

PRODUKSI BIOETANOL DARI HIDROLISAT ASAM TEPUNG UBI KAYU DENGAN KULTUR CAMPURAN *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Ethanol Production from Acid Hydrolysate Cassava Flour with Mixed Culture *Trichoderma viride* and *Saccharomyces cerevisiae*

I Wayan Arnata¹, Dwi Setyaningsih², Nur Richana³

¹Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana,
Jl. Kampus Unud Bukit Jimbaran, Badung 80364

²Teknologi Industri Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Raya Darmaga Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

³Balai Besar Penelitian Pascapanen, Bogor, Jl. Tentara Pelajar No. 12. Bogor 16111

Email: yan_kadir@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi bioetanol dari hidrolisat asam tepung ubi kayu dengan menggunakan kultur campuran *Trichoderma viride* and *Saccharomyces cerevisiae*. Hidrolisis tepung ubi kayu untuk menghasilkan glukosa dilakukan dengan menggunakan H₂SO₄ 0,4 M, pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 10 menit. Proses fermentasi dilaksanakan secara *batch* selama 96 jam pada suhu 30°C. Pencampuran kultur *T. viride* dan *S. cerevisiae* pada proses fermentasi hidrolisat asam dilakukan dalam dua metode yaitu secara bertahap dan secara simultan. Hasil penelitian menunjukkan hidrolisat asam tepung ubi kayu mempunyai konsentrasi total gula 38,93 ± 8,09% (b/v) dan konsentrasi gula reduksi 22,04 ± 4,31% (b/v). Pada proses produksi bioetanol menunjukkan bahwa dengan pencampuran kultur secara bertahap menghasilkan konsentrasi bioetanol 6,77 ± 1,23% (v/v), rendemen 27,97% (v/w) dan efisiensi fermentasi 59,01% dari perolehan bioetanol secara teoritis, sedangkan dengan pencampuran kultur secara simultan menghasilkan konsentrasi bioetanol 4,96 ± 0,39%(v/v), rendemen 19,85% (v/w) dan efisiensi fermentasi 62,72% dari perolehan bioetanol secara teoritis.

Kata kunci: Bioetanol, tepung ubi kayu, hidrolisat asam, *Trichoderma viride*, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The objective of this research was to produce bioethanol from acid hydrolysate of cassava flour with mix cultured *Trichoderma viride* and *Saccharomyces cerevisiae*. The hydrolysis of cassava flour to glucose was conducted by 0.4 M sulfuric acid using autoclave at 121°C, pressure at 1 atm for 10 min. The fermentation were performed in batch system for 96 hours in 30°C. Mixed culture of *T. viride* and *S. cerevisiae* in the fermentation process of acid hydrolysate carried out in two methode that is gradually and simultaneously. The results showed the acid hydrolyzate of cassava flour has a total sugar concentration of 38.93 ± 8.09% (w/v) and reducing sugar concentration of 22.04 ± 4.31% (w/v) . In the bioethanol production process shows that the bioethanol concentration 6.77 ± 1.23% (v/v), yield 27.97% (v/w) and fermentation efficiency 59.01% of the theoretical value was achieved using gradually addition of mixed culture, while simultaneously addition of mixed culture was produced ethanol concentration 4.96 ± 0.39%(v/v), yield 19.85% (v/w) and fermentation efficiency 62.72% of the theoretical value.

Keywords: Bioethanol, cassava flour, acid hydrolysate, *Trichoderma viride*, *Saccharomyces cerevisiae*

PENDAHULUAN

Berbagai jenis sumber bahan baku bioetanol terdapat di Indonesia, seperti ubi kayu, sagu, ubi jalar dan tetes tebu. Ubi kayu sebagai bahan baku bioetanol mempunyai

kelebihan yaitu dapat tumbuh pada lahan yang kurang subur, mempunyai daya tahan tinggi terhadap penyakit dan dapat diatur masa panennya. Ubi kayu mempunyai kadar karbohidrat sekitar 82,30% (Richana dkk., 2004). Kadar ini tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan oleh Kusmiyati

(2010) yang menyatakan bahwa kadar karbohidrat ubi kayu adalah 83,47%. Melihat kandungan karbohidrat yang tinggi, maka ubi kayu saat ini sangat prospektif dikembangkan sebagai bahan baku bioetanol. Untuk menghindari terjadinya persaingan penggunaan singkong sebagai bahan pangan, pemerintah melalui Badan Litbang Pertanian telah melakukan pengembangan guna menghasilkan teknologi produksi ubi kayu unggul untuk industri. Upaya ini dilakukan untuk mewujudkan rencana strategis Kementerian Pertanian periode 2015-2019 yaitu menjadikan singkong sebagai komoditas unggulan nasional. Berkaitan dengan hal ini, 16 varietas ubi kayu unggul sudah dihasilkan dan produktivitasnya juga mampu ditingkatkan sekitar 4,64% (Julianto, 2014). Pengembangan dan penggunaan pati ubi kayu sebagai bahan baku potensial bioetanol juga dilakukan untuk mendukung kebijakan Kenterian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia (2006), tentang penelitian, pengembangan dan penerapan ilmu pengetahuan dan teknologi bidang sumber energi baru dan terbarukan untuk mendukung keamanan ketersediaan energi tahun 2025. Kebijakan ini tertuang dalam roadmap sektor energi bioetanol periode 2005-2015.

Produksi bioetanol dari ubi kayu secara umum melalui tahap hidrolisis, fermentasi dan pemurnian (Hambali dkk., 2007; Ubalua, 2007). Proses ini dilakukan secara bertahap baik dengan hidrolisis asam maupun hidrolisis enzimatis (Kongkiattikajorn dan Yoonan, 2004). Pada proses fermentasi umumnya menggunakan kultur tunggal *Saccharomyces cerevisiae* (Yoonan dkk., 2004; Subashini dkk., 2011). Pada tahap hidrolisis biasanya dilakukan secara enzimatis dengan menggunakan enzim-enzim amilolitik seperti α -amilase dan amiloglukosidase untuk menghasilkan glukosa sebagai substrat fermentasi (Budiyanto dkk., 2006; Aro, 2008). Hidrolisis enzimatik memiliki keuntungan tidak menghasilkan produk-produk sampingan yang dapat menghambat proses fermentasi. Namun, proses ini memiliki kelemahan dengan waktu proses yang lama dan harga enzim-enzim komersial yang mahal (Tahezadeh dan Karimi, 2007^b). Kondisi ini berbanding terbalik dengan hidrolisis secara kimiawi terutama dilihat dari segi waktu prosesnya yang lebih cepat dan harga bahan yang lebih murah, namun hidrolisis secara kimiawi menghasilkan senyawa-senyawa penghambat dalam proses fermentasi, seperti furfural dan hidroksimetilfurfural (Alriksson dkk. 2005; Tahezadeh dan Karimi, 2007^a; Radojka dkk., 2011).

