

# **PRODUKSI BIOETANOL DARI BATANG *Sorghum bicolor* (L.) Moench DENGAN *Saccharomyces cerevisiae* DAN KONSORSIUM *S. cerevisiae*-*Pichia stipites***

## **BIOETANOL PRODUCTION FROM *Sorghum bicolor* (L.) Moench USING *Saccharomyces cerevisiae* AND CONSORTIUM *S. cerevisiae*-*Pichia stipitis***

**Audiananti Meganandi Kartini <sup>1)</sup> Ellina S. Pandebesie <sup>2)</sup>**

**<sup>1)</sup>Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan/Teknik Lingkungan/Laboratorium Sampah dan B3, Institut Teknologi sepuluh Nopember, Jalan Raya ITS Surabaya, 60111.**

**<sup>2)</sup>Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan/Teknik Lingkungan/Laboratorium Sampah dan B3, Institut Teknologi sepuluh Nopember, Jalan Raya ITS Surabaya, 60111**

**\*E-mail: Audiamega.its@gmail.com**

### **Abstrak**

Indonesia merupakan penghasil biomassa lignoselulosa residu pertanian yang cukup melimpah, salah satunya adalah limbah pertanian sorgum yang belum memiliki nilai ekonomis berupa batang Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Total gula dalam nira sorgum hampir setara dengan nira tebu. Berdasarkan kandungan total gula yang cukup tinggi tersebut, limbah pertanian sorgum berupa batang sorgum beserta kandungan niranya adalah salah satu potensi sumber bioetanol yang menjanjikan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi substrat optimum dan proses fermentasi batang sorgum dengan menggunakan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Pretreatment yang akan digunakan adalah dengan metode fisik dan kimia. Batang sorgum yang telah menjadi bubuk dibuat dalam konsentrasi 25 gram (5%) dan 50 gram (10%), kemudian dilakukan penambahan aquades hingga 500 ml. Substrat diperlakukan dengan pretreatment pencacahan, pengeringan dan penggilingan, kemudian dilakukan penambahan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25% dan dipanaskan pada suhu 121° C selama 10 menit. Metode hidrolisis pada penelitian ini menggunakan metode hidrolisis enzimatis, yaitu dengan memanfaatkan kapang *T. viride* dan *A. niger*. Sampel yang telah ditambahkan *T. viride* dan *A. niger* kemudian ditambahkan *S. cerevisiae* CC 3012 dan konsorsium *S. cerevisiae* CC 3012-*P. stipitis* untuk proses fermentasi. Data yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu kadar lignin, selulosa, hemiselulosa, gula reduksi, pH, C, N, P dan bioetanol. Analisis menggunakan *Response Surface* digunakan untuk mengambil kesimpulan dan mengetahui nilai optimum terhadap berbagai perlakuan substrat yang digunakan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemanfaatan batang sorgum berpotensi rendah sebagai bahan baku bioetanol karena menghasilkan kadar gula reduksi dan etanol yang tergolong rendah. Hasil etanol tertinggi dihasilkan pada substrat 50 gram (10%), yaitu sebesar 2.1% dengan penambahan konsorsium *S. cerevisiae* CC 3012-*P. stipitis* 10 % selama 24 jam fermentasi.

### **Abstract**

Lignocellulosic agricultural biomass residues in Indonesia are abundant enough, one of agricultural wastes is sorghum straw (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) that does not have economic value. Total sugar in the sorghum straw almost same with sugar cane juice. Based on the high enough total sugar content in the sorghum crop residues, sorghum straw is one of the promising potential source for bioethanol production. This study was conducted to determine the optimum substrate concentration and sorghum straw fermentation process using *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Pretreatment in this study using physical and chemical methods. Sorghum straw was treated with chopping, drying and grinding and separate with concentration of 25 grams (5%) and 50 grams (10%) then adden aquades until 500 ml. Substrat pretreated by added 0.25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and heated at temperature of 121° C for 10 minutes. Hydrolysis method in this study using enzymatic

hydrolysis method using *T. viride* and *A. niger*. Samples that have been added *T. viride* and *A. niger* then added *S. cerevisiae* CC 3012 and consortium *S. cerevisiae* CC 3012-*P. stipitis* for the fermentation process. The data that obtained in this research are the value of lignin, cellulose, hemicellulose, reducing sugar, pH, C, N, P and bioethanol. Response Surface Analysis is used to draw conclusions and determine the optimum value of various treatments substrate that used. Results of this study indicate that sorghum straw is low potential as raw material for producing bioethanol because of low reducing sugar and ethanol content. The highest ethanol yield is produced with 50 g (10%) substrat as optimum substrat using 10% optimum concentration of consortium *S. cerevisiae* CC 3012-*P. stipitis* for 24 hours of fermentation with etanol value 2.1 %.

**Kata kunci:** Sorgum, bioetanol, fermentasi

## 1. PENDAHULUAN

Sumber biomassa yang selalu melimpah adalah limbah biomassa pertanian dengan salah satu potensinya adalah kandungan lignoselulosa yang terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Struktur kompleks lignoselulosa dan struktur kristal selulosa sebagian besar bersifat *recalcitrant* atau sulit terdegradasi, sehingga akan lebih baik bila dapat dimanfaatkan agar bernilai ekonomis. Biomasa lignoselulosa residu pertanian berpotensi untuk digunakan sebagai sumber biofuel generasi kedua yaitu bioetanol, biogas dan biohidrogen, karena lignoselulosa tidak berkompetisi dengan produksi pangan dalam hal kebutuhan lahan (Kleinert and Barth, 2008). Salah satu sumber biomassa lignoselulosa residu pertanian adalah limbah pertanian batang sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) yang belum memiliki nilai ekonomis (Sari, 2009). Sorgum merupakan salah satu jenis tanaman serelia yang mempunyai potensi besar untuk dikembangkan di Indonesia karena mempunyai daerah adaptasi yang luas. Selain itu tanaman sorgum lebih resisten terhadap serangan hama dan penyakit sehingga resiko gagal relatif kecil, sorgum dapat dikatakan memiliki produktivitas yang tinggi (Pabendon *et al.*, 2012). Produktivitas rata-rata batang tanaman sorgum berkisar antara 30 ton hingga 50 ton per hektar. Potensi batang dan daun sorgum dapat mencapai 30-40 ton/ha berat basah. Sedangkan sorgum manis dapat menghasilkan 20 ton/ha berat basah dan sekitar 14-16 persen atau setara dengan sekitar 3 ton daun segar (Soebarinoto dan Hermanto, 1996). Selain itu, proses budidaya tanaman sorgum mudah dengan biaya yang relatif murah, dapat ditanam monokultur maupun tumpangsari. Menurut Irawan dan Sutrisna (2011), kandungan total gula pada nira sorgum

