

Produksi Etanol dari Ampas Tebu Terdelignifikasi Alkali melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

Maulida Oktaviani^{1,*}, Triyani Fajriutami¹, Euis Hermiati¹

¹ Pusat Penelitian Biomaterial, LIPI, Jalan Raya Bogor KM 46, Cibinong, Bogor, 16911

* E-mail : maulida.oktaviani@lipi.go.id

Abstrak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi enzim dan waktu inkubasi optimum untuk memproduksi etanol dari ampas tebu terdelignifikasi alkali melalui proses sakarifikasi dan fermentasi serentak (SSF). Ampas tebu telah didelignifikasi (*pretreatment*) menggunakan NaOH 1% pada 121°C selama 60 menit. Sakarifikasi dan fermentasi serentak dilakukan menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan enzim selulase komersial (*Meicellase*) dengan konsentrasi 10-50 fpu/g berat kering ampas tebu. SSF dilakukan pada 38°C, 130 rpm selama 72 jam. Parameter seperti konsentrasi etanol, rendemen etanol, konsentrasi gula pereduksi dan pH medium fermentasi diukur setiap 24 jam sekali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi etanol tertinggi (22.64 g/L) dan rendemen tertinggi (29.18% per g berat kering ampas tebu) dihasilkan pada konsentrasi enzim 50 fpu/g berat kering ampas tebu setelah 72 jam SSF. Analisis gula pereduksi menunjukkan bahwa konsentrasi gula pereduksi meningkat pada 48 jam pertama SSF dan menurun hingga 72 jam SSF. Nilai pH medium fermentasi setelah SSF menunjukkan bahwa pH medium berkisar antara 4.5 dan 5.0.

Kata Kunci: Ampas Tebu, Bioetanol, Delignifikasi, Natrium Hidroksida, Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak.

1. Pendahuluan

Kebutuhan dan konsumsi energi yang semakin meningkat setiap tahun telah mendorong semakin intensifnya penelitian produksi sumber energi alternatif pengganti bahan bakar minyak. Bahan nabati yang telah dikonversi menjadi bahan bakar nabati dapat menjadi substitusi bahan bakar minyak. Bioetanol merupakan salah satu jenis bahan bakar nabati yang berpotensi sebagai substitusi bensin ^[1].

Bioetanol dapat diperoleh melalui proses fermentasi gula dari biomassa yang mengandung karbohidrat (jagung, gandum), sukrosa (tebu) atau bahan lignoselulosa (ampas tebu, tandan kosong kelapa sawit, dsb.) ^[2]. Bahan lignoselulosa seperti limbah ampas tebu merupakan bahan baku etanol yang menjanjikan disebabkan keberadaannya yang melimpah, murah, serta tidak digunakan sebagai bahan pangan ^[3]. Di Indonesia sendiri, potensi perolehan etanol dari ampas tebu yang dihasilkan oleh pabrik gula dapat mencapai 614,827 kL/tahun ^[4]. Di sisi lain, berdasarkan peraturan presiden No 5 tahun 2006 tentang *blue print* pengelolaan energi nasional 2006-2024, penggunaan energi baru dan terbarukan (EBT) diproyeksikan sebesar 17% pada tahun 2025, dengan bahan bakar nabati menyumbang sebesar 5%. Hal ini mengindikasikan bahwa pengembangan bioetanol dari ampas tebu masih sangat perlu dikembangkan.

Seperti biomassa lignoselulosa lainnya, ampas tebu merupakan substrat kompleks yang terdiri dari campuran polimer karbohidrat (selulosa dan hemiselulosa), lignin, dan senyawa-senyawa yang larut dalam air (abu). Selulosa merupakan senyawa yang paling banyak terkandung dalam ampas tebu dan merupakan bagian terpenting yang akan dikonversi menjadi produk lain seperti bioetanol. Proses konversi ampas tebu menjadi bioetanol memerlukan beberapa tahap, yaitu *pretreatment*, hidrolisis selulosa menjadi gula sederhana dan fermentasi gula sederhana menjadi etanol ^[4].