Untuk mengurangi terbentuknya senyawa-senyawa penghambat dalam proses hidrolisis pati menjadi glukosa, maka dalam penelitian ini dilakukan dengan hidrolisis secara kimiawi menggunakan asam dengan konsentrasi rendah yaitu H_2SO_4 0,4 M. Pada kondisi ini, hanya sekitar 80,77% fraksi pati yang terhidrolisis dan masih menyisakan padatan sebesar 8,72% (Susmiati, 2010). Padatan pada umumnya terdiri

dari fraksi serat kasar berupa selulosa. Selulosa merupakan homopolimer yang jika dihidrolisis akan menghasilkan glukosa (Wu dkk., 2006; Chellapandi dan Himanshu, 2008; Hu dkk., 2009; Acharya dan Anita, 2012). Fraksi selulosa bersama-sama dengan hemiselulosa dan lignin merupakan pembentuk matriks dinding sel yang melindungi fraksi pati, sehingga derajat hidrolisis pati pada hidrolisis asam dengan konsentrasi rendah menjadi tidak sempurna. Untuk meningkatkan derajat hidrolisis pati dan serat, maka dalam penelitian ini akan dicoba dengan mengkombinasikan hidrolisis asam dengan hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim selulase. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memproduksi bioetanol dengan teknologi kombinasi hidrolisis asam dengan enzimatis yang dilanjutkan dengan proses fermentasi. Jenis asam yang umumnya dipergunakan adalah asam anorganik seperti HCl dan H_2SO_4 (Nwachukwu dkk., 2008), sedangkan enzim yang dipergunakan dapat berupa selulase, xylanase, α -amilase ataupun amiloglukosidase (Kusmiyati, 2010; Nair dkk., 2011; Hermiati dkk., 2012).

Enzim selulase dapat diproduksi oleh mikroorganisme. *Trichoderma viride* merupakan salah satu jenis kapang yang telah banyak dilaporkan mempunyai kemampuan untuk memproduksi enzim selulase (Suhartono, 1989; Tahezadeh dan Karimi, 2007^b; Malik dkk., 2010). Untuk memproduksi enzim selulase dapat menggunakan sumber karbon dari limbah-limbah hasil pertanian, seperti ampas tebu dan limbah kapas (Jayant dkk., 2011), rumput kering (Khobragade dkk., 2004), tongkol jagung dan dedak gandum (Chandra dkk., 2008; Aslam dkk., 2010; Anindyawati, 2010), dan limbah apel (Sun dkk., 2010). Onggok merupakan salah satu limbah pertanian dari industri tapioka yang dapat dipergunakan sebagai sumber karbon (Juariah, 2004). Jenie (1990) berhasil memproduksi enzim selulase dari substrat onggok dengan aktivitas CMC-ase 12,7 U/ml dan FP-ase 0,88 U/ml.

Dalam penelitian ini, enzim selulase kasar yang diproduksi dari substrat onggok dipergunakan untuk proses hidrolisis dan fermentasi dalam kultur campuran *T. Viride* dan *S. cerevisiae*. Pada proses hidrolisis, selulase yang dihasilkan oleh *T. viride* diharapkan dapat melonggarkan matrik selulosa yang melindungi fraksi pati sehingga pati lebih mudah terhidrolisis. Selain itu, dengan penambahan selulase, juga diharapkan dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Glukosa yang terbentuk dalam kultur campuran selanjutnya secara simultan dimanfaatkan oleh *S. cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi bioetanol melalui hidrolisis secara kimiawi menggunakan H_2SO_4 untuk menghasilkan hidrolisat asam berupa glukosa yang masih bercampur dengan serat. Hidrolisat ini kemudian dihidrolisis lebih lanjut secara enzimatis dengan penambahan enzim selulase kasar *T. viride* yang dicampurkan baik secara

bertahap maupun secara simultan dengan *S. cerevisiae* pada proses fermentasi untuk menghasilkan bioetanol.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan adalah ubi kayu varietas Darul Hidayah yang diperoleh dari Sukabumi, Jawa Barat. Mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae* dan *Trichoderma viride* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU IPB. Bahan-bahan penelitian yang dipergunakan adalah bahan untuk kultivasi mikroba meliputi *Potato Dextrose Agar* (Merck Germany), glukosa (Merck Germany), *yeast extract* (Merck Germany), *malt* (Merck Germany), *pepton* (Sigma Aldrich). Bahan-bahan untuk keperluan analisis menggunakan bahan *Pro Analys* (PA) meliputi etanol Absolute GR 100983 (Merck Germany), H_2SO_4 (Sigma Aldrich), HCl 25 % GR 100316, (Merck Germany) dan NaOH (Merck Germany). Alat-alat yang digunakan adalah inkubator (Memmert), spektrofotometer (Hach DR/2400) dan kromatografi gas (Agilent 6890N). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Bioindustri Teknologi Industri Pertanian Bogor.

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yaitu penentuan karakteristik tepung ubi kayu, persiapan kultur *S. cerevisiae* dan *T. viride*, produksi enzim kasar selulase, hidrolisis tepung ubikayu dan fermentasi. Pada proses penentuan karakteristik ubi kayu, bahan baku dikecilkan ukurannya 2 cm dan dikeringkan hingga kadar airnya 9,69%, kemudian digiling dan diayak dengan ukuran 40 mesh. Tepung ubi kayu yang dihasilkan kemudian dianalisa untuk mengetahui karakteristik bahan baku yang meliputi analisis kadar air, lemak, protein, pati, abu, selulosa, hemiselulosa dan serat kasar (AOAC, 1990).

Pada tahap persiapan kultur *Trichoderma viride*, kultur sebelum dipergunakan dikultivasi pada agar miring menggunakan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Selama kultivasi dilakukan pengamatan setiap hari terhadap jumlah spora yang dihasilkan. Hal ini dilakukan untuk menentukan waktu kultivasi terbaik dalam menghasilkan jumlah spora maksimum yang selanjutnya dipergunakan untuk proses produksi enzim kasar selulase. Jumlah spora dihitung menggunakan hemasitometer. Pada tahap persiapan kultur *S. cerevisiae*, isolat diremajakan pada media PDA dan diinkubasi selama 2 hari. Setelah itu isolat ditumbuhkan lagi pada 50 ml media YMGP yang terdiri dari ekstrak yeast 5 g/l, malt 5 g/l, glukosa 10 g/l dan pepton 5 g/l di dalam erlenmeyer 200 ml. Inkubasi

