

# PEMBUATAN BIOETANOL DARI JERAMI PADI DENGAN METODE OZONOLISIS – *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION (SSF)*

Novia \*, Astriana Windarti, Rosmawati

\*Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sriwijaya  
Jl. Raya Palembang-Prabumulih KM. 32 Indralaya-Ogan Ilir 30662

## Abstrak

Jerami padi dapat di manfaatkan untuk pembuatan energi alternatif. Hal ini dikarenakan jerami padi mengandung lignosellulosa yang merupakan bahan baku bioetanol generasi-2. Proses hidrolisis dan fermentasi untuk memproduksi bioetanol biasanya dilakukan secara terpisah atau disebut *Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)*. Namun proses tersebut masih kurang efektif karena dilakukan dalam dua buah reaktor dan tidak dilakukan secara berkelanjutan atau simultan. Untuk mengatasi masalah ini, dilakukan proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*. Kelebihan proses ini tanpa melalui tenggang waktu yang lama, dilakukan dalam satu reaktor sehingga dapat menghemat biaya. *Pretreatment* yang dilakukan untuk menguraikan senyawa lignin yang mengikat selulosa adalah proses *alkaline pretreatment* dan ozonolisis. Ozon dapat digunakan untuk mendegradasi lignin dan hemiselulosa pada kebanyakan bahan-bahan biomassa seperti residu hasil pertanian, bagas, jerami, batang jagung, potongan kayu. Metode ini meningkatkan kecepatan hidrolisis enzim. Proses ini juga sangat efektif menyisihkan lignin dan proses tidak menghasilkan residu beracun. Pada penelitian ini variabel yang digunakan adalah lamanya waktu tinggal proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)* dan konsentrasi ragi *saccharomyces cereviceae*. Waktu tinggal yang digunakan mulai dari 3, 4, 5, 6 dan 7 hari. Sedangkan konsentrasi ragi *saccharomyces cereviceae* yang digunakan adalah 10%; 20%; 30%; dan 40%. Dari hasil penelitian yang dilakukan didapat kadar etanol yang tertinggi 5,65336% dengan waktu tinggal 7 hari dan konsentrasi ragi *saccharomyces cereviceae* 40%.

**Kata kunci :** *Bioetanol, Jerami Padi, Ozonolisis, Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*.

## Abstract

The rice straw can be utilized to an alternative energy such as bioethanol. This is due to the rice straw contained the lignosellulose as raw material the second generation of bioethanol. Hydrolysis and fermentation process to produce bioethanol is usually done separately called *Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)*. However, this process is less effective since it was carried out in two reactors. To overcome this problem, the *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)* was chosen. The advantages of this process are the short period of *Saccharification and Fermentation*, occurring in one reactor and saving the production cost. The pretreatment used to decompose the lignin with alkaline pretreatment process and ozonolysis. Ozone can be used to degrade lignin and hemicellulose in the biomass materials such as agricultural residues, bagasse, straw, corn stalks, wood chips. This method can increase the speed of enzymatic hydrolysis. It is very effective to decompose the lignin due to no toxic residue. In this research, the variable used are the residence time of *SSF*, the concentration of yeast *Saccharomyces cereviceae*. The residence time used was from 3, 4, 5, 6 and 7 days. While the yeast *Saccharomyces cereviceae* concentration used was 10 % ; 20 %, 30 % and 40 %. The results showed the highest levels of bioethanol is about 5.65336 % with a residence time of 7 days and the concentration of the yeast *Saccharomyces cereviceae* of 40 %.

**Key Words :** *Bioethanol, Ozonolysis, Rice straw, Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*.

## 1. PENDAHULUAN

Kebutuhan energi dari bahan bakar minyak bumi (BBM) di berbagai negara di dunia dalam tahun terakhir ini mengalami peningkatan yang sangat tajam. Tidak hanya pada negara - negara maju, tetapi juga di negara berkembang seperti Indonesia. Untuk mengantisipasi terjadinya krisis bahan bakar minyak bumi (BBM) pada masa yang akan datang, maka perlu dikembangkan pemanfaatan bioenergi sebagai sumber energi terbarukan.

Salah satu energi alternatif yang mulai dikembangkan baik di Indonesia maupun di berbagai negara di dunia adalah *biofuel*. Bioetanol merupakan salah satu jenis *biofuel* ramah lingkungan dan berasal dari biomassa yang dikembangkan dengan teknologi bioproses. Namun, saat ini sebagian besar produsen bioetanol masih menggunakan bahan baku yang mengandung gula dan pati dan bersumber dari bahan pangan. Hal tersebut akan berdampak buruk bagi penyediaan kebutuhan pangan. Untuk menghindari hal tersebut, maka perlu dikembangkan teknologi yang mampu memproduksi bioetanol dari biomassa limbah agroindustri yang memiliki banyak lignoselulosa. Penggunaan biomassa limbah agro industri untuk memproduksi bioetanol juga mengurangi biaya proses pengolahan biomassa sebelum dibuang ke lingkungan dan dapat mengurangi masalah pencemaran lingkungan [Gomez *et al.*, 1995].

Jerami padi merupakan salah satu bahan baku pembuatan bioetanol generasi-2 karena mengandung selulosa. Selama ini pemanfaatan limbah jerami belum optimal, biasanya jerami digunakan untuk pakan ternak dan sisanya dibiarkan membusuk atau dibakar. Hal ini akan menghasilkan polutan ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_x$ ) yang dapat merusak lingkungan dan penyumbang gas rumah kaca. Oleh karena itu sebaiknya jerami padi diolah menjadi bioetanol.

Produksi jerami padi dapat melimpah tergantung pada variasi lokasi dan varietas tanaman padi yang digunakan. Salah satu bahan yang dapat dihasilkan dari jerami padi ini adalah bioetanol. Hal ini dikarenakan jerami padi mengandung selulosa. Selulosa merupakan komponen utama yang terkandung dalam dinding sel tumbuhan dan mendominasi hingga 50% berat kering tumbuhan. Jerami padi diketahui memiliki kandungan selulosa yang tinggi, mencapai 34.2% berat kering, 24.5% hemiselulosa dan kandungan lignin hingga 23.4%. (Yulianto, 2009)

Produksi bioetanol dari limbah tidak membutuhkan penanaman khusus sehingga tidak perlu perluasan lahan dan penggunaan pupuk kimia. Selain itu, penggunaan limbah juga

membantu mengatasi permasalahan lingkungan seperti polusi air, udara, dan tanah (Noordwijk, 2003).