sebesar 11-16 % dan sukrosa 10,0-14,4 % tidak berbeda jauh dengan kandungan total gula pada nira tebu sebesar 10-18 % dan sukrosa 9-17 %. Berdasarkan kandungan total gula yang cukup tinggi tersebut, limbah pertanian sorgum berupa batang sorgum adalah salah satu potensi sumber bioetanol yang menjanjikan (Pabendon *et al.*, 2012). Penelitian untuk melihat potensi batang sorgum sebagai sumber biomassa produksi bioetanol perlu dilakukan untuk melihat konsentrasi substrat batang sorgum yang paling optimum dan melihat perbandingan penggunaan mikroorganisme tunggal dengan mikroorganisme konsorsium dalam produksi bioetanol optimum. *S. cerevisiae* dapat memproduksi etanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi terhadap alkohol yang tinggi, namun tidak mampu memfermentasi gula pentosa (Wahlbom and Hahn-Hägerdal, 2002) sehingga menjadi salah satu kendala pemanfaatannya. Beberapa yeast diketahui dapat memfermentasi xylosa salah satunya adalah *P. stipitis* (Bayrakci and Kocar, 2014), sehingga *P. stipitis* digunakan dalam penelitian ini untuk membentuk konsorsium dengan *S. cerevisiae* dan diharapkan dapat menghasilkan etanol lebih baik.

## 2. BAHAN DAN METODA

### 2.1 Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah batang sorgum, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aquades, buffer asetat, media *Potato Dextrose Agar*, biakan *T. viride*, *A. niger*, *S. cerevisiae*, *P. stipitis*. Alat-alat yang digunakan adalah reaktor 2 liter, erlenmeyer, petridish, shaker, neraca analitik, tabung reaksi, termometer, kertas pH indikator, spektrofotometer, gas chromatography.

## 2.2 Persiapan Bahan Baku

Tahap persiapan bahan baku dilakukan dengan cara memisahkan batang sorgum dari akarnya. Setelah dipisahkan dilanjutkan mencuci bersih batang sorgum lalu diperas nira batangnya, kemudian nira disimpan pada suhu 4°C. Persiapan lainnya dengan mengembangbiakkan *T. viride* dan *A. niger* di Laboratorium Sampah dan Bahan Berbahaya dan Beracun Teknik Lingkungan ITS Surabaya. *P. stipitis* telah dikembangbiakkan di jurusan Biologi Universitas Airlangga dan *S. cerevisiae* CC 3012 telah dikembangbiakkan di *Food And Nutrition Culture Collection* (FNCC), PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gajah Mada. Pengembangbiakan di media PDB dilakukan dengan cara agitasi shaker 180 rpm dan diinkubasi berdasarkan kecepatan pertumbuhan yaitu ½ dari  $V_{max}$  (fase log) *T. viride*, *A. niger* yaitu 3 hari, sedangkan ½ dari  $V_{max}$  *P. stipitis* dan *S. cerevisiae* CC 3012 adalah 24 jam.

## 2.3 Pretreatment

Sisa ampas batang sorgum yang telah diperas dicacah kecil-kecil dengan ukuran  $\pm 5$  mm. Sampel kemudian dikeringkan didalam oven suhu 60°C selama 48 jam supaya berada dalam kondisi benar-benar kering sehingga mudah untuk ditumbuk/digiling. Batang sorgum yang telah menjadi bubuk dibuat dalam konsentrasi 25 gram dan 50 gram. kemudian dilakukan penambahan  $H_2SO_4$  2 %. Perbandingan substrat dan  $H_2SO_4$  yaitu 5 mg substrat membutuhkan 12 mL  $H_2SO_4$ . Setelah ditambah asam, substrat dipanaskan pada suhu 121°C selama 10 menit.

## 2.4 Hidrolisis dan Fermentasi

Inokulum *T. viride* dan *A. niger* (2:1) berusia 3 hari ditambahkan ke dalam sampel dengan konsentrasi 2,5 % per 500 ml media (w/v) kemudian diinkubasi selama 3 hari. Setiap 24 jam dilakukan pengukuran suhu, pH dan gula reduksi. Setelah itu dilanjutkan dengan tahap fermentasi. Fermentasi pada penelitian ini menggunakan yeast *S. cerevisiae* CC 3012 serta konsorsium *S. cerevisiae* CC 3012 dan *P. stipitis* (2:1). Sampel yang telah ditambahkan *T. viride* dan *A. niger* dan diinkubasi selama 3 hari kemudian ditambahkan *S. cerevisiae* CC 3012

10% (v/v) dan konsorsium *S. cerevisiae* CC 3012 dan *P. stipitis* 10 % (v/v) sesuai dengan variabel masing-masing reaktor yang telah ditentukan. OD yeast sebelumnya telah diukur dan ditentukan konversi  $OD_{600} = 1 = 0.33 \times 10^8$  CFU. Sebelum dimasukkan ke dalam substrat, yeast dalam media diukur pH nya dan dikondisikan pH  $\pm 5$  dengan menambahkan buffer asetat 0,2 M. pH  $\pm 5$  merupakan pH optimum *S. cerevisiae* CC 3012 dan *P. stipitis*. Selama proses fermentasi dalam reaktor, pertumbuhan konsorsium mikroba diamati setiap 24 jam. Dilakukan pengukuran suhu dan pH secara berkala selama proses hidrolisis dan fermentasi untuk menjaga kondisi pH stabil di 5. Kemudian dilakukan uji selulosa, hemiselulosa, dan lignin dengan menggunakan Metode Datta, serta gula reduksi dengan Metode Nelson Samogyi. Sampel diukur kadar bioetanolnya setelah dimulainya tahap fermentasi yaitu setelah penambahan *S. cerevisiae* CC 3012 dan konsorsium *S. cerevisiae* CC 3012 dan *P. stipitis* terhitung mulai 72, 96 dan 120 jam dengan Metode Gas Chromatography.

## 2.5 Analisa Hasil

Pengukuran yang dilakukan dalam penelitian ini adalah analisis lignin, selulosa, hemiselulosa, C, N, P, pH, gula reduksi, pertumbuhan mikroba dan kadar bioetanol. Pengukuran dilakukan untuk melihat pengaruh parameter terhadap kadar bioetanol yang terbentuk. Pengukuran Carbon, Nitrogen, dan Phospor (C, N dan P) juga perlu dilakukan hanya untuk mengetahui karakteristik substrat dan kecukupan nutrient bagi pertumbuhan mikroorganisme.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Komposisi C:N:P Batang Sorgum.

