

Produksi Bioetanol Daun Sorghum (*Sorghum bicolor* L.Moench)

Sorghum (*Sorghum bicolor* L.Moench) Leaves Bioethanol Production

Birgitta Narindri^{1*}, Muhammad Nur Cahyanto², dan Ria Millati²

¹Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Email: birgitta_narindri@mail.staff.uajy.ac.id *Penulis untuk korespondensi

Abstract

The aim of this research was to analyze the potency of sorghum leaves as biomass in ethanol production. Sorghum leaves were used as a substrate in an enzymatic hydrolysis process and the reduction sugar that produced was used as substrate in fermentation. Hydrolysis was conducted without pretreatment. Sorghum leaves were degraded into 30 mesh powder before used as biomass in enzymatic hydrolysis using Celluclast (nozyme) 90FPU/g dry weight. Concentration of reduced sugar and Cellulose Conversion Ratio (CCR) were used to analyze the degradability of sorghum leaves cellulose at enzymatic hydrolysis. Reduced sugar in hydrolysate as the result of enzymatic hydrolysis were fermented by *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 to produce ethanol. Initial *S. cerevisiae* concentration was 10⁶ CFU/ml and added 10% of hydrolysate volume. Observation was carried out on reduced sugar and ethanol concentration during fermentation. The results presented that some cellulose cannot be enzymatically hydrolysed directly because of the low value of CCR. Highest reduced sugar concentration after enzymatic hydrolysis was 3.18 mg/ml. Highest level of ethanol concentration was 0,23% (v/v).

Keywords: bioethanol, sorghum leaves, *Sorghum bicolor*, enzymatic hydrolysis

Abstrak

Penelitian ini bertujuan menganalisis potensi daun sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) sebagai biomassa dalam produksi etanol. Daun sorghum akan digunakan sebagai substrat dalam proses hidrolisis enzimatis dan gula reduksi yang dihasilkan akan digunakan sebagai substrat dalam fermentasi. Hidrolisis dilakukan tanpa perlakuan pendahuluan. Daun sorghum dihancurkan hingga berbentuk serbuk berukuran 30mesh sebelum digunakan sebagai substrat dalam hidrolisis enzimatis menggunakan enzim Celluclast (nozyme) 90FPU/g berat kering. Konsentrasi gula reduksi dan nilai CCR (Cellulose Conversion Ratio) akan digunakan untuk menganalisis tingkat degradabilitas selulosa daun sorghum. Gula reduksi dalam hidrolisat sebagai hasil proses hidrolisis enzimatis akan difermentasi oleh *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 untuk menghasilkan etanol. Konsentrasi *Sorghum cerevisiae* yang digunakan adalah 10⁶ CFU/ml dan ditambahkan dalam 10% volume hidrolisat. Pengamatan dalam proses fermentasi dilakukan terhadap konsentrasi gula reduksi dan etanol selama 36 jam. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa selulosa tidak dapat dihidrolisis enzimatis secara langsung dilihat dari rendahnya nilai CCR. Konsentrasi gula reduksi tertinggi setelah hidrolisis enzimatis adalah 3,18 mg/ml. Konsentrasi etanol tertinggi setelah proses fermentasi adalah 0,23% (v/v).

Kata kunci: bioetanol, daun sorghum (*Sorghum bicolor*), hidrolisis enzimatis

Diterima: 23 September 2015, disetujui: 16 November 2015

Pendahuluan

Sumber energi, terutama bahan bakar, merupakan salah satu kebutuhan penting dalam berbagai sektor kehidupan. Bahan bakar yang banyak digunakan bersumber dari fosil dan

berwujud minyak, atau yang biasa disebut dengan BBM (Bahan Bakar Minyak).

Berdasarkan Nasir (2014), produksi minyak Indonesia yang dapat diolah di kilang dalam negeri hanya sekitar 900.000 barrel per hari. Di era tahun 70-an, konsumsi minyak

hanya dikisaran 100 ribu s.d. 350 ribu BPD. Namun, dari tahun ke tahun konsumsi terus meningkat atau tumbuh di kisaran 6,1% per tahun selama periode 1970 s.d. 2012. Permasalahan ini mendorong diciptakannya Perpres no 5 tahun 2006 tentang kebijakan energi nasional yang menargetkan 5% sumber energi alternative berasal dari biofuel. Salah satu energi alternative biofuel yang banyak dikembangkan adalah bioetanol.

