

PENGARUH SUHU DAN PH TERHADAP BANYAKNYA YIELD (KADAR GLUKOSA) YANG DIHASILKAN PADA PROSES HIDROLISIS ENZIMATIS DARI LIMBAH KERTAS

AM Fuadi¹, Kun Harismah², Adi Setiawan³

^{1,2,3}Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jl. A. Yani Tromol Pos 1 Pabelan, Surakarta, Jawa Tengah 57162
Email: am_fuadi@ums.ac.id

Abstrak

Hidrolisis enzimatis selulosa merupakan proses pemecahan polimer (selulosa) menjadi monomer penyusunnya (glukosa) dengan bantuan enzim selulase. Kertas HVS merupakan komponen yang memiliki kandungan selulosa yang tinggi, hampir 90% dari berat kertas HVS merupakan selulosa. Hidrolisis selulosa menjadi glukosa dapat dilakukan dengan menggunakan asam, namun hidrolisis asam mempunyai dampak negatif terhadap lingkungan, oleh sebab itu pada penelitian ini menggunakan hidrolisis enzimatis yang ramah lingkungan. Namun hidrolisis enzimatis memiliki kekurangan yaitu waktu yang dibutuhkan cenderung lama sehingga diperlukan beberapa perlakuan untuk mendapatkan hasil yang optimal dan waktu yang relatif singkat. Pada penelitian ini dilakukan dengan memberikan perlakuan suhu operasi 30°C, 35°C, 40°C, 45°C serta dengan ph 4, ph 5, ph 6 dengan waktu hidrolisis 4 jam, 20 jam, 24 jam, 28 jam, 44 jam, 48 jam, 52 jam dan 66 jam. Perlakuan perbedaan suhu serta ph dimaksudkan untuk mengetahui kondisi operasi optimum yang dibutuhkan enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa dari kertas HVS menjadi glukosa. Dimana dari penelitian yang dilakukan didapatkan hasil kadar glukosa yang paling banyak diperoleh pada suhu 40°C, ph 4 serta waktu hidrolisis 66 jam dengan kadar glukosa sebanyak 603,56 mg dari 5 gram kertas HVS.

Kata Kunci: enzim selulase; hidrolisis enzimatis; kertas; selulosa

Pendahuluan

Tingginya pemanfaatan minyak bumi sebagai sumber bahan bakar utama di dunia memicu munculnya dua permasalahan besar yaitu semakin menipisnya persediaan minyak bumi (*non renewable*). Di Indonesia sendiri pemanfaatan bahan bakar minyak (BBM) sangat besar, hal tersebut disebabkan karena peningkatan jumlah kendaraan bermotor yang sangat pesat. Oleh karena itu perlu dicari sumber energi alternatif lainnya yang berasal dari bahan baku yang dapat diperbaharui.

Pemerintah telah mengeluarkan Peraturan Presiden Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2006 tentang Kebijakan Energi Nasional untuk mengembangkan sumber energi alternatif sebagai pengganti BBM (Prihandana, 2007). Dimana sumber energi alternatif tersebut dapat digunakan sebagai pengganti BBM yang jumlahnya sangat terbatas. Kebijakan energi nasional menargetkan pada tahun 2000-2025 sebesar 5% kebutuhan energi nasional harus dapat dipenuhi melalui pemanfaatan *biofuel* sebagai energi baru.

Salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan adalah bioetanol yang dapat dihasilkan dari fermentasi bahan yang mengandung glukosa. Bahan yang mengandung selulosa juga dapat digunakan tapi setelah di hidrolisis terlebih dahulu menjadi glukosa. Salah satu bahan yang banyak mengandung selulosa adalah kertas.

Kertas yang telah digunakan, biasanya hanya akan dibuang dan menimbulkan masalah bagi lingkungan. Apabila kertas bekas dibakar akan menimbulkan polusi udara, sedangkan apabila kertas bekas dibuang sembarangan akan menimbulkan bau busuk dan akan mencemari lingkungan. Oleh sebab itu pemanfaatan kertas bekas sebagai bahan baku bioetanol bisa mengatasi berbagai masalah diatas. Baik masalah energi maupun masalah lingkungan.