Karakteristik C, N dan P substrat batang sorgum dalam penelitian ini perlu diketahui untuk mengetahui karakteristik dan potensi nutrien yang terkandung di dalam batang sorgum (Tabel 3.1).

Kandungan C:N:P batang sorgum awal pada penelitian ini dapat diketahui yaitu 55.36:1.6:0.48, sedangkan setelah melalui tahap pretreatment, rasio C:N:P diketahui adalah

67:1.95:0.51. Perbandingan kandungan C:N:P yang ideal bagi biomassa untuk pertumbuhan mikroorganisme adalah 100:5:1. Hasil rasio C/N awal dalam penelitian ini adalah 34.6, sedangkan rasio C/N setelah proses pretreatment tidak jauh berbeda dengan rasio awal yaitu 34.35.

Hasil tersebut sesuai dengan rasio ideal yaitu 30-40 (Isroi, 2004). Menurut Isroi (2004), pada rasio C/N tersebut mikroba mendapatkan cukup karbon untuk energi dan nitrogen untuk sintesis protein. Jika bahan organik mempunyai rasio C/N tinggi, maka mikroba akan kekurangan nitrogen sebagai sumber makanan sehingga proses dekomposisinya akan berjalan lambat karena nitrogen akan menjadi faktor penghambat (*growth-rate limiting factor*), sebaliknya jika rasio C/N rendah (kandungan unsur N yang tinggi) maka akan kehilangan nitrogen karena penguapan selama proses perombakan berlangsung. Literatur lain menyebutkan rasio C/N ideal adalah 20-30% (Napon *et al.*, 2013).

Tabel 3.1 Kandungan C:N:P batang sorgum

Waktu Pengukuran	Kandungan C:N:P Batang Sorgum (%)		
	C	N	P
Sebelum Pretreatment	55.36	1.6	0.48
Setelah Pretreatment	67.0	1.95	0.51

Rasio C/N ideal dalam penelitian ini berpengaruh terhadap keseimbangan nutrisi pada substrat batang sorgum untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroorganisme penghidrolisis maupun pemfermentasi yang akan digunakan dalam tahapan produksi etanol. Proses biodegradasi sendiri dipengaruhi oleh temperatur, pH, kandungan air, dan nutrisi yang tersedia. Nutrisi merupakan faktor yang berpengaruh besar dalam sintesis dan pertumbuhan sel serta dalam aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba untuk mendegradasi substrat. Beberapa nutrisi penting yang dibutuhkan mikroorganisme adalah karbon, nitrogen, dan fosfor. Pada dasarnya semua mikroorganisme memerlukan karbon sebagai sumber energi untuk aktivitasnya. Nitrogen dan fosfor merupakan penyusun senyawa-senyawa penting dalam sel yang menentukan aktivitas

pertumbuhan mikroorganisme. Ketiga unsur ini harus ada dalam rasio yang tepat agar tercapai pertumbuhan mikroorganisme yang optimal. Rasio C/N yang didapatkan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa substrat siap digunakan sebagai media tumbuh dengan sumber karbon bagi mikroba penghidrolisis dan pemfermentasi.

### 3.2 Komposisi Hemiselulosa, Selulosa dan Lignin.

Rekapitulasi perbandingan hasil analisis lignin, selulosa dan hemiselulosa substrat batang sorgum setelah perlakuan pretreatment dan SSF dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Analisis komposisi lignoselulosa pada keseluruhan tahap penelitian.

Komposisi Lignoselulosa	Awal (%)	Setelah Pretreatment (%)	Setelah SSF (%)
Hemiselulosa	57.99	50.33	48.51
Selulosa	17.41	8.20	7.80
Lignin	14.95	10.28	9.89

Penelitian ini menunjukkan komposisi hemiselulosa, selulosa, lignin mengalami penurunan setelah melalui proses pretreatment fisik, asam dan pemanasan. Penurunan kandungan lignin berbanding lurus terhadap penurunan kandungan selulosa dan hemiselulosa. Penurunan selulosa yang signifikan ini dapat disebabkan oleh dilakukannya pemanasan suhu tinggi setelah penambahan asam. Menurut Cardoso *et al.* (2013), pretreatment dengan suhu 150-230°C dapat menurunkan kadar selulosa hingga 50%. Namun menurut Choudhary *et al.* (2013), pretreatment menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% dilanjutkan pemanasan 121°C selama 10 menit dapat menghasilkan konsentrasi glukosa dan xylosa maksimum yaitu 0.2 g/g dan 0.4 g/g dibandingkan variasi konsentrasi asam dan waktu pemanasan lainnya.

Pretreatment merupakan tahapan paling penting dalam proses konversi lignoselulosa. Kombinasi proses pretreatment dalam penelitian ini dilakukan secara fisika dan termokimia. Pretreatment fisik dengan pencacahan,

pengeringan, penggilingan dan proses termokimia dengan menggunakan  $H_2SO_4$  2% dilanjutkan pemanasan pada suhu  $121^\circ C$  selama 10 menit. Pada tahap persiapan batang sorgum dicacah kecil, kemudian dikeringkan serta digiling/diblender sebagai proses fisika. Proses fisik pada tahapan persiapan seperti pencacahan (*chipping*), penggilingan (*milling*) yang dilakukan pada penelitian ini dapat memecah struktur lignin dan mereduksi kristal selulosa (*cellulose crystallinity*) (Sun dan Cheng, 2002).

Kombinasi perlakuan pretreatment ini juga dibutuhkan untuk mengubah struktur biomassa selulosa supaya meningkatkan aksesibilitas selulosa menjadi *fermentable sugars* (gula sederhana yang mudah untuk difermentasi) (Mosier *et al.*, 2005). Selain itu, dengan perlakuan pretreatment dapat menghilangkan lignin, mengurangi kristalinitas selulosa, dan meningkatkan porositas bahan (Hermiati *et al.* 2010). Ketika tahap hidrolisis berlangsung, rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Selain itu hemiselulosa juga akan lebih mudah terurai menjadi senyawa gula sederhana seperti glukosa, galaktosa, manosa, heksosa, pentosa, xilosa dan arabinosa. Selanjutnya senyawa-senyawa gula sederhana tersebut dapat difermentasi oleh mikroorganisme menghasilkan etanol.

Pada penelitian ini kadar hemiselulosa lebih tinggi daripada selulosa dan lignin yang merupakan dinding sel tumbuhan, yang berupa rangka molekul. Kedua bagian tersebut menjadi kesatuan ikatan yang erat sehingga menyebabkan dinding sel menjadi kuat. Tahapan persiapan substrat dengan adanya mekanisme fisik, dinding yang terdiri dari selulosa dan lignin terdegradasi sehingga akses hemiselulosa menjadi besar, ditandai dengan kandungannya yang paling besar dibandingkan komponen selulosa dan lignin.

Degradasi lignin merupakan kometabolisme degradasi selulosa sehingga kedua proses tersebut berlangsung bersamaan (Boominathan dan Adinarayana, 1991). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi delignifikasi secara fisik,

salah satunya ukuran sampel. Ukuran sampel dapat mempengaruhi porositas yang kemudian mempengaruhi kontak terhadap delignifikator. Selain itu, pengecilan ukuran sampel akan memutuskan rantai polimer yang panjang menjadi rantai polimer yang lebih pendek sehingga memudahkan pemisahan lignin dari ikatan selulosa (Sun and Cheng, 2002). Semakin kecil ukuran sampel maka akan semakin mudah dalam mendegradasi lignin, karena itulah pada penelitian ini batang sorgum dicacah, dikeringkan dan digiling hingga berbentuk serbuk.

Komposisi hemiselulosa, selulosa dan lignin semakin mengalami penurunan seiring dengan berbagai tahapan yang dilakukan. Hal ini menunjukkan adanya degradasi konversi substrat batang sorgum akibat kombinasi perlakuan pretreatment fisik, asam dan pemanasan serta hidrolisis dan fermentasi secara enzimatik. *T. viride* memiliki kemampuan mendegradasi lignin saat proses hidrolisis. *T. viride* sangat baik dalam menghasilkan enzim selulase dan efektif untuk melengkapi degradasi komposisi lignoselulosa (Neethu *et al.*, 2012). Jamur *A. niger* memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase untuk merombak selulosa dan sedikit hemiselulosa menjadi gula pereduksi. Selain itu, *A. niger* juga dapat menghasilkan enzim xilanase. (Daud *et al.*, 2012). Kandungan lignin yang tersisa tidak habis terdegradasi setelah tahapan SSF yaitu sebesar 9.89%. Lignin yang tersisa dalam substrat disebabkan oleh adanya ikatan antara lignin dan karbohidrat yang dikenal dengan lignin-carbohydrate complexes (LCCs) (Daud *et al.*, 2012).

### 3.3 Analisis Gula Reduksi Awal.

Pada penelitian ini kandungan gula reduksi awal perlakuan substrat 25 g rata-rata sebesar 2.70 mg/g dan pada perlakuan substrat 50 g rata-rata sebesar 1.69 mg/g. Kandungan gula reduksi yang terbentuk akibat adanya konversi komposisi lignoselulosa pada substrat batang sorgum. Produk utama hasil biokonversi yang diukur dalam penelitian ini adalah gula pereduksi yang dihasilkan dari hasil biokonversi selulosa dan hemiselulosa. Pretreatment asam

menyebabkan hidrolisis hemiselulosa terutama xylan yang terkandung dalam lignoselulosa. Hemiselulosa dapat terdegradasi menjadi xyloza, mannose, asam asetat, galaktosa, glukosa dan lainnya, sedangkan selulosa dikonversikan menjadi gula heskosa berupa glukosa.

Kandungan gula reduksi yang terbentuk dalam proses pretreatment pada penelitian ini juga disebabkan kemampuan asam dalam membongkar rantai lignin yang kompleks sehingga dapat mempercepat akses enzim pada proses hidrolisis, selain itu juga dikarenakan komponen gula yang memang terkandung dalam sorgum yaitu 70% sukrosa, 20% glukosa dan 10% fruktosa. Proses pemanasan menggunakan suhu tinggi yang juga dilakukan dalam penelitian ini dapat memutus ikatan dalam polisakarida substrat sehingga bisa dikonversi menjadi gula reduksi. Kadar gula yang dihasilkan dari keseluruhan proses pretreatment dan hidrolisis nantinya diharapkan dapat meningkatkan gula pada proses bioetanol yang dihasilkan dalam proses fermentasi (Sun dan Cheng, 2002).

### 3.4 Analisis Gula Reduksi Setelah Hidrolisis dan Fermentasi.

Metode dan variasi perlakuan yang dilakukan dalam penelitian ini mempengaruhi pembentukan gula reduksi. Tahapan hidrolisis dan fermentasi dalam penelitian ini dilakukan secara biologis (hidrolisis enzimatis). Mikroorganisme yang digunakan dalam proses hidrolisis adalah kombinasi kapang *T. viride* dan *A. niger* serta *S. cerevisiae* dan konsorsium *S. cerevisiae* - *P. stipitis* untuk fermentasi. Pada penelitian ini, hasil rata-rata gula reduksi yang terbentuk selama tahapan hidrolisis dan fermentasi dapat dilihat pada table 3.3.

Tabel 3.3 Rata-rata gula reduksi selama tahap hidrolisis dan fermentasi

Mikroba	Tahapan	Rata-rata gula reduksi
TV AN	Hidrolisis	4.18
SC 10%	Fermentasi	2.42
TV AN	Hidrolisis	4.71
K 10%	Fermentasi	2.74

Nilai tersebut menunjukkan bahwa hidrolisis mempengaruhi peningkatan gula reduksi seiring dengan lamanya waktu hidrolisis. Dalam penelitian ini, peningkatan gula reduksi juga terjadi seiring dengan besarnya jumlah substrat. Semakin banyak substrat maka akan semakin banyak gula reduksi yang dihasilkan karena proses dekomposisi substrat dapat berlangsung secara optimal (Sanito dan Pandebesie, 2014). Pada proses fermentasi kadar gula mengalami penurunan seiring berjalannya waktu dikarenakan gula yang dihasilkan dalam proses hidrolisis dimanfaatkan oleh mikroba pemfermentasi sebagai sumber karbon. *T. viride* menghasilkan selulase lengkap dengan semua komponen-komponen yang dibutuhkan untuk hidrolisis total selulosa kristal dengan kadar gula yang dihasilkan cukup tinggi (Esterbauer *et al.*, 1991).

Proses hidrolisis bertujuan memecah ikatan hemiselulosa, menghilangkan kandungan lignin, serta merusak struktur kristal selulosa menjadi senyawa gula sederhana. Enzim selulase yang dihasilkan *T. viride* dan *A. niger* adalah campuran beberapa enzim yaitu endoglukanase, eksoglukanase, dan  $\beta$ -glukosedase. Keberadaan enzim selulase menyebabkan kapang ini mampu menghidrolisis selulosa dan sebagian hemiselulosa menjadi gula pereduksi seperti glukosa (Daud *et al.*, 2012).

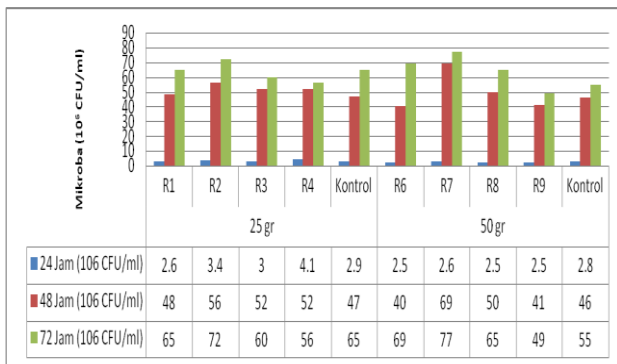
Dalam proses hidrolisis penelitian ini, *T. viride* berperan dalam menghancurkan selulosa tingkat tinggi dan memiliki kemampuan mensintesis beberapa faktor esensial untuk melarutkan bagian selulosa yang terikat kuat dengan ikatan hidrogen. Selain itu, *T. viride* menghasilkan selulase lengkap dengan semua komponen-komponen yang dibutuhkan untuk hidrolisis total selulosa kristal dengan kadar gula yang dihasilkan cukup tinggi (Esterbauer *et al.*, 1991).

*A. niger* banyak berperan memproduksi enzim hemiselulase yang dapat menghidrolisis hemiselulosa kompleks menjadi glukosa, dan juga memproduksi selulase yang juga tinggi. Kelebihan *A. niger* dari jamur lain yaitu selain dapat memproduksi enzim selulolitik juga

memproduksi xyloglukanase (Pham *et al.*, 2010). Pada tahap fermentasi *S. cerevisiae* berperan dalam fermentasi gula yang dihasilkan selama proses hidrolisis menjadi etanol. *S. cerevisiae* memfermentasi semua gula heksosa dalam biomassa lignoselulosa batang sorgum dan menghasilkan yield etanol, tetapi tidak mampu menggunakan gula pentosa (Wahlbom and Hahn-Hägerdal, 2002). Sedangkan *P. stipitis* mengubah xilosa (gula pentose) dan semua senyawa gula sederhana menjadi etanol (Van *et al.*, 1988).

**3.5 Pertumbuhan Mikroba Selama Hidrolisis.**

Tahapan hidrolisis dan fermentasi dalam penelitian ini dilakukan secara biologis (hidrolisis enzimatis). Mikroorganisme yang digunakan dalam proses hidrolisis adalah kombinasi kapang *T. viride* dan *A. niger*. Hasil pengamatan pertumbuhan mikroba selama hidrolisis menggunakan kombinasi kapang *T. viride* dan *A. niger* ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Mikroba Selama Hidrolisis Menggunakan Kombinasi Kapang *T. Viride* Dan *A. Niger*

Hasil pengamatan pertumbuhan *T. viride* dan *A. niger* pada penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi kedua kapang tersebut mengalami peningkatan cukup signifikan pada jam ke 48. Peningkatan pertumbuhan sel yang signifikan pada jam ke 48 tersebut merupakan fase log (eksponensial) pada penelitian ini. Pada fase log ini pertumbuhan mikroorganisme berlangsung paling cepat. Hal ini dikarenakan terjadi katabolisme substrat dalam jumlah besar yang digunakan untuk pertumbuhan, sintesis enzim dan sintesis senyawa lainnya (Ernes *et al.*, 2014),

seiring dengan tingginya kadar gula yang dihasilkan pada tahap hidrolisis. Namun pada jam ke 72 *T. viride* dan *A. niger* mulai memasuki masa stasioner karena substrat yang dapat dihidrolisis semakin menurun sehingga proses katabolisme substrat juga menurun. Hal ini berbanding terbalik dengan kadar gula reduksi yang dihasilkan.

Selama fase ekponensial kadar gula terus meningkat bahkan hingga jam ke 72. Hal ini dikarenakan proses katabolisme selulosa menjadi gula-gula sederhana akibat aktivitas enzim selulosa *T. viride* dan *A. niger*.

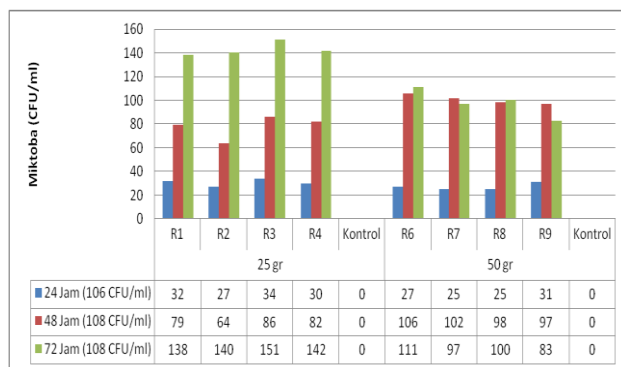
Biomassa sorgum mengandung polisakarida yaitu hemiselulosa dan selulosa. Menurut Sun dan Cheng (2002), polisakarida hemiselulosa dan selulosa tersebut dihidrolisis oleh *T. viride* dan *A. niger* sebagai sumber karbon untuk memproduksi gula monomer seperti, glukosa, xyloza, arabinosa, mannos, dan galaktosa. Proses hidrolisis dalam penelitian ini menghasilkan glukosa dari kinerja enzim selulolitik yang dihasilkan oleh kedua mikroorganisme penghidrolisa tersebut. Kombinasi kapang *T. viride* dan *A. niger* yang digunakan dalam penelitian ini sangat mempengaruhi pembentukan gula reduksi. Hal inilah yang menyebabkan pertumbuhan sel kapang *T. viride* dan *A. niger* berbanding lurus dengan peningkatan gula reduksi.

**3.6 Pertumbuhan Mikroba Selama Fermentasi.**

Tahapan hidrolisis dan fermentasi dalam penelitian ini dilakukan secara biologis (hidrolisis enzimatis). Mikroorganisme yang digunakan dalam proses fermentasi adalah *S. cerevisiae* dan konsorsium *S. cerevisiae-P. stipitis* untuk. Hasil pengamatan pertumbuhan mikroba selama fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dan konsorsium *S. cerevisiae-P. stipitis* ditunjukkan pada Gambar 3.2.

