



PRODUKSI BIOETANOL DARI BAGAS SORGUM MANIS MELALUI SAKARIFIKASI DAN FERMENTASI SIMULTAN (SSF) KONVENSIONAL MENGUNAKAN *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Bioethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse by Conventional Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) using Trichoderma reesei and Saccharomyces cerevisiae

Essa Annisa Syadiah*, Khaswar Syamsu

Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Peternakan
Universitas Sembilanbelas November Kolaka, Sulawesi Tenggara, Indonesia1
Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia2

* syadiahessa@gmail.com

ABSTRAK

Bagas sorgum manis (*Sorghum bicolor* L. Moench) merupakan hasil samping industri gula dari nira sorgum manis yang dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi bioetanol dari bagas sorgum manis menggunakan *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Teknik Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SSF) konvensional adalah teknik SSF produksi bioetanol dengan aerasi penuh atau tidak direkayasa. Penggunaan teknik SSF memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan teknik sakarifikasi dan fermentasi terpisah (SHF), yaitu waktu proses produksi yang dibutuhkan lebih pendek, meningkatkan rendemen, dan laju produksi bioetanol. Produk bioetanol akhir yang dihasilkan sebesar 6.60 ± 0.28 g L⁻¹. Dengan μ maks gabungan sebesar 0.02/jam, nilai Yp/s sebesar 0.17 ± 0.01 g bioetanol/g substrat, dan laju produksi bioetanol sebesar 0.09 ± 0.00 g L⁻¹ jam⁻¹.

Kata kunci: limbah biji buah, bioplastik, kemasan pangan

ABSTRACT

Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) bagasse is a by-product of sugar industry from sweet sorghum juice which can be used as raw material for bioethanol production. The aim of this research is to produce bioethanol from sweet sorghum bagasse using *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. The Conventional Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Technique is the SSF process of bioethanol production with full aeration. The use of SSF techniques has advantages when compared with Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) techniques, i.e shorter production process times, improved yield, and bioethanol productivity. The final bioethanol product produced is 6.60 ± 0.28 g L⁻¹. With a combined maximum specific growth rate (μ) of 0.02/h, the Yp/s value of 0.17 ± 0.01 g of bioethanol/g substrate, and ethanol production rate of 0.09 ± 0.00 g L⁻¹ h⁻¹.

Keywords: bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, simultaneous saccharification and fermentation, sweet sorghum bagasse, *Trichoderma reesei*

PENDAHULUAN

Produksi bioetanol dapat menggunakan beberapa bahan baku seperti sirup glukosa, bahan berpati (sukun, jagung, singkong, ubi dll), serta bahan berlignoselulosa. Setiap karakteristik bahan baku memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Bahan sirup glukosa dan berpati berasal dari bahan baku untuk pemenuhan kebutuhan pangan, sehingga sudah jarang digunakan untuk bahan

baku alternatif energi seperti bioetanol. Bahan baku tersebut disebut dengan bahan baku bioetanol generasi pertama (G1). Bahan baku pembuatan bioetanol mulai dialihkan pada bahan baku berlignoselulosa. Bahan berlignoselulosa berasal dari tanaman atau limbah hasil pertanian dengan kandungan utama lignin, hemiselulosa dan selulosa dan merupakan bahan baku bioetanol generasi kedua (G2). Bahan berlignoselulosa jumlahnya melimpah di alam, namun perlu proses praperlakuan untuk mendegradasi lignin yang merupakan senyawa polifenol. Berdasarkan prinsip *zero waste* dan jumlah bahan baku yang melimpah maka hasil samping industri pertanian berupa bahan berlignoselulosa digunakan untuk produksi bioetanol.

Bagas sorgum manis (BSM) adalah hasil samping industri gula dari nira sorgum manis. BSM merupakan bagian batang yang sudah diperah niranya, dan memiliki kandungan lignoselulosa yang dapat dikonversi menjadi bioetanol. Varietas sorgum manis (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench) adalah kandidat tanaman yang menjanjikan untuk pembuatan energi terbarukan karena mempunyai hasil biomassa per hektar pertahun yang tinggi. Bahan baku lignoselulosa perlu praperlakuan atau delignifikasi yang selektif untuk menghilangkan hambatan struktural dan meningkatkan aksesibilitas selulosa. Hal ini tergantung pada agen kimia yang digunakan (misalnya asam, alkali) serta kondisi perlakuan yang diterapkan (Wu *et al.* 2011). Delignifikasi bagas sorgum manis menggunakan alkali hidrotermal dan hidrogen peroksida dinilai cukup efektif untuk meningkatkan aksesibilitas selulosa dan mampu menurunkan lignin hingga 85% (Pramasari *et al.* 2017).

Produksi bioetanol dapat menggunakan beberapa teknik, diantaranya teknik sakarifikasi dan fermentasi terpisah atau *separate hydrolysis and fermentation* (SHF) dan sakarifikasi dan fermentasi simultan atau *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF). Namun teknik SHF mempunyai kelemahan (Dahnum *et al.* 2015) seperti penggunaan dua bioreaktor berbeda, membutuhkan waktu proses yang lebih lama serta perlu netralisasi dahulu jika menggunakan asam untuk sakarifikasi dan laju produksi yang rendah. Teknik SSF untuk produksi bioetanol mengatasi kelemahan teknologi sebelumnya (SHF) yaitu dengan menerapkan teknologi sakarifikasi dan fermentasi simultan atau *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Proses ini langsung menggabungkan proses sakarifikasi dan fermentasi dengan menggunakan campuran enzim dan khamir. Dahnum *et al.* (2015) melaporkan teknik SSF dapat menutupi kekurangan teknik SHF, seperti mempersingkat waktu proses dan meningkatkan rendemen etanol.

Produksi bioetanol membutuhkan enzim atau mikroba untuk menghasilkan produk yang diinginkan (Song, *et al.* 2018). *Trichoderma reesei* merupakan mikroba jenis kapang yang dapat memproduksi enzim selulase. Selulase yang dihasilkan oleh kapang merupakan enzim yang memiliki sistem paling efisien untuk hidrolisis sempurna substrat selulosa menjadi komponen glukosa monomer, yang merupakan gula fermentasi. Selulase adalah enzim komersial yang penting, banyak digunakan dalam makanan, pakan ternak, tekstil, pulp dan kertas, fermentasi alkohol dan biji-bijian, pengolahan pati, farmasi, malting, dan industri pembuatan bir (Mood, *et al.* 2013). *Saccharomyces cerevisiae* merupakan khamir yang paling penting pada fermentasi, karena mampu memproduksi alkohol dengan konsentrasi tinggi dan fermentasi spontan. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik dan mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol konsentrasi yaitu 10-14% (Buckle *et al.* 2007). Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi bioetanol dari bahan baku bagas sorgum manis dengan teknik SSF konvensional menggunakan *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

METODE

Alat dan Bahan

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah bagas sorgum manis yang diperoleh dari PT. Samirana Surya Semesta, Jakarta. Isolat *Trichoderma reesei* IPBCC.93.260 dan *Saccharomyces cerevisiae* IPBCC.Y. 05.544 merupakan koleksi Institut Pertanian Bogor *Culture Collection* (IPB CC). Media yang digunakan untuk peremajaan *stock culture* adalah PDA (*Potato Dextrosa Agar*). NaOH, H₂O₂ 30%, dan beberapa reagen untuk analisis komponen bahan seperti: aquades, H₂SO₄ pekat, pereaksi Fenol dan glukosa. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya cawan petri, tabung reaksi, bioreaktor *batch*, *baffle flask*, labu Erlenmeyer, autoklaf,

centrifuge, *laminar air flow*, pH-meter, inkubator, saringan 40 dan 60 mesh dan spektrofotometer UV-Vis, dan kromatografi gas Hitachi OV-17.

Prosedur Penelitian

1. Kultur *Trichoderma reesei*

Peremajaan *Trichoderma reesei* dilakukan dengan menginokulasikan kultur stok pada agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring secara zig – zag dengan bantuan kawat Ose dan api Bunsen (secara aseptik) di dalam *laminar air flow* kemudian diinkubasi selama 7 hari. Kemudian *Trichoderma reesei* ditumbuhkan pada media nutrisi cair untuk memproduksi enzim selulase. Media cair dibuat dengan mencampurkan 1 L larutan buffer sitrat dengan 1,0 g ekstrak ragi (*yeast extract*); 1,5 g *bacteriological peptone*; 1,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g KH_2PO_4 ; 0,005 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mL larutan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*) 1%; 1% bagas sorgum manis sebagai *inducer*. Larutan nutrisi kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Satu *loop Trichoderma reesei* dipindahkan ke media cair dan inkubasi pada *rotary shaker* berkecepatan 120 rpm dengan suhu 30°C selama 7 hari (Wahyuningtyas 2013).

2. Kultur *Saccharomyces cerevisiae*

Isolat *Saccharomyces cerevisiae* diremajakan pada agar miring PDA dan diinkubasi selama 2 hari. Setelah itu isolat ditumbuhkan lagi pada 50 ml media YMGP (*yeast malt peptone-glucose*) yang terdiri dari ekstrak yeast 5 g/l, malt 5 g/l, glukosa 10 g/l dan pepton 5 g/l di dalam labu erlenmeyer 200 ml. Inkubasi dilakukan pada *rotary shaker* berkecepatan 125 rpm dengan suhu 30°C selama 24 jam.

3. Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan Konvensional

Media untuk SSF Konvensional sebanyak 1.2 L pH 5 disterilisasi pada autoklaf 121°C selama 20 menit. Campuran tersebut secara aseptik dituang ke dalam bioreaktor *batch* yang sebelumnya telah disterilisasi pada suhu 121°C selama 45 menit, selanjutnya diinokulasikan 10% (v/v) kultur *T. reesei* dan *S. cerevisiae* di awal proses. Kondisi bioreaktor diatur dalam keadaan aerobik sampai akhir proses, dengan agitasi 150 rpm dan aerasi 1 vvm.

Metode Analisis

Perhitungan kadar etanol sebagai produk (P), sisa selulosa sebagai substrat (S), gula total, bobot biomassa kering (X), dan *Total Plate Count* (N), dilakukan setiap 12 jam selama 84 jam. Konsentrasi selulosa diukur menggunakan metode Rowell dan total gula diukur menggunakan metode Fenol. Kurva standar dibuat berdasarkan angka absorpsi 490 nm menggunakan spektrofotometer UV/VIS.

Parameter Pengukuran

Parameter yang diukur dan dihitung sebagai indikator kinerja proses kultivasi adalah:

1. Bobot biomassa kering (X) yang dihasilkan setiap 12 jam (pengukuran dikoreksi dengan bobot sisa selulosa karena substrat berbentuk padat)
2. Kadar gula total yang dihasilkan tiap 12 jam
3. Kadar etanol [P] yang dihasilkan tiap 12 jam
4. Sisa substrat selulosa yang terdapat dalam media (S) tiap 12 jam
5. Laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ maks)
 $\ln X_1 - \ln X_0 = \mu (t_1 - t_2)$ di mana, plot antara $\ln X$ dan t pada fase eksponensial akan menghasilkan garis lurus dengan *slope* = μ maks
6. Nilai penggunaan substrat selulosa terhadap level produk yang dihasilkan (Y_p/s); nilai *slope* dimana nilai $S_0 - S$ (absis) dan $P - P_0$ (ordinat) dengan unit g etanol/ g substrat selulosa.
7. Laju produksi etanol dari plot antara P dengan waktu ($\text{g L}^{-1} \text{jam}^{-1}$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

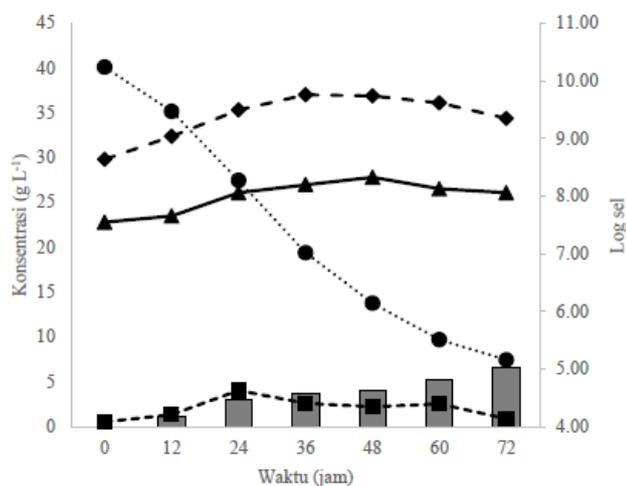
Kinerja Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan (SSF) Konvensional

Proses sakarifikasi dan fermentasi (SSF) secara simultan pertama kali dilakukan oleh Gomes *et al.* (2018). menggabungkan hidrolisis enzimatis selulosa dengan fermentasi secara simultan gula untuk memproduksi etanol. Dalam proses SSF, tahapannya hampir sama dengan sistem hidrolisis dan fermentasi terpisah, kecuali keduanya dilakukan dalam bioreaktor yang sama. Dengan demikian, kehadiran khamir bersama dengan kompleks enzim selulolitik mengurangi akumulasi gula dalam

bioreaktor sehingga meningkatkan hasil dan tingkat sakarifikasi dibandingkan dengan sakarifikasi dan fermentasi terpisah. Keuntungan lain dari teknik SSF adalah bahwa bioreaktor tunggal digunakan untuk seluruh proses dengan demikian mengurangi biaya produksi yang diperlukan. Pemanfaatan selulosa dari biomassa lignoselulosa untuk menghasilkan gula merupakan aspek sangat penting untuk produksi etanol secara ekonomis dan efisien. Hasil konsentrasi gula yang dihasilkan untuk memproduksi etanol tergantung kepada teknik praperlakuan yang digunakan. Biasanya gula difermentasi menggunakan ragi konvensional (*Saccharomyces cerevisiae*) (Correia *et al.* 2013).

Tahapan pada penelitian ini menggunakan teknik sakarifikasi dan fermentasi secara simultan (SSF) dan dilakukan secara konvensional (aerasi penuh). Proses sakarifikasi merupakan proses hidrolisis selulosa bagas sorgum manis menjadi gula sederhana. Agen sakarifikasi yang digunakan adalah kapang *Trichoderma reesei* yang mampu menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase terdiri dari tiga komponen yaitu endo-1,4- β -D-glukanase, ekso-1,4- β -D-glukanase dan 1,4- β -D-glukosidase yang dapat dihasilkan oleh berbagai macam mikroba (Anwar *et al.* 2010). Mikroba untuk proses fermentasi yang digunakan adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir jenis ini umum digunakan dalam proses produksi bioetanol. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan mikroba lain yang dapat memproduksi bioetanol. Kelebihan tersebut antara lain lebih mudah beradaptasi dengan lingkungan, lebih tahan terhadap kadar alkohol tinggi, dan lebih mudah didapat (Mood, *et al.* 2013).

Proses pada penelitian ini menggunakan bioreaktor sistem *batch* 2 L. Bioreaktor dalam keadaan aerobik penuh dari awal sampai akhir proses. Kultivasi dilakukan selama 72 jam sesuai penelitian yang telah dilakukan oleh Jain dan Agrawal (2018). Semakin lama waktu sakarifikasi dan fermentasi yang dilakukan diharapkan akan menyebabkan kontak yang semakin baik antara kapang *Trichoderma reesei* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini akan meningkatkan konversi substrat menjadi produk yang diharapkan. Kultivasi dilakukan dengan adanya pemberian aerasi penuh sebesar 0.5-1 vvm. Gambar 1 menunjukkan produksi bioetanol selama kultivasi pada bioreaktor dengan teknik SSF konvensional. Konsentrasi bioetanol maksimum yang dapat dicapai selama 72 jam sebanyak 6.60 g L⁻¹. Masing-masing aspek pada proses kultivasi memiliki nilai yang berbanding terbalik antara konsentrasi substrat selulosa bagas sorgum manis, konsentrasi total gula, konsentrasi biomassa sel dan konsentrasi produk etanol yang dihasilkan. Dalam penelitian SSF konvensional, agen sakarifikasi yang digunakan adalah kapang *Trichoderma reesei*. Penggunaan kapang *Trichoderma reesei* bertujuan untuk menghasilkan enzim selulase. Enzim selulase berfungsi menghidrolisis selulosa bagas sorgum manis menjadi gula-gula sederhana yang selanjutnya difermentasi (Zhang, *et al.* 2013).



Gambar 1. Hasil kultivasi secara SSF Konvensional (aerasi penuh). — Bioetanol (g L⁻¹), -♦- selulosa (g L⁻¹), total gula (g L⁻¹), —▲— *T reesei*,•..... *S cerevisiae*.

Produksi bioetanol dipengaruhi oleh jumlah gula yang dihasilkan, pertumbuhan mikroba yang mengkatalisis proses, serta kondisi lingkungan bioreaktor pada proses sakarifikasi dan fermentasi.

Sakarifikasi menggunakan kapang *Trichoderma reesei* dan proses fermentasi menggunakan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Proses sakarifikasi dan fermentasi terjadi secara simultan dalam satu bioreaktor dengan kondisi aerobik, agitasi dilakukan untuk meningkatkan kontak antara biokatalis dan media. Proses sakarifikasi yaitu hidrolisis selulosa menjadi gula menggunakan mikroba *Trichoderma reesei*. Selulosa digunakan kapang *T. reesei* sebagai sumber substratnya, sehingga konsentrasi selulosa terus menurun hingga akhir proses. Terlihat kadar gula yang naik turun diindikasikan hubungan antara *T. reesei* yang memproduksi gula, dan *S. cerevisiae* yang secara simultan menggunakan gula sebagai substratnya.

Pada jam ke 0-12 terjadi fase adaptasi bagi mikroba kapang dan khamir. Pemberian aerasi akan membantu sel dalam melakukan aktivitas dan metabolisme. Pada waktu tersebut kapang *Trichoderma reesei* sudah menghidrolisis selulosa bagas sorgum manis menjadi gula sederhana. Produksi bioetanol pada kondisi aerobik disebut peristiwa efek *Crabtree*. Efek *Crabtree* merupakan kondisi penghambatan sintesis enzim respirasi. