaan-kegunaan tersebut. Salah satu alternatif pemanfaatan tanaman nipah adalah sebagai bahan baku pembuatan bioetanol.

Namun ada masalah yang dihadapi dalam proses produksi bioetanol secara fermentasi adalah terjadinya inhibisi produk bioetanol ke dalam sel *yeast*. Produk bioetanol yang terakumulasi dalam fermentor akan berpengaruh terhadap pertumbuhan *yeast*, misalnya bioetanol akan merusak membran plasma, denaturasi protein, dan terjadinya perubahan profil suhu pertumbuhan. Hal-hal tersebut dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan mikroba sehingga akan menurunkan produktivitas. Pada konsentrasi alkohol 15% mikroba tidak dapat tumbuh (Bulawayo, 1996). Rezky (2014) telah melakukan fermentasi nira nipah dalam skala laboratorium dengan variasi tween 80 dan ergosterol, serta waktu fermentasi. Diperoleh konsentrasi bioetanol tertinggi sebesar 20,47% (v/v) pada waktu fermentasi 72 jam dengan penambahan tween 80 10 ml dan ergosterol 1 gram. Melihat hasil penelitian tersebut maka diperlukan pengkajian lebih lanjut guna mengetahui pengaruh tween 80 dan ergosterol pada skala pilot.

II. METODE PENELITIAN

2.1 Bahan dan Alat

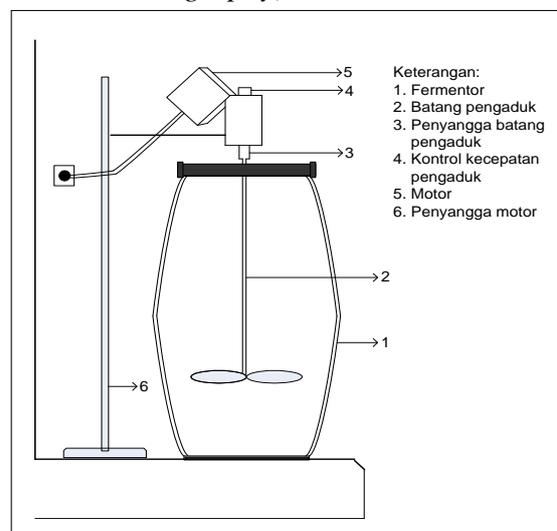
2.1.1 Bahan

Bahan baku pada penelitian ini adalah nira nipah yang didapat dari desa Rantau Panjang Kiri kecamatan Kubu Babussalam Kabupaten Rokan Hilir Provinsi Riau. Mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan merupakan produk dari Saf-Instant. Bahan kimia yang digunakan antara lain reagen Nelson-Samogyi, *Yeast extract*, Urea, NPK, NaOH, H₂SO₄, ergosterol, Tween 80, dan aquadest.

2.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan yaitu rangkaian alat fermentasi seperti ditampilkan pada Gambar 2.1 (fermentor 50 liter, pengaduk, motor pengaduk), *sterilizer*, inkubator, erlenmeyer, gelas

piala, labu ukur, gelas ukur, pH meter, *vacuum rotary evaporator*, timbangan analitik, pipet tetes, dan tabung reaksi serta alat analisa (spektrofotometer UV-VIS dan *Gas Chromatography*).



Gambar 2.1. Rangkaian Alat Fermentasi

2.2 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari beberapa tahap sebagai berikut.

1. Persiapan Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah nira nipah. Nira nipah hasil penyadapan dilakukan pemanasan untuk mencegah nira nipah supaya tidak menjadi asam dan juga untuk menguapkan sebagian air yang masih banyak terkandung dalam nira nipah.

2. Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar glukosa digunakan dalam penentuan konsentrasi glukosa dari substrat dengan metode Nelson-Somogyi (Sudarmadji, 1997). Kurva ini menyatakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa. Dengan kurva ini larutan yang mengandung gula (gula pereduksi) dapat diketahui konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak.

3. Sterilisasi Peralatan

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan, penyiapan *starter*, dan pada

tahap fermentasi disterilisasi terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil fermentasi. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan menggunakan *sterilizer*. Peralatan yang terbuat dari plastik disterilkan dengan cara menyemprotnya dengan alkohol 98%.

4. Penyiapan starter

Pembuatan *starter* yaitu dengan menyiapkan nira nipah 5000 ml sebagai medium pengembang (*starter*), medium pengembang yang digunakan sama dengan medium yang akan difermentasikan dengan pH awal 5. Selanjutnya tambahkan nutrisi dengan konsentrasi 1 g/l *yeast extract*; 0,4 g/l (NH₂)₂CO (Urea) dan 0,5 gr/l NH₄H₂PO₄ (NPK) kedalam medium pengembang (*starter*) dan diaduk hingga merata (homogen). Larutan tersebut disterilkan dalam *sterilizer* selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian medium pengembang (*starter*) didinginkan sampai suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan ragi (*Sacharomyces cerevisiae*) sebanyak 100 gram dan di inkubasi dalam inkubator selama 24 jam.

5. Penyiapan medium fermentasi

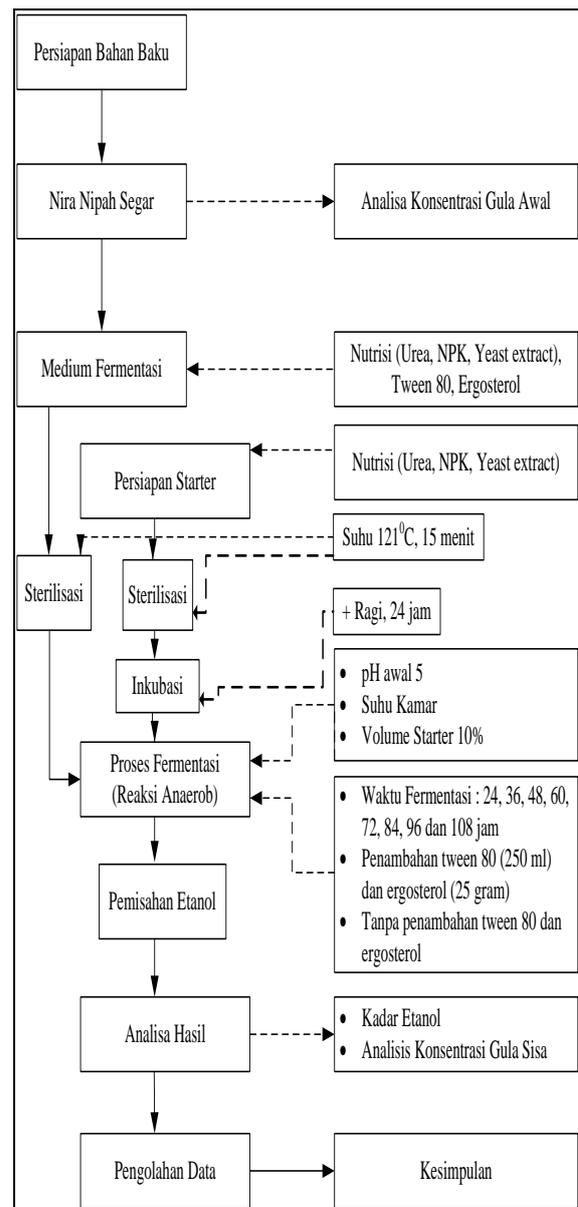
Medium fermentasi yang digunakan adalah nira nipah yang dianalisa konsentrasi gulanya dengan menggunakan spektrofotometer sinar tampak, kemudian di cek pH 5. Selanjutnya ditambahkan nutrisi beserta tween 80 kedalam medium fermentasi dan disterilkan dalam *sterilizer* pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu dinginkan sampai suhu kamar.

6. Proses Fermentasi

Proses Fermentasi dimulai dengan menambahkan sejumlah *starter* beserta ergosterol ke dalam medium fermentasi (nira nipah) dengan komposisi yang sesuai dengan variabel penelitian, perbandingan yang digunakan adalah 10% volume *starter* terhadap volume total cairan yaitu 50 L. Fermentor yang digunakan berukuran 70 liter. Fermentasi dilakukan pada suhu

kamar (25-30°C). Waktu fermentasi divariasikan pada 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 dan 108 jam untuk mengamati pengaruh waktu fermentasi terhadap etanol yang dihasilkan. Kontak antara medium fermentasi dengan oksigen dibatasi dengan cara menutup rapat fermentor menggunakan kapas dan kain kasa kemudian dilapisi dengan aluminium foil.

Prosedur penelitian dalam bentuk diagram alir dapat dilihat pada Gambar 3.3 berikut ini :



Gambar 2.2. Diagram Alir Penelitian Fermentasi Nira Nipah Skala 50 Liter menjadi Bioetanol

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pengaruh Penambahan Tween 80, Ergosterol dan Waktu Fermentasi Nira Nipah Terhadap Konsentrasi Bioetanol

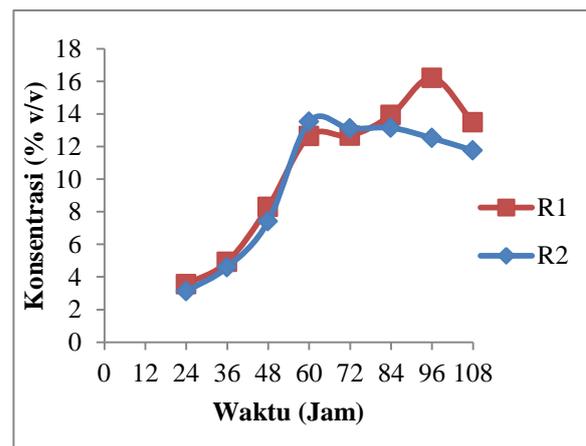
Hasil fermentasi terlebih dahulu di *rotary evaporator* untuk memisahkan impuritis dari hasil fermentasi berupa sisa-sisa nutrisi, biomassa dan lain-lain. Untuk menentukan konsentrasi bioetanol yang dihasilkan dari proses fermentasi nira nipah digunakan alat kromatografi gas. Konsentrasi bioetanol yang diperoleh pada masing-masing variabel penelitian dapat dilihat pada tabel. 3.1.

Tabel 3.1. Konsentrasi Bioetanol

Waktu (jam)	Konsentrasi Bioetanol Yang Diperoleh (% v/v)	
	Penambahan tween 80 (250 ml) dan ergosterol (25 gr)	Tanpa penambahan tween 80 dan ergosterol
24	3,56	3,12
36	4,92	4,59
48	8,30	7,41
60	12,64	13,52
72	12,67	13,11
84	13,93	13,15
96	16,22	12,52
108	13,49	11,77

Berdasarkan tabel 3.1. dapat dilihat bahwa hasil perolehan bioetanol tertinggi terjadi pada waktu fermentasi 96 jam dengan penambahan tween 80 sebanyak 250 ml dan ergosterol sebanyak 25 gram diperoleh konsentrasi bioetanol sebesar 16,22% (v/v). Sedangkan perolehan bioetanol tanpa penambahan tween 80 dan ergosterol didapat konsentrasi bioetanol tertinggi sebesar 13,52% (v/v) pada waktu fermentasi 60 jam. Awalnya semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi bioetanol yang dihasilkan juga semakin tinggi, akan tetapi setelah kondisi optimum tercapai, konsentrasi bioetanol yang diperoleh cenderung mengalami penurunan. Adanya

penurunan konsentrasi bioetanol disebabkan karena bioetanol yang dihasilkan terkonversi menjadi asam-asam organik seperti asam asetat, asam cuka dan ester (Purwoko, 2007). Penambahan tween 80 dan ergosterol secara nyata mempengaruhi perolehan bioetanol yang dihasilkan. Penambahan tween 80 dan ergosterol dapat meningkatkan pertumbuhan sel mikroba *Saccharomyces cerevisiae* sehingga konsentrasi bioetanol yang diperoleh juga ikut meningkat (Pham *et al*, 2010).



Ket.: R1 = Tween 80 (250 ml) + Ergosterol (25 gr)
R2 = Tween 80 (0 ml) + Ergosterol (0 gr)

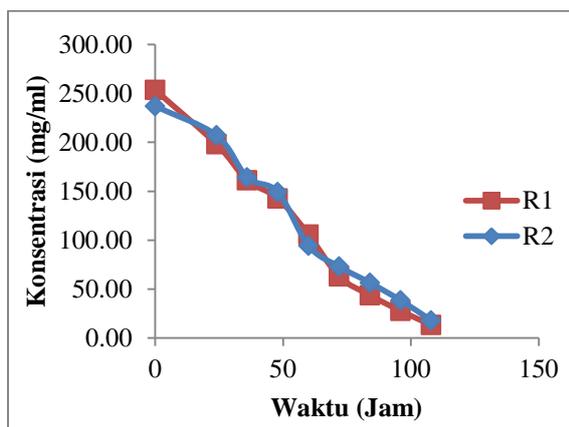
Gambar 3.1. Pengaruh Penambahan tween 80 dan Ergosterol serta Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Bioetanol % (v/v) yang dihasilkan

Pada gambar 3.1 terlihat jelas bahwa efek penambahan tween 80 dan ergosterol mampu meningkatkan konsentrasi bioetanol hasil fermentasi. Pada variabel tanpa penambahan tween 80 dan ergosterol hasil bioetanol yang diperoleh memiliki konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan dengan variabel penambahan tween 80 dan ergosterol. Hal ini menunjukkan bahwa sterol (ergosterol) berperan penting bagi pertumbuhan dan metabolisme ragi. Menurut Dawes dan Sutherland (1992) dalam (Deacon, 1997) ergosterol memberi peranan penting dalam regulasi osmotik, penyerapan nutrisi,

sekresi, biosintesis dinding sel dan komponen utama membran plasma fungi dan khamir. Pendapat Dawes dan Sutherland (1992), ini sejalan dengan Odumeru *et al* (1992), yang menyatakan bahwa Ergosterol juga dapat meningkatkan toleransi stres ragi untuk kondisi seperti tekanan osmotik (*osmotic shock*) dan toleransi bioetanol yang tinggi dalam sel ragi. Sementara efek penambahan tween 80 dapat meningkatkan daya serap ergosterol pada membran plasma dan aksesibilitass enzimatik (Mcallister *et al*, 2000).

3.2 Pengaruh Waktu Fermentasi Nira Nipah Terhadap Konsentrasi Gula Sisa

Substrat yang digunakan dalam proses fermentasi pada penelitian ini adalah nira nipah. Menurut Tamunaidu *et al* (2013), nira nipah mengandung gula dengan komposisi yaitu sukrosa 11,1%, glukosa 5,9%, dan fruktosa 1,6%, yang dapat dikonversi menjadi bioetanol. Analisa konsentrasi gula sisa dari nira nipah menggunakan metode Nelson–Somogyi dengan alat Spektrofotometer Sinar Tampak.



Ket.: R1 = Tween 80 (250 ml) + Ergosterol (25 gr)
R2 = Tween 80 (0 ml) + Ergosterol (0 gr)

Gambar 3.2. Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Gula Sisa Hasil Fermentasi

Proses fermentasi nira nipah menggunakan *yeast saccharomyces cerevisiae* dilakukan secara *batch* tetapi dengan pengambilan sampel secara *kontinu* dengan penambahan tween 80 dan ergosterol serta waktu fermentasi. Waktu fermentasi sangat berpengaruh terhadap aktivitas *yeast* karena semakin lama fermentasi, maka semakin banyak jumlah *yeast* atau semakin aktif *yeast* untuk berkembang biak. Sehingga mempunyai kemampuan untuk mengkonversi substrat semakin besar pula (Umaiyah, 2013). Pada proses fermentasi, *sacharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim *zimase* dan *invertase*. Enzim *zimase* berfungsi sebagai biokatalis yang dapat mengubah glukosa dan fruktosa menjadi alkohol dan CO₂, sedangkan enzim *invertase* berfungsi mengubah sukrosa menjadi gula invert (glukosa dan fruktosa) (Poedjiadi dan Titin, 2006).

Dari Gambar 3.2 terlihat bahwa semakin lama waktu fermentasi, konsentrasi gula yang ada semakin berkurang. Hal ini menunjukkan adanya penggunaan gula oleh *yeast*. Penurunan konsentrasi gula tersebut terjadi karena *yeast* membutuhkan substrat untuk pertumbuhan, baik memperbanyak maupun mempertahankan hidup sel. Gula digunakan oleh *yeast* untuk beraktivitas sehingga menghasilkan bioetanol sebagai metabolit primer (Rachman, 1991).

Pada penelitian ini, waktu fermentasi yang divariasikan adalah 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 dan 108 jam. Dari Gambar 3.2 dapat dilihat bahwa konsentrasi gula sisa terendah terdapat pada variabel dengan penambahan tween 80 dan ergosterol. Sedangkan variabel tanpa penambahan tween 80 dan ergosterol gula sisa yang dihasilkan lebih besar. Hal ini disebabkan karena peran ergosterol yang berperan sebagai pembentuk membran sel yang mengalami lisis (Andika, 2015).

3.3 Perbandingan Konsentrasi Bioetanol dalam Penelitian ini dengan Penelitian lainnya

Penelitian sebelumnya sudah melakukan percobaan mengkonversi gula

nira nipah menjadi bioetanol dengan berbagai variabel bebas. Perbandingan konsentrasi bioetanol penelitian ini dengan penelitian lainnya ditunjukkan pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Perbandingan konsentrasi bioetanol dengan penelitian lainnya

Peneliti	Irsyad (2013)	Yerri (2013)	Rezky (2014)	Penelitian Ini (2015)
Substrat	Nira Nipah	Nira Nipah	Nira Nipah	Nira Nipah
Variabel Berubah	pH awal (4,5; 5,0 dan 5,5)	Nutrisi (KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ .7H ₂ O, dan (NH ₄) ₂ SO ₄)	Tween 80 dan Ergosterol (5 ml + 0,5 gr; 10 ml + 1 gr; 15 ml + 1,5 gr; dan 20 ml + 2 gr)	Penambahan Tween 80 & Ergosterol, dan Tanpa Penambahan Tween 80 & Ergosterol
Volume fermentasi (Liter)	50	50	2	50
Konsentrasi Gula Awal (mg/ml)	221,16	205,28	317,52	253,35
Konsentrasi Bioetanol % (v/v)	14	13	20,47	16,22
Mikroorganisme Yang Berperan	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>

Tabel 3.2 memberikan informasi tentang perbandingan produksi bioetanol dengan proses fermentasi pada berbagai variabel berubah, volume fermentasi, konsentrasi gula, dan *yeast* yang digunakan. Konsentrasi bioetanol tertinggi diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh rezky (2014) yaitu 20,47% (v/v) yang masih lebih tinggi daripada penelitian ini yaitu 16,22% (v/v). Hal ini disebabkan pada penelitian Rezky (2014) volume fermentasi yang digunakan masih pada skala laboratorium (2 Liter), sedangkan pada penelitian ini dilakukan pada *scale up* (skala 50 Liter) sehingga hasil bioetanol yang dihasilkan menjadi berbeda. Pada penelitian ini kondisi operasi dilakukan hanya men-*scale up* kondisi terbaik yang diperoleh pada penelitian Rezky (2014) yaitu pada penambahan tween 80 sebanyak 10 ml dan ergosterol sebanyak 1 gram artinya pada *scale up* yang dilakukan pada penelitian ini

dilakukan penambahan tween 80 sebanyak 250 ml dan ergosterol sebanyak 25 gram pada skala 50 liter.

Pada skala laboratorium kondisi operasinya belum tentu sejalan dengan kondisi operasi pada *scale up*. Sehingga perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut terhadap kondisi operasi pada *scale up* baik pada skala 50 liter maupun pada skala yang lebih besar. Pada penelitian yang dilakukan oleh Irsyad (2013) mendapatkan hasil bioetanol yang lebih besar 14% (v/v) dari penelitian yang dilakukan oleh Yerri (2013) yang hanya memperoleh konsentrasi bioetanol sebesar 13% (v/v). hal ini terjadi karena konsentrasi gula awal pada penelitian Irsyad (2013) sebesar 221,16 mg/ml masih lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi gula awal pada penelitian Yerri (2013) sebesar 205,28 mg/ml, sehingga konsentrasi gula awal berpengaruh terhadap perolehan bioetanol yang dihasilkan.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

1. Penambahan tween 80 dan ergosterol berpengaruh terhadap aktivitas *saccharomyces cereviceae* dalam mengkonversi nira nipah menjadi bioetanol. Dengan penambahan tween 80 dan ergosterol perolehan bioetanol yang dihasilkan semakin meningkat.
2. Waktu fermentasi berpengaruh terhadap konsentrasi bioetanol yang dihasilkan, karena semakin lama waktu fermentasi akan meningkatkan konsentrasi bioetanol sampai titik terbaiknya.
3. Kondisi terbaik dari fermentasi nira nipah ini adalah pada variabel penambahan tween 80 sebanyak 250 ml dan ergosterol 25 gram serta waktu fermentasi 96 jam dengan perolehan konsentrasi bioetanol yang diperoleh sebesar 16,22% (v/v) atau 127,99 mg/ml.