Hasil pengamatan pertumbuhan *S. cerevisiae* dan konsorsium *S. cerevisiae-P. stipitis* pada penelitian ini menunjukkan bahwa baik *S. cerevisiae* sebagai mikroorganisme tunggal

maupun *S. cerevisiae*-*P. stipitis* sebagai konsorsium mengalami peningkatan pertumbuhan sel cukup signifikan pada jam ke 48 fermentasi. Peningkatan pertumbuhan sel yang signifikan pada jam ke 48 tersebut diindikasikan sebagai fase log (eksponensial) pada masing-masing mikroorganisme. Namun pada jam ke 72 baik *S. cerevisiae* sebagai mikroorganisme tunggal maupun *S. cerevisiae*-*P. stipitis* sebagai konsorsium tidak lagi mengalami peningkatan jumlah sel yang signifikan. Hal ini dikarenakan mikroorganisme memasuki fase stasioner dimana jumlah sel relatif tetap karena terbatasnya jumlah substrat sehingga sel hidup sama dengan sel yang mati (Wardani dan Pertiwi, 2013).



Gambar 3.2. Hasil Pengamatan Pertumbuhan Mikroba Selama Fermentasi Menggunakan *S. cerevisiae* dan konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis*.

Pertumbuhan sel mikroba pemfermentasi berbanding terbalik dengan kadar gula reduksi. Semakin meningkat jumlah sel *S. cerevisiae* sebagai mikroorganisme tunggal maupun *S. cerevisiae*-*P. stipitis*, maka semakin menurun kadar gula reduksi. Hal ini dikarenakan gula-gula sederhana yang dihasilkan selama hidrolisis, dimanfaatkan oleh mikroba pemfermentasi, baik *S. cerevisiae* maupun konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis* sebagai sumber karbon dan diubah menjadi etanol. Pada tahap fermentasi ini, *S. cerevisiae* memproduksi ethanol dari gula heksosa yang terdapat didalam substrat (Bayrakci and Kocar, 2014), sedangkan *P. stipitis* memfermentasi heksosa dan pentosa menjadi etanol (Ganguly *et al.*, 2013).

### 3.7 Analisis pH dan Suhu Terhadap Hasil Gula Reduksi dan Bioetanol

Penelitian ini menggunakan proses biologis pada tahap hidrolisis dan fermentasinya. Derajat keasaman (pH) dan suhu merupakan salah satu faktor penting yang mampu mempengaruhi keseluruhan proses dalam fermentasi bioetanol. Mikroorganisme yang digunakan mempunyai suatu kondisi pH tertentu yang mempengaruhi pertumbuhan dan pembentukan produk dalam proses fermentasi.

Pada penelitian ini buffer asetat pH 5 pada inokulum yang disesuaikan dengan kondisi optimum mikroorganisme. Kisaran pH rata-rata dalam penelitian ini adalah pH 5. Suhu awal substrat sebelum perlakuan adalah 30°C, sedangkan kisaran suhu setelah pretreatment dalam penelitian ini meningkat menjadi 31°C dan terus meningkat hingga 32.5°C pada akhir tahap fermentasi. Pengukuran suhu dilakukan dengan thermometer ruang skala 0.5. Tidak terjadi peningkatan pH yang signifikan selama proses hidrolisis dan pada proses fermentasi terjadi sedikit penurunan pH, namun suhu terus meningkat selama proses hidrolisis dan fermentasi berlangsung. Penurunan pH yang terjadi selama proses fermentasi karena mikroorganisme yang digunakan selain menghasilkan bioetanol juga menghasilkan CO<sub>2</sub> dan asam-asam organik (Wignyanto *et al.*, 2001). Sedangkan peningkatan suhu yang terjadi pada tahap hidrolisis dan fermentasi membuktikan terjadinya aktivitas mikroba di dalam reaktor.

Penstabilan pH digunakan buffer asetat pH 5. pH 5 merupakan pH optimum pertumbuhan jamur, terutama yeast *S. cerevisiae* dan *P. stipitis*. Menurut Apriwinda (2013), yeast dapat tumbuh pada kisaran pH 2,5-8,5 dan dapat tumbuh optimum pada pH 4,0-5,0. Selain itu, menumbuhkan yeast pada pH rendah dapat mencegah kontaminasi bakteri. Dalam fermentasi, kontrol pH penting sekali dilakukan karena pH yang optimum harus dipertahankan selama fermentasi. Pengkondisian pH agar stabil di 5 adalah untuk menjaga aktivitas yeast dalam fermentasi lebih optimal. pH juga mempengaruhi



aktivitas enzim dan proses degradasi lignin (Patel *et al.*, 2009).

**3.8 Analisis Kadar Bioetanol Hasil Fermentasi Batang Sorgum oleh *S. cerevisiae* dan konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis*.**

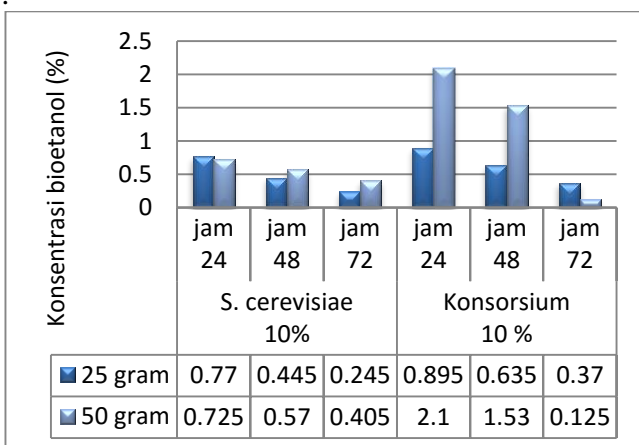
Fermentasi umumnya dilakukan pada kisaran suhu 30°C, pH 5 dan kondisi sedikit aerobik. Pada proses fermentasi glukosa, satu molekul glukosa menghasilkan dua molekul etanol dan dua molekul karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) (Hermiati *et al.*, 2010). Hasil analisis kadar bioetanol dengan menggunakan jamur *S. cerevisiae* dan konsorsium dapat dilihat pada Gambar 3.3.