Dalam penelitian ini kertas yang digunakan adalah kertas HVS bekas, penggunaan kertas HVS bekas sebagai bahan baku karena kandungan selulosa didalam kertas HVS yang cukup tinggi. Untuk menghasilkan glukosa kertas HVS bekas harus dilakukan hidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim selulase. Kelebihan hidrolisis enzimatis adalah karena sifatnya yang ramah lingkungan dan kondisi proses yang ringan.

Untuk mendapatkan hasil Ethanol yang tinggi diperlukan konversi glukosa yang tinggi pula, penelitian ini dimaksudkan untuk menghasilkan glukosa dengan konversi yang tinggi dengan berbagai perlakuan, sehingga bioetanol yang dihasilkan nantinya semakin banyak. Dengan melihat fenomena diatas, untuk mengatasi masalah energi dan lingkungan maka penelitian ini perlu dilakukan.

Klasifikasi kertas

Komposisi kertas HVS sebagian besar terdiri dari selulosa dibandingkan dengan kandungan lignin atau hemiselulosa. Kandungan selulosa pada kertas HVS mampu mencapai 90% berat. Makin tinggi kandungan selulosa pada kertas maka jumlah glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis enzimatis akan lebih besar. (Taruna, *dkk.* 2010).

Jika dibandingkan dengan kertas buram, maka glukosa yang dihasilkan akan semakin rendah dikarenakan jumlah lignin yang cukup besar yang dikandung oleh kertas buram. Lignin merupakan komponen fenolik yang tidak mengandung gugus glukosa, maka produk degradasi lignin tidak menghasilkan glukosa (Taruna, *dkk.* 2010).

Komponen lignoselulosa

Secara umum material lignoselulosa terdiri dari selulosa (35- 50% berat), hemiselulosa (20-35% berat) dan lignin (10-25% berat) (Schacht et al., 2008). Kandungan selulosa dan hemiselulosa yang besar inilah yang membuat lignoselulosa sangat potensial dimanfaatkan untuk proses hidrolisis.

Selulosa

Selulosa adalah senyawa organik yang paling melimpah di alam dan mudah diperbarui. Pemanfaatan selulosa telah dilakukan di berbagai bidang, diantaranya untuk produksi kertas, fiber, dan senyawa kimia turunannya untuk industri plastik, film fotografi, rayon, dan lainnya. Produk hidrolisis selulosa yaitu gula (glukosa) juga merupakan senyawa yang vital dalam industri bioproses.

Saat ini banyak peneliti mengungkapkan bahwa limbah yang mengandung selulosa dapat digunakan sebagai sumber gula yang murah dan mudah didapat untuk menggantikan bahan pati dalam proses fermentasi (Graf & Koehler, 2000). Sumber selulosa yang dapat digunakan diantaranya adalah sisa-sisa produk pertanian dan hasil hutan, kertas bekas, dan limbah industri (White, 2000).

Selulosa adalah biopolimer linear yang tersusun dari molekul-molekul anhidro D-glukosa yang berikatan dengan β -1,4 glukosidik dengan ikatan hydrogen

Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan salah satu penyusun dinding sel tumbuhan selain selulosadan lignin, yang terdiri dari kumpulan beberapa unit gula atau disebut heteropolisakarida, dan dikelompokkan berdasarkan residu gula utama sebagai penyusunnya seperti xylan, mannan, galactan dan glucan. Hemiselulosa terikat dengan polisakarida, protein dan lignin dan lebih mudah larut dibandingkan dengan selulosa.

Lignin

Lignin adalah bagian utama dari dinding sel tanaman yang merupakan polimer terbanyak setelah selulosa. Tidak seperti selulosa dan hemiselulosa, meskipun tersusun atas karbon, hydrogen dan oksigen, lignin bukanlah karbohidrat. Lignin adalah heteropolimer yang kompleks dengan berat molekul tinggi. Lignin tersusun dari tiga jenis unit fenilpropana yang berbeda yaitu *p*-kumaril, koniferil, dan sinapil alkohol (Girisuta, 2007).