Pretreatment bertujuan untuk menghilangkan lignin (delignifikasi), mengurangi kristalinitas selulosa, dan meningkatkan porositas bahan sehingga aksesibilitas enzim dalam mengubah selulosa menjadi gula pereduksi semakin meningkat ^[5]. Penggunaan alkali seperti natrium hidroksida (NaOH)

atau kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) dalam proses delignifikasi biomassa lignoselulosa telah banyak dilaporkan [6,7].

Hidrolisis dan fermentasi serentak atau *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) merupakan salah satu metode yang umum digunakan dalam rangka mencapai proses konversi etanol dari bahan berlignoselulosa yang lebih efektif. SSF merupakan kombinasi dari tahap hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan dilanjutkan fermentasi glukosa menjadi etanol yang berlangsung dalam satu tempat atau reaktor^[8]. SSF memiliki banyak kelebihan apabila dibandingkan dengan Hidrolisis dan Fermentasi Terpisah atau *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF). SSF dapat menghasilkan rendemen etanol yang lebih tinggi karena meminimalisasi inhibisi produk akhir serta meminimalisasi kontaminasi bakteri yang mungkin terjadi apabila proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan terpisah^[9].

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa delignifikasi menggunakan NaOH 1% dan pemanasan pada 121°C selama 60 menit, dilanjutkan dengan proses hidrolisis menggunakan enzim selulase 10 fpu, merupakan kondisi *pretreatment* optimal yang dapat menghasilkan total gula pereduksi sebesar 33.97 g (per 100 g ampas tebu) ^[10]. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui jumlah etanol yang dapat diproduksi melalui proses SSF dengan menggunakan enzim selulase dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh konsentrasi enzim dan lama waktu fermentasi terhadap produksi etanol dari ampas tebu terdelignifikasi NaOH 1%. Selain itu juga dilakukan analisis terhadap faktor-faktor lain yang memengaruhi keberhasilan SSF seperti temperatur, pH, dan konsentrasi inokulum.

2. Metode Penelitian

2.1 Mikroorganisme dan Media Kultur

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae* LIPI MC 0070 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI. Kultur kerja *S. cerevisiae* dipreservasi pada *Potato Dextrose Agar* (PDA) 2% miring dan diinkubasi selama 1—2 hari pada suhu 28°C. Kultur kerja disimpan di dalam lemari pendingin (4°C) sebelum digunakan atau diremajakan kembali setelah satu bulan preservasi ^[11].

Starter dibuat dengan menginokulasikan satu *loop* penuh kultur kerja *S. cerevisiae* ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 50 mL media *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) 5% (10 g/L *Yeast Extract*; 20 g/L Pepton; 50 g/L Glukosa). Biakan kemudian diagitasi pada 120 rpm selama 24 jam pada suhu 30°C. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan starter sebanyak 10 % (v/v) ke dalam 225 mL media YPD 5%, kemudian diagitasi pada 120 rpm selama 16-20 jam pada suhu 30°C. Volume inokulum yang akan digunakan dalam proses SSF ditentukan berdasarkan Dowe & McMillan ^[12].

2.2 Ampas Tebu dan Pretreatment

Ampas tebu yang digunakan diperoleh dari pabrik gula Rajawali di Subang, Jawa Barat. Ampas tebu dikeringkan, digiling, dan disaring sehingga diperoleh partikel berukuran 40-60 mesh. Ampas tebu kemudian didelignifikasi dengan menggunakan NaOH 1% dan pemanasan pada 121°C selama 60 menit. Rincian proses delignifikasi dapat dilihat pada laporan sebelumnya ^[10].