Salah satu faktor penentu harga produksi bioetanol dari biomassa limbah agroindustri adalah harga enzim pendegradasi biomassa yang mengandung selulosa dan hemiselulosa [Yinbo *et al.*, 2006]. Komponen terbesar polisakarida dalam biomassa adalah selulosa dan hemiselulosa, sehingga untuk memecah komponen-komponen tersebut diperlukan enzim yang spesifik. Proses hidrolisis dan fermentasi untuk memproduksi bioetanol biasanya dilakukan secara terpisah, atau *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF). Namun proses tersebut masih kurang efektif karena dilakukan dalam dua buah reaktor dan tidak dilakukan secara berkelanjutan atau simultan. Untuk mengatasi masalah ini, dilakukan proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Kelebihan proses ini tanpa melalui tenggang waktu yang lama, dilakukan dalam satu reaktor sehingga dapat menghemat biaya.

### Jerami Padi

Padi merupakan tumbuhan *monocotyl* yang tumbuh di daerah tropis. Tanaman padi yang telah siap panen akan diambil butiran – butirannya, sementara batang serta daunnya akan dibuang. Batang dan daun inilah yang disebut dengan jerami. Jerami merupakan salah satu limbah pertanian yang belum dimanfaatkan secara optimal. Selama ini jerami padi digunakan untuk pakan ternak dan media tumbuh jamur. Meskipun demikian jerami masih berlimpah dan terkadang harus dibakar. Sebatang jerami yang telah dirontokkan gabahnya terdiri atas (<http://www.scribd.com/doc/120147579/Biomass-Wes-Ringkes>) :

1. Batang (lidi jerami)  
Bagian batang jerami kurang lebih sebesar lidi kelapa dengan rongga udara memanjang di dalamnya.
2. Ranting jerami  
Ranting jerami merupakan tempat dimana butiran butiran menempel. Ranting jerami ini lebih kecil, seperti rambut yang bercabang – cabang meskipun demikian ranting jerami mempunyai tekstur yang kasar dan kuat.
3. Selongsong jerami  
Selongsong jerami adalah pangkal daun pada jerami yang membungkus batang atau lidi jerami.

Jerami merupakan golongan kayu lunak yang mempunyai komponen utama selulosa. Selulosa adalah serat polisakarida yang berwarna putih yang merupakan hasil dari fotosintesa tumbuh - tumbuhan. Jumlah kandungan selulosa dalam

jerami antara 35 - 40%. Kandungan lain pada jerami adalah lignin, hemiselulosa dan komponen lainnya dalam jumlah sedikit.

Secara umum jerami dan bahan lignoselulosa lainnya tersusun dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Selulosa dan hemiselulosa tersusun dari monomer-monomer gula sama seperti gula yang menyusun pati (glukosa). Selulosa ini berbentuk serat-serat yang terpilin dan diikat oleh hemiselulosa, kemudian dilindungi oleh lignin yang sangat kuat. Akibat dari perlindungan lignin dan hemiselulosa ini, selulosa menjadi sulit untuk dipotong-potong menjadi gula (proses hidrolisis). Salah satu langkah penting untuk biokonversi jerami menjadi etanol adalah memecah perlindungan lignin ini.

**Tabel 1.** Kandungan jerami menurut Karimi (2006)

Komponen	Kandungan (%)
Hemiselulosa	27 ( $\pm$ 0,5)
Selulosa	39 ( $\pm$ 1)
Lignin	12 ( $\pm$ 0,5)
Abu	11( $\pm$ 0,5)

### Ozonolisis

Pembentukan ozon dengan *electrical discharge* ini secara prinsip sangat mudah. Prinsip ini dijelaskan oleh Devins pada tahun 1956. Ia menjelaskan bahwa tumbukan dari elektron yang dihasilkan oleh *electrical discharge* dengan molekul oksigen menghasilkan dua buah atom oksigen. Selanjutnya atom oksigen ini secara alamiah bertumbukan kembali dengan molekul oksigen di sekitarnya, lalu terbentuklah ozon. Dewasa ini, metode *electrical discharge* merupakan metode yang paling banyak dipergunakan dalam pembuatan ozon diberbagai kegiatan industri. Ozon adalah spesies aktif yang mempunyai sifat radikal, memerlukan perhatian khusus dalam penyimpanannya. Kadar 100 persen ozon pada suhu kamar mudah sekali meledak.

Karena sifat oksidatornya yang sangat kuat, maka ozon bisa dimanfaatkan untuk desinfeksi (membunuh kuman), detoksifikasi (menetralkan zat beracun) dan deodorisasi (menghilangkan bau tidak enak) dalam air dan udara. Pemanfaatan ozon telah dilakukan lebih dari seratus tahun yang lalu.

Ozonolisis sebelumnya telah diusulkan sebagai proses *pretreatment* untuk limbah kayu yang banyak digunakan untuk pakan ternak. Daya tarik menggunakan ozon ( $O_3$ ) untuk peningkatan bahan baku disebabkan oleh aksesibilitas kandungan nutrisi dari karbohidrat yang tidak terlarut. sedangkan *pretreatment* lainnya biasanya akan menghasilkan turunan lignin yang tidak diinginkan, ozonolisis umumnya menghasilkan gugus asam karboksilat, seperti asam format, asam

oksalat, asam asetat dan gugus asam dikarboksilat lainnya, yang semuanya dapat dimetabolisme oleh ruminansia (Vidal, 1988).

### Simultan Sakarifikasi dan Fermentasi

Secara umum sintesis bioetanol yang berasal dari biomassa terdiri dari dua tahap utama, yaitu hidrolisis dan fermentasi. Pada metode terdahulu proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara terpisah atau *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF) dan yang terbaru adalah proses *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) atau Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SFS). Satu diantara beberapa keuntungan dari proses SSF adalah hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu wadah atau reaktor sehingga dapat berlangsung secara efisien. Hidrolisis bertujuan untuk memecah polisakarida menjadi monosakarida sehingga dapat langsung difermentasi oleh *yeast*. Pada penelitian ini hidrolisis dilakukan secara biologis, yaitu menggunakan enzim. Enzim merupakan protein yang bersifat katalis, sehingga sering disebut biokatalis. Enzim memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia yang akan berlangsung lama apabila tidak menggunakan enzim. Enzim yang digunakan harus sesuai dengan polisakarida yang akan dihidrolisis.