Hidrolisis selulosa menjadi glukosa

Hidrolisis merupakan proses pemecahan gula kompleks menjadi gula sederhana. Pada proses hidrolisis, selulosa diubah menjadi selobiosa atau sukrosa dan selanjutnya menjadi gula-gula sederhana seperti glukosa. Sementara itu hasil hidrolisis komponen hemiselulosa adalah campuran gula-gula sederhana seperti glukosa, galaktosa, xylosa, dan arabinosa (Schacht et al., 2008). Hidrolisis selulosa dapat dilakukan menggunakan larutan asam, larutan basa secara enzimatik, maupun termal, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangannya (Pejo et al., 2008).

Hidrolisis dengan menggunakan asam

Proses hidrolisis secara asam dapat dilakukan dengan penambahan asam, seperti asam sulfat dan asam klorida. Hidrolisis asam adalah hidrolisis dengan menggunakan asam yang dapat mengubah polisakarida (pati, selulosa) menjadi gula. Asam akan bersifat sebagai katalisator yang dapat membantu dalam proses pemecahan karbohidrat menjadi gula. Rendemen glukosa yang tinggi dapat dihasilkan dari hidrolisis asam bila dicapai kondisi yang optimum (Girisuta, 2007).

Asam sulfat merupakan asam yang paling banyak diteliti dan dimanfaatkan untuk hidrolisis asam. Namun, kekurangan menggunakan metode ini adalah kurang ramah lingkungan. Terlebih lagi adalah bahaya zat asam yang digunakan terhadap kesehatan manusia. Di sisi lain, Hidrolisis asam pekat juga membutuhkan biaya investasi dan pemeliharaan yang tinggi, hal ini mengurangi ketertarikan untuk komersialisasi proses ini (Taherzadeh & Karimi, 2007).

Pada hidrolisis dengan menggunakan asam pada konsentrasi tinggi, gula yang dihasilkan akan diubah menjadi senyawa-senyawa furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), asam levulinik, asam asetat (acetic acid), asam format (formic acid), asam uronat (uronic acid), asam 4-hydroxybenzoic, asam vanilik (vanilic acid), vanillin, phenol, cinnamaldehyde, formaldehida (formaldehyde), dan beberapa senyawa lain (Pejo et al., 2008). Lama waktu hidrolisis mempengaruhi proses degradasi selulosa menjadi glukosa dan juga mempengaruhi degradasi glukosa sebagai produk. Waktu hidrolisis yang melebihi waktu optimum akan mendegradasi glukosa menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana yang biasanya bersifat racun terhadap mikroorganisme (Grehlein, 1984).

Hidrolisis termal

Hidrolisis termal dilakukan dengan menggunakan hot compressed water (HCW) sebagai media cair untuk proses hidrolisis. Hidrolisis termal menggunakan tekanan dan temperatur yang tinggi untuk memisahkan komponen organiknya, menghidrolisis hemiselulosa dan mengubah sifat-sifat selulosa dan lignin. Hidrolisis ini mempunyai beberapa keuntungan, seperti ramah lingkungan dan tidak memerlukan proses pemurnian. Larutan gula hasil hidrolisis mendapat perlakuan detoksifikasi untuk menghilangkan racun yang mungkin terkandung dalam bahan baku. Kerugian dari hidrolisis secara termal adalah adanya kemungkinan reaksi dekomposisi gula menjadi produk seperti 5-hydroxymethyl furfural dan asam levulinat. Selain itu dibutuhkan energi yang besar untuk mencapai temperatur reaksi (di atas 100°C) (Schacht et al., 2008).

Hidrolisis enzimatik

Proses menggunakan enzim biasanya lebih disukai daripada proses menggunakan asam karena enzim bekerja lebih spesifik sehingga tidak menghasilkan produk yang tidak diharapkan, dapat digunakan pada kondisi proses yang lebih ringan, dan lebih ramah lingkungan.

