

Sakarifikasi Dan Fermentasi Bagas Menjadi Ethanol Menggunakan Enzim Selulase Dan Enzim Selobiase

Misri Gozan¹, Muhammad Samsuri^{1,3}, Fani Siti H.², Bambang P.² dan M. Nasikin¹

¹Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia, Depok 16424, Indonesia

²Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong Science Center, Indonesia

³Kementerian Negara Riset dan Teknologi, Indonesia

E-mail : msysamsuri@ristek.go.id

Abstrak

Pengembangan bioetanol dari biomassa berbasis lignoselulosa seperti bagas merupakan salah satu sumber energi alternatif yang cukup berpotensi untuk diterapkan di Indonesia. Selain karena sumber bahan bakunya yang melimpah di negara kita, prosesnya juga ramah lingkungan. Pada penelitian ini telah dilakukan konversi selulosa pada bagas menjadi etanol menggunakan teknologi sakarifikasi dan fermentasi serentak atau *Simultaneous Sacharification and Fermentation (SSF)* dengan menggunakan enzim selulase dan selobiase. Pada proses sakarifikasi, enzim selulase akan memecah polimer selulosa menjadi glukosa sedangkan enzim selobiase akan memecah selobiosa (disakarida) menjadi glukosa. Selanjutnya glukosa melalui fermentasi diubah menjadi etanol dengan menggunakan yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Variasi yang dilakukan meliputi variasi pH sistem yaitu pH 4 ; 4,5 dan 5, penambahan HCl konsentrasi rendah pada pH 5 dengan variasi konsentrasi 0,5 % dan 1 %, serta variasi jenis sampel pada pH 5 dimana bagas biasa tanpa pretreatment dibandingkan dengan bagas yang telah dilakukan pretreatment menggunakan jamur *Lentinus edodes* selama 4 minggu. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan enzim selulase dan selobiase dengan kondisi optimum pH 5 menghasilkan konsentrasi etanol yang lebih tinggi daripada penggunaan enzim selulase saja pada kondisi pH yang sama. Untuk konsentrasi substrat 50 g/L, pada penggunaan enzim selulase dan selobiase, konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan bagas tanpa pretreatment adalah sebesar 5,62 g/L atau 11,24 % dari bagas. Pada penambahan HCl, konsentrasi etanol tertinggi dihasilkan oleh konsentrasi 1 % sebesar 6,52 g/L atau 13,04 % dari bagas. Dengan bagas *L. Edodes* dan *P. Ostreatus* dihasilkan konsentrasi etanol yang lebih tinggi lagi yakni sebesar 6, 86 g/L dan 6,50 g/L atau 13,72% dan 12,99% dari bagass. Ini juga menunjukkan bahwa penambahan HCl konsentrasi rendah serta pretreatment dengan jamur pelapuk putih *L. edodes* dapat meningkatkan kuantitas etanol yang dihasilkan dari konversi bagas.

Kata kunci : Bioetanol, bagas, selulase, selobiase dan *saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The bioetanol development from biomass bases of lignocellulose like bagasse is one of alternative energy which has potential to be applied in Indonesia. Beside of raw material source that is so many in our country, the process is also environmentally friendly. Conversion of bagasse becomes etanol using *Simultaneous Sacharification and Fermentation (SSF)* technology by cellulase and cellobiase enzyme had been done on this research. Sacharification process or hydrolysis process, cellulase enzyme will break cellulose polimer becomes glucose whereas cellobiase enzyme will break cellobiose becomes glucose. Then, glucose through fermentation is changed to etanol by using yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The variations include pH of system that is pH 4 ; 4,5 and 5, HCl addition low concentrated HCl at pH 5 with variation of concentration that is 0,5 % and 1 %, also variation of sample at pH 5 where bagasse without pretreatment is compared with bagasse which had been done pretreatment by using fungi *Lentinus edodes* for 4 weeks. The result shows that the use of cellulase and cellobiase enzyme with system optimum condition pH 5 produce etanol concentration is higher than using only cellulase enzyme at the same pH condition. For substrate concentration 50 g/L, on the use of cellulase and cellobiase, the highest etanol concentration which is produced bagasse without pretreatment is 5,62 g/L or 11,24 % from bagasse. On HCl addition, the highest etanol concentration is produced by concentration HCl 1 % with amount 6,52 g/L or 13,04 % from bagasse. With bagasse *L. edodes* and *P. ostreatus* 6 weeks, the highest etanol concentration that is 6, 86 g/L and 6,50 g/L or 13,72% and 12,99% from bagasse. It also shows that HCl addition low concentrated and pretreatment by white rot fungi *L. edodes* and *P. ostreatus* can increase the etanol quantity that is produced from bagasse conversion.