SSF pertama kali dikenalkan oleh Takagi et al, 1977, yaitu kombinasi antara hidrolisis menggunakan enzim selulase dan *yeast S. cerevisiae* untuk fermentasi gula menjadi etanol secara simultan. Proses SSF sebenarnya hampir sama dengan dengan proses yang terpisah antara hidrolisis dengan enzim dan proses fermentasi, hanya dalam proses SSF hidrolisis dan fermentasi dilakukan dalam satu reaktor.

Keuntungan dari proses ini adalah polisakarida yang terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi polisakarida karena monosakarida langsung difermentasi menjadi etanol. Selain itu dengan menggunakan satu reaktor dalam prosesnya akan mengurangi biaya peralatan yang digunakan. (Samsuri, 2007)

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel pada keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi, terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa akseptor elektron eksternal.

## Bioetanol

Bioetanol adalah etanol yang berasal dari sumber hayati. Bioetanol bersumber dari karbohidrat yang potensial sebagai bahan baku seperti tebu, nira sorgum, ubi kayu, garut, ubi jalar, sagu, jagung: jerami, bonggol jagung dan kayu. Etanol dihasilkan melalui proses fermentasi. Etanol adalah senyawa organik yang terdiri dari karbon, hidrogen dan oksigen, sehingga dapat dilihat sebagai derivat senyawa hidrokarbon yang mempunyai gugus hidroksil dengan rumus  $C_2H_5OH$ . Etanol merupakan zat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan menguap, dapat bercampur dalam air dengan segala perbandingan.

Bioetanol adalah sebuah bahan bakar alternatif yang diolah dari tumbuhan, dimana memiliki keunggulan mampu menurunkan emisi  $CO_2$  hingga 18%. Di Indonesia, minyak bioethanol sangat potensial untuk diolah dan dikembangkan karena bahan bakunya merupakan jenis tanaman yang banyak tumbuh di negara ini dan sangat dikenal masyarakat. Tumbuhan yang potensial untuk menghasilkan bioetanol adalah tanaman yang memiliki kadar karbohidrat tinggi, seperti: tebu, nira, sorgum, ubi kayu, garut, ubi jalar, sagu, jagung, jerami, bonggol jagung, dan kayu.

Banyaknya variasi tumbuhan yang tersedia memungkinkan kita lebih leluasa memilih jenis yang sesuai dengan kondisi tanah yang ada. Sebagai contoh ubi kayu dapat tumbuh di tanah yang kurang subur, memiliki daya tahan yang tinggi terhadap penyakit dan dapat diatur waktu panennya. Namun kadar patinya yang hanya 30%, masih lebih rendah dibandingkan dengan jagung (70%) dan tebu (55%) sehingga bioetanol yang dihasilkan jumlahnya pun lebih sedikit.

Biaya produksi bioetanol tergolong murah karena sumber bahan bakunya merupakan limbah pertanian atau produk pertanian yang nilai ekonomisnya rendah serta berasal dari hasil pertanian budidaya tanaman pekarangan (hortikultura) yang dapat diambil dengan mudah. Dilihat dari proses produksinya juga relatif sederhana dan murah.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan

#### a) Alat

1. Gelas ukur
2. Termometer
3. *Mesh Screening*
4. Neraca Analitik
5. *Blender*
6. Erlenmeyer
7. Buret Titrasi
8. *Hot Plate*

#### 9. *Water bath*

10. Statif
11. Oven
12. Kertas pH
13. Kertas Saring
14. Beaker Gelas
15. Batang Pengaduk
16. Labu Ukur
17. Alat Ozonolisis
18. *Rotary Shaker*
19. Pipet Tetes
20. Auto Klaf
21. *Vacuum dryer*
22. *Refrigerator*
23. *Crusher*

#### b) Bahan

1. Jerami Padi
2. Ragi *saccharomyses cereviceae*
3. Enzim selulase
4. *Aspergillus Nigger*
5. HCl
6. *Aquadest*
7. KI
8. NaOH
9.  $H_2SO_4$
10. Sukrosa
11.  $(NH_4)_2SO_4$
12.  $KH_2PO_4$
13. PDA
14.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
15. Nutrisi Urea
16.  $(KMnO_4)$  0,1 N
17.  $(Na_2SO_3)$  0,1 N
18. (KI) 1 N
19.  $(H_2SO_4)$  4 N
20. *Amylum* 1 %

### Prosedur Kerja

#### Persiapan Bahan Baku

Biomassa berupa jerami padi dihancurkan menggunakan alat pencacah (*Crusher*). Kemudian dikeringkan di panas matahari selama 3 hari. Lalu dipanaskan di oven bersuhu  $45^\circ C$  untuk menghilangkan kandungan air dalam biomassa tersebut. Setelah kering, ukurannya diperkecil dengan alat *blander* lalu diayak untuk memperoleh ukuran jerami 80 *mesh*.

### Delignifikasi

#### 1. Proses Alkaline Pretreatment

Proses dilakukan untuk mengurangi kadar lignin didalam jerami padi dengan menggunakan basa kuat NaOH, 50 gram jerami ditempatkan didalam Erlenmeyer dan di tambahkan NaOH 5% lalu dipanaskan menggunakan *water bath* pada suhu  $85^\circ C$  selama satu jam, dengan rasio NaOH dan jerami padi 1:10, setelah itu jerami di cuci

hingga memiliki pH yang netral kembali dan di keringkan hingga tingkat kadar air yang rendah.