2.3 Hidrolisis dan Fermentasi Serentak (*Simultaneous Saccharification and Fermentation/SSF*)

Proses SSF dilakukan sesuai dengan Dowe & McMillan dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 26.95 g (berat basah) atau 3.88 g (berat kering) pulp ampas tebu terdelignifikasi (*solid loading* 4% w/w) ditambahkan media fermentasi (5 ml) yang terdiri dari 100 g/L *Yeast Extract*; 200 g/L Pepton, 1 M larutan penyangga sodium sitrat (2.5 mL), 10% (v/v) inokulum *Yeast*, dan enzim dengan konsentrasi 10-50 fpu/g berat kering ampas tebu. Akuades steril ditambahkan ke dalam labu hingga berat total campuran mencapai 50 g. Kecuali enzim, ampas tebu, media fermentasi dan larutan buffer yang digunakan telah disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Persiapan yang sama dilakukan juga untuk kontrol enzim (tanpa substrat). Labu SSF kemudian dilengkapi dengan leher angsa sebagai *gas trapped*. Proses SSF dilakukan dalam *shaking incubator* 130 rpm pada suhu 38°C selama 72 jam ^[12].

2.4 Penentuan Konsentrasi Etanol

Sampel dicuplik setelah 24, 48, dan 72 jam inkubasi. Sampel kemudian disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil untuk kemudian diukur konsentrasi etanolnya dengan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) Shimadzu 14B, *Packed Column Carbowax 20m* = 2m, suhu akhir 70°C, laju program 10°C/menit, selama 10 menit. Kondisi tekanan N₂ = 260 KPa, H₂ = 70 kPa, dan udara 50 kPa. Suhu injektor 150°C, suhu detektor 250°C, dan volume injeksi sebesar 5 µl. Sampel disimpan dalam botol vial pada suhu 4°C apabila analisis etanol tidak dapat dilakukan pada hari sampel dicuplik.

2.5 Penghitungan Jumlah Khamir Sebelum dan Setelah SSF

Jumlah khamir sebelum dan setelah proses SSF dihitung dengan metode *direct count method* dengan menggunakan kamar hitung *Improved Neubauer* dan pewarnaan *Trypan Blue* [13].

2.6 Analisis Komponen Kimia Bahan

Bahan baku berupa serbuk ampas tebu sebelum dan sesudah *pretreatment* dianalisis komponen kimianya mengacu pada metode *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), yang meliputi kadar air [14], kadar ekstraktif [15], kadar abu [16], kadar selulosa, hemiselulosa, dan lignin [14]. Kadar gula pereduksi hidrolisat setelah SSF dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi [17]. Konversi selulosa menjadi etanol dihitung berdasarkan Dowe & McMillan [12].

3. Hasil dan Pembahasan

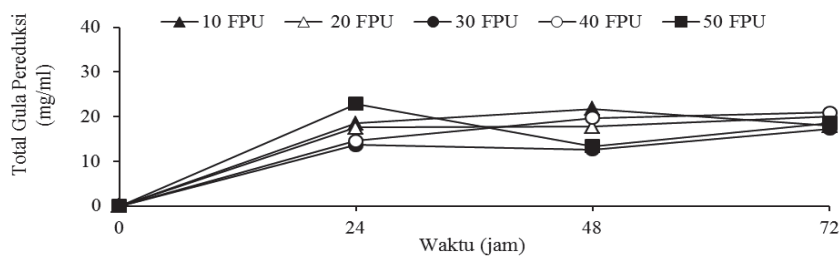
Proses delignifikasi dengan NaOH 1% telah berhasil menghilangkan lignin sebesar 13.45% sehingga kadar selulosa (alfaselulosa) pun meningkat sebesar 17.01% (Tabel 1). Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Bjerre *et. al.* [18] yang menyatakan bahwa *pretreatment* bahan lignoselulosa dengan menggunakan NaOH mampu mengurangi kadar lignin sebesar 10-18%. *Pretreatment* ampas tebu dengan menggunakan NaOH 1% (w/v) juga mampu mengurangi kadar lignin dari 25% menjadi 6% [19].

Tabel 1. Komponen Kimia Ampas Tebu Sebelum dan Sesudah *Pretreatment*

Komponen	Bagas Mentah [% berat kering]	Pretreatment NaOH 1% [% berat kering]
Kadar abu	2.13 ± 0.38	0.64 ± 0.06
Kadar ekstraktif	1.58 ± 0.20	0.61 ± 0.14
Klason Lignin	22.45 ± 0.01	9.00 ± 0.12
Holoseululosa		
α-selulosa	34.48 ± 0.20	51.49 ± 0.44
hemiselulosa	27.48 ± 0.20	27.96 ± 0.44

Gambar 1 menunjukkan profil gula pereduksi yang diperoleh setelah SSF. Gula pereduksi pada tiga variasi konsentrasi enzim (20, 30, dan 50 fpu/g berat kering) menunjukkan kecenderungan yang sama, di mana konsentrasi gula pereduksi meningkat pada 24 jam pertama SSF sebelum kemudian menurun hingga 48 jam SSF.

Konsentrasi gula pereduksi tertinggi (22.83 g/L) diperoleh pada perlakuan konsentrasi enzim 50 fpu/g berat kering dengan waktu inkubasi 24 jam. Konsentrasi gula pereduksi yang tinggi sampai pada 24 jam pertama SSF menunjukkan bahwa telah terjadi akumulasi gula pereduksi sebagai akibat dari hidrolisis selulosa oleh enzim selulase serta masih sedikitnya jumlah gula yang dikonsumsi oleh khamir. Konsentrasi gula pereduksi kemudian menurun setelah 24 jam SSF disebabkan karena pada fase ini pertumbuhan khamir mulai beralih dari fase eksponensial ke fase stasioner sehingga konsumsi gula oleh khamir semakin meningkat dan mengurangi konsentrasi gula pereduksi dalam medium SSF. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Lin and Lee (2013) yang menyatakan bahwa konsentrasi glukosa yang tinggi diperoleh pada beberapa jam pertama fermentasi disebabkan laju fermentasi oleh khamir belum dapat mengimbangi laju hidrolisis oleh enzim. Konsentrasi glukosa tertinggi diperoleh setelah 6 jam fermentasi dan kemudian menurun secara perlahan ketika laju fermentasi oleh khamir lebih cepat dibandingkan laju hidrolisis oleh enzim [20].

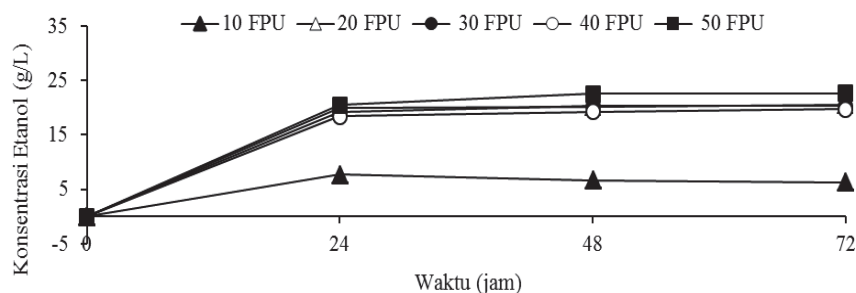


Gambar 1. Produksi gula pereduksi dari ampas tebu terdelignifikasi NaOH 1% setelah SSF

Konversi selulosa menjadi etanol ditunjukkan oleh Tabel 2. Konversi selulosa tertinggi adalah sebesar 100.02% dari nilai konversi maksimal secara teoritis yang dihasilkan setelah inkubasi 72 jam. Nilai maksimal konversi selulosa tersebut diperoleh pada konsentrasi enzim 50 fpu/g berat kering ampas tebu. Konsentrasi etanol sangat dipengaruhi oleh konsentrasi enzim ($p < 0.05$). Dapat disimpulkan bahwa ketika konsentrasi enzim meningkat maka nilai konversi selulosa menjadi meningkat. Hasil ini sesuai dengan Lu *et. al.* yang menyatakan bahwa konsentrasi enzim memiliki pengaruh yang signifikan terhadap konversi selulosa menjadi etanol [21].

Tabel 2. Konversi Selulosa menjadi Etanol

Waktu [jam]	Konversi Selulosa [%]				
	10 fpu	20 fpu	30 fpu	40 fpu	50 fpu
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	34.15	87.82	85.04	81.20	90.26
48	29.62	88.87	89.57	85.04	99.67
72	27.88	90.26	89.57	87.13	100.02



Gambar 2. Konsentrasi etanol dari ampas tebu terdelignifikasi NaOH 1% setelah SSF

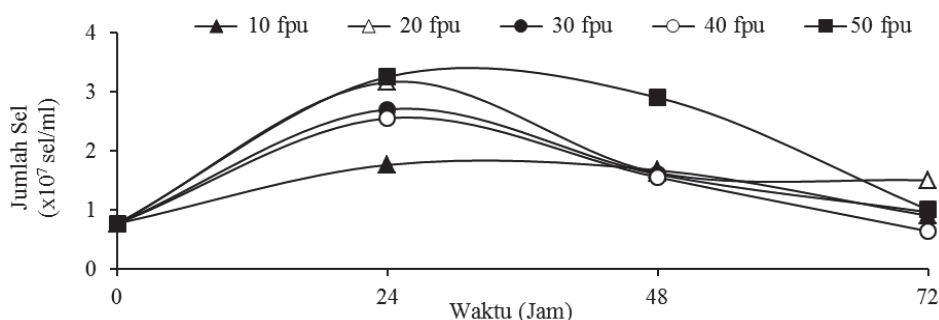
Hasil analisis kadar etanol menunjukkan bahwa konsentrasi etanol tertinggi diperoleh pada perlakuan menggunakan enzim 50 fpu/g berat kering ampas tebu dengan waktu fermentasi selama 72 jam, yaitu sebesar 22.64 g/L (Gambar 2). Rendemen etanol tertinggi yang diperoleh adalah sebesar 29.18 % /g berat kering ampas tebu, yang diperoleh dari berat etanol tertinggi dibandingkan dengan berat sampel kering (3.88 g) (Tabel 3). Hasil ini lebih tinggi dari konsentrasi etanol pada penelitian Wahono dkk. yang menghasilkan 21.37 g/L etanol pada SSF ampas tebu terdelignifikasi 1N NaOH dengan menggunakan *S. cerevisiae* dan enzim selulase [16].

Tabel 3. Rendemen Etanol dari Ampas Tebu Terdelignifikasi NaOH 1% Setelah SSF

Waktu [jam]	Rendemen Etanol [%]				
	10 fpu	20 fpu	30 fpu	40 fpu	50 fpu
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	9.96	25.62	24.81	23.69	26.33
48	8.64	25.93	26.13	24.81	29.08
72	8.13	26.33	26.13	25.42	29.18

Pada penelitian ini, SSF dilakukan dengan memanfaatkan khamir *S. cerevisiae* pada 38°C, 130 rpm. Hingga saat ini, *S. cerevisiae* masih banyak digunakan dalam penelitian bioetanol karena penggunaannya terbukti efektif dalam konversi glukosa menjadi etanol dari bahan berlignoselulosa^[20].

Apabila dihubungkan dengan kurva pertumbuhan, jelas sekali terlihat bahwa konsentrasi dan rendemen etanol tertinggi dicapai ketika khamir telah memasuki fase stasioner di mana tidak ada lagi pertumbuhan sel sehingga produksi etanol cenderung konstan (Gambar 3). Jumlah sel khamir cenderung menurun ketika waktu inkubasi diperpanjang hingga 72 jam. Hal ini dapat terjadi karena khamir telah memasuki fase kematian sehingga tidak lagi efektif memfermentasi glukosa menjadi etanol.