Pada proses hidrolisis secara enzimatik dapat digunakan enzim selulase atau enzim lainnya yang dapat memecah selulosa menjadi monomer-monomernya. Aplikasi hidrolisis menggunakan enzim secara sederhana dilakukan dengan mengganti tahap hidrolisis asam dengan tahap hidrolisis enzim. Hidrolisis enzimatis memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis asam, antara lain tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, kondisi proses yang lebih lunak (pH sekitar 4,70-4,80 dan suhu 45–50°C), tidak terjadi reaksi samping, lebih ramah lingkungan, dan tidak melibatkan bahan-bahan yang bersifat korosif (Cheng & Timilsina, 2011; Schacht et al., 2008). Beberapa kelemahan dari hidrolisis enzimatis antara lain adalah membutuhkan waktu yang lebih lama, dan kerja enzim dihambat oleh produk. Selain itu, enzim bekerja secara spesifik dan tidak bisa menembus lignin yang mengikat selulosa dan hemiselulosa. Sehingga sebelum dihidrolisis secara enzimatis, limbah lignoselulosa harus mengalami proses penghilangan lignin atau biasa disebut delignifikasi. Harga enzim yang relatif lebih mahal dibandingkan asam juga menjadi kerugian penggunaan hidrolisis enzimatis (Cheng & Timilsina, 2011; Schacht et al., 2008).

Selulosa dapat dihidrolisis secara enzimatik dengan menggunakan enzim selulase. Enzim selulase biasanya merupakan campuran dari beberapa enzim, sedikitnya ada tiga kelompok enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis selulosa, yaitu endoglukanase (endo- β -1,4 glukukanase) yang bekerja pada wilayah serat selulosa yang mempunyai kristalinitas rendah untuk memecah selulosa, secara acak dan membentuk ujung rantai yang bebas, eksoglukanase (ekso- β -1,4 glukukanase) atau selobiohidrolase yang mendegradasi lebih lanjut molekul tersebut dengan memindahkan unit-unit selobiosa dari ujung-ujung rantai yang bebas, dan β -1,4 glukosidase atau selobiase yang menghidrolisis selobiosa menjadi glukosa. Hidrolisis selulosa juga dapat dilakukan dengan menggunakan mikroba yang menghasilkan enzim selulase, seperti *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, dan *Aspergillus niger* (Cheng & Timilsina, 2011).

Metode Penelitian

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Universitas Muhammadiyah Surakarta. Pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan Juni 2014 sampai dengan bulan Januari 2015.

Tahapan dan rancangan penelitian.

Dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan 2 tahap. Tahap pertama yaitu hidrolisis kertas menggunakan enzim selulase dengan waktu hidrolisis (4 Jam, 20 Jam, 24 Jam, 28 Jam, 44 Jam, 48 Jam, 52 Jam dan 66 Jam), suhu hidrolisis (30°C, 35°C, 40°C, 45°C) dan juga pada pH 4, pH 5, pH 6. Tahap kedua yaitu pengujian sampel menggunakan metode *Nelson Somogi* untuk mendapatkan nilai kadar glukosa pada setiap sampel.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu blender, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, kertas pH, kuvet, kompor stirer, labu ukur, penangas air, pipet ukur, pipet volume, sentrifuge, spektrofotometer, tabung reaksi, tabung sentifuge. Serta bahan yang digunakan yaitu aquades, H₂SO₄, enzim selulase, arsenomolybdate, larutan Nelson.

Cara kerja

Dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu tahap hidrolisis dan tahap uji kandungan glukosa:

Hidrolisis kertas bekas

Menyiapkan 4 erlenmeyer yang masing-masing berisi 5 gram kertas kering kemudian dicampur dengan 200 ml aquadest, setelah itu ditambahkan 0,7 gram enzim. Setelah semua bahan dicampur kemudian mengatur pH larutan dengan menambahkan H₂SO₄ 2 N sebanyak beberapa tetes agar pH larutan menjadi sesuai dengan kondisi yang diinginkan (pH 4, pH 5, pH 6). Setelah pH diatur selanjutnya meletakkan erlenmeyer yang sudah berisi larutan diatas kompor penangas yang sebelumnya sudah di set suhunya. Suhu yang di kehendaki pada penelitian

ini adalah (30°C, 35°C, 40°C, 45°C). Nyalakan stirrer kemudian larutan diambil sebanyak 5 ml sesuai dengan variasi waktu yang sudah di tentukan yaitu setiap (4 Jam, 20 Jam, 24 Jam, 28 Jam, 44 Jam, 48 Jam, 52 Jam dan 66 Jam).

Penentuan kadar glukosa dengan metode nelson somogi

Sampel yang sudah diambil sesuai dengan variabelnya kemudian diuji kandungan glukosanya dengan menggunakan metode Nelson Somogi yaitu menggunakan larutan Nelson dan Arsenomolybdate kemudian di ukur panjang gelombangnya menggunakan sinar spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm . Sampel sebelumnya di senrifuge dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, kemudian diambil 1 ml sampel, ditambahkan 1 ml larutan nelson, selanjutnya dipanaskan selama 20 menit pada suhu 100°C. Setelah itu didinginkan dan ditambah larutan arsenomolybdate 1 ml sambil dikocok, setelah itu ditambahkan 7 ml aquadest. Larutan diuji adsorbansinya menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui kandungan glukosanya.

Hasil dan pembahasan

Hasil percobaan

Tabel 1. Data kurva standar

Blanko (g/100ml)	1	2	3	rata- rata
	0	0	0	
1	2,581	2,583	2,585	2,583
2	2,791	2,793	2,796	2,793
3	2,922	2,924	2,925	2,924
4	2,426	2,427	2,428	2,427
5	2,992	2,993	2,994	2,993
6	3,112	3,106	3,111	3,110
7	3,271	3,275	3,272	3,273

Tabel 2. Data kadar glukosa pada ph 6

Waktu (Jam)	Kadar glukosa (mg/100ml)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
4	39,63	70,63	66,03	64,22
20	82,18	73,55	70,86	67,05
24	216,13	211,58	122,26	89,06
28	242,64	263,30	127,89	100,52
44	311,86	300,34	135,63	105,65
48	327,27	300,34	243,93	138,44
52	375,51	310,62	262,75	153,03
66	420,46	350,48	315,49	173,78

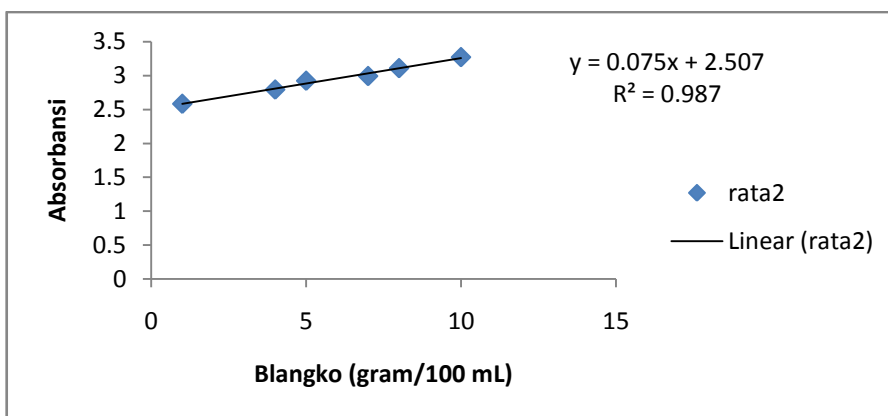
Tabel 3. Data kadar glukosa pada ph 5

Waktu (Jam)	Kadar Glukosa (mg/100ml)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
4	62,75	82,92	85,87	94,09
20	71,52	113,57	241,07	216,86
24	104,15	219,63	244,73	235,52
28	106,26	226,35	336,17	252,25
44	118,27	299,14	352,80	329,03
48	121,38	317,53	413,43	329,74
52	133,87	328,68	445,78	348,94
66	137,61	339,34	548,11	366,31