### Proses Ozonolisis

*Pretreatment* ini dilakukan dalam reaktor *fixed bed* pada kondisi kamar. Biomassa dengan ukuran *80 mesh* dimasukkan ke dalam reaktor sebanyak 50 gram. Proses pengozonan dilaksanakan pada tegangan konstan, yakni 8500 volt. Perlakuan terhadap laju alir terdiri dari variabel 5 L/menit dan waktu proses 15 menit. Proses diawali dengan menghubungkan kabel listrik dengan generator listrik. Lalu dipastikan bahwa posisi regulator voltase diset pada titik terendah (nol), sehingga generator ozon masih bertegangan rendah (220 V). Gas oksigen dialirkan, laju alir diatur sesuai kebutuhan, dan dijaga agar tetap stabil. Selanjutnya voltase listrik dinaikkan secara perlahan-lahan sampai pada voltase yang diinginkan.

Sebelum mengozonisasi biomassa, kadar ozon dianalisis terlebih dahulu dengan metode Iodometri. Larutan KI 2% yang dimasukkan ke dalam tabung analisis ke-1 (tabung bawah). Gas yang mengandung ozon dialirkan ke dalam tabung analisis sampai waktu tertentu (pengelembungan */bubbling*). Setelah proses pengelembungan selesai dilakukan, aliran gas yang mengandung ozon dihentikan. Larutan di dalam tabung analisis diambil sebagian dan dititrasi dengan larutan  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , dengan indikator kanji.

Proses ozonolisis jerami padi dilaksanakan di reaktor ozonisasi. 50 gram sampel jerami padi dalam kondisi *moisture content* 10% dimasukkan ke dalam reaktor ozonisasi. Larutan KI 2% dimasukkan ke dalam tabung analisis ke-2 (tabung atas). Gas ozon dialirkan ke dalam reaktor ozonisasi, gas sisa dialirkan ke tabung analisis ke-2. Kandungan ozon sisa reaksi ozonisasi dianalisis sebagaimana pada tabung analisis ke-1 dengan metode Iodometri. Sampel yang telah diozonasi, dianalisa kandungan ligninnya dengan menggunakan metode Kappa.

### Pembuatan Enzim Selulase Dari *Aspergillus Niger*

#### Pembenihan Inokulasi

Mikroba yang digunakan adalah *Aspergillus niger*. Pembenuhan dilakukan pada media Jerami padi secara zig-zag dengan menggunakan kawat inokulasi di dalam cawan petri secara aseptik. Mikroba diinkubasi pada suhu  $\pm 30^\circ\text{C}$  selama 120 jam.

#### Penyiapan Inokulum

Membuat 100 ml media cair yang terdiri dari sukrosa 12,5%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,25 % dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 %. Lalu pH media cair diatur dengan HCl

hingga diperoleh pH = 3 – 4,5. Kemudian ujung kawat ose dicelupkan ke dalam etanol 96 % lalu dipanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah. Selanjutnya biakan *Aspergillus niger* dari media PDA diambil dengan menggunakan kawat ose dan dicelupkan beberapa saat pada media cair hingga tampak keruh. Pekerjaan ini dilakukan di ruang aseptik. Media cair ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu  $\pm 30^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

### Produksi Enzim selulase dalam media cair padat

Jerami padi dicacah dan dikeringkan kemudian dihaluskan. Sebanyak 20 gram jerami padi dimasukkan ke dalam *beaker glass* 250 ml serta ditambahkan nutrisi urea 0,03 gr;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,005 gr dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,0023 gr. Selanjutnya menambahkan 80 ml aquadest ke dalam media tersebut. pH diatur hingga mencapai pH = 5, lalu media disterilkan di dalam auto klaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 15 menit. Media yang telah disterilkan kemudian didinginkan. Suspensi spora *aspergillus niger* ditambahkan sebanyak 10 ml pada media tersebut. Media diinkubasi pada suhu  $\pm 30^\circ\text{C}$  dengan waktu fermentasi 96 jam.

### Pengambilan Enzim

Hasil fermentasi diekstrak dengan *aquadest* sebanyak 100 ml lalu di letakkan pada *rotary shaker* 150 rpm selama 1 jam. Cairan hasil fermentasi dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Enzim yang diperoleh kemudian disimpan di lemari pendingin dan siap untuk digunakan.

### Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

#### Stock pembiakan *Saccharomyces Cerevisiae*

*Saccharomyces Cerevisiae* di *preculture* pada *Potato Dextrose Agar* (PDA) 2%, Agar (0,25 g),  $\text{H}_2\text{O}$  (50ml) dan diinkubasi selama 1-3 hari pada suhu  $28^\circ\text{C}$ , kemudian digunakan sebagai yeast pada proses SSF.

#### Persiapan yeast inoculum

*Saccharomyces Cereviceae* dari stock di-*preculture* pada 50 ml medium (glukosa, 10 g l-1; *yeast extract*, 1,0 g l-1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g l-1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g l-1; dan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 g l-1) dalam 200 ml flask, kemudian diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 24 jam menggunakan orbital *shaker* dengan kecepatan 100 rpm.

#### Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

Medium untuk SSF sebanyak 50 ml terdiri dari sampel jerami padi (2,5 g), nutrients medium (25 ml), 0,05 M HCl (hingga mencapai pH 5.0), enzim selulase 20% (v/v), dan variasi 10%, 20%,

30% dan 40% (v/v) *yeast inoculum*. Sampel, *nutrients* medium dan *buffer* disterilisasi selama 121°C dan 20 menit pada *autoclave*, namun larutan enzim ditambahkan tanpa sterilisasi. *Nutrients* medium terdiri dari 1,0 g l<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan 0,05 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Proses SSF dilakukan pada *rotary shaker* 100 rpm selama 3,4,5,6 dan 7 hari pada suhu ruangan. Sampel diambil dan diuji etanol yang dihasilkan.

### Destilasi

Distilasi dilakukan untuk memurnikan atau memisahkan substrat bioetanol dengan pengotornya. Prosedur distilasi yaitu :

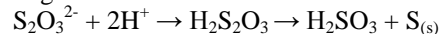
1. Menyiapkan 1 set peralatan destilasi. Lalu merangkai dan menghidupkan peralatan destilasi dengan baik.
2. Memasukkan hasil SSF yang telah disaring ke dalam labu, kemudian memasang labu tersebut pada alat destilasi.
3. Mengatur temperaturnya 79-80°C.
4. Proses destilasi dilakukan selama 1 - 1,5 jam sampai bioetanol tidak menetes lagi.
5. Destilat (bioetanol) yang dihasilkan disimpan di dalam botol yang tertutup rapat.
6. Bioetanol diukur densitasnya dengan menggunakan piknometer.