Gambar 3.3 menunjukkan pada reaktor substrat 25 gram dengan menggunakan inokulum *S. cerevisiae* 10% rata-rata kadar bioetanol yang diperoleh jam ke 24 dan jam ke 48 adalah 0.77% dan 0.44%. Pada reaktor substrat 25 gram dengan menggunakan inokulum konsorsium 10% rata-rata kadar bioetanol yang diperoleh jam ke 24 dan jam ke 48 adalah 0.89% dan 0.63%. Pada reaktor substrat 50 gram dengan menggunakan inokulum *S. cerevisiae* 10% rata-rata kadar bioetanol yang diperoleh jam ke 24 dan jam ke 48 adalah 0.72% dan 0.57%. Pada reaktor substrat 50 gram dengan menggunakan inokulum konsorsium 10% rata-rata kadar bioetanol yang diperoleh jam ke 24 dan jam ke 48 adalah 2.1% dan 31.53%. Sedangkan pada jam ke-72 rata-rata kadar bioetanol yang dihasilkan cenderung menurun menjadi 0.

Hasil kadar bioetanol tertinggi dihasilkan oleh konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis* 10% dengan konsentrasi substrat 50 gram pada jam ke 24 yaitu 2.1 %. Penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi substrat terbaik dalam produksi bioetanol adalah 50 gram (10% substrat) dengan menggunakan yeast konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis* konsentrasi 10% sebagai mikroba pemfermentasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan kadar etanol tertinggi rata-rata terbentuk pada jam ke 24 dengan kondisi pH 5 dan suhu sekitar 32°C. Menurut Wahlbom dan Hahn-Hägerdal (2002), *S. cerevisiae* dapat menghasilkan etanol secara optimum dalam keadaan fakultatif anaerob pada suhu 30 - 35 °C dan kisaran pH 4-5. Konsentrasi substrat 10% (50 gram) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan konsentrasi substrat optimum untuk produksi etanol.

Hasil penelitian ini menunjukkan kadar etanol tertinggi rata-rata terbentuk pada jam ke 24 dengan kondisi pH 5 dan suhu sekitar 32°C. Menurut Wahlbom dan Hahn-Hägerdal (2002), *S. cerevisiae* dapat menghasilkan etanol secara optimum dalam keadaan fakultatif anaerob pada suhu 30 - 35 °C dan kisaran pH 4-5. Konsentrasi substrat 50 gram (10%) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan konsentrasi substrat optimum untuk produksi etanol. Jika dibandingkan dengan fermentasi oleh *S. cerevisiae* sebagai mikroorganisme tunggal, etanol yang dihasilnya konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis* cenderung lebih tinggi. Hal ini dikarenakan kemampuan *S. cerevisiae* yang hanya mampu memfermentasi gula heksosa, namun tidak mampu memfermentasi xilosa maupun gula pentosa lain yang umumnya terdapat dalam hemiselulosa, baik secara aerob maupun anaerob. Sedangkan dalam tahap hidrolisis juga dihasilkan xilosa karena banyaknya kandungan hemiselulosa dalam batang sorgum. *P. stipitis* mampu memfermentasi dalam kondisi aerobik dan anaerobik, dan memiliki kemampuan alami yang dikenal tertinggi dalam memfermentasi xilosa, mengubahnya menjadi etanol tanpa menghasilkan xilitol (Nigam, 2002). *P. stipitis*



Gambar 3.3 Hasil analisis kadar bioetanol dengan menggunakan jamur *S. cerevisiae* 10% dan konsorsium 10%

melengkapi kinerja *S. cerevisiae* sehingga konsorsium keduanya dapat menghasilkan etanol lebih baik dibandingkan menggunakan mikroorganisme tunggal saja

Kadar etanol yang cukup rendah dalam penelitian ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pada tahap fermentasi dapat dihasilkan pula furfural hasil degradasi xilosa, asam karboksilat dan asam asetat hasil dekomposisi hemiselulosa dan komponen fenol dari hasil degradasi lignin (Li *et al.*, 2011). Senyawa-senyawa tersebut merupakan inhibitor pertumbuhan mikroba pemfermentasi selama fermentasi berlangsung. Pertumbuhan mikroba pemfermentasi yang tidak meningkat secara signifikan dalam penelitian ini mengindikasikan pertumbuhan yang terhambat dan dimungkinkan akibat adanya senyawa-senyawa inhibitor yang terbentuk selama proses fermentasi, namun penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa inhibitor seperti furfural, asam-asam dan fenol, tidak dilakukan pada penelitian ini.

Hasil analisis kadar bioetanol baik menggunakan *S. cerevisiae* maupun konsorsium menunjukkan pada waktu fermentasi jam ke-48 kadar etanol menurun dibandingkan dengan pada jam ke-24. Hal ini menunjukkan adanya hubungan lama fermentasi dengan kadar bioetanol yang dihasilkan. Waktu fermentasi ini juga berhubungan dengan pertumbuhan sel yeast. Dari hasil pengamatan pertumbuhan mikroba, fase log (ekponensial) *S. cerevisiae* dan konsorsium adalah pada jam ke 24 hingga 48. Sedangkan pada jam ke 48 hingga 72 mulai memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner mikroba berada pada fase stag, dimana nutrisi sudah mulai habis dan jumlah sel cenderung stabil hingga memasuki fase kematian. Selama fase akan terjadi penumpukan zat-zat toksin sehingga dapat melumpuhkan mikroba lain (Griffin, 1996).

Konsentrasi bioetanol yang cukup rendah dalam penelitian ini juga dapat disebabkan kandungan lignin yang tersisa. Kadar lignin belum maksimal terdegradasi pada tahapan pretreatment dalam penelitian ini mengakibatkan rendahnya kerja

enzim pada substrat karena sifat kristalinitas selulosa yang belum terdegradasi dengan maksimal. Residual lignin serta turunan senyawa fenoliknya merupakan penghambat yang dapat mengurangi fermentabilitas selulosa dan hemiselulosa menjadi bioetanol (Stenberg *et al.*, 2000)

#### 4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan kesimpulan yang didapatkan adalah Konsentrasi substrat optimum untuk menghasilkan kadar bioetanol tertinggi adalah substrat batang sorgum 50 gram (10%). Mikroorganisme yang menghasilkan kadar bioetanol tertinggi adalah konsorsium *S. cerevisiae*-*P. stipitis*. Hasil bioetanol tertinggi sebesar 2.1 % pada waktu fermentasi jam ke-24. Konsentrasi inokulum optimum dengan kadar bioetanol tertinggi yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu sebesar 10% (v/v).

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- Apriwinda. (2013), Studi Fermentasi Batang Sorgum Manis (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) untuk Produksi Etanol, *Skripsi*, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin.
- Bayrakci, A.G., and Koçar, G. (2014), Second-Generation Bioethanol Product From Water Hyacinth and Duckweed In Izmir: A Case Study, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 30, hal. 306–316.
- Boominathan, K and C. Adinarayana. (1991), Fungal Degradation of Lignin: Biotechnological Application. Arora, D.K., B. Raj, K.G Mukerji., G. Khudnsen (Ed), *Handbook of Applied Micology (Soil and Plant)*, Vol 1. New York: Marcell Dekker, Inc.
- Cardoso, W.S., Tardin, F.D., Tavares, G.P., Queiroz, P.V., Mota, S.S., Catarina, M., Kasuya, M., and Queiroz, J.H. (2013), Use Of Sorghum Straw (*Sorghum Bicolor*) For Second Generation Ethanol Production:

- Pretreatment And Enzymatic Hydrolysis, *Quim. Nova*, Vol. 36, Issue. 5, Hal. 623-627.
- Choudhary, S.J., Mehmood, S., and Naz, H. (2013), Optimization of pretreatment conditions of *Sorghum bicolor* straw, a substrate for bioethanol production: a pilot study, *Pakistan Journal Biochem. Mol. Biol*, Vol. 46, Issue 2, hal. 80-84
- Daud, M., Safii, W., Syamsu, K. (2012), Biokonversi Bahan Berlignoselulosa Menjadi Bioetanol Menggunakan *Aspergillus niger* Dan *Saccharomyces cerevisiae*, *Jurnal Perennial*, Vol.8, hal. 43-51.
- Ernes, A., Ratnawati, L., Wardani, A.K., Kusnadi, J. (2014), Optimasi Fermentasi Bagas Tebu Oleh *Zymomonas mobilis* CP4 (NRRL B-14023) Untuk Produksi Bioetanol. *Agritech*, Vol. 34, No.3, Agustus 2014.
- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I. (1991), Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale, *Biores Technol*, Vol. 36, hal. 51-65.
- Ganguly, A., Chatterjee, P.K., and Dey, A. (2013), Studies On Ethanol Production From Water Hyacinth-A Review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 16, hal. 966-972.
- Griffin, D. H. (1996), *Fungal Physiology*, Wiley Science Paper Back Series.
- Hermiati, E., Mangunwidjaja, Sunarti, T. C., Suparno, O., Prasetya, B. (2010), Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol, *Jurnal Litbang Pertanian*, Vol. 29, hal. 121-130.
- Irawan, B., and Sutrisna, N. (2011), Prospek Pengembangan Sorgum di Jawa Barat Mendukung Diversifikasi Pangan, *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, Vol. 29, Issue 2, hal. 99-113.
- Isroi. (2004), Pengomposan Limbah Kakao, Lembaga Riset Perkebunan Indonesia, [www.isroi.org](http://www.isroi.org).
- Kleinert, M., and Barth, T. (2008), Towards A Lignocellulosic Biorefinery: Direct One-Step Conversion Of Lignin To Hydrogen-Enriched Biofuel, *Energy Fuel*, Vol. 22, Issue 2, hal. 1371-1379.
- Li, Y., Park, J., Shiroma, R., and Tokuyasu, K. (2011). Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation. *Article in Press. Journal of bioscience and bioengineering*. JBIOSC-00594, Hal. 5.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., (2005), Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, Vol. 96, hal. 673-686.
- Napon, K., Kanokorn, H., Teekasap, S. (2013). The Effect Of Natural Water With Cow Dung and Agricultural Waste Ratio On Biogas Production From Anaerobic Co-Digestion. *American Journal of Environmental Science*, 9: 529-536.
- Neethu, K., Rubeena, M., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K. N., Josh, M. K. S., Jisha, V. N., Pradeep, S., Benjamin, S. (2012). A Novel Strain of *Trichoderma viride* Shown Complete Lignocellulolytic Activities. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Vol. 3, Hal. 1160-1166.
- Nigam, J. N. (2002), Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia Crassipes*) Hemicellulose Acid Hydrolysate to Motor Fuel Ethanol by Xylose-Fermenting Yeast. *Journal Biotechnology*, Vol. 97, Hal. 107-16.

- Pabendon, M.B., Aqil, M., and Mas'ud, S. (2012), Kajian Sumber Bahan Bakar Nabati Berbasis Sorgum Manis, *Sorghum Manis Sumber Bioetanol*, Balai Penelitian Tanaman Serealia, Sulawesi Selatan.
- Patel, H., Gupte, A., Gupte, S. (2009). Effect of Different Culture Condition and Inducers Onproduction of Laccase by a Basidiomycetes Fungal Isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 Under Solid State Fermentation. *Bioresources*, 4: 1806-1812.
- Pham, T. H., Berrin, J. G., Record, E., To, K. A., Sigoillot, J. (2010), Hydrolysis of softwood by *Aspergillus mannanase*: Role of a carbohydrate-binding module. *Journal of Biotechnology*, Vol.148, hal. 163-170.
- Sanito, R. C., Pendebesie, E. S. (2014), Penentuan Kinetika Reaksi dan Gula Reduksi Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) Menggunakan Mikroba Rumen Selulolitik. *Seminar Nasional Pascasarjana XIV*, ITS Surabaya 7 Agustus 2014.
- Sari, R.P.P. (2009), Pembuatan Etanol Dari Nira Sorgum Dengan Proses Fermentasi, *Skripsi*, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Soebarinoto and Hermanto. (1996), Potensi Jerami Sorgum Sebagai Pakan Ternak Ruminansia, Risalah Simposium Prospek Tanaman Sorgum untuk Pengembangan Agroindustri, *Edisi Khusus Balai Penelitian Tanaman Kacang kacang dan Umbi umbian* No. 4, hal. 217-221.
- Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2000), Effect of Substrate and Cellulase Concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Biotechnology And Bioengineering*, 68: 204-210.
- Sun, Y. and Cheng, J. (2002), Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Bioresource Technology*, Vol. 83, hal. 1-11.
- Van Zyl, C., Prior, B.A., Du Preez, J.C. (1988), Production of ethanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol*, Vol. 17, hal. 357-369.
- Wahlbom, C.F., Hahn-Hägerdal, B. (2002), Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol*.
- Wardani, A.K., Pertiwi, F.N. (2013), Produksi Etanol Dari Tetes Tebu Oleh *Saccharomyces cerevisiae* Pembentuk Flok (NRRL-Y265), *Agritech*, Vol. 33, Hal.