

PENGARUH KONSENTRASI TWEEN 80 PADA SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SERENTAK PATI SORGUM MENJADI BIOETANOL

Ajma Nouri, 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: ajma.nouri@yahoo.co.id

ABSTRACT

*The growing energy needs of Fuel (BBM) in the world are experiencing the limitations of the natural resources of raw materials in the form of fossil fuels are declining. To meet the needs of fuel need to be developed for non-fossil fuels. One type of vegetable fuel (BBN) is bioetanol. Raw materials that are potentially as bioetanol one is sweet sorghum (*Sorghum bicolor* l. Moench). Starch sorghum can be converted into glucose and then by using the help of microorganisms are converted into bioetanol. The methods used in this research is the process of sakarifikasi and the fermentation is done simultaneously (SSF) in 2-Litre fermenters. Sampling is conducted during the process of hidrolisa by using StargenTM enzyme and fermentation at specific time intervals to analyze levels of ethanol and sugar levels. Test your sugar levels reduction done by the method of Nelson-Somogy, alcohol concentration testing using the tool alkoholmeter. The purpose of this study was to determine the influence of the concentrations of Tween 80 and the fermentation time against levels of ethanol produced. Starch fermentation process conditions of sorghum with the variation of the concentrations of Tween 80 (0.5%; 1%; 0.9%; 2% and 2.5%) at each sampling time (36; 24; 48; 60, 72 and 96 h). The fermentation process takes place in the anaerobic conditions of operation pH (4.5) speed of 200 rpm and pengadukkan at room temperature. The best fermented indicated on condition of addition of enzyme concentration of 2.5%, the fermentation time 72 hours with the resulting ethanol concentration of 8% (v/v).*

Keywords: Bioetanol, Fermentation, starch sorghum, StargenTM 002, Tween 80

I. PENDAHULUAN

Kehidupan manusia tidak bisa dipisahkan dari lingkungan sekitarnya. Seiring dengan perkembangan zaman, jumlah penduduk dunia juga terus mengalami peningkatan setiap tahunnya, sehingga peningkatan akan kebutuhan energi tidak dapat dihindarkan lagi. Pada tahun 2004 Indonesia telah menjadi importir minyak karena produksi minyak Indonesia hanya sebesar 1126 ribu barrel/hari. Angka ini sudah berada di bawah konsumsi minyak Indonesia yang jumlahnya sebesar 1150 ribu barrel/hari [British Petroleum, 2011]. Penggunaan konsumsi energi di bidang industri yang semakin hari semakin bertambah membuat

persediaan energi semakin menipis. Dengan semakin menipisnya persediaan energi, dibutuhkan sumber energi alternatif yang dapat dimanfaatkan manusia. Energi yang dapat menggantikan peran bahan bakar fosil yang tidak terbarukan.

Bioetanol merupakan bahan bakar yang dapat diperbaharui karena berasal dari tumbuh-tumbuhan. Bioetanol dapat mensubstitusi bahan bakar bensin atau premium yang digunakan secara luas di masyarakat dan penggunaannya meningkat dari tahun ke tahun. Tantangan dalam pengembangan bioetanol di Indonesia terletak pada suplai bahan baku yang pada umumnya berasal dari tanaman pangan

sehingga menyebabkan produksi besar-besaran bioetanol akan mempengaruhi tanaman untuk kebutuhan pangan. Oleh karena itu di samping bahan baku yang sudah ada, juga diperlukan sumber bahan baku baru untuk menambah bahan baku pembuatan bioetanol seperti tanaman sorgum (*sorghum bicolor*, L Moench).

Sorgum (*Sorghum bicolor* L. Moench) merupakan sumber daya biji-bijian yang sangat berpotensi sebagai bahan baku produksi bioetanol. Tanaman sorgum memiliki keunggulan tahan terhadap kekeringan dibanding jenis tanaman sereal lain. Tanaman ini mampu beradaptasi pada daerah yang luas, dari daerah yang beriklim tropis–kering (*semi arid*) sampai daerah beriklim basah. Selain itu tanaman sorgum lebih resisten terhadap serangan hama dan penyakit sehingga resiko gagal relatif kecil. Tanaman sorgum berfungsi sebagai bahan baku industri yang ragam kegunaannya besar dan merupakan komoditas ekspor dunia [Laimheriwa,1990].

Berbagai penelitian tentang pembuatan bioetanol dari biji sorgum telah berhasil dikembangkan. Retno dkk, (2009), telah meneliti proses pembuatan bioetanol melalui reaksi SSF dari biji sorgum dengan variabel yang digunakan adalah konsentrasi Enzim Stargen dan Tween 80 dengan rotasi shaker 6 dan 9 skala shaker. Proses sakarifikasi dilakukan pada suhu 30⁰C selama 96 jam. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa pada konsentrasi substrat 10%, konsentrasi yeast 4 gram menghasilkan gula reduksi semakin rendah pada konsentrasi katalis *glukoamilase* yang semakin tinggi dan pada putaran shaker yang semakin besar. Pada konsentrasi enzim *glukoamilase* 4 ml dengan konsentrasi substrat yang sama disimpulkan bahwa konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan juga lebih sedikit. Hal ini terlihat dari gula reduksi yang dihasilkan terus menurun sampai pada waktu terakhir.

Salah satu masalah yang sering terjadi dalam proses hidrolisis pati

sorgum secara enzimatik yaitu diperlukan proses pemanasan hingga 80⁰C dan pengadukan yang terus menerus. Adanya matriks protein yang melingkupi butir patinya dapat menghambat kontak butir pati tersebut dengan katalis enzim *alpha-amylase* yang ditambahkan. Sebagai akibatnya, proses pemutusan ikatan *alpha-1,4 D-glukosa* senyawa *amylase* dan *amilopektin* yang dikatalisasi *alpha-amylase* menjadi terhambat. Pada saat suhunya mencapai titik gelatinasinya, viskositas *suspense* pati tersebut meningkat tajam dan tidak segera turun lagi, karena laju proses *liquifikasi*nya terhambat [Pujaningsih, 2005].

Anggriani (2009) telah meneliti proses pembuatan bioetanol melalui reaksi sakarifikasi dan fermentasi secara simultan dari biji sorgum dengan variabel yang digunakan adalah konsentrasi NaOH 0,05%, 0,1%, 0,15% w/v dengan variasi papain 0,05%, 0,15%, 0,25% w/v. Proses *liquifikasi* dilakukan pada suhu 80-90⁰C selama 2 jam. Dilanjutkan proses sakarifikasi dan fermentasi pada suhu 30⁰C selama 60 jam. Dari hasil penelitian diperoleh pada konsentrasi NaOH sebesar 0,15% w/v dengan papain 0,25% didapatkan konsentrasi etanol paling tinggi yaitu 9,3% w/v. 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).

Penelitian ini akan di coba menggunakan enzim komersil jenis baru yaitu enzim Stargen™ 002. Enzim ini adalah generasi kedua yang diproduksi oleh Genencor Internasional di Palo Alto,

CA, USA. Kelebihan dari enzim ini yaitu dapat langsung menghidrolisis pati tanpa memerlukan proses pemanasan (*no cook Enzym*) dan dapat mengkonversi butiran pati menjadi gula secara terus menerus. Selanjutnya untuk menghambat terjadinya inhibisi produk bioetanol ke dalam sel *yeast* digunakan *Tween 80*. *Tween 80* berperan mempercepat penyerapan sterol (ergosterol) kedalam membran plasma, pertumbuhan, dan penyerapan glukosa [Odumeru et al., 1992]. *Tween 80* juga berperan sebagai surfaktan untuk menurunkan tegangan permukaan cairan di sekitar sel *Saccharomyces cerevisiae* sehingga media fermentasi yang kental tidak memberikan efek negatif pada sel [Feng et al, 2006]. Sehingga, dengan adanya penambahan *Tween 80* dapat meningkatkan kinerja sel dalam menghasilkan etanol dengan kadar yang lebih tinggi.

Proses fermentasi penelitian ini menggunakan *Yeast Saccharomyces cereviceae*, perbandingan konsentrasi *Tween 80* terhadap pati dan konversi bioetanol yang dihasilkan menjadi dasar utama dari penelitian ini. Diharapkan dengan perbandingan konsentrasi enzim dan waktu produksi dalam mengkonversi bioetanol, dapat diperoleh konsentrasi enzim dan waktu optimum untuk menghasilkan etanol dengan konsentrasi yang tinggi.

II. METODE PENELITIAN

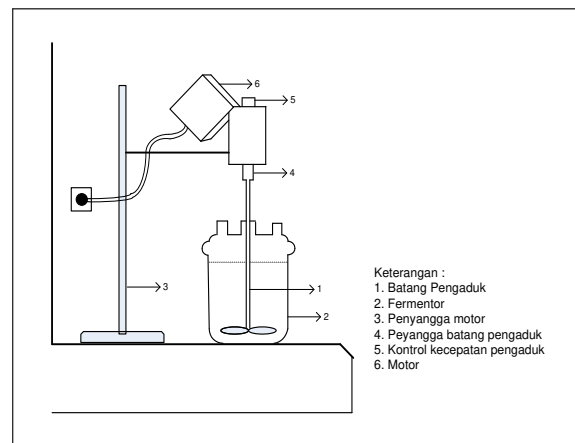
2.1 Bahan dan Alat

2.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sorgum yang diperoleh dari Kec. Banjaran Kabupaten Bandung, *Yeast Saccharomyces Cereviceae*, dari ragi kemasan yang diperoleh dari toko sembako, Reagen Nelson–Somogyi, digunakan dalam analisis konsentrasi glukosa dari substrat, HCl dan NaOH, Urea, NPK, sebagai sumber nutrisi sel ragi, Enzim Stargen™ 002, Aquades, dan *Tween 80*

2.2.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Reaktor 2 liter berpengaduk *Shaker*, Autoklaf, Alkoholmeter, Labu Erlenmeyer, Pipet tetes, Timbangan Analitik, Cawan Petri, Rangkaian Alat distilasi, Tabung reaksi, Spektrofotometer, dan Gelas Piala 500 ml & 1000 ml.



Gambar 2.1 Rangkaian Alat Fermentasi

2.2 Prosedur Penelitian

1. Persiapan Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji sorgum yang di ambil dari Kec. Banjaran Kabupaten Bandung. Sebelum digunakan, biji sorgum dihaluskan terlebih dahulu, Kemudian di ayak hingga berukuran $\pm 60-80$ mesh sehingga ukuran partikel lebih seragam.

2. Pembuatan Kurva Standar Glukos

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. Tahap Persiapan Medium Fermentasi (substrat)

Medium yang digunakan adalah medium pati sorgum yang diberi garam-garam nutrisi untuk pertumbuhan ragi, kemudian di cek pH. Nutrisi yang

dibutuhkan dalam medium pertumbuhan ragi antara lain unsur C, N, O, P, dan K.

4. Tahap Sterilisasi

Alat-alat yang akan digunakan pada proses pembuatan dan penyiapan starter serta proses fermentasi harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan menggunakan autoklaf. Medium fermentasi yang telah ditambahkan 40 gram pati sorgum, 0,4 g/L (NH₂)₂CO (Urea) dan 0,5 gr/L NH₄H₂PO₄ (NPK) di sterilisasi untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil fermentasi.

5. Tahap Penyiapan Inokulum Yeast (Starter)

Pembuatan inokulum *yeast* bertujuan untuk mengadaptasikan sel *yeast* terhadap media fermentasi. Dengan adanya adaptasi diharapkan fase lambat sebagai tahap awal fermentasi dilewati. *Saccharomyces Cereviceae* diinokulasi dalam 500 ml medium (10 g/l glukosa; 0,1 g/l Urea; 0,1 g/l Npk dan *aquades*) dalam 500 ml erlenmeyer. Sebelum diinokulasi, medium disterilisasi uap dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan. Setelah dingin 1 g/l *yeast extract* dimasukkan ke dalam medium lalu diaduk dengan menggunakan *shaker* selama 24 jam. Fungsi *shaker* adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium dan campuran menjadi homogen.

6. Proses Fermentasi

Proses fermentasi ini menggunakan metoda SSF dimana proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara bersamaan dalam satu reaktor 2 liter berpengaduk. Proses dimulai dengan cara menambahkan starter sebanyak 10% volume substrat kedalam medium fermentasi. Yeast extract sebanyak 1.2 g/l serta enzim stargenTM 002 untuk menghidrolisis pati menjadi glukosa dengan perbandingan komposisi sesuai dengan variabel penelitian yang digunakan adalah 0.5%, 1%, 1.5%, 2% dan 2.5% volume total cairan fermentasi pada suhu

25°C sampai 30°C. Waktu fermentasi divariasikan pada 36, 48, 60, 72, 84 dan 96 jam untuk mengamati konsentrasi gula substrat dan pengaruh waktu fermentasi terhadap etanol yang dihasilkan.

7. Cara Analisis Hasil

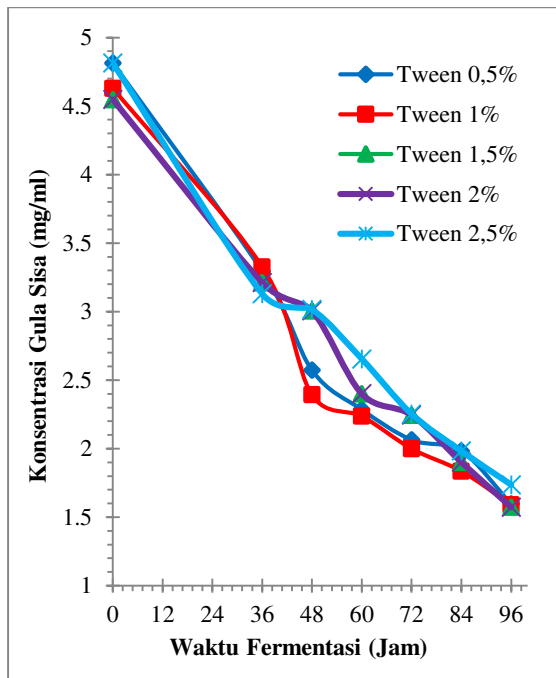
Pada penelitian ini parameter yang dianalisis, yaitu: konsentrasi gula substrat dan konsentrasi bioetanol. Konsentrasi bioetanol diukur dengan menggunakan alkohol meter. Konsentrasi gula substrat berupa gula akhir dianalisis dengan metode Nelson-Samogyi [Sudarmadji, 1997].

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian pendahuluan yang dilakukan adalah penggilingan biji sorgum menjadi tepung, penyeragaman ukuran biji sorgum yaitu 60-80 *mesh*, kalibrasi alat dan pembuatan kurva standar antara konsentrasi glukosa pada larutan standar terhadap absorbansi dengan spektrofotometer sinar tampak. Analisa konsentrasi glukosa dilakukan pada panjang gelombang 540 nm.

3.1 Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Gula Sisa Hasil Fermentasi

Proses fermentasi pati sorgum menggunakan *yeast Saccharomyces cerevisiae* dilakukan secara *batch* tetapi dengan pengambilan sampel secara *kontinu* dengan proses SSF menggunakan enzim stargenTM 002 dan *Tween* 80 serta waktu fermentasi sebagai variabel berubah. Setelah proses fermentasi selesai, dilakukan analisa terhadap konsentrasi gula sisa dengan metode Nelson-Somogyi. Tujuan dari analisis ini adalah untuk melihat efektifitas mikroorganisme dalam mengkonversi gula (substrat) menjadi bioetanol (produk). Konsentrasi gula sisa, gula yang habis selama proses pada masing-masing kondisi proses fermentasi ditunjukkan pada Gambar 3.1.