Keywords : Bioetanol, bagasse, cellulase, cellobiase and *saccharomyces cerevisiae*.

1. Pendahuluan

Kebutuhan energi dunia termasuk Indonesia di dalamnya semakin meningkat dari tahun ke tahun. Lebih dari 80% kebutuhan energi dunia dipenuhi oleh bahan bakar fosil yang berasal dari minyak bumi dan gas alam[1]. Tingkat pertumbuhan pemakaian energi bahan bakar minyak (BBM) di negara kita Indonesia cukup tinggi yakni mencapai 5,6 % per tahun[2]. Namun sangat disayangkan peningkatan konsumsi energi ini tidak disertai dengan produksi energi yang memadai. Saat ini, produksi bahan bakar sektor migas semakin menurun karena sumbernya yang semakin menipis di lapisan bumi. Kita tidak mungkin terus mengandalkan minyak bumi sebagai pasokan energi karena minyak bumi adalah sumber energi yang tidak dapat diperbaharui (*unrenewable resources*) dan suatu saat akan habis.

Pengembangan bioetanol dari biomassa yang banyak mengandung lignoselulosa seperti bagas merupakan salah satu energi alternatif yang cukup berpotensi untuk diterapkan di Indonesia. Selain karena sumber bahan bakunya yang melimpah di negara kita, produksi bioetanol dari bagas juga ramah lingkungan serta membutuhkan biaya yang relatif murah. Bioetanol dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar substitusi bensin dan sebagai bahan campuran premium. Etanol juga dapat dicampur secara langsung ke dalam bensin dengan campuran 10% etanol dan 90 % bensin yang biasa disebut gasohol.

Produksi etanol dari lignoselulosa seperti bagas dapat dilakukan dengan teknologi hidrolisis menggunakan asam sulfat (H_2SO_4) atau asam klorida (HCl). Namun dengan cara ini dihasilkan yield etanol yang kecil[3]. Selain itu, biaya produksinya besar karena menggunakan bahan kimia yang relatif mahal, menimbulkan masalah korosi serta kurang ramah lingkungan karena penggunaan asam pada proses hidrolisisnya. Cara yang lebih baik untuk produksi bioetanol yaitu dengan pengembangan teknologi bioproses dengan pendekatan enzimatik. Bioproses

dengan menggunakan enzim menghasilkan efisiensi sakarifikasi yang tinggi sehingga *yield* etanolnya besar. Teknologi ini juga diyakini sebagai suatu proses yang lebih ramah lingkungan karena menggunakan enzim pada proses hidrolisisnya[4]. Hasil sakarifikasi selanjutnya difermentasi menggunakan mikroorganisme. Proses ini disebut sistem sakarifikasi dan fermentasi serentak atau SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*).

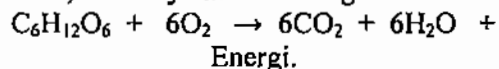
Diperkirakan kandungan polisakarida pada tebu mencapai lebih dari 70% yang terbagi selulosa 50%-55% dan hemiselulosa 15%-20%. Kandungan lignin diperkirakan hanya sekitar 20-30%. Pada biomassa lignoselulosa hanya selulosa dan hemiselulosa yang bisa diolah menjadi monosakarida untuk pembuatan etanol.