Gambar 3. Pola pertumbuhan *S. cerevisiae* selama SSF

Salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan SSF adalah pH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH medium pada semua perlakuan berkisar pada 4.5 – 5.0 selama SSF. Hal ini menunjukkan bahwa pH 4.5 – 5.0 merupakan kisaran pH optimal bagi SSF. Lu *et. al* [21] menyebutkan bahwa nilai konversi selulosa menjadi lebih tinggi karena penggunaan buffer sodium sitrat efektif meningkatkan kerja enzim serta mampu mengontrol pH medium selama proses SSF berlangsung. Selulase bekerja lebih efektif pada lingkungan yang asam (4.5 – 5.0). Kisaran pH tersebut juga sangat penting bagi pertumbuhan yang secara natural optimal tumbuh pada lingkungan asam dan aktivitas metabolismenya untuk memfermentasi glukosa menjadi etanol secara efisien.

4. Kesimpulan

Semakin tinggi konsentrasi enzim selulase yang digunakan, maka semakin tinggi konsentrasi etanol yang dihasilkan selama SSF. Konsentrasi enzim 50 fpu dengan waktu inkubasi 72 jam menghasilkan konsentrasi etanol tertinggi sebanyak 22.64 g/L dan rendemen etanol tertinggi sebesar 29.18% per gam berat kering ampas tebu. Namun, jika dibandingkan dengan penggunaan konsentrasi enzim yang sama (50 fpu) dan waktu inkubasi lebih singkat, yaitu 48 jam, diperoleh hasil konsentrasi etanol 22.56 g/L dan rendemen etanol sebanyak 29.08%. Hal ini menunjukkan bahwa setelah 48 jam inkubasi, produksi etanol sangat sedikit bahkan hampir tidak ada. Oleh karena itu, dapat dipertimbangkan untuk memilih waktu inkubasi SSF selama 48 jam di penelitian selanjutnya.

5. Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA 2014 Pusat Penelitian Biomaterial, LIPI. Ucapan terima kasih juga kami berikan kepada Raden Permana Budi Laksana atas bantuan teknis dalam penelitian ini.