Etanol sebagai energi alternatif telah menarik perhatian sejak krisis minyak di tahun 1970 (Shen dkk., 2012). Etanol dapat dihasilkan dari proses fermentasi berbagai macam bahan seperti bahan berpati, limbah pertanian yang mengandung lignoselulosa, atau bahan bersaccharin (Goshadrou dkk., 2011).

Salah satu jenis tanaman pertanian yang banyak dikembangkan di Indonesia adalah tanaman serealia seperti padi, jagung, beras ketan, serta sorghum. Bagian tanaman seperti batang jagung, jerami gandum, jerami padi, sekam padi, dan baggase merupakan residu dan produk samping yang dapat digunakan sebagai bahan baku produksi bioetanol (Saha dan Michael, 2006).

Limbah pertanian tersebut mengandung selulosa dan hemiselulosa yang dapat dihidrolisis menjadi gula dan selanjutnya digunakan sebagai substrat pada proses fermentasi. Hidrolisis dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti fisikawi dengan penguapan, kimiawi dengan asam ataupun enzimatis (Goshadrou dkk., 2011).

Dalam industri fermentasi glukosa menjadi etanol, secara umum digunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini karena *Saccharomyces cerevisiae* mampu memproduksi etanol dalam jumlah besar dan mempunyai toleransi terhadap alkohol yang tinggi, toleransi terhadap adanya garam, dan mudahnya aplikasi untuk skala industri karena tidak membutuhkan medium yang sangat steril (Elevri dan Surya, 2006).

Pada penelitian ini dilakukan hidrolisis enzimatis menggunakan enzim selulase untuk mengubah selulosa dari daun sorghum menjadi glukosa. Hasil hidrolisis enzimatis ini akan digunakan sebagai substrat dalam fermentasi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisia*. Analisis kadar gula reduksi dan kadar etanol

yang dihasilkan akan digunakan untuk mengukur efisiensi fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat degradabilitas selulosa dalam daun sorghum dan proses fermentasi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae*.

Metode Penelitian

Analisis Karakter Bahan

Analisis Kadar Air dilakukan berdasarkan metode Anonim (2005). Sebanyak 2 gr sampel ditambahkan ke dalam cawan terukur yang telah dikeringkan pada suhu 100–105°C hingga berat konstan. Berat bahan ditentukan dengan rumus berikut ini:

$$Ka = \frac{(\text{berat sampel awal} + \text{cawan kosong}) - (\text{berat sampel} + \text{botol kering})}{\text{Berat sampel awal}} \times 100$$

Analisis kandungan lignoselulosa daun sorghum dilakukan dengan metode Chesson (1981). Analisis kandungan lignoselulosa dilakukan secara bertahap dengan mendegradasi bagian-bagian dari bahan. Degradasi dilakukan untuk mengetahui kandungan WSC (*Water Soluble Carbohydrate content*), hemiselulosa, selulosa, dan lignin.

Hidrolisis Enzimatis Daun Sorghum

Daun sorghum dari varietas Numbu putih diambil dari daerah Banguntapan, Yogyakarta. Daun sorghum dikumpulkan dan dihaluskan menjadi bubuk berukuran 30mesh. Dalam penelitian ini juga digunakan PASC (*Phosporic Acid Swollen Cellulose*) sebagai control pada hidrolisis enzimatis. PASC dibuat dengan pencampuran bubuk selulosa dan asam phosphor selama 1 jam pada suhu 4°C, dilanjutkan dengan pencampuran bersama aquades dan diaduk selama 1 jam pada suhu 4°C. Campuran dicuci dengan pembilasan menggunakan aquades dan NaHCO₃ 1% (w/v) hingga pH 7. PASC disimpan dalam buffer sitrat pH 4,8 sebelum digunakan (Walseth, 1952).

Aktivitas selulase diukur menggunakan metode Ghose (1987). Sebanyak 1 mL 0,05 buffer sitrat (pH4,8) dipanaskan hingga suhu 40°C dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 lembar kertas saring Whatman

(1X6cm). sebanyak 0,5 ml enzim selulase (Celluclast ® 1,5L Novozyme) ditambahkan dalam tabung reaksi lalu diinkubasi pada waterbath suhu 50°C selama 1 jam. Campuran dianalisis menggunakan metode DNS (Anonim, 2005) untuk mengukur konsentrasi gula reduksi. Hasil dinyatakan dalam FPU (Filter Paper Unit). Satu unit merupakan jumlah enzim untuk melepas 1 µmol glukosa dalam 1 menit pada suhu 50°C.