dilakukan dengan agitasi berkecepatan 125 rpm pada suhu 30°C selama 24 jam. Pada tahap produksi enzim kasar selulase, media yang dipergunakan adalah modifikasi media Andreoti (Jenie, 1990). Media mengandung 14 ml $(NH_4)_2SO_4$ 10%, 15 ml KH_2PO_4 1M, 3 ml urea 10%, 3 ml $CaCl_2$ 10%, 3 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10%, 1 ml stok unsur kelumit dan 2 ml Tween 80, kemudian dijadikan 1 liter. Unsur kelumit terdiri dari 495 ml aquades, 5 ml HCl pekat, 2,5 gram $FeSO_4$, 0,89 gram $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1,76 gr $ZnSO_4 \cdot H_2O$, 1,25 gr $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Untuk produksi selulase ditambahkan 5-10 gr onggok dan 0,5-1,0 gr polipepton untuk 1 liter media. Proses produksi dilakukan pada suhu 30°C dan pH 4,0. Kemampuan untuk menghasilkan enzim selulase diamati dengan mengukur aktivitas FP-ase dan CMC-Ase setiap 24 jam selama 7 hari. Kurva aktivitas enzim dibuat dan dipergunakan untuk melihat waktu tercapainya aktivitas maksimum *T. viride* untuk menghasilkan selulase.

Pada tahap hidrolisis, tepung singkong dengan konsentrasi 30% (b/v) dalam H_2SO_4 0,4M dihidrolisis menggunakan otoklaf selama 10 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Susmiati, 2010). Hidrolisat kemudian dinetralisasi dengan cara menambahkan NH_4OH 10% hingga pH mencapai 10,0 dan dibiarkan selama 30 menit, setelah itu diatur pH-nya menjadi 5,0 dengan menambahkan HCl 1 N (Alriksson dkk., 2005). Pada tahap akhir proses hidrolisis dilakukan pengukuran terhadap total gula dan gula reduksi dari hidrolisat.

Proses fermentasi dilaksanakan secara *batch* pada suhu 30°C selama 96 jam dalam erlemmeyer 1 liter dengan volume kerja 500 ml hidrolisat asam sebagai substrat. Sebelum proses fermentasi, substrat diatur pH-nya sampai 5, kemudian kultur *T. viride* dan *S. cerevisiae* masing-masing 10% (v/v) dicampurkan kedalam substrat sesuai dengan perlakuan. Perlakuan pertama (P1), substrat ditambahkan dengan kultur secara bertahap, yaitu pada 48 jam pertama dilakukan fermentasi hanya dengan penambahan kultur *T. viride*, kemudian 48 jam berikutnya ditambahkan lagi kultur *S. cerevisiae*. Perlakuan kedua (P₂), substrat ditambahkan kultur secara simultan antara *T. viride* dan *S. cerevisiae* mulai dari awal sampai akhir proses fermentasi. Kultur *T. viride* yang ditambahkan pada proses fermentasi adalah media kultur yang mengandung enzim selulase kasar dan spora *T. viride* hasil produksi enzim pada tahap sebelumnya. Selama proses fermentasi dilakukan pengamatan terhadap perubahan pH dan total gula pada jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 dan 96. Masing-masing proses produksi diulang 3 kali dan pada akhir fermentasi dianalisa kadar etanolnya.

Rancangan Percobaan

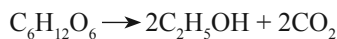
Untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap besarnya aktivitas selulase, maka dilakukan analisis keragaman

dengan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal. Faktornya adalah lama fermentasi dengan tujuh taraf perlakuan yaitu 1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, 5 hari, 6 hari dan 7 hari. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali. Apabila perlakuan lama fermentasi berpengaruh nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan untuk mengetahui adanya perbedaan antar perlakuan.

Analisa Data

Ubi kayu sebelum dipergunakan sebagai substrat terlebih dahulu dianalisis proximat (AOAC, 1990), kadar hemiselulosa dan selulosa (Van Soest, 1963) dan lignin (AOAC, 1990). Analisis yang dilakukan pada tahap produksi enzim selulase kasar adalah aktivitas FP-ase dan CMC-ase (Malik dkk., 2010) serta perubahan pH selama proses fermentasi (pH-meter). Pada hasil hidrolisis dilakukan pengujian total gula (Phenol-H₂SO₄ method; Dubois dkk., 1956), gula reduksi (DNS method; Miller, 1959) dan ditentukan nilai *dextrose equivalen* (DE) yang merupakan persentase dari rasio antara kadar gula reduksi dengan total gula (Parwiyanti dkk., 2011).

Dari tahapan proses fermentasi, data yang diperoleh dipergunakan untuk menentukan efisiensi fermentasi, dan rendemen. Efisiensi fermentasi merupakan persentase konsentrasi etanol hasil produksi aktual terhadap konsentrasi etanol secara teoritis. Konsentrasi etanol aktual adalah konsentrasi etanol hasil fermentasi. Konsentrasi etanol teoritis merupakan konsentrasi etanol yang diperoleh berdasarkan persamaan reaksi berikut: (Rudolf dkk., 2005). Secara teoritis konsentrasi glukosa 1 g/l akan menghasilkan etanol dengan konsentrasi 0,51g/l.



$$Eff. fermentasi = (Konsentrasi etanol aktual / Konsentrasi etanol teoritis) \times 100\% \tag{1}$$

Rendemen merupakan persentase volume etanol yang dihasilkan dari proses produksi terhadap bobot tepung ubi kayu yang dipergunakan dalam proses produksi (Rodmui dkk., 2008).

$$Rendemen (\% v/b) = (Volume etanol aktual / Bobot tepung ubi kayu) \times 100\% \tag{2}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Ubi Kayu

Ubi kayu yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah ubi kayu varietas Darul Hidayah yang diperoleh dari Daerah Sukabumi, Jawa Barat. Dari hasil analisa proksimat

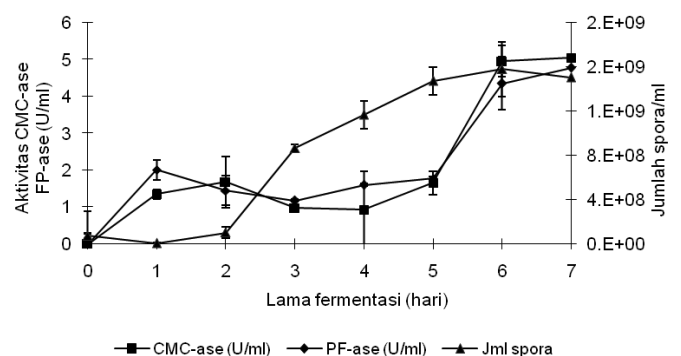
diperoleh kadar air 8,65 ± 0,10%, abu 2,55 ± 0,14%, lemak 6,54 ± 0,02%, protein 1,81 ± 0,03%, serat kasar 2,69 ± 0,04% dan pati 62,54 ± 0,00%. Dari fraksi serat kasar sekitar 69,98 % adalah hemiselulosa dan 13,44% merupakan selulosa. Padonou dkk. (2005) menyatakan bahwa kadar lemak tepung ubi kayu sekitar 0,56% (bk). Menurut Richana dkk. (2004), kadar karbohidrat dalam tepung ubi kayu adalah 82,30 ± 0,31%. Kandungan pati yang terdapat dalam ubi kayu ini tidak jauh berbeda dengan kadar pati yang dilaporkan oleh Nair dkk. (2011) yaitu sekitar 60 sampai 68%. Kandungan pati yang cukup tinggi menunjukkan ubi kayu mempunyai potensi sebagai sumber glukosa dalam substrat fermentasi.

Kultivasi dan Produksi Enzim Kasar Selulase

Dari hasil proses kultivasi *Trichoderma viride* diperoleh bahwa pada awal inokulasi terdapat rata-rata jumlah spora 7,1 x 10⁷ spora/ml. Pada akhir hari ke-1 jumlah spora mengalami penurunan yang cukup signifikan karena spora diduga telah mengalami germinasi. Pada hari berikutnya mulai terbentuk spora berwarna putih dengan jumlah rata-rata 1,0 x 10⁸ spora/ml dan jumlah spora maksimum dengan rata-rata spora 1,6 x 10⁹ spora/ml terjadi pada hari ke-6. Kurva pertumbuhan *T. viride* di sajikan pada Gambar 1.

Penentuan waktu produksi enzim merupakan salah satu faktor penting dalam proses biosintesis produksi selulase oleh kapang (Sibtain dkk., 2009). Dari hasil analisis keragaman untuk penentuan pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas selulase diperoleh bahwa lama fermentasi memberi pengaruh nyata terhadap besarnya aktivitas CMC-ase dan FP-ase (p<0,05).

Dari Gambar 1. terlihat bahwa pada awal fermentasi terjadi penurunan aktivitas CMC-ase sampai hari ke-4. Setelah itu aktivitas enzim CMC-ase cenderung mengalami peningkatan dan aktivitas maksimal sebesar 5,05 ± 0,42 U/ml diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari, namun berdasarkan uji lanjut Duncan, aktivitas CMC-ase ini tidak berbeda nyata dengan lama fermentasi selama 6 hari.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *T. viride*, aktivitas CMC-ase dan FP-ase

Hal serupa juga ditunjukkan pada besarnya aktivitas FP-ase, dimana pada awal fermentasi juga terjadi penurunan aktivitas sampai hari ke-3 dan pada hari berikutnya mengalami peningkatan. Aktivitas maksimal sebesar $4,77 \pm 0,72$ U/ml juga diperoleh setelah fermentasi selama 7 hari, namun berdasarkan uji lanjut Duncan, aktivitas FP-ase ini tidak berbeda nyata pada fermentasi selama 6 hari. Terjadinya peningkatan aktivitas enzim selulase baik CMC-ase dan FP-ase menunjukkan *T. viride* telah melakukan degradasi terhadap fraksi selulosa yang terdapat pada substrat onggok untuk menghasilkan glukosa yang akan dipergunakan untuk metabolisme sel. Suhartono (1989) menjelaskan bahwa sintesis enzim ekstraseluler dalam jumlah terbesar secara normal terjadi pada saat sebelum sporulasi, yaitu pada akhir fase eksponensial dan awal fase stasioner. Keadaan tersebut diduga karena pada masa transisi fase eksponensial diikuti dengan penurunan jumlah sumber karbon dalam medium, sehingga sintesis enzim selulase mulai meningkat. Terjadinya peningkatan aktivitas enzim pada proses fermentasi juga diduga disebabkan oleh adanya perubahan pH dari pH awal 4,0 menjadi 3,28 pada hari ke-7. Pothiraj dkk. (2006) dan Wahid dkk. (2011) menyebutkan bahwa pH optimal untuk pertumbuhan *Trichoderma* sekitar 4,0, sedangkan untuk produksi selulase mendekati 3,0. Selama produksi enzim, pH harus dipertahankan dalam kisaran 3,0-4,0 karena inaktivasi enzim akan terjadi jika pH berada dibawah 2,0. Penurunan pH yang terjadi pada produksi selulase berhubungan langsung dengan adanya konsumsi karbohidrat yang terdapat pada onggok.

Pothiraj dkk. (2006) melaporkan bahwa produksi selulase dengan substrat onggok dengan lama fermentasi 10 hari menghasilkan aktivitas FP-ase 0,26 U/ml dan CMC-ase 0,46 U/ml. Jenie (1990) juga memproduksi selulase menggunakan substrat onggok dengan lama fermentasi 9 hari dan diperoleh aktivitas FP-ase sebesar 0,88 U/ml dan CMC-ase 12,7 U/ml. Selain onggok bahan lain juga dapat dipergunakan untuk produksi selulase. Produksi enzim selulase dari substrat ampas tebu dengan lama fermentasi 3 hari ternyata dihasilkan aktivitas yang lebih tinggi yaitu FP-ase 0,92 U/ml dan CMC-ase 1,57 U/ml (Malik dkk., 2010). Hasil yang lebih tinggi juga diperoleh dari penelitian yang dilakukan Mekala dkk. (2008) yaitu aktivitas FP-ase maksimum sebesar 25,6 U/ml dengan lama fermentasi 2,8 hari. Terjadinya perbedaan aktivitas enzim selulase yang diproduksi dapat disebabkan oleh adanya perbedaan dalam metode fermentasi, jenis mikroba, suhu, pH, jenis sumber karbon dan nitrogen yang dipergunakan dalam fermentasi (Ahmed dkk., 2009; Niranjane dkk., 2007). Perbedaan ini juga dapat disebabkan oleh terjadinya perbedaan komposisi rasio antara fraksi amorf dan kristalin selulosa yang dipergunakan

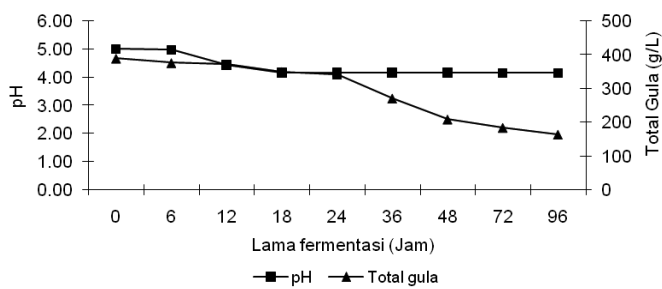
sebagai penginduksi dalam proses produksi enzim (Dashtban dkk., 2011).