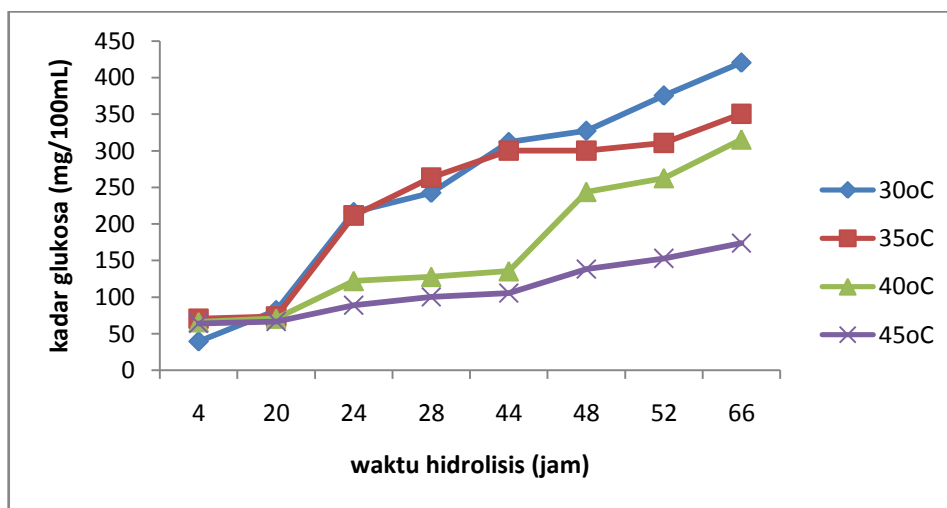
Tabel 4. Data kadar glukosa pada ph 4

Waktu (Jam)	Kadar Glukosa (mg/100ml)			
	30oC	35oC	40oC	45oC
4	62,44	65,80	66,07	68,04
20	86,55	101,03	183,82	93,85
24	101,41	109,52	205,98	113,67
28	120,92	153,85	232,11	115,30
44	189,78	311,10	414,59	119,74
48	226,24	362,86	534,99	140,79
52	274,86	369,12	535,74	143,60
66	363,71	387,52	603,56	151,34

Pembahasan

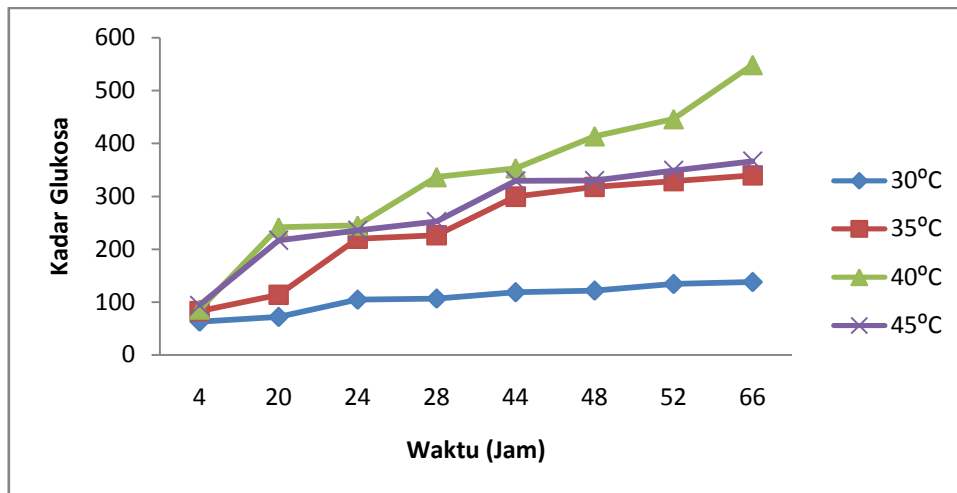


Gambar 1. Kurva standar



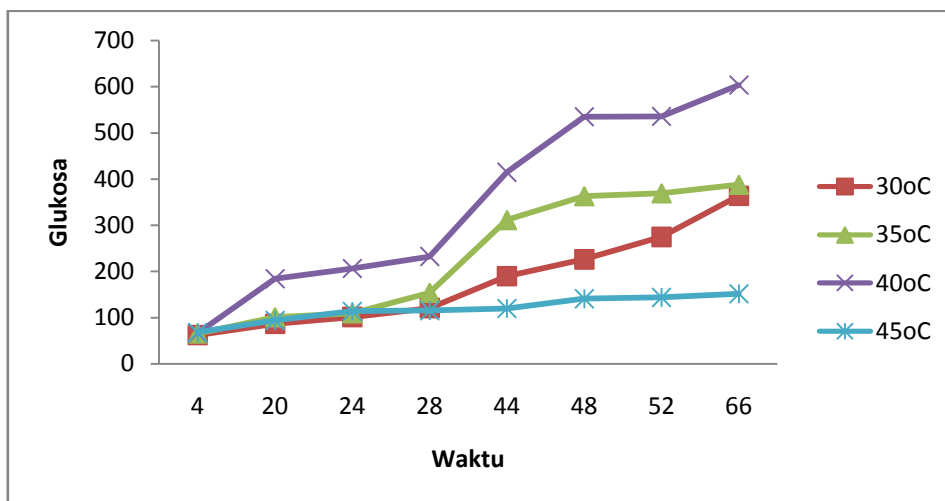
Gambar 2. Pengaruh suhu dan waktu terhadap kadar glukosa (ph 6)

Pada grafik 2 pengaruh suhu dan waktu terhadap kadar glukosa yang dihasilkan pada pH 6, variabel yang digunakan yaitu waktu dan suhu. Waktu yang dipilih 4 jam, 20 jam, 24 jam, 28 jam, 44 jam, 48 jam, 52 jam dan 66 jam sedangkan suhu yang digunakan yaitu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C. Dari grafik diperoleh kadar glukosa yang maksimal yaitu pada suhu 30 °C dan waktu 66 jam yaitu sebanyak 420,46 mg/100ml. Pada grafik juga dapat dilihat semakin lama waktu hidrolisis maka glukosa yang dihasilkan semakin banyak, hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Kodri,dkk (2013). Hasil yang diperoleh, kadar glukosa yang paling banyak pada suhu 30 °C karena pada kondisi pH 6, enzim dapat bekerja secara maksimal pada suhu lingkungan.



Gambar 3. Pengaruh suhu dan waktu terhadap kadar glukosa (ph 5)

Pada grafik 3 pengaruh suhu dan waktu terhadap kadar glukosa yang dihasilkan pada pH 5, variabel yang digunakan yaitu waktu dan suhu. Waktu yang dipilih 4 jam, 20 jam, 24 jam, 28 jam, 44 jam, 48 jam, 52 jam dan 66 jam sedangkan suhu yang digunakan yaitu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C. Dari grafik diperoleh kadar glukosa yang paling tinggi diperoleh pada suhu 40 °C dan waktu 66 jam yaitu sebanyak 548,11 mg/100ml dan kadar glukosa yang paling rendah diperoleh pada suhu 30 °C . Pada grafik juga dapat dilihat semakin lama waktu hidrolisis maka glukosa yang dihasilkan semakin banyak. Pada grafik 3 ini terjadi perbedaan dibandingkan dengan grafik 2, yaitu suhu optimum untuk mendapatkan kadar glukosa yang paling maksimal. Pada grafik 2 diperoleh suhu optimum yaitu 30°C dan pada grafik 3 suhu optimumnya yaitu 40 °C, hal ini disebabkan karena perbedaan kondisi operasi yaitu pada grafik 3 digunakan pH 5. Hal tersebut dikarenakan keaktifan enzim berpengaruh terhadap suhu dan pH, berbeda kondisi pH maka suhu optimumnya juga berbeda.



Gambar 4. Pengaruh suhu dan waktu terhadap kadar glukosa (ph 4)

Pada grafik 3 pengaruh suhu dan waktu terhadap kadar glukosa yang dihasilkan pada pH 5, variabel yang digunakan yaitu waktu dan suhu. Waktu yang dipilih 4 jam, 20 jam, 24 jam, 28 jam, 44 jam, 48 jam, 52 jam dan 66 jam sedangkan suhu yang digunakan yaitu 30°C, 35°C, 40°C, 45°C. Dari grafik diperoleh kadar glukosa yang paling banyak diperoleh pada suhu 40 °C dan waktu 66 jam yaitu sebanyak 603,56 mg/100ml sedangkan kadar glukosa yang paling sedikit diperoleh pada suhu 45 °C dengan waktu 66 jam. Pada grafik juga dapat dilihat semakin lama waktu hidrolisis maka kadar glukosa yang dihasilkan semakin banyak, namun pada waktu tertentu kadar glukosa yang dihasilkan akan tetap bahkan menurun karena substrat selulosa yang dihidrolisis berkurang, serta terbentuk inhibitor yang mempengaruhi keaktifan enzim.

Kesimpulan Dan Saran

Kesimpulan

Dari pembahasan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Kadar glukosa paling banyak diperoleh pada suhu 40 °C, pH 4 dan waktu hidrolisis selama 66 jam yaitu sebanyak 603,56 mg/100ml
2. Semakin lama waktu hidrolisis maka kadar glukosa yang dihasilkan juga semakin banyak
3. PH optimum untuk hidrolisis yaitu antara pH 5 sampai pH 6

Saran

Untuk mendapatkan penelitian yang lebih baik, disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan. Perlu dilakukan pengujian kadar glukosa dengan metode lain sebagai pembandingan terhadap penelitian yang kami lakukan serta menambah variabel yang diperlukan agar memperoleh kadar glukosa yang banyak sehingga bioetanol yang dihasilkan semakin banyak pula.

Daftar Pustaka

- Cheng, J. J., & Timilsina, G. R., (2011). "Status and barriers of advanced biofuel technologies" A review. *Renewable Energy*, Vol: 36, pp. 3541-3549.
- Fitroyah, D.F., (2007), "*Pembuatan Sirup Fruktosa dari Umbi Gembili secara Hidrolisis Enzimatis*", Skripsi. Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, UPN "Veteran" Jawa Timur. Surabaya.
- Girisuta, B., Janssen, L., & Heeres, H. J. (2007), "Kinetic study on the acid-catalyzed hydrolysis of cellulose to levulinic acid" *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Vol. 46, pp. 1696-1708.
- Graf, A. & Koehler, T., (2000), "*Oregon Cellulose-Ethanol study. An Evaluation of the potential for ethanol production in Oregon using cellulose-based feedstock*", Oregon Office of Energy. Oregon.
- Grethlein, H. E., (1984), "Pretreatment for enhanced hydrolysis of cellulosic biomass. *Biotechnology Advances*", Vol. 2, pp. 43-62.
- Kodri. Argo, B., Yulianingsih, R., (2013), "*Pemanfaatan Enzim Selulase dari Tricoderma Reesei Dan Aspergillus Niger Sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatis Jerami Padidengan Pretreatment Microwave*". Jurnal Bioproses Komoditas Tropis Malang.
- Muchtadi, D., Palupi, D., Astwan, N.S., (1992), "*Enzim Dalam Industri Pangan*". Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Pejo, E. T., Oliva, J. M., & Ballesteros, M., (2008), Realistic approach for full scale bioethanol production from lignocellulose : A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, Vol. 67, pp: 874 – 884.
- Prihandana. 2007. "*Bioetanol Ubi kayu Bahan Bakar Masa Depan*", Agromedia. Jakarta.
- Schacht, C., Zetzl, C., & Brunner, G., (2008), "From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology", *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol: 46, pp. 299-321.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K., (2007), "Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review.", *Bioresources*", Vol. 2(3) pp. 472-499.
- Taruna, H., Rita A., Tania S., Sri A., (2010). "*Studi Awal Pemanfaatan Limbah Kertas HVS sebagai Bahan Baku Dalam Proses Pembuatan Etanol*". Universitas Indonesia.
- Tjokroadikoesoemo, s., (1986), "*HFS dan Industri Kayu Lainnya*". Gramedia. Jakarta.
- White, J.G., (2000), "*Oregon perspective on cellulose-to-ethanol*", Oregon Office of Energy. Oregon.