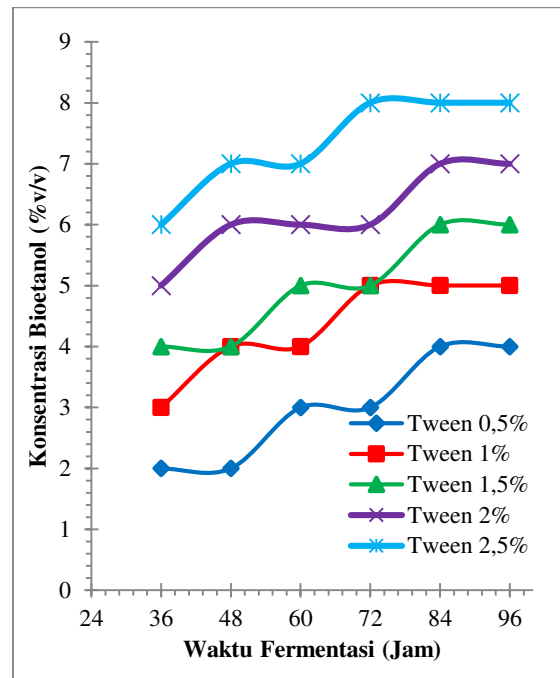


Gambar 3.1 Kurva Hubungan Antara Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Gula Sisa Hasil Fermentasi

Dari Gambar 3.1 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 serta konversi gula oleh yeast menjadi bioetanol sebagai metabolit.

3.2 Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Bioetanol Hasil Fermentasi

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan pengaruh waktu fermentasi dan konsentrasi Tween 80 terhadap konsentrasi bioetanol hasil fermentasi yang diperoleh menggunakan alat Alkoholmeter. Data yang diperoleh ditampilkan dalam konsentrasi Tween 80 terhadap bioetanol hasil fermentasi. Konsentrasi bioetanol yang diperoleh pada masing-masing variabel penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.2.



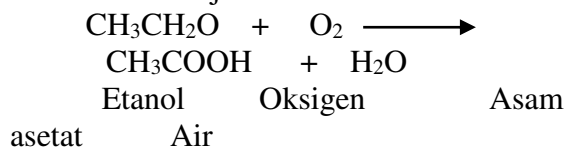
Gambar 3.2 Kurva Hubungan Antara Waktu Fermentasi Terhadap Konsentrasi Bioetanol dengan Variasi Konsentrasi Tween 80

Pada penelitian ini, waktu fermentasi yang divariasikan adalah 36, 48, 60, 72, 84 dan 96 jam.. Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa dengan semakin banyaknya konsentrasi Tween 80 yang diberikan maka konsentrasi bioetanol yang terbentuk semakin cepat dan tinggi. Hal ini terjadi karena dengan semakin banyaknya konsentrasi Tween 80 yang diberikan maka kemampuan enzim stargenTM 002 untuk mendegradasi pati menjadi gula semakin cepat. Dengan demikian glukosa dapat langsung dikonversi menjadi produk bioetanol oleh mikroorganisme.

Konsentrasi bioetanol tertinggi pada konsentrasi Tween 80 2,5% dengan waktu fermentasi 72 jam yaitu sebesar 8% (v/v). Saat proses fermentasi tetap dilanjutkan, bioetanol yang dihasilkan tidak mengalami penurunan setelah fermentasi selama 72 jam. Penyebab tidak menurunnya konsentrasi bioetanol ini terjadi karena gula yang dikonversi menjadi produk oleh mikroorganisme semakin banyak karena Tween 80 yang berguna sebagai nutrisi tambahan bagi sel ragi.