Hidrolisis Asam

Proses pembuatan hidrolisat dilakukan dengan menghidrolisis fraksi pati dan serat yang terkandung pada bahan. Hidrolisis dilakukan dengan tujuan untuk menyediakan glukosa yang akan dipergunakan sebagai substrat *S. cerevisiae* dalam proses fermentasi. Hasil analisis menunjukkan bahwa penggunaan H_2SO_4 0,4 M pada hidrolisis tepung ubi kayu ini, menghasilkan konsentrasi total gula $38,93 \pm 8,09\%$ (b/v) dan konsentrasi gula reduksi $22,04 \pm 4,31\%$ (b/v). Jika dilihat dari persentase perbandingan antara konsentrasi total gula dengan gula pereduksi maka nilai DE yang dihasilkan dari hidrolisis ini adalah 56,63%. Ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis belum berjalan sempurna atau sekitar 43,37% dari total gula terutama fraksi pati belum terhidrolisis. Rendahnya nilai DE dapat disebabkan oleh belum terhidrolisisnya granula pati menjadi glukosa yang masih tersusun secara kompak dan dilindungi oleh matrik lignoselulosa (selulosa, hemiselulosa dan lignin). Kondisi ini juga bisa disebabkan oleh rendahnya konsentrasi asam atau waktu proses yang singkat pada tahap hidrolisis, sehingga fraksi karbohidrat terutama pati belum terhidrolisis secara sempurna. Susmiati (2010) melaporkan bahwa semakin tinggi konsentrasi asam dan waktu hidrolisis, maka akan semakin tinggi konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan, dengan demikian akan meningkatkan derajat hidrolisis. Namun, dengan konsentrasi asam dan waktu hidrolisis yang semakin tinggi juga akan menghasilkan senyawa-senyawa penghambat dalam proses fermentasi oleh *S. cerevisiae* seperti furfural dan hidroksimetilfurfural (HMF) (Alriksson dkk., 2005; Taherzadeh dan Karimi, 2007^a). Lebih lanjut, Susmiati (2010) menyatakan bahwa hidrolisis tepung ubi kayu dengan konsentrasi H_2SO_4 0,5 M dengan waktu 10 menit dapat menghasilkan derajat hidrolisis sampai 88,35% namun menghasilkan konsentrasi HMF 0,71 g/l. Peningkatan waktu hidrolisis menjadi 15 menit pada konsentrasi asam yang sama, akan meningkatkan konsentrasi HMF menjadi 0,87 g/l.

Fermentasi

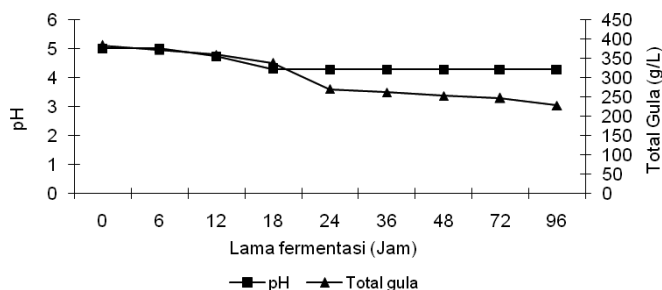
Perlakuan pertama (P_1), 500 ml hidrolisat asam, ditambahkan kultur *T. viride* ($1,6 \times 10^9$ spora/ml) sebanyak 10% dari volume substrat dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi dilakukan proses fermentasi dengan menambahkan kultur *S. cerevisiae* sebanyak 10% dari volume substrat. Penambahan kultur *T. viride* dimaksudkan untuk menghidrolisis fraksi serat yang terdapat pada hidrolisat terlebih dahulu untuk menghasilkan glukosa, kemudian glukosa yang terbentuk dimanfaatkan oleh *S. cerevisiae* untuk memproduksi etanol.



Gambar 2. Perubahan pH dan total gula selama fermentasi P1

Selama proses fermentasi pada perlakuan P₁, terjadi penurunan konsentrasi total gula dan pH awal. Penurunan konsentrasi total gula terjadi dari 389,26 ± 8,09 g/l menjadi 164,16 ± 5,83 g/l, sedangkan penurunan pH awal terjadi dari 5,01 ± 0,01 menjadi 4,17 ± 0,02. Selisih konsentrasi total gula awal dengan total gula akhir menunjukkan besarnya konsentrasi total gula yang dikonsumsi selama proses fermentasi yaitu 225,10 g/l. Dari total gula yang dikonsumsi, maka konsentrasi etanol yang dihasilkan secara teoritis adalah 114,80 g/l atau 11,48 % (v/v). Dari perlakuan P₁ diperoleh konsentrasi etanol aktual hasil fermentasi 6,77 ± 1,23% (v/v), rendemen 27,97% (v/b), dan efisiensi fermentasi 59,01% terhadap perolehan konsentrasi etanol teoritis. Perubahan total gula dan pH substrat selama fermentasi pada perlakuan P₁ disajikan pada Gambar 2.

Perlakuan kedua (P₂), proses hidrolisis dan netralisasi dilakukan sama halnya seperti pada perlakuan P₁, hanya saja hidrolisat asam yang masih mengandung serat setelah dinetralisasi dan diatur pH-nya sampai 5,0 kemudian ditambahkan kultur campuran *T. viride* (1,6 x 10⁹ spora/ml) dan *S. cerevisiae* secara simultan dengan perbandingan 1:1 yaitu masing-masing 10 % dari volume substrat. Penambahan kultur campuran ini dimaksudkan agar *T. viride* dapat menghidrolisis serat dan hasilnya langsung dimanfaatkan oleh *S. cerevisiae* untuk memproduksi etanol.

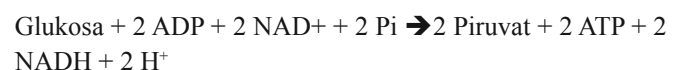


Gambar 3. Perubahan pH dan total gula selama fermentasi P2

Selama proses fermentasi pada perlakuan P₂, terjadi penurunan konsentrasi total gula dan pH awal. Penurunan konsentrasi total gula terjadi dari 383,08 ± 3,70 g/l menjadi

227,94 ± 17,29 g/l. Ini menunjukkan konsentrasi total gula yang dikonsumsi selama fermentasi adalah 155,14 g/l. Dengan konsumsi total gula 155,14 g/l berarti secara teoritis dihasilkan etanol sebesar 79,12 g/l atau 7,91% (v/v). Selama fermentasi juga terjadi penurunan pH awal terjadi dari 5,01 ± 0,01 menjadi 4,27 ± 0,02. Penurunan total gula dan pH terjadi secara cepat pada awal fermentasi sampai jam ke-24. Pada fase ini diduga mikroba lebih banyak mengkonsumsi substrat untuk menghasilkan etanol dibandingkan dengan waktu setelah jam ke-24 sampai jam ke-96. Selama proses fermentasi diperoleh konsentrasi etanol aktual 4,96 ± 0,39% (v/v), rendemen 19,85% (v/b), dan efisiensi fermentasi 62,72% terhadap perolehan konsentrasi etanol secara teoritis. Perubahan total gula dan pH substrat selama fermentasi pada perlakuan P₂ disajikan pada Gambar 3.