4.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan pengkajian yang lebih mendalam seperti proses fermentasi menggunakan sistem sinambung/kontinu.
2. Perlu dilakukan perhitungan jumlah sel pada waktu fermentasi untuk melihat pengaruhnya terhadap perolehan konsentrasi bioetanol.
3. Perlu dikembangkan dan dilaksanakan penelitian lebih lanjut untuk melihat perbandingan proses fermentasi dengan penambahan tween 80 saja atau ergosterol saja.

DAFTAR PUSTAKA

Andika, D. 2015. *Penambahan Tween80tm dan Ergosterol Untuk Mengatasi Osmotic Shock dan Kerusakan Membran Sel dalam Proses Fermentasi Bioetanol dari Nira Nipah Kental*. Universitas Riau.

Skripsi Sarjana. Fakultas Pertanian. Pekanbaru.

- Bulawayo, B. 1996. *Ethanol Production by Fermentation of Sweet-Stem Sorghum Juice Using Various Yeast Strains*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol. 12, pp. 357-360.
- Daecon, J. W. 1997. *Modern Mycology*. Blackwell Scientific Publitions. London
- Irsyad, M.A. 2013. *Fermentasi Nira Nipah Menjadi Bioetanol menggunakan Saccharomyces Cereviceae pada Fermentor 70 Liter*. Universitas Riau. Skripsi Sarjana. Fakultas Teknik. Pekanbaru.
- Mcallister, T. A., K. Stanford, H. D. Bae, R. J. Treacher, A. N. Hristov, J. Baah, J. A. Shelford And K.-J. Cheng. (2000). Effect Of A Surfactant And Exogenous Enzymes On Digestibility Of Feed And On Growth Performance And Carcass Traits Of Lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80:35-44.
- Odumeru, J.A., D'amore, T., Russell, I. And Stewart, G. 1992. *Change In Protein Composition of Saccharomyces Brewing in Response to Heat Shock and Ethanol Stress*. *Journal of Industrial Microbiology* 9 (3-4): 229-234
- Pham, T.N.L., Doan, N.H.D. And *Le, V.V.M. 2010. *Sing Fed-Batch Fermentation In Very High Gravity Brewing: Effects Of Tween 80 And Ergosterol Supplementation On Fermentation Performance Of Immobilized Yeast In Calcium Alginate Gel*. Vietnam.
- Poedjiadi, Anna dan F. M. Titin Supriyanti. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta :Ui-Press
- Purwoko, Tjahjadi. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara: Jakarta
- Rachman, A. K. dan Y. Sudarto. 1991. *Nipah Sumber Pemanis Baru*. Kanisius. Yogyakarta.
- Rezky, M. 2014. *Pembuatan Bioetanol dari Nira Nipah dengan Penambahan*

- Tween 80 dan Ergosterol pada Proses Fermentasi menggunakan Saccharomyces Cereviceae.* Universitas Riau. Skripsi Sarjana. Fakultas Teknik. Pekanbaru.
- Tamunaidu, Pramila, Naohiro Matsui, Yasuyuki Okimori, And Shiro Saka. 2013. *Nipa (Nypa Fructicans) sap as a potential feedstock for ethanol production.* Journal Biomass and Bioenergy. 96-102.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi. 1997. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian.* Liberty. Yogyakarta.
- Umaiyah, A.S. 2013. *Fermentasi Nira Nipah Skala 50 Liter Menjadi Bioetanol menggunakan Saccharomyces Cereviceae.* Universitas Riau. Skripsi Sarjana. Fakultas Teknik. Pekanbaru.
- Yerri, F. 2013. *Pengaruh Penambahan KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, dan $(NH_4)_2SO_4$ Terhadap Fermentasi Nira Nipah Menjadi Bioetanol menggunakan Saccharomyces Cereviceae pada Fermentor 70 Liter.* Universitas Riau. Skripsi Sarjana. Fakultas Teknik. Pekanbaru.