Akumulasi produk bioetanol yang dapat menghambat pertumbuhan *yeast*. Selain itu *Tween* 80 juga berperan dalam meningkatkan ketahanan sel mikroba dalam medium fermentasi untuk menghasilkan bioetanol dengan kadar yang lebih tinggi. Penambahan *Tween* 80 pada medium fermentasi dapat meningkatkan kemampuan membran sel untuk bertahan dari peristiwa osmosis [Tren et al, 2010].

Selain itu, konsentrasi bioetanol yang menurun dipengaruhi oleh konsentrasi gula yang semakin berkurang dan proses hidrolisis yang lebih rendah dibandingkan laju fermentasinya. Ketika laju fermentasi cepat sementara terjadi kekurangan substrat gula, sebagian *yeast Saccharomyces cereviceae* cenderung untuk mengkonsumsi bioetanol, kemudian adanya reaksi lanjut dari bioetanol yang teroksidasi menjadi asam asetat.



Pembentukan asam asetat akan mempengaruhi kondisi pH proses hidrolisis sehingga terjadinya penurunan aktifitas enzim. Selain itu, kemungkinan masih terdapatnya senyawa kimia yang masih tersisa pada substrat dan bioetanol yang terbentuk pada proses persiapan inokulum juga berperan sebagai inhibitor yang dapat menghambat proses hidrolisis enzim pada proses sakarifikasi dan fermentasi serentak. Sehingga, dapat menghambat pembentukan gula yang berperan sebagai substrat pada proses hidrolisis oleh enzim.

Berdasarkan Gambar 4.2 tersebut dapat diketahui bahwa waktu maksimum fermentasi secara *batch* pada media pati sorgum dengan penambahan *Tween* 80 pada variasi penambahan *Tween* 80 1% dan 2,5% diperoleh konsentrasi bioetanol tertinggi selama 72 jam, sedangkan pada variasi penambahan *Tween* 80 0,5%; 1,5%; dan 2% diperoleh konsentrasi bioetanol

tertinggi selama 84 jam. Namun dari variasi variasi penambahan *Tween* 80 0,5%; 1%; 1,5%; 2%, dan 2,5% konsentrasi bioetanol tertinggi yang diperoleh pada waktu fermentasi 72 jam pada variasi penambahan *Tween* 80 2,5%. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang diperoleh dari fermentasi nira nipah adalah variasi penambahan *Tween* 2,5% dengan konsentrasi bioetanol sebesar 8% (v/v).

Tingginya konsentrasi bioetanol pada variasi penambahan *Tween* 80 2,5% di bandingkan fermentasi dengan variasi lainnya, hal ini kemungkinan di sebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi gula awal pada variasi tersebut lebih tinggi dibandingkan variasi lainnya, pada variasi penambahan *Tween* 80 2,5% suplemen *Tween* 80 yang ditambahkan lebih banyak daripada variasi lainnya, dan kemungkinan lainya karena pada penelitian ini tidak di lakukan pengulangan pada semua media fermentasi. Jadi, pada variasi penambahan *Tween* 80 sebesar 2,5% menjadi efisien yang menghasilkan etanol tertinggi di bandingkan yang lainya.

3.3 Konsentrasi Gula Sisa Fermentasi dan Konsentrasi Bioetanol yang diperoleh

Dalam penentuan konsentrasi gula sisa, bioetanol dan kinetika pengurangan konsentrasi gula pada fermentasi nira nipah perlu dilakukan penentuan konsentrasi gula awal, yaitu dengan persamaan linear yang terbentuk pada kurva standar glukosa (Lampiran D). Setelah proses fermentasi selesai, dilakukan analisa terhadap konsentrasi gula sisa dengan metode Nelson-Somogyi. Tujuan dari analisa ini adalah untuk melihat efektifitas mikroorganisme dalam mendegradasi gula (substrat) menjadi bioetanol (produk). Konsentrasi gula sisa dan gula yang habis selama proses fermentasi pada masing-masing kondisi proses fermentasi ditunjukkan dalam Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Hasil Perhitungan Konsentrasi Gula Sisa Fermentasi dan Konsentrasi Bioetanol yang diperoleh