Pada semua perlakuan menunjukkan adanya korelasi searah antara penurunan total gula dengan pH yaitu penurunan konsentrasi total gula diikuti dengan penurunan pH substrat. Hal ini berkaitan dengan adanya konsumsi glukosa melalui proses glikolisis dan akumulasi senyawa asam-asam organik yang terbentuk selama proses fermentasi. Hal ini sejalan dengan pernyataan Ghori dkk. (2011), yang menyebutkan bahwa selama proses fermentasi dapat terbentuk senyawa asam-asam organik seperti asam asetat, laktat dan asam piruvat. Asam piruvat merupakan senyawa yang terbentuk selama proses glikolisis pada siklus *Embden Meyerhof Parnas Pathway* (EMP) (Antonius dkk., 2006). Selama proses glikolisis, setiap satu mol glukosa akan dipecah menjadi dua mol asam piruvat dan melepaskan dua mol ion H⁺ (Wolin dkk., 1999). Adanya ion H⁺ ini diduga dapat menurunkan pH larutan fermentasi. Secara keseluruhan proses glikolisis dapat dilihat dari persamaan reaksi berikut ini:



Asam piruvat yang terbentuk kemudian dirubah menjadi asetaldehid dan CO₂ oleh enzim piruvat dekarboksilase yang selanjutnya dirubah menjadi alkohol oleh enzim alkohol dehidrogenase. Adanya penumpukan asam diduga karena *S. cerevisiae* kurang mampu untuk mengubah asam piruvat menjadi etanol sehingga terjadi penurunan pH.

Dari kedua perlakuan terlihat bahwa konsentrasi etanol yang dihasilkan dari perlakuan P₁ yaitu penggunaan kultur campuran *T. viride* dan *S. cerevisiae* yang ditambahkan secara bertahap lebih tinggi dari pada konsentrasi etanol yang dihasilkan dari perlakuan P₂ yaitu penggunaan kultur campuran *T. viride* dan *S. cerevisiae* yang ditambahkan secara simultan. Efisiensi fermentasi yang dihasilkan dari kedua perlakuan relatif masih kecil, hal ini diduga bahwa selama proses hidrolisis pati dengan asam terbentuk senyawa

furfural dan Hidroksimetil furfural (HMF). Kedua senyawa telah dilaporkan bersifat toksik bagi khamir *S. cerevisiae* (Modig dkk., 2002). Rendahnya hasil fermentasi juga diduga bahwa konsentrasi total gula yang dikonsumsi oleh mikroba dalam substrat tidak sepenuhnya terkonversi menjadi etanol, melainkan dapat juga dipergunakan untuk pertumbuhan sel oleh mikroba, atau asam piruvat yang terbentuk pada proses glikolisis belum mampu sepenuhnya dirubah menjadi etanol oleh *S. cerevisiae*. Adanya penumpukan asam piruvat ini ditandai dengan adanya penurunan pH selama proses fermentasi.

Penelitian tentang produksi bioetanol baik menggunakan hidrolisis asam maupun enzimatis telah banyak dilakukan. Susmiati (2010) melakukan proses produksi etanol menggunakan hidrolisat asam tepung ubi kayu dengan kultur tunggal *S. cerevisiae* menghasilkan konsentrasi etanol $5,66 \pm 0,66\%$, Zamora dkk., (2010) menghasilkan konsentrasi $4,97\%$, sedangkan Akponah dan Akpomie (2012), menghasilkan konsentrasi etanol yang lebih rendah yaitu $3,61\%$. Konsentrasi ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil dari penelitian ini yaitu pada penggunaan kultur campuran *T. viride* dan *S. cerevisiae* yang ditambahkan secara bertahap dengan konsentrasi etanol $6,77 \pm 1,23\%$. Ini menunjukkan bahwa dengan penambahan enzim kasar selulase dari *T. viride* yang dilanjutkan dengan fermentasi dengan *S. cerevisiae* dapat meningkatkan konsentrasi etanol. Pada produksi bioetanol menggunakan hidrolisis secara enzimatis dengan enzim murni α -amilase dan amiloglukosidase menghasilkan konsentrasi etanol $6,98\%$ (Kusmiyati, 2010), sedangkan Ocloo dan Ayernor (2010) menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu $8,30\%$. Pada proses produksi menggunakan α -amilase dan amiloglukosidase yang ditambahkan enzim selulase yang dilanjutkan dengan proses fermentasi mampu memberikan hasil $7,55\%$ (Han dkk., 2011).

Dari beberapa hasil penelitian di atas, terlihat bahwa fermentasi menggunakan hidrolisat enzimatis cenderung menghasilkan konsentrasi etanol yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi etanol dari hidrolisat asam. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya senyawa-senyawa inhibitor sebagai hasil samping dari proses hidrolisis asam yang menggunakan suhu dan tekanan yang relatif tinggi yaitu sekitar 121°C dan 1atm . Pada suhu dan tekanan yang tinggi komponen-komponen gula hasil hidrolisis akan terdegradasi lebih lanjut. Gula-gula dari golongan pentosa seperti xilosa dan arabinosa didegradasi menjadi furfural, sedangkan gula dari golongan heksosa seperti glukosa akan terdegradasi menjadi HMF (Taherzadeh dan Karimi, 2007^a). Hidroksimetil furfural akan dapat terus bereaksi untuk membentuk asam-asam organik seperti asam levulinat dan asam format yang dapat berpengaruh terhadap penurunan pH substrat. Furfural dan HMF dapat bersifat toksik bagi mikroorganisme fermentatif

baik pada kapang, khamir maupun bakteri (Chandel dkk., 2007; Horvath dkk., 2003). Furfural juga dilaporkan bersifat lebih toksik dari pada HMF dalam metabolisme *S. cerevisiae*. Konsentrasi furfural 1 g/L dapat menurunkan laju metabolisme CO_2 dan menurunkan laju pertumbuhan sel pada fase awal pertumbuhan (Modig dkk., 2002; Purwadi, 2006; Hawkins dan Joy, 2011).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa perlakuan P_1 yang menghasilkan konsentrasi etanol secara aktual lebih tinggi ternyata memberikan efisiensi fermentasi yang lebih rendah dari pada perlakuan P_2 . Ini disebabkan perbandingan antara produk etanol aktual yang dihasilkan dengan konsentrasi etanol secara teoritis sangat rendah. Dalam proses fermentasi, konsentrasi etanol secara teoritis dipengaruhi oleh konsumsi substrat selama fermentasi. (Rudolf dkk., 2005). Efisiensi fermentasi rendah menunjukkan bahwa substrat yang dikonsumsi selama proses fermentasi sangat sedikit dikonversi menjadi produk berupa etanol.