### Analisa Kadar Ozon

Perhitungan kadar ozon dilakukan dengan metode iodometri. Larutan KI 2% dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml ditambah larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N sebanyak 10 ml dan warna larutan akan berubah menjadi kuning. Lalu titrasi dengan menggunakan larutan Natrium Tiosulfat 0,2 N hingga larutan berubah warna menjadi kuning muda. Selanjutnya tambahkan beberapa tetes indikator kanji berupa Larutan amylum 0,2% hingga larutan berubah warna lagi menjadi biru. Kemudian larutan dititrasi kembali dengan natrium tiosulfat 0,2 N, hingga terjadi perubahan warna dari biru menjadi tidak berwarna (putih bening).

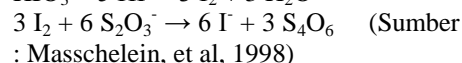
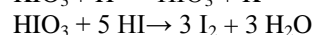
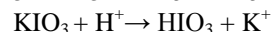
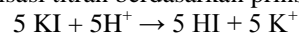
Jumlah ozon ditentukan secara tidak langsung melalui titrasi iodometri. Penentuan jumlah ozon didasari oleh reaksi I<sup>-</sup> dengan O<sub>3</sub> yang menghasilkan I<sub>2</sub> pada kondisi sedikit asam. Selanjutnya jumlah ekuivalen I<sub>2</sub> ditentukan melalui titrasi dengan Natrium Thiosulfat yang sebelumnya sudah distandarisasi dengan Kalium Iodat. Jumlah ekuivalen KI yang kira-kira digunakan untuk menampung ozon ditentukan berdasarkan nilai teoritis ini. Konsentrasi I<sup>-</sup> harus sedikit berlebih agar menambah kelarutan I<sub>2</sub> dalam air, sehingga kemungkinan I<sub>2</sub> yang hilang dapat diperkecil. Larutan KI harus sedikit asam, biasanya dengan penambahan HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dengan konsentrasi tertentu.

Pada kondisi asam, ozon mudah bereaksi dengan I<sup>-</sup> membentuk I<sub>2</sub>. Thiosulfat diuraikan lambat dalam larutan asam dengan membentuk belerang sebagai endapan mirip susu. Reaksinya adalah sebagai berikut :

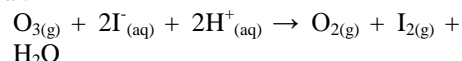


Reaksi diatas tidak akan mengganggu bila titrasi dilakukan dengan cepat dan larutan diaduk dengan baik. Reaksi antara Iod dan Thiosulfat berlangsung lebih cepat daripada reaksi penguraianya. Metode iodometri ini langsung diterapkan pada kisaran 1g/m<sup>3</sup> sampai 200g/m<sup>3</sup> dari ozon, volume dinyatakan pada NTP (*Normal Temperature and Pressure*), yang sama dengan : 0°C atau 273.15 K dan 1.01325 x 10<sup>5</sup> Pa atau 1 Atm (Masschelein, et al, 1998).

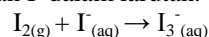
Standarisasi titran berdasarkan prinsip :



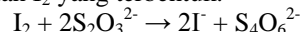
Dalam penentuan jumlah ozon yang dihasilkan dari ozon generator, ozon dialirkan ke dalam wadah tertutup yang berisi larutan KI dengan konsentrasi tertentu. Persamaan reaksi kimianya :



Untuk menghindari I<sub>2</sub> yang terlepas, kelarutan I<sub>2</sub> dalam air dapat diperbesar dengan sedikit kelebihan I<sup>-</sup> dalam larutan.



Selanjutnya Natrium Thiosulfat yang sudah distandarisasi digunakan sebagai titran untuk penentuan I<sub>2</sub> yang terbentuk.



Dari persamaan diatas dapat diketahui perbandingan mol grek antara O<sub>3</sub> dengan I<sup>-</sup> Dimana 1 mol O<sub>3</sub> = 1 mol I<sub>2</sub>, sedangkan 1 mol I<sub>2</sub> = 2 mol I<sup>-</sup>, sehingga 1 mol O<sub>3</sub> = 2 mol I<sup>-</sup>. Jadi, persamaan untuk mengetahui konsentrasi ozon dalam satuan g/L = (1/2 x BM O<sub>3</sub>) x Volume thiosulfat dalam L x Normalitas Thiosulfat dibagi volume inlet gas dalam L (Masschelein, et al, 1998).

### Analisa Kadar Lignin

Sampel dimasukkan sebanyak 3,5 gram ke dalam gelas piala dan ditambahkan 400 ml akuades dan dimasukkan *magnetic stirrer* lalu. Kemudian ditambahkan 50 ml larutan kalium permanganat 0,1 N dan 50 ml larutan asam sulfat 4 N secara bersamaan. Kemudian pengadukan dibiarkan berlangsung selama 10 menit lalu ditambahkan larutan kalium Iodida 1 N sebanyak 10 ml. Selanjutnya dititrasi dengan larutan natrium Tiosulfat 0,1 N hingga larutan berubah warna

menjadi kuning dan ditambahkan indikator amylum 1% hingga larutan berubah warna menjadi biru. Selanjutnya dititrasi hingga larutan tak berwarna (putih bening).

### Analisis Density

Analisis *density* digunakan untuk menganalisa kadar alkohol (bioetanol) yang diperoleh. Analisis *density* ini dilakukan dengan menggunakan alat piknometer 5 ml pada suhu kamar. Dimana prosedur perhitungan *density* dengan menggunakan piknometer yaitu :

1. Menimbang berat piknometer kosong pada suhu kamar sehingga diperoleh **a** gr.
2. Menimbang berat piknometer yang telah berisi *aquadest* penuh pada suhu kamar diperoleh **b** gr.
3. Menghitung volume piknometer dengan menggunakan rumus

$$Vol = \frac{b-a}{0.995797} = c \text{ ml}$$

4. Menimbang berat piknometer yang telah diisi penuh dengan zat (bioetanol) yang akan ditentukan *densitynya* pada suhu kamar diperoleh **d** gr.

$$Density = \frac{\text{berat piknometer sampel} - \text{berat pikno kosong}}{\text{Volume piknometer}}$$

$$Density = \frac{d - a}{c}$$

Dari *density* yang diperoleh, dapat ditentukan kadar alkohol (bioetanol) yang terkandung dengan melihat tabel *density* standar etanol pada suhu kamar. Analisa ini dilakukan terhadap hasil fermentasi yang telah di destilasi, untuk mengetahui kadar alkohol (bioetanol) yang terdapat dalam hasil fermentasi.