Volume Tween 80	Waktu Fermentasi (Jam)	Konsentrasi Bioetanol (% v/v)
0,5%	36	2
	48	2
	60	3
	72	3
	84	4
	96	4
1%	36	3
	48	4
	60	4
	72	5
	84	5
	96	5
1,5%	36	4
	48	4
	60	5
	72	5
	84	6
	96	6
2%	36	5
	48	6
	60	6
	72	6
	84	7
	96	7
2,5%	36	6
	48	7
	60	7
	72	8
	84	8
	96	8

Dari Tabel 3.1 dapat dilihat bahwa konsentrasi bioetanol tertinggi diperoleh pada waktu fermentasi 72 jam dengan volume Tween 80 2,5% yaitu sebesar 8% (v/v). Hal ini dipengaruhi oleh jumlah konsentrasi Tween 80 yang semakin besar maka semakin cepat stargen™ 002 mengkonversi pati menjadi glukosa yang dibutuhkan oleh yeast untuk pertumbuhannya, baik memperbanyak maupun mempertahankan hidup sehingga mempengaruhi konsentrasi bioetanol yang terbentuk.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Waktu fermentasi berpengaruh terhadap konsentrasi bioetanol yang dihasilkan, karena semakin lama waktu fermentasi akan meningkatkan konsentrasi bioetanol sampai titik terbaiknya. Waktu optimum dari fermentasi pati sorgum adalah pada waktu fermentasi 72 jam dengan perolehan konsentrasi bioetanol yaitu sebesar 8% (v/v). Penambahan Tween 80 sebagai nutrisi tambahan bagi sel ragi terbukti dapat meningkatkan metabolisme sel ragi dan mengurangi kematian yeast *saccaromyces cereviceae*. Konsentrasi bioetanol tertinggi yang diperoleh yaitu pada variasi penambahan Tween 80 dengan konsentrasi 2,5%.

4.2 Saran

Untuk memperoleh ketelitian dari analisis kadar etanol yang diperoleh dari proses fermentasi pati sorgum, ada baiknya analisis etanol dilakukan dengan GC (*Gas Chromatography*). Serta perlu dikembangkan dan dilaksanakan penelitian lebih lanjut untuk memurnikan bioetanol hasil fermentasi pati sorgum, sehingga diperoleh bioetanol dengan tingkat kemurnian yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggriani, dkk., 2009, Hidrolisis Biji Sorgum Menjadi Bioetanol Menggunakan NaOH-Papain dengan Metode Sakarifikasi dan fermentasi Simultan, Skripsi, Institut teknologi Sepuluh Nopember.
- British Petroleum*. 2011, "Statistical Review of World Energyjune", Diperoleh dari: www.bp.com/statisticalreview. [Diakses 26 November 2014].
- 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.

- Feng, J., Y. Zeng, C. Ma, X. Cai, Q. Zhang, M. Tong, B. Yu, and P. Xu. 2006. *The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (11) : 7390-7393.
- Composition Of Saccharomyces Brewing In Response To Heat Shock And*
Laimheheriwa, J. Departemen Pertanian. (1990). *Teknologi Budidaya Sorgum*. Balai Informasi Pertanian, Jayapura, Irian Jaya.
- Odumeru, J.A., D'amore, T., Russell, I. And Stewart, G. 1992. *Change In Protein Ethanol Stress*. *Journal Of Industrial Microbiology* 9 (3-4): 229-234
- Pujaningsih, I.R. 2005. *Teknologi Fermentasi dan Peningkatan Kualitas Pakan*. Laboratorium Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. Universitas Diponegoro.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi, 1997, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty, Yogyakarta.
- Tren, Q. H., Nguyen, T. T., Le V. V. M. and Hoang, K. A. 2010. *Effect of Tween80™ and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing*. *International Food Research Journal* 17: 309-318.