Pada proses produksi etanol dari bagas, sebelum dilakukan SSF dapat dilakukan perlakuan awal dengan menggunakan jamur pelapuk putih (*white rot fungi*) dan pemanasan pada suhu tinggi (*steaming*) yang bertujuan untuk meningkatkan konversi etanol dari bagas agar lebih optimal[5]. Hal ini dikarenakan *pretreatment* dengan jamur pelapuk putih dan *steaming* dapat menghancurkan kandungan lignin pada bagas yang mempersulit kerja enzim dalam mengakses keberadaan selulosa.

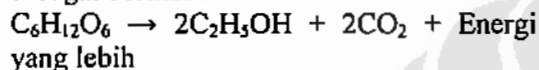
Pada penelitian ini dilakukan konversi bagas menjadi etanol dengan teknologi SSF menggunakan enzim selobiose dan selulase. Selobiosa adalah dua molekul glukosa yang saling berikatan. Jadi, selobiosa merupakan disakarida dari selulosa. Enzim selobiose akan memecah selobiosa menjadi glukosa. Enzim selulase akan memecah selulosa menjadi glukosa. Selanjutnya hasil sakarifikasi tersebut difermentasi menjadi etanol dengan menggunakan yeast *Sacharomyces cerevisiae*. Dengan penggunaan enzim selulase dan selobiose secara serentak ini diharapkan kuantitas etanol yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan enzim selulase saja.

Glukosa yang telah tersedia akan digunakan oleh *yeast* untuk proses respirasi.

Pada proses ini akan dihasilkan energi bagi yeast tersebut. Energi dari proses respirasi akan digunakan oleh yeast untuk melakukan aktivitas kehidupannya. Secara umum, reaksinya adalah sebagai berikut :



Berdasarkan pada reaksi diatas terlihat bahwa proses respirasi memerlukan oksigen sampai kadar tertentu. Oleh karena wadah fermentasi yang ditutup rapat dan suplai oksigen di dalam sistem berkurang maka kondisi untuk terjadi reaksi diatas tidak terpenuhi, maka terjadi proses fermentasi yakni perubahan glukosa menjadi etanol oleh ragi *S. cerevisiae*. Reaksi pembentukan etanol dari glukosa yakni sebagai berikut :



yang lebih sedikit

Selain itu, pada penelitian ini juga dilakukan variasi pH sistem dan penambahan asam kuat konsentrasi rendah serta penggunaan bagas yang telah di-pretreatment dengan jamur pelapuk putih. Derajat keasaman (pH) sistem merupakan faktor penting yang mempengaruhi kehidupan yeast. Variasi pH dilakukan untuk menemukan kondisi optimum pH dimana yeast tumbuh dan beraktivitas optimal sehingga etanol yang dihasilkan tinggi. Penambahan asam kuat konsentrasi rendah juga dapat meningkatkan kuantitas etanol yang dihasilkan karena ion H^+ pada asam kuat dapat memutuskan ikatan glikosid pada selulosa[6,7]. Penggunaan bagas yang telah di-pretreatment dengan jamur pelapuk putih pada penelitian ini akan dibandingkan etanol yang dihasilkannya dengan penggunaan bagas tanpa pretreatment.

2. Percobaan

Penelitian dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

2.1. Persiapan sampel

Bagas dihaluskan (kurang lebih 30-60 mesh) sehingga ukuran partikel lebih

seragam, kemudian dikeringkan dengan oven selama 1 jam pada suhu 60-70°C sehingga kadar air maksimal 10% dan disimpan di tempat yang kering. Pada penelitian ini digunakan 2 jenis bagas yaitu bagas biasa tanpa pretreatment dan bagas yang telah di-pretreatment dengan jamur pelapuk putih *Lentinus edodes* selama 4 minggu.

2.2. Stock pembiakan *S. cerevisiae*

S. cerevisiae di-preculture pada Potato Dextrose Agar (PDA) 2%, Agar (0,25 g), H_2O (50ml) dan diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu 28 °C, kemudian digunakan sebagai yeast pada proses SSF.