### Analisa Gas Kromatografi

Untuk melihat kadar bioetanol yang dihasilkan dengan lebih akurat maka dilakukan analisa dengan menggunakan Gas Kromatografi dengan tahapan analisa sebagai berikut :

1. Sampel disiapkan dengan komposisi belum diketahui dan larutan baku dengan komposisi diketahui.
2. *Running* alat, dengan kondisi suhu maksimum 200°C dan jenis detektor FID (*Flame Ionisation Detector*).
3. Mengatur tekanan manometer pada tabung sebesar 3,5 kg/cm.
4. Mengatur kecepatan gas pembawa (Helium) ke kanan atau ke kiri sebesar 300ml/min.

5. Menyuntikan larutan baku minimal 1µL etanol.
6. Puncak etanol tampak pada kromatogram (alat perekam).
7. Hasil analisa akan tertulis oleh integrator dalam bentuk laporan RT (waktu retensi), AREA (luas puncak), TYPE (tipe puncak), AREA% (persen senyawa dalam larutan).
8. Menyuntikan larutan cuplikan minimal 1µL etanol dan membuat kromatogramnya.
9. Membandingkan antara kromatogram larutan baku dan larutan cuplikan.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Analisa Kadar Lignin

Tabel 2. Kadar Lignin Sebelum dan Sesudah Pretreatment

No.	Keadaan Jerami	Kadar Lignin
1	Sebelum Pretreatment	8,526
2	Sesudah alkaline Pretreatment	4,557
3	Sesudah Ozonolisis	2,352

### Kadar bioetanol didalam jerami padi

Tabel 3. Hasil Analisa Kadar Biotanol Jerami padi

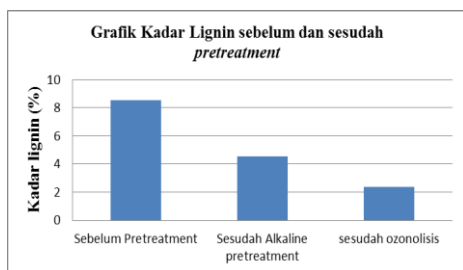
Waktu SSF (Hari)	Konsentrasi Ragi <i>Saccharomyces cereviceae</i>			
	10%	20%	30%	40%
3	1,87008	1,87421	1,88763	1,89692
4	1,87215	1,90001	1,90621	1,91446
5	1,88040	1,90827	2,04999	2,30881
6	2,21759	2,65992	3,63217	4,26310
7	2,23456	3,74127	5,53622	5,65336

### Pengaruh Proses Pretreatment terhadap penurunan kadar lignin

Dari tabel hasil perhitungan kadar lignin hasil analisa dengan menggunakan metode kappa maka didapatkan hubungan seperti gambar 1.

Dari grafik tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa kadar lignin didalam jerami padi mengalami penurunan setelah dilakukan *alkaline pretreatment* dan proses ozonolisis, kadar

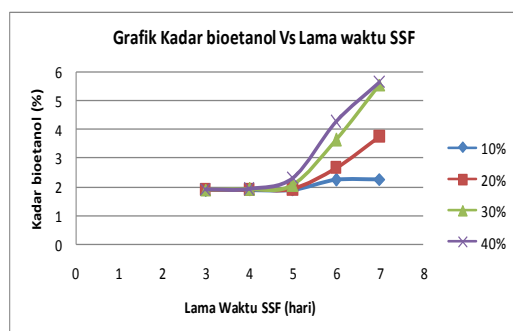
lignin awal yaitu 8,256 % turun menjadi 4,557 % setelah proses *alkaline pretreatment* yang berarti 53,4 % lignin berkurang didalam jerami padi. Jenis alkali yang digunakan adalah basa NaOH dimana basa NaOH dapat mendegradasi kandungan lignin yang ada didalam jerami padi dengan melarutkannya kedalam NaOH. Setelah proses ozonolisis kadar lignin turun hingga mencapai 2,352 % yaitu 51,6 % kadar lignin turun didalam jerami padi hal ini disebabkan karena ozon memiliki sifat oksidasi yang kuat dan bersifat radikal yaitu mudah bereaksi dengan senyawa disekitarnya sehingga mampu mendegradasi kandungan lignin yang ada didalam jerami padi. Banyaknya ozon yang digunakan untuk mendegradasi lignin dalam penelitian adalah 0,011936 g/l yang dihitung dengan menggunakan metode iodometri berdasarkan banyaknya ozon yang terbentuk didalam tabung 1 dan tabung 2 yang perhitungannya terdapat didalam lampiran A. Dalam penelitian ini *Alkaline pre-treatment* dilanjutkan dengan *pre-treatment* ozonolisis adalah untuk menjadikan penurunan kadar lignin yang lebih signifikan.



**Gambar 1.** Perbandingan kadar lignin sebelum dan sesudah *pretreatment*.

### Pengaruh Konsentrasi Ragi Terhadap Kadar Bioetanol Pada Berbagai Variasi Waktu SSF.

Dari tabel hasil perhitungan kadar bioetanol hasil analisa dengan menggunakan metode piknometer maka didapatkan hubungan seperti pada gambar berikut:



**Gambar 2.** Perbandingan kadar bioetanol pada konsentrasi ragi dan hari yang berbeda-beda.

Konsentrasi ragi yang ditambahkan pada proses SSF bervariasi, yaitu 10%, 20%, 30%, dan 40%. Dari gambar 2. terlihat bahwa kenaikan persen bioetanol berbanding lurus dengan penambahan ragi dan lama waktu proses SSF. Lama fermentasi berkaitan dengan pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae*. Seperti mikroorganisme yang lain, pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae* dapat digambarkan dengan kurva pertumbuhan yang menunjukkan masing-masing fase pertumbuhan.