Tahap hidrolisis enzimatis dilakukan dengan modifikasi metode Musatto dkk., (2008). Selulase (90 FPU/g substrat) ditambahkan dalam 50 mM buffer Na-sitrat (pH 4,8) yang disuplementasi dengan 0,02% (b/v) sodium azida lalu dicampurkan dengan daun sorghum dengan konsentrasi 2% (b/v). Campuran diinkubasi dalam waterbath suhu 50°C selama 72 jam. Pada jam ke 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 dilakukan pengambilan sampel untuk analisis kadar glukosa dengan menggunakan metode DNS. Sebelum dilakukan analisis kadar glukosa, sampel terlebih dahulu disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan hidrolisat dengan padatan. Analisis tingkat degradabilitas dengan menghitung nilai %CCR (*Cellulose Conversion Ratio*) menggunakan rumus di bawah ini:

$$\%CCR = (\text{mg gula reduksi} / \text{mg selulosa}) \times 0,9 \times 100\%$$

(Mussato dkk., 2008)

Berat gula reduksi diperoleh dari data analisis konsentrasi gula reduksi dan berat selulosa didapatkan dari analisis karakter.

Fermentasi Etanol

Tahap fermentasi etanol dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Cao dkk., (2012). *S. cerevisiae* disiapkan dengan memindahkan kultur dari agar miring menuju medium PGY (*Peptone Glucose Yeast*) yang berisi 7,5g/L Peptone; 4,5g/L yeast extract; 20g/L glukosa. Sebanyak satu ose *S.cerevisiae* dipindahkan dalam 100mL medium PGY broth sebelum inkubasi pada suhu 30°C selama 12 jam. Hidrolisat (hasil hidrolisis) disterilisasi pada suhu 121°C selama 30 menit sebelum digunakan. *S.cerevisiae* ditambahkan sebanyak 10%(v/v) ke dalam hidrolisat steril dan diinkubasi 30°C selama 36 jam dan dilakukan pengambilan sampel pada jam ke 0, 4, 8, 12, 24, 36. Semua langkah dilakukan dalam kondisi steril. Analisis gula reduksi dilakukan dengan metode DNS sedangkan analisis etanol dilakukan menggunakan kromatografi gas.

Hasil dan Pembahasan

Karakter Daun Sorghum

Hasil analisis kadar air, WSC, dan komposisi lignoselulosa dari daun sorghum disajikan dalam Tabel 1.

Daun sorghum berada dalam bentuk bubuk berukuran 30 mesh. Hemiselulosa merupakan komposisi tertinggi dalam kandungan lignoselulosa daun sorghum. Hemiselulosa dapat berperan sebagai inhibitor proses hidrolisis enzimatis dengan membatasi kontak antara enzim dan selulosa. Daun sorghum mengandung hemiselulosa antara 26,4–38,5% (Murray, 2008).

Tabel 1. Karakter daun Sorghum

Komposisi		Jumlah
Kadar air (%)		10,02
WSC (%db)		20,99
Lignoselulosa (%db)	Hemiselulosa	32,93
	Selulosa	26,89
	Lignin	17,80

Hidrolisis Enzimatis Daun Sorghum

Selulase ditambahkan sebanyak 90FPU/g dari substrat. Konsentrasi gula reduksi selama hidrolisis enzimatis ditunjukkan dalam Gambar 1.

Dalam hidrolisis enzimatis, selulosa murni dan PASC digunakan sebagai kontrol. Konsentrasi gula reduksi tertinggi dari PASC dan selulosa selama hidrolisis enzimatis adalah 26,15mg/ml dan 24,26 mg/ml. PASC menghasilkan gula reduksi yang lebih tinggi karena struktur amorf yang dimilikinya membuat kontak selulosa dengan enzim menjadi mudah dan tingkat hidrolisis tinggi (Andersen, 2007).

Gula reduksi bertambah selama hidrolisis enzimatis. Enzim selulase secara aktif mengubah selulosa menjadi gula pada jam ke 24–48. Pada jam ke 60–72 tidak ada peningkatan signifikan dari gula reduksi. Menurut Mussato dkk., (2008) di dalam bahan berlignoselulosa, selulosa terikat secara fisikawi dengan hemiselulosa dan terikat secara fisikawi dan kimiawi dengan lignin. Keberadaan kedua fraksi tersebut membuat akses selulase menuju selulosa menjadi terhambat sehingga mengurangi efisiensi hidrolisis. Penghambatan akses selulase dan penurunan efisiensi hidrolisis akan menyebabkan produksi glukosa menjadi lebih rendah. Produksi gula reduksi tertinggi adalah 3,18 mg/ml.