2.3. Persiapan yeast inokulum

S. cerevisiae dari stock di-preculture pada 50 ml medium (glukosa, 10 g l⁻¹; yeast ekstrak, 1,0 g l⁻¹; KH_2PO_4 , 0,1 g l⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 g l⁻¹; $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g l⁻¹, dan air aquades), lalu di-autoclave selama 20 menit. Selanjutnya didiamkan agar dingin kembali, kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam menggunakan orbital shaker dengan kecepatan 100 rpm.

2.4. Pengkondisian selama SSF

Pada tabung reaksi, dimasukkan secara berurutan 0,25 g sampel bagas, selulase 10 FPU (*Filter Paper Unit*) setara dengan 0,016 g, selobiase 10 FPU, dan 2,5 ml yeast inokulum, 0,5 ml Na-citrate buffer (variasi pH 4 ; 4,5 dan 5,0), dan medium nutrient 2,5 ml. Sampel, medium nutrient, dan citrate buffer disterilisasi pada suhu 121 °C selama 20 menit dengan menggunakan autoclave, namun enzim ditambahkan tanpa sterilisasi. Medium nutrient terdiri dari 1,0 g l⁻¹ $(NH_4)_2PO_4$; 0,05 g l⁻¹ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ dan 2 g l⁻¹ yeast ekstrak. Kultivasi diambil dan dimasukkan dalam test tube sebanyak 5.0 ml kemudian disentrifugasi menggunakan orbital shaker pada kecepatan 100 rpm selama 96 jam pada suhu 35 °C. Cairan bersih sampel diambil dengan sampling 24, 48, 72 dan 96 jam dan diuji etanol yang dihasilkan.

Pada variasi penambahan asam kuat konsentrasi rendah, 1 ml HCl (variasi konsentrasi 0,5 % dan 1%) ditambahkan

pada tabung reaksi setelah sampel bagas dimasukkan. Buffer sitrat yang digunakan untuk variasi penambahan HCl dan sampel bagas LE 4W adalah sebesar 0,5 ml dengan pH 5. Yeast inokulum dan medium nutrient yang digunakan pada variasi penambahan HCl masing-masing sebanyak 2 ml.

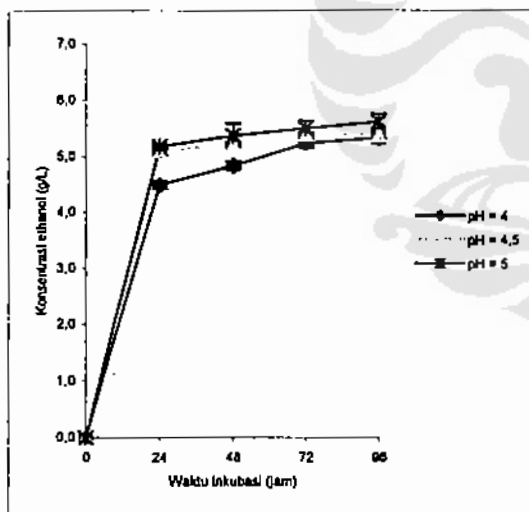
2.5. Penentuan Konsentrasi Etanol

Konsentrasi etanol ditentukan dengan metode kromatografi gas (*Gas Chromatography*) jenis SUPEL COWAX-10 (Supelco Inc., 0,53 mm i.d., 15 m, 0,5 mm, FID) pada temperatur 50°C. Sebelum pengujian, sampel diambil 50 µl dan ditambah 200 µl distilled water (5 kali pengenceran).