Ada 4 fase pertumbuhan yang meliputi fase adaptasi (lag fase), fase tumbuh cepat (fase log/fase eksponensial), fase stasioner (fase tumbuh konstan), dan fase kematian. Fase adaptasi digambarkan dengan garis kurva dari keadaan nol kemudian sedikit ada kenaikan. Di dalam fase ini *Saccharomyces cerevisiae* mengalami masa adaptasi dengan lingkungan dan belum ada pertumbuhan.

Fase tumbuh cepat yang digambarkan dengan garis kurva yang mulai menunjukkan adanya peningkatan yang tajam. Pada fase ini *Saccharomyces cerevisiae* mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Di dalam fase ini terjadi pemecahan gula secara besar-besaran guna memenuhi kebutuhan pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil pemecahan gula oleh *Saccharomyces cerevisiae* dalam keadaan anaerob menghasilkan alkohol. Kemungkinan dihasilkan alkohol paling tinggi pada fase ini. Fase stasioner digambarkan dengan garis kurva mendatar yang menunjukkan jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang hidup sebanding dengan jumlah yang mati. Fase kematian digambarkan dengan penurunan garis kurva. Pada fase ini jumlah *Saccharomyces cerevisiae* yang mati jumlahnya lebih banyak sampai akhirnya semua *Saccharomyces cerevisiae* mati. Pada penelitian ini ragi *Saccharomyces cerevisiae* hanya dapat dilihat fase lag dan fase eksponensialnya untuk merubah glukosa menjadi bioetanol.

Pada perlakuan dengan menggunakan dosis ragi 10 % didapatkan kadar alkohol yang terbanyak sebesar 2,23 % terbentuk pada proses SSF selama 7 hari. hal ini terjadi karena rendahnya populasi awal sehingga gula yang ada hanya sedikit yang dirombak menjadi alkohol, bila pertumbuhan ragi terhambat maka akan mengakibatkan aktivitas dari raginya akan berkurang, sehingga enzim yang dihasilkan juga berkurang dan alkohol pun akan berkurang juga.

Pengaruh banyaknya kadar ragi pada pembentukan bioetanol berhubungan dengan pertumbuhan sel *saccharomyces sereviceae*, apabila sel tumbuh di dalam medium yang kekurangan nutrisi atau eksese nutrisi, maka waktu fase lag lebih lama. Karena sel harus



menghasilkan enzim yang sesuai dengan jenis nutrisi yang ada. Parameter lain yang mempengaruhi waktu fase lag adalah banyaknya inokulum. Apabila sel yang jumlah sedikit ditumbuhkan dalam media yang volumenya besar, sel akan mengalami fase lag yang lama. Untuk memproduksi biomassa skala besar tujuan yang akan dicapai adalah memperpendek fase lag oleh karena itu untuk memproduksi sel dalam skala besar, diperlukan inokulasi yang relatif besar. Semakin besar konsentrasi ragi maka nutrisi yang diperlukan oleh *saccharomyces cerevisiae* untuk melewati fase lag semakin menurun dan akhirnya *saccharomyces cerevisiae* mampu dengan cepat memproduksi bioetanol dari gula dan menyebabkan pembentukan kadar bioetanol yang semakin banyak karena pemanfaatan glukosa yang optimal. Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa kondisi terbaik dari penelitian ini yaitu pada saat waktu SSF 7 hari dengan konsentrasi ragi 40% yang menghasilkan bioetanol sebanyak 5,65336 %.

Konsentrasi bioetanol dengan proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak (SSF) dapat dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yaitu dengan proses Sakarifikasi Filtrasi Fermentasi (SFF) (Mursyid, 2011), hasil yang diperoleh dari proses SSF lebih tinggi daripada proses SFF. Perbedaan dari proses ini terletak pada enzim yang digunakan. Perbandingan konsentrasi etanol hasil penelitian menggunakan proses SSF dan SFF dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Perbandingan Konsentrasi Bioetanol pada Penelitian ini dengan Penelitian Terdahulu

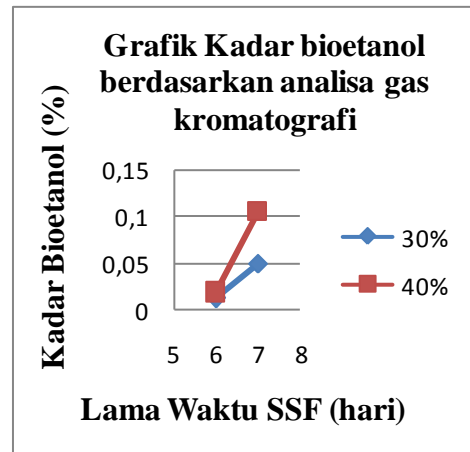
Variabel	SSF	SFF
Bahan Baku	Jerami padi	Jerami padi
Enzim	<i>aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma AA1</i>
Yeast	<i>Sacharomicess cerevisiae</i>	<i>Sacharomicess cerevisiae</i>
Waktu optimum	7 Hari	3 Hari
Konsentrasi Bioetanol maksimum	5,653	1,054

Mursyid, 2011 melakukan proses SFF dengan bahan baku jerami padi. Medium jerami padi diinokulasi dengan spora mutan *Trichoderma AA1* yang diinkubasi selama 3 hari dan didapatkan hasil glukosa. Kemudian medium

larutan glukosa diinokulasi dengan yeast *Sacharomicess cerevisiae* dan diinkubasi secara anaerob selama 3 hari.

#### Analisa Kadar Bioetanol Dengan Menggunakan Gas Kromatografi

Sampel yang dianalisa menggunakan *Gas Chromatograph* merupakan 4 sampel yang memiliki kadar bioetanol tertinggi pada saat analisa menggunakan piknometer.



**Gambar 3.** Grafik Kadar Bioetanol Berdasarkan Analisa Gas Chromatography.

Dari Gambar 3 terlihat bahwa semakin lama waktu SSF dan semakin banyak kadar ragi maka kadar bioetanol semakin naik. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ragi maka semakin sempurna proses pembentukan bioetanol yang dibentuk dari perubahan struktur glukosa.