KESIMPULAN

Penggunaan kultur campuran *T. viride* dan *S. cerevisiae* yang ditambahkan secara bertahap pada proses fermentasi menggunakan substrat hidrolisat asam menghasilkan konsentrasi etanol $6,77 \pm 1,23\%$ (v/v), rendemen $27,97\%$ (v/b), dan efisiensi fermentasi $59,01\%$ terhadap konsentrasi etanol secara teoritis. Sedangkan pada penggunaan kultur campuran *T. viride* dan *S. cerevisiae* yang ditambahkan secara simultan menghasilkan konsentrasi etanol $4,96 \pm 0,39\%$ (v/v), rendemen $19,85\%$ (v/b), dan efisiensi fermentasi $62,72\%$ terhadap konsentrasi etanol secara teoritis.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, S. dan Anita, C. (2012). Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India. *African Journal of Microbiology Research* **6**: 5453-5458.
- Ahmed, S., Ammara, B., Huma, S., Mubshara, S. dan Amer, J. (2009). Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Botany* **41**: 1411-1419.
- Akponah, E. dan Akpomie, O.O. (2012). Optimization of bioethanol production from cassava effluent using *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology* **11**: 8110-8116.
- Alriksson, B., Horvath, I. S., Sjode, A., Nilvebrant, N. O. dan Jonsson, L. J. (2005). Ammonium hydroxide

- detoxification of spruce acid hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121**: 911-922.
- Anindyawati, T. (2010). Potensi selulase dalam mendegradasi lignoselulosa limbah pertanian untuk pupuk organik. *Berita Selulosa* **45**: 70-77.
- Antonius, J. A., Maris V., Derek, A. A., Eleonora, B., Joost, V.D.B., Marko, K., Marijke, A.H., Luttk, H., Wouter, W., Alexander, S., Johannes, P., Dijken, V. dan Jack, T.P. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Journal of Antonie van Leeuwenhoek* **90**: 391-418.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist) (1990). *Official Methods of Analysis*, 12th Edition. Association of Official Analytical Chemist. Washington.
- Aro, S.O. (2008). Improvement in the nutritive quality of cassava and its by-products through microbial fermentation. *African Journal of Biotechnology* **7**: 4789-4797.
- Aslam, N., Munir, A.S., Muhammad, A. dan Amer, J. (2010). Expression pattern of *Trichoderma* cellulases under different carbon sources. *Journal of Botany* **42**: 2895-2902.
- Budiyanto, A., Martosuyono, P. dan Richana, N. (2006). Optimasi proses produksi tepung kasava dari pati ubi kayu skala laboratorium. *Buletin Balai Besar Pascapanen* **2**: 28-35.
- Chandra, M.S., Rajasekhar, R.B. dan Yong, L.C. (2008). Optimization of extraction of fp-ase from the fermented bran of *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Applied Biological Chemistry* **51**: 155-159.
- Chandel, A.K., Chan, E.S., Ravinder, R., Laksmi, M., Venkateswar, R. dan Pogaku, R. (2007). Economic and environmental impact of bioethanol production technology: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **2**: 014-032.
- Chellapandi dan Himanshu (2008). Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Journal of Microbiology* **39**: 122-127.
- Dashtban, M., Robert, B. dan Wensheng, Q. (2011). Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **2**: 274-286.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. dan Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Journal of Analytical Chemistry* **28**: 350-356.
- Gutierrez, M.G.D., Padilla, dan Karim, M.N. (2005). Influence of furfural on the recombinant *zymomonas mobilis* strain cp4 (pzb5) for ethanol production. *American Science* **1**: 24-27.
- Ghori, M.I., Sibtain, A., Muhammad, A.M. dan Amer, J. (2011). Corn stover-enhanced cellulase production by *Aspergillus niger* NRRL 567. *African Journal of Biotechnology* **10**: 5878-5886.
- Hambali, E., Mudjadlipah, S., Tambunan, A.H., Pattiwiri, A.W., Hendroko, R. (2007). *Teknologi Bioenergi*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Han, M., Yule, K., Youngran, K., Bongwoo, C. dan Gi, W.K. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Chemical Engineering* **28**: 119-125.
- Hawkins, G.M. dan Joy, D.P. (2011). A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnology for Biofuels* **4**: 1-14.
- Hermiati, E., Djumali, M., Titi, C.S., Ono, S. dan Bambang, P. (2011). Potential utilization of cassava pulp for ethanol production in Indonesia. *Scientific Research and Essays* **7**: 100-106.
- Horvath, I.S., Franzen, C.J., Taherzadeh, M.J., Niklasson, C. dan Liden, G. (2003). Effects of furfural on the respiratory metabolism of *saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4076-4086.
- Hu, G., Heitmann, J.A. dan Rojas, O.J. (2009). Quantification of cellulase activity using the quartz crystal microbalance technique. *Journal of Analytical Chemistry* **81**: 1872-1880.
- Jayant, M., Rashmi, J., Shailendra, M. dan Deepesh, Y. (2011). Production of cellulase by different co-culture of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* from waste paper, cotton waste and baggase. *Yeast and Fungal Research* **2**: 24-27.
- Jenie, L.S.B. (1990). *Kajian Teknik Imobilisasi Kapang Penghasil Selulase dan Asam Sitrat dalam Spons Untuk Pemanfaatan Onggok Menjadi Asam Sitrat*. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Juariah, S., Ari, S. dan Ratna, S. (2004). Fermentasi etanol dari limbah padat tapioka (onggok) oleh *Aspergillus niger* dan *Zymomonas mobilis*. *Bioteknologi* **1**: 7-12.
- Julianto (2014). Produksi singkong nasional. Tabloid sinar tani. <http://tabloidsinartani.com/content/read/produksi-singkong-nasional/>. [17 Februari 2015].
- Kementerian Negara Riset dan Teknologi Republik Indonesia (2006). Penelitian, pengembangan dan penerapan ilmu pengetahuan dan teknologi bidang sumber energi baru dan terbarukan untuk mendukung keamanan ketersediaan energi tahun 2025. www.ristek.go.id/file/upload/.../Rangkuman%20Buku%20Putih.pdf. [17 Februari 2015].
- Khobragade, C.N., Sureshkumar, K., Prita, S.B. dan Sagar, A.D. (2004). Enzymatic saccharification of cellulosic waste by cellulose system of *Cellulomonas uda* immobilized on tri(4-formyl phenoxy) cyanurate. *Chemical Technology* **11**: 816-819.
- Kongkiattikajorn, J. dan Yoonan, K. (2004). Ethanol production from cassava pulp hydrolysate using fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* 5049. Paper presented at 30th Congress on Science and Technology of Thailand. October 2004. [http://www.energybased.nrct.go.th/Article/Ts-3 ethanol production from cassava pulp hydrolysate using fermentation by Saccharomyces cerevisiae 5049.pdf](http://www.energybased.nrct.go.th/Article/Ts-3%20ethanol%20production%20from%20cassava%20pulp%20hydrolysate%20using%20fermentation%20by%20Saccharomyces%20cerevisiae%205049.pdf). [17 Juli 2013].
- Kusmiyati (2010). Comparison of yam and cassava tubers as a *Saccharomyces cerevisiae* substrate fermentation for bioethanol production. *Bioscience* **2**: 7-13.
- Malik, S.K., Hamid, M., Ammad, A.F. dan Ikram, U.H. (2010). Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*. *Journal of Botany* **42**: 4243-4251.
- Martinez, A., Rodriguez, M., York, S., Preston, J. dan Ingram, L. (2000). Use of the UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysis of biomass. *Biotechnology* **16**: 37-41.
- Mekala, N.K., Singhanian, R.R., Sukumaran, R.K. dan Pandey. 2008. Cellulose production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**: 122-31.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Journal of Analytical Chemistry* **31**: 426-428.
- Modig, T., Liden, G. dan Taherzadeh, M.J. (2002). Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **363**: 769-776.
- Nair, M.P.D., Padmaja, G. dan Moorthy, S.N. (2011). Biodegradation of cassava starch factory residue using a combination of cellulases, xylanases and hemicellulases. *Biomass Bioenergy* **35**: 1211-1218.
- Niranjane, A.P., Madhou, P. dan Stevenson, T.W. (2007). The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 1464-1468.
- Nwachukwu, I.N., Ibekwe, V.I., Nwabueze, R.N., Anyanwu, B.N., Ezeji, U., Kalu, I. dan Chinakwe, E. (2008). Production of high-ethanol-yielding *Saccharomyces cerevisiae* of palm wine origin by protoplast fusion. *Life Science* **5**: 64-68.
- Ocloo, F.C.K. dan Ayernor, G.S. (2010). Production of alcohol from cassava flour hydrolysate. *Brewing and Distilling* **1**: 15-21.
- Padonou, W., Mestres, C. dan Nago, M.C. (2005). The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties. *Food Chemistry* **89**: 261-270.
- Parwiyanti, Pratama, F. dan Arnita, R. (2011). Sifat kimia dan fisika gula cair dari pati umbi gadung (*Dioscorea hispida* Dennt). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **22**: 171-176.
- Pothiraj, C., Balaji, P. dan Eyini, M. (2006). Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. *African Journal of Biotechnology* **5**: 1882-1885.
- Purwadi, R. (2006). *Continue Ethanol Production from Dilute-Acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy*. Tesis. Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology, Sweden.
- Radojka, N., Razmovski, Marina, B., Šćiban, Vesna, M. dan Vučurović. (2011). Bioethanol production from Jerusalem artichoke by acid hydrolysis. *Romanian Biotechnological* **16**: 6497-6503.
- Richana, N., Lestina, P. dan Irawadi, T.T. (2004). Karakterisasi lignoselulosa dari limbah tanaman pangan dan pemanfaatannya untuk pertumbuhan bakteri RXA III-5 penghasil xilanase. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* **23**: 171-176.
- Rodmui, A., Kongkiattikajorn, J. dan Dandusitapun, Y. (2008). Optimization of agitation conditions for maximum ethanol production by coculture. *Kasetsart Journal: Natural Science* **42**: 285-293.