Produk yang muncul dari proses hidrolisis enzimatis dapat berperan sebagai inhibitor aktivitas enzim. Penghambatan aktivitas selulase dalam hidrolisis enzimatis dilakukan oleh gula terutama sellubiosa dan glukosa (Tahezadeh dan Karimi, 2007).

Komposisi lignoselulosa memengaruhi produksi gula reduksi. Dalam substrat lignoselulosa, selulosa terikat secara fisik pada hemiselulosa dan secara kimia pada lignin. Lignin dan hemiselulosa dapat menghambat akses enzim selulase pada selulosa. Penghambatan dan pengurangan efisiensi hidrolisis akan memproduksi konsentrasi gula yang rendah (Mussato dkk., 2008).

Efisiensi Hidrolisis Enzimatis Selulosa

Efisiensi hidrolisis enzimatis selulosa daun sorghum dinyatakan dalam % CCR (*Cellulose Conversion Ratio*). Nilai %CCR daun sorghum adalah 55,058%. Hasil ini menyatakan

bahwa 55% selulosa dapat diubah menjadi glukosa. Hidrolisis enzimatis dalam penelitian ini dilakukan tanpa perlakuan pendahuluan untuk melihat potensi alami dari bahan yang digunakan sebagai substrat sebelum dikenai perlakuan pendahuluan. Masih terdapat hemiselulosa dan lignin di dalam bahan yang dapat menghambat selulase untuk mencapai selulosa dan memproduksi nilai %CCR yang rendah (Mussato dan Teixeira, 2010)

%CCR dapat dipengaruhi oleh minimnya perlakuan pendahuluan. Perlakuan pendahuluan meningkatkan area permukaan dari bahan yang akan dilanjutkan dengan kontak yang cukup antara selulase dan substrat sehingga membuat peningkatan gula reduksi yang dihasilkan (Lu dkk., 2012)

Proses pemutusan ikatan selulosa yang ada dalam substrat lignoselulosa dibatasi oleh berbagai faktor seperti faktor fisikokimia, struktur, dan komposisi. Dalam konversi substrat lignoselulosa menjadi bahan bakar, substrat perlu diberikan perlakuan pendahuluan sehingga selulosa dalam serat tanaman dapat terekspose (Mussato dan Teixeira, 2010). Perlakuan pendahuluan menggunakan berbagai macam metode termasuk ledakan ammonia fiber, perlakuan kimia, perlakuan biologis, dan ledakan uap panas untuk merusak struktur selulosa substrat dan meningkatkan akses terhadap enzim (Kumar dkk., 2009).

Tingkat kekerasan substrat lignoselulosa dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu rendahnya tingkat akses substrat, tingginya nilai DP (*Degree of Polymerization*) selulosa, keberadaan lignin dan hemiselulosa, tingginya tingkat kristalinitas, ukuran partikel, dan porositas (Mussato dan Teixeira, 2010). Faktor-faktor tersebut berkorelasi dengan tingkat akses substrat dan tingkat hidrolisis. Penggilingan dan penghancuran selulosa dalam solven selulosa diikuti dengan regenerasi pada antisolven dapat meningkatkan akses selulosa sebelum hidrolisis enzimatis (Sathisuksanoh dkk, 2011).

Fermentasi Etanol

Saccharomyces cerevisiae ditambahkan sebanyak 10% (v/v) dengan konsentrasi 1×10^6 CFU/ml sebelum diinkubasi 30°C selama 36 jam. Konsentrasi gula reduksi dan perubahan

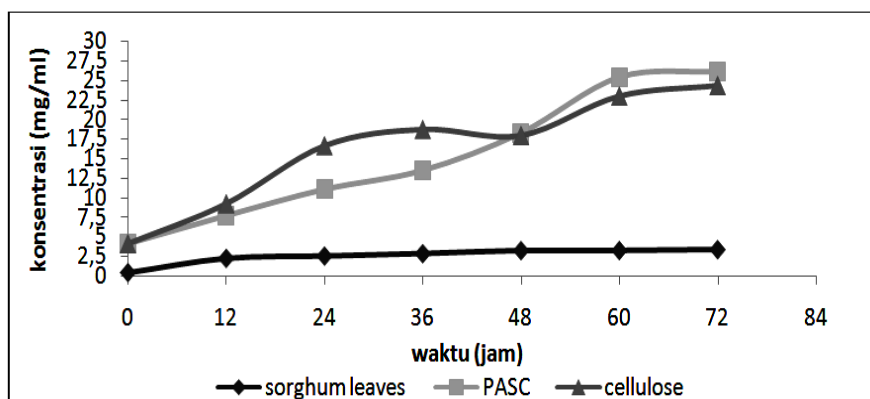
etanol selama proses fermentasi ditampilkan dalam Gambar 2.

Dari Gambar 2, pada 12 jam pertama penurunan gula reduksi sebanding dengan peningkatan konsentrasi etanol. Hal ini menunjukkan bahwa gula reduksi diubah menjadi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* melalui proses fermentasi (Musanif, 2008).

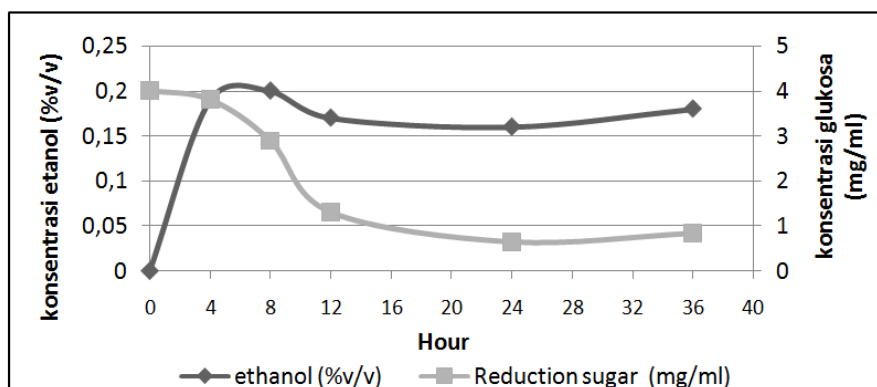
Konsentrasi gula reduksi berkurang selama fermentasi. Penurunan gula reduksi tertinggi tampak pada 12 jam pertama fermentasi lalu diikuti oleh penurunan yang tidak signifikan. Pada 12 jam awal merupakan fase log bagi *S. cerevisiae* sehingga konsumsi gula tinggi digunakan untuk pertumbuhan dan produksi etanol. Substrat merupakan vahan baku fermentasi yang mengandung nutrien-nutrien yang dibutuhkan oleh mikroba untuk tumbuh

maupun untuk menghasilkan produk fermentasi. Nutrien yang paling dibutuhkan adalah karbohidrat (Azizah dkk., 2012). Konsentrasi akhir gula reduksi hampir mendekati 0. Konsentrasi awal gula reduksi dari hidrolisat yang rendah tidak dapat memenuhi kebutuhan pertumbuhan *S. cerevisiae*. pertumbuhan optimum *S. cerevisiae* membutuhkan 10% konsentrasi gula reduksi (Afriyanti dkk., 2014).

Konsentrasi etanol tertinggi dihasilkan pada 12 jam pertama. Pada jam ke-24 dan 36 perubahan konsentrasi etanol tidak signifikan. Pada 12 jam awal, *S. cerevisiae* memasuki fase log dan secara aktif memproduksi etanol lalu dilanjutkan pada fase stasioner pada jam pengamatan selanjutnya sehingga produksi etanol tidak berbeda signifikan (Shen dkk., 2012).



Gambar 1. Konsentrasi gula reduksi selama hidrolisis enzimatis.



Gambar 2. Konsentrasi gula reduksi dan perubahan etanol selama fermentasi.

Simpulan

Penggunaan daun sorghum tanpa perlakuan pendahuluan sebagai substrat dalam produksi etanol menghasilkan nilai konversi selulosa menjadi gula reduksi yang rendah. Adanya hemiselulosa dan lignin di dalam daun sorghum dapat berperan sebagai inhibitor dalam proses hidrolisis enzimatik. Nilai %CCR produksi adalah 55,058% dengan konsentrasi gula tertinggi 3,18 mg/ml. Dalam tahap fermentasi, konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan adalah 0,23% (v/v). Perlakuan pendahuluan dibutuhkan untuk memutus ikatan lignoselulosa dan meningkatkan kontak antara selulosa dan enzim selulase.

Daftar Pustaka

- Afriyanti, A., Sardjono dan Sigit, S. 2014. Konversi mikrobiologis Batang Pohon Singkong (*Manihot esculenta*) Menjadi Etanol oleh *Trichoderma reesei* PK1J2 Dan *Saccharomyces cerevisiae* 3012. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Andersen, N. 2007. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Experimental and Modeling Studies. BioCentrum- DTU Technical University of Denmark.
- Anonim. 2005. *Official Methods of Analysis AOAC International Method 932.14* 18th Edition: Sugar and Sugar Products 44 (Solid in Syrup). AOAC International, Maryland, USA.
- Azizah, N., Al-Baarri, A.N. dan Mulyani, S. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1 (2) : 72–77.
- Cao, W., Chen, S., Ronghou, L., Renzhan, Y. dan Xiaou, W. 2012. Comparison of The Effect of Five Pretreatment Methods on Enhancing The Enzymatic Digestibility and Ethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse. *Bioresour Technol*, 111: 215-221. www.elsevier.com/locate/biortech.
- Chesson, D. 1981. Acidogenic Fermentation of Lignocellulosic-Acid Yield and Conversion of Components. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIII: 2167–2170.
- Elevri, Putra, A. dan Surya, R.P. 2006. Produksi Etanol Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* Yang Diamobilisasi Dengan Agar Batang. *Akta Kimindo*, 1 (2): 105–114.
- Goshadrou, A., Keikhosro, K. dan Mohammad, J.T. 2011. Improvement of Sweet Sorghum Bagasse Hydrolysis by Alkali and Acidic Pretreatment. *World Renewable Energy Congress*, 2011-Sweden 8-13 May 2011.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure&appl. Chem.*, 59 (2): 257–268.
- Kumar, P., Diane, M. Barrett, Michael, Delwiche, J., dan Pieter, S. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, Article ASAP • DOI: 10.1021/ie801542g • Publication Date (Web): 20 March 2009 Downloaded from <http://pubs.acs.org> on March 26, 2009.
- Lu, Jie, Xue Zhi Li, Jian Zhao dan Yinbo Qu. 2012. Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid HotWater. *Hindawi publishing corporation: Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2012 (2012), Article ID 276278, 9 pages.<http://dx.doi.org/10.1155/2012/276278>.
- Murray, C.S., William, R., Sharon, M., Arun, S., Patricia, K. dan John, E.M. 2008. Genetic Improvement of Sorghum as a Biofuel Feedstock: II. QTL for Stem and Leaf Structural Carbohydrates. *Crop Science*, 48, November–December.
- Musanif, J. 2008. Bio-etanol. p.php.deptan.go.id/xplore/files/PENGOLAHAN-HASIL/BioEnergi-Lingkungan/BioEnergi-Perdesaan/BIOFUEL/Bioetanol/Bioethanol.pdf. diakses tanggal 15 juni 2014.
- Mussatto, S.I., Marcela, F., Adriane, M.F.M. dan Ines, C.R. 2008. Effect of Hemicellulose and Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose from Brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 124-129. www.sciencedirect.com.
- Mussatto, S. I. dan Teixeira, J.A. 2010. Lignocellulose as Raw Material in Fermentation Processes. Current research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial biotechnology. *Formatex 2010* hal 897-907.
- Nasir, M. 2014. Potret Kinerja Migas Indonesia. *Buletin Info Risiko Fiskal (IRF) Edisi 1 : Pendahuluan*.
- Saha, B.C. dan Michael, A.C. 2006. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Lime Pretreated Wheat Straw to Ethanol. *Journal of Clinical Technology and Biotechnology*, 82: 913–919.

Produksi Bioetanol Daun Sorghum

- Sathisuksanoh, N., Zhiguang Zhu dan Percival Zhang, Y.H. 2012. Cellulose solvent-based pretreatment for corn stover and avicel: concentrated phosphoric acid versus ionic liquid [BMIM]Cl. Springer : *Cellulose* DOI 10.1007/s10570-012-9719-z
- Shen, F., Jinguang, H., Yuehua, Z., Michael, L., Jack, N. dan Ronghou, L. 2012. Ethanol Production from Steam Pretreated Sweet Sorghum Bagasse With High Substrate Consistency Enzymatic Hydrolysis. *Biomass and Bioenergy* 41: 157-164. www.elsevier.com/locate/biombioe. Diakses 9 juli 2013.
- Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K. 2007. Enzyme Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. *Bio Resource* 2 (4), 707-738. http://www.ncsu.edu/bioresources/BioRes_02/BioRes_02_4_707_738. diakses tanggal 29 juni 2014.
- Walseth, C.S. 1952. Occurance of Cellulases in Enzyme Preparations from Microorganisms. *Tappi*, 35: 228-233.