Dari hasil analisa kadar bioetanol dengan menggunakan *Gas Chromatography* ini juga menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibandingkan dengan metode analisa piknometer, hal ini diduga dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:

- 1) Nilai hasil analisa merupakan densitas campuran sehingga lebih besar jika dibandingkan dengan analisa GC. Sedangkan dengan analisa GC, hanya etanol yang dideteksi untuk diukur nilainya.
- 2) Jarak waktu antara analisa piknometer dengan analisa GC cukup lama.
- 3) Penyimpanan sampel yang tidak terlalu hati-hati sehingga menyebabkan beberapa sampel mengalami penguapan kadar bioetanolnya sebelum mengalami proses analisa GC.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

##### Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan, dapat diambil beberapa kesimpulan :

1. Semakin lama waktu *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF), maka kadar bioetanol yang dihasilkan semakin tinggi. Lamanya waktu SSF menjadikan ragi *saccharomyce cereviceae* memiliki waktu yang lebih optimal dalam memaksimalkan pembentukan bioetanol. Waktu SSF terbaik adalah 7 hari yang merupakan waktu SSF terlama pada penelitian ini dengan kadar bioetanol 5,653% pada saat konsentrasi ragi 40%.
2. Semakin besar konsentrasi ragi, maka semakin tinggi kadar bioetanol yang di hasilkan. Semakin besar konsentrasi ragi maka nutrient yang diperlukan oleh *saccharomyces sereviceae* untuk melewati fase lag semakin menurun dan akhirnya *saccharomyces sereviceae* mampu dengan cepat memproduksi bioetanol dari gula dan menyebabkan pembentukan kadar bioetanol yang semakin banyak karena pemanfaatan glukosa yang optimal. Kadar bioetanol tertinggi adalah 5,653% diperoleh pada saat konsentrasi ragi 40% dan waktu SSF 7 hari.

#### Saran

1. Untuk penelitian selanjutnya, disarankan selain memvariasikan konsentrasi ragi juga diikuti dengan memvariasikan kadar enzim.
2. Untuk penelitian yang selanjutnya disarankan menggunakan waktu SSF lebih lama dengan jarak waktu yang signifikan, agar dapat di lihat perbandingan persen bioetanol dengan jelas.

#### DAFTAR PUSTAKA

Achmadi SS. 1990. *Kimia Kayu*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor : IPB Press

Alvira, P. et. al. 2009. *Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Basedon Enzymatic Hydrolysis*. CIEMAT, Renewable Energy Division, Biomass Unit, Avda. Complutense 22, Madrid 28040, Spain.

Anggorodi.1979. *limit Makanan Ternak Umum*. PT. Gramedia: Jakarta.

Anindyawati, Trisanti.2009. *Prospek Enzim Dan Limbah Lignoselulosa Untuk Produksi Bioetanol*.Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI: Bogor.

Banerjee, Saumita. et.al. 2009. *Evaluation of Wet Air Oxidation as a Pretreatmentstrategy for Bioethanol Production from Rice Husk and Process Optimization*. Environmental Biotechnology Division, National Environmental Engineering Research

Institute, Nehru Marg, Nagpur 440 020 Maharashtra, India.

Chen, Hongzhang & Weihua Qiu. 2010. *Key Technologies for Bioethanol Production from Lignocellulose*. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China.

Considine, Douglas.1996. *Van Nostrand Scientific's Encyclopedia*. New York. Van Nostrand Reinhold Company.

Fessenden & Fessenden. 1986. *Kimia Organik, Jilid 2*, Jakarta : Gramedia.

Freudenberg, K. 1920. *Die chemie der &turlichen Gorbstoffe*. Berlin, Germany, Springer.

Gomez, A.A & Kwanchai A. (1995). *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian* [Edisi kedua]. Terjemahan Endang Sjamsuddin dan Justika S. Baharsjah. Jakarta: Universitas Indonesia (UI-Press).

Gullichsen, J. & Paulapuro, H. (2000). *Papermaking Science and Technology, Book 3: Forest Products Chemistry*. Fapet Oy, Helsinki, Finland.

Hartono, R. et. al. 2010. *Pemutihan Pulp Eceng Gondok Menggunakan Proses Ozonolisis*

Holliday, R.L., Y.M. Jong and J.W. Kolis, 1998. *Organic synthesis in subcritical water: Oxidation of alkyl aromatics*. J. Supercritic. Fluid, 12: 255-260. DOI: 10.1016/S0896 8446(98)000849.

Hormeyer, H.F., W. Schwals, G. Bonn and O. Bobleter, 1988. *Hydrothermolysis of birchwood as pretreatment for enzymatic saccharification*. *Holzforschung*, 42: 96-98. DOI: 10.1515/hfsg.1988.42.295/1988.

Kaparaju, P & M. Serrano, dkk. 2009. *Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept*. *Bioresour. Technol.*, 100: 2562-2568. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.011.

Masschelein, W.J. (1998), "Ozone generation: use of air, oxygen, or air simpsonized with oxygen", *Ozone Science and Engineering*, 20, 191-203.

Mursyid, Ali & dkk. 2011. *Fermentasi Etanol Dari Jerami Padi*. Universitas Veteran Bangunan Nusantara: Yogyakarta

Samsuri, M & dkk. 2007. *Pemanfaatan Sellulosa Bagas Untuk Produksi Ethanol Melalui Sakarifikasi Dan Fermentasi Serentak Dengan Enzim Xylanase*. Universitas Indonesia : Depok.

Vidal, P. F. and J. Molinier. 1988. *"Ozonolysis of lignin - Improvement of in vitro*

- digestibility of poplar sawdust.*". Biomass 16(1): 1-17.
- Wulandari, Annissa. 2012. Studi Awal Fermentasi Air Perasan Jerami Padi Menjadi Bioetanol dengan Ragi Komersial. <http://digilib.itb.ac.id/gdl.php?mod=browse&op=read&id=jbptitbpp-gdl-annissawul-26767>. Diakses pada tanggal 24 Oktober 2012
- Yinbo, Q., M. Zhu, K. Liu, X. Bao, dan J. Lin. 2006. *Studies on Cellulosic Ethanol Production for Sustainable Supply of Liquid Fuel in China*. *Biotechnology J.* 1: 1235-1240.
- Yulianto, M.E & Dkk. 2009. *Pengembangan Hidrolisis Enzimatis Biomassa Jerami Padi Untuk Produksi Bioetanol*. UNDIP : Semarang.