3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

3.1. Pengaruh Harga pH Terhadap Konversi Bagas Menjadi Etanol

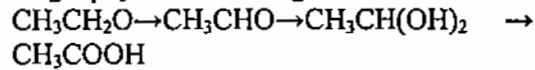
Tabel 1.
Konsentrasi Etanol Dengan Variasi pH



Gambar 1.
Kurva Hubungan Waktu Fermentasi Dengan Konsentrasi Etanol Pada Variasi pH

Peningkatan konsentrasi etanol pada pH 4, 4,5 dan 5 hingga jam ke-72 menunjukkan bahwa yeast berada pada fase eksponensial (*log phase*). Hal ini terlihat pada Tabel 1 dan Gambar 1 Pada jam ke-72 hingga jam ke-96, yeast mengalami fase stasioner yang menunjukkan yeast sudah tidak bekerja lagi secara optimal. Fase tersebut disebabkan

kadar glukosa yang semakin berkurang dan pembentukan produk samping dari fermentasi. Produk samping tersebut berupa asam asetat yang terbentuk dari etanol yang mengalami reaksi lanjut[8,9]. Reaksi lengkapnya adalah sebagai berikut :



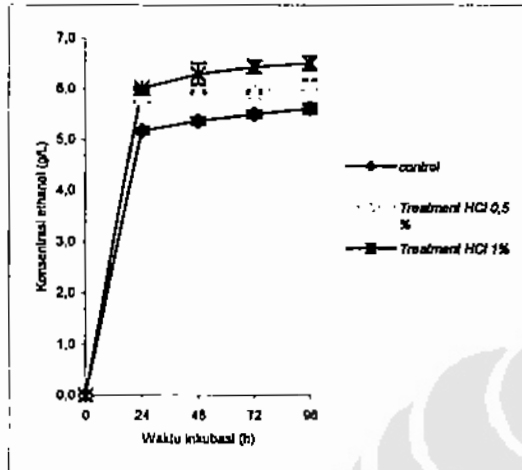
Etanol Asetaldehid Asetaldehid hidrat
Asam asetat

Stasionernya konsentrasi etanol pH 5 yang mulai terjadi pada rentang waktu jam ke-48 dan jam ke-72 disebabkan meningkatnya gugus OH sehingga pH sistem naik. Oleh karena konsentrasi etanol tertinggi pH 5 dicapai pada jam ke-96 dan etanol mempunyai gugus OH yang bersifat basa maka gugus OH pada jam ke-96 meningkat yang pada akhirnya menaikkan pH sistem. Meskipun pada saat tersebut kondisi pH sistem sempat berada di bawah pH optimum dari yeast *Saccharomyces cerevisiae*, pada jam ke-72 terjadi peningkatan kembali walaupun tidak signifikan konsentrasi etanol yang menandakan bahwa pH sistem dapat kembali dipertahankan pada kondisi optimumnya. Hal ini terjadi juga karena kemungkinan adanya produk samping fermentasi yang berupa asam asetat[8] yang membantu menurunkan pH sistem sehingga dapat kembali pada posisi pH optimum. Konsentrasi tertinggi yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah pada pH 5 dengan waktu inkubasi 96 jam yaitu sebesar 5,62 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa pH 5 merupakan kondisi yang lebih optimum daripada pH 4 dan 4,5.

3.2. Pengaruh Konsentrasi HCl Terhadap Konversi Bagas Menjadi Etanol

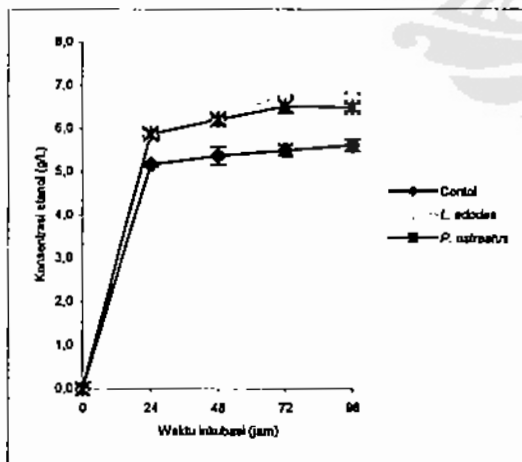
Konsentrasi asam kuat HCl 1 % lebih besar daripada HCl konsentrasi 0,5 % sehingga ion H⁺ yang dihasilkan HCl 1 % juga lebih banyak daripada penambahan HCl 0,5 %. Seperti penjelasan sebelumnya bahwa ion H⁺ mampu memecah ikatan glikosid pada selulosa[6], dengan begitu akan lebih banyak glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis (sakarifikasi)[7]. Konsentrasi etanol tertinggi dihasilkan

sistem dengan penambahan HCl 1 % adalah sebesar 6,56 g/L atau 13,04 % dari bagas dan nilai ini lebih tinggi daripada penambahan HCl 0,5 % maupun tanpa penambahan HCl dengan sistem pH yang sama yaitu pH 5. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2.
Kurva Hubungan Waktu Fermentasi Dengan Konsentrasi Etanol Pada Variasi Konsentrasi HCl

3.3. Pengaruh Jenis Sampel Terhadap Konversi Bagas Menjadi Etanol



Gambar 3.
Kurva hubungan Waktu Fermentasi Dengan Konsentrasi Etanol Pada Perlakuan Awal Menggunakan Jamur Pelapuk Putih

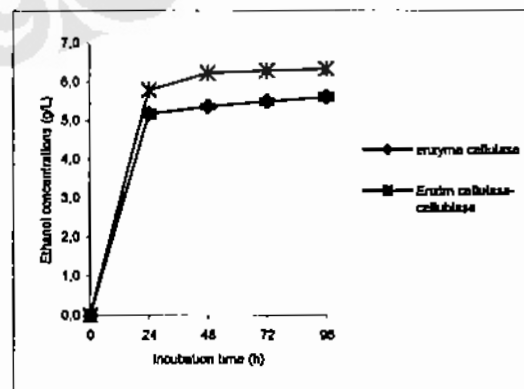
Pada Tabel 3 dan Gambar 3 terlihat bahwa bagas dengan perlakuan *L. Edodes* dan *P. Ostreatus* selama 6 minggu dapat

mencapai konsentrasi etanol tertinggi sebesar 6,68 g/L dan 6,50 g/L atau 13,72% dan 12,99% dari bagas. Nilai ini lebih tinggi daripada bagas biasa tanpa *treatment* awal. Hal ini dikarenakan perlakuan awal secara biologis dengan menggunakan jamur pelapuk putih *Lentinus edodes* dan *Pleurotus ostreatus* selama 6 minggu mampu menghancurkan jaringan lignin yang kuat pada bagas[10]. Jaringan lignin mempersulit kerja enzim dalam mengakses keberadaan selulosa, tapi karena kemampuan jamur pelapuk putih *Lentinus edodes* dan *Pleurotus ostreatus* dalam mendegradasi jaringan lignin tersebut, enzim dapat lebih mudah melakukan sakarifikasi pada selulosa dan mengubahnya menjadi glukosa.

3.4. Pengaruh Enzim Selulase dan Selobiase Terhadap

Konversi Bagas Menjadi Etanol

Enzim adalah protein yang bersifat katalis (biokatalis) yang memiliki kemampuan mengaktifkan senyawa lain secara spesifik dan dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Reaksi kimia ini akan berjalan lambat jika tidak menggunakan enzim. Enzim dapat mempercepat reaksi kimia karena enzim bekerja dengan menurunkan energi aktivasi dari reaksi tersebut[11].



Tabel 4.
Perbandingan Konsentrasi Etanol Tertinggi Pada Penggunaan Enzim Selulase dan Selobiase Dengan Penggunaan Enzim Selulase Saja.

Penggunaan enzim selulase dan selobiase menghasilkan konsentrasi etanol

yang lebih tinggi daripada penggunaan enzim selulase saja dengan pH sistem yang sama yaitu pH 5. Pada Gambar 4 ditunjukkan konsentrasi etanol dalam SSF menggunakan enzim cellulase dan cellubiase pada pH 5 nilai tertinggi sebesar 6,32 g/L atau 12,95 % dari bagas dan ini lebih tinggi daripada konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan hanya menggunakan enzim selulase saja yang besarnya 5,62 g/L atau 11,24 % dari bagas. Hal ini terjadi karena Enzim selulase dapat memecah selulosa pada bagas menjadi glukosa dan selobiase berfungsi memecahkan selobiosa yang merupakan disakarida menjadi glukosa [12]. Penggunaan enzim selulase dan selobiase secara simultan mengakibatkan akan lebih banyak selobiosa pada sistem yang dapat dipecah menjadi glukosa. Oleh karena glukosa yang dihasilkan lebih banyak, etanol yang dihasilkan juga lebih tinggi konsentrasinya dibandingkan dengan penggunaan enzim selulase saja.

4. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penggunaan enzim selulase dan selobiase secara serentak pada produksi bioetanol dari bagas menghasilkan konsentrasi etanol lebih tinggi daripada dengan penggunaan enzim selulase saja. Konsentrasi etanol tertinggi menggunakan enzim cellulase dan cellubiase pada pH 5 sebesar 6,32 g/L atau 12,95 % dari bagas dan ini lebih tinggi daripada konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan hanya menggunakan enzim selulase saja yang besarnya 5,62 g/L atau 11,24 % dari bagas.
2. Derajat keasaman (pH) 5 merupakan kondisi pH sistem yang paling optimum. Pada penggunaan enzim selulase dan selobiase, konsentrasi etanol tertinggi dihasilkan oleh pH 5 sebesar 5,62 g/L atau 11,24 % dari bagas.
3. Semakin tinggi konsentrasi asam pada variasi penambahan HCl maka semakin besar konsentrasi etanol yang dihasilkan. Pada penambahan HCl 1 %

dengan enzim selulase dan selobiase, konsentrasi etanol tertinggi yang dihasilkan mencapai 6,52 g/L atau 13,04% dari bagas sedangkan pada penambahan HCl 0,5 % lebih kecil yakni sebesar 6,08 g/L atau 12,16% dari bagas.

4. Jenis sampel bagas yang telah dilakukan perlakuan awal (*pretreatment*) dengan jamur pelapuk putih *Lentinus edodes* dan *Pleurotus ostreatus* selama 6 minggu dapat meningkatkan konsentrasi etanol yang dihasilkan. Ethanol yang dihasilkan sebesar 6,86 g/L dan 6,50 g/L atau 13,72% dan 12,99% dari bagas

Daftar Acuan

- [1]. Anonim, The International Energy Agency. <http://www.energi.lipi.go.id/utama>. April 2006.
- [2]. Anonim, Pusat Informasi Energi. <http://www.esdm.go.id/content>. April 2006
- [3]. Rajoka, M.I., Yasmin, A., Latif. Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamylase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. <http://www.blackwell-synergy.com>. April 2006.
- [4]. Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., Xiao, Z., Zhang, X., Saddler, J., 2004. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 473-481.
- [5]. Samsuri, M. 2006. Pengaruh perlakuan jamur pelapuk putih dan steaming pada produksi etanol dari bagas melalui proses sakarifikasi dan fermentasi serentak (SSF). Teknik gas dan petrokimia Universitas Indonesia, Depok. pp 1-21.
- [6]. Lee, Sunggyu. *Alternative Fuels*. Taylor & Francis Publisher. 1996.
- [7]. Qian xiang, Y. Y. Lee, Par o. Petterson, and Robert W. Torget.

Heterogeneous Aspect of Acid Hydrolysis of α -Cellulose.

- [8]. Sjostrom, Eero. *Kimia Kayu* edisi 2. Gadjah Mada University Press, 1998.
- [9]. Crueger, Wulf dan Anneliese Crueger. *Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology*. Science Tech, Inc. Madison, 1986
- [10]. Itoh. H., Wada. M., Kuwahara. M., Watanabe. T., 2003. *Bioorganosolve Pretreatment for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Beech Wood by Etanolysis and White Rot Fungi*. *J. Biotechnol.* 103,273-280.
- [11]. Schuler, Michael L and Fikret Korgi. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice Hall. 1992. USA.
- [12]. Anonim, Cellulase. <http://www.wikipedia.com>. April 2006.