6. Daftar Referensi

- [1] W. Fatriasari, "Produksi Gula Pereduksi melalui Rekayasa Proses Pra-Perlakuan Bambu Betung (*Dendrocalamus asper* (Schult. F.)), " Doktoral Disertasi, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia, 2014.
- [2] M.O.S. Dias, A. V. Ensinas, S. A. Nebra, R. M. Filho, C. E. V. Rossel and M. R. W. Maciel, "Production of Bioethanol and Other Bio-based Materials from Sugarcane Bagasse: Integration to Conventional Bioethanol Production Process," *Chemical Engineering Research and Design*, pp. 1206-1216, 2009.
- [3] J. Seabra, L. Tao, H. Chum and I. Macedo, "A Techno-Economic Evaluation of The Effects of Centralized Cellulosic Ethanol and Co-Products Refinery Options With Sugarcane Mill Clustering," *Biomass Bioenergy*, vol. 34, pp. 1065-1078, 2010.
- [4] E. Hermiati, D. Mangunwidjaja, T. C. Sunarti, O. Suparno dan B. Prasetya, "Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol," *Jurnal Litbang Pertanian*, vol. 29, issue 4, pp. 121-130, 2010.
- [5] M. Zviely, "Converting Lignocellulosic Biomass to Low-Cost Fermentable Sugars," dalam *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries*, ser. *Green Energy and Technology*, Z. Fang, Ed. Springer Science & Business Media, 2013.
- [6] S. K. Wahono, C. Darsih, T. Vita, Rosyida, R. Maryana dan D. Pratiwi, "Optimization of Cellulose Enzyme in the Simultaneous Saccharification and Fermentation of Sugarcane Bagasse on the Second-generation Bioethanol Production Technology," *Energy Procedia*, vol. 47, pp. 268-272, 2014.
- [7] I. B. W. Gunam, N. M. Wartini, A. A. M. D. Anggaeni dan P. M. Suparyana, "Delignifikasi Ampas Tebu dengan Larutan Natrium Hidroksida sebelum Proses Sakarifikasi secara Enzimatis menggunakan Enzim Selase Kasar dari *Aspergillus Niger* FNU 6018," *Jurnal Teknologi Indonesia*, vol. 34, pp. 24-32, 2011.
- [8] A. Isci, P. T. Murphy, R. P. Anex and K. J. Moore, 2006. A Rapid Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Technique to Determine Ethanol Yields. *Bioenerg. Res.* vol. 1, pp. 163-169, 2006.
- [9] K. Olofsson, M. Bertilsson and G. Liden, "A Short Review on SSF —An Interesting Process Option for Ethanol Production from Lignocellulosic Feedstocks," *Biotechnology for Biofuels*, vol. 1, pp. 1-14, 2008.
- [10] T. Fajriutami, W. Fatriasari, R. P. B. Laksana dan E. Hermiati, "Pretreatment NaOH dan Hidrolisis Enzimatis pada Ampas Tebu," *Laporan Teknik Akhir Tahun 2013 UPT BPP Biomaterial LIPI*, 2013.
- [11] W. L. Bergman, "Growth and maintenance of Yeast," dalam MacDonald, Ed. *Methods in Molecular Biology, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols*, 2001, vol. 177.
- [12] N. Dowe and J. McMillan, "SSF experimental protocols-Lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation," *Technical Report NREL/TP-510-42630*, National Renewable Energy Laboratory, Colorado, 2008.
- [13] J. R. Pringle and J. R. Mor, "Methods for Monitoring the Growth of Yeast Cultures and for Dealing with the Clumping Problem" dalam Prescott, David M. (XI). *Methods in Cell Biology: Yeast Cells*. Academic Press, Inc., London, 1975.
- [14] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton and D. Crocker, "Determination of Structural Carbohydrate and Lignin in Biomass," *Technical Report NREL/TP-510-42618*, National Renewable Energy Laboratory, Colorado, 2008.
- [15] A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton, "Determination of Extractives in Biomass," *Technical Report NREL/TP-510-42619*, National Renewable Energy Laboratory, Colorado, 2008.

- [16] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton, "Determination of Ash in Biomass," Technical Report NREL/TP-510-42622. National Renewable Energy Laboratory, Colorado, 2008.
- [17] S. Sudarmadji, B. Haryono dan Suhardi, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Yogyakarta: Penerbit Liberty, 1984.
- [18] A. B. Bjerre, A. B. Olesen and T. Fernqvist, "Pretreatment of Wheat Straw using Combined Wet Oxidation and Alkaline Hydrolysis Resulting in Convertible Cellulose and Hemicellulose," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 49, pp. 568-577, 1996.
- [19] M. L. Soares and E. R. Gouveia, "Influence of The Alkaline Delignification on The Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Sugarcane Bagasse," *Bioresource Technology*, vol. 147, pp. 645-648, 2013.
- [20] Y. S. Lin and W. C. Lee, "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Alkali-Pretreated Congogass for Bioethanol Production," *BioResources*, vol. 6, issue 3, pp. 2744-2756, 2013.
- [21] J. Lu, X. Li, J. Zhao and Y. Qu, "Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation of Reed Pretreated with Liquid Hot Water," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, pp. 1-9, 2012.
- [22] K. Stenberg, M. Galbe and G. Zacchi, "The Influence of Lactic Acid Formation on The Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Sofwood to Ethanol," *Enzyme Microbial Technology*, vol. 26, pp. 71-79, 2000.