- Rudolf, A., Malek, A., Guido, Z. dan Gunnar, L. (2005). A comparison between batch and fed batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology* **37**: 195-204.
- Sibtain, A., Ammara B., Huma, S., Mubshara, S. dan Amer, J. (2009). Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Botany* **41**: 1411-1419.
- Subashini, D., Ejilane, J., Radha, A., Jayasri, M.A. dan Suthindhiran, K. (2011). Ethanol production from sago waste using *Saccharomyces cerevisiae* Vits-M1. *Biological Sciences* **3**: 42-51.
- Suhartono, M.T. (1989). *Enzim dan Bioteknologi*. Hal 142-171. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pettanian Bogor, Bogor.
- Sun, H., Xiangyang, G., Zhikui, H. dan Ming, P. (2010). Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology* **9**: 163-166.
- Susmiati, Y. (2010). *Rekayasa Proses Hidrolisis Pati dan Serat Ubi Kayu Untuk Produksi Bioetanol*. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K. (2007^a). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. *BioResources* **2**: 472-499.
- Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K. (2007^b). Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic material. *BioResources* **2**: 707-738.
- Ubalua, A.O. (2007). Cassava wastes: treatment options and value addition alternatives. *African Journal of Biotechnology* **6**: 2065-2073.
- Van Soest, P.J. (1963). Use of detergent in analysis of fibrous feeds III. *Dalam*: M.L. Dreher (ed.). The Handbook of Dietary Fiber. New York, USA.
- Wahid, M.Z.A., Madihah, S., Faridah, Y., Mohammed, I.A.K. dan Zahangir, A. (2001). Factors affecting endoglucanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30 from solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches using Plackett-Burman design. *African Journal of Biotechnology* **10**: 9402-9409.
- Wargiono, J., Hasanuddin, A. dan Suyamto (2006). *Teknologi Produksi Ubikayu Mendukung Industri Bioetanol*, hal. 8-28. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Jakarta.
- Wikandari, R., Ria, M., Siti, S., Ririn, M. dan Yulianni, A. (2010). Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigeneous microbial isolate for bioethanol production. *Journal Agricultural* **5**: 105-109.
- Wolin, M.J., Miller, T.L., Susan, Y., Yongchao, Z., Shelton, B. dan Gary, A. W. (1999). Changes of fermentation pathways of fecal microbial communities associated with a drug treatment that increases dietary starch in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2807-2812.
- Wu, B., Gao, P.J. dan Zhao, Y. (2006). A new approach to measurement of saccharifying capacities of crude cellulase. *BioResources* **1**: 189-200.
- Yoonan, K., Kongkiattikajom, J. dan Rattanakanokchai, K. (2004). Ethanol production from acid hydrolysates of cassava pulps using fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. <http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4305049.pdf>. [17 Juli 2013].
- Zamora, L.L., José, A.G.C., Evangelina, T.V. dan Eusebio, B.R. (2010). Optimization of ethanol production process from cassava starch by surface response. *Journal of Mexican Chemical Society*. **54**: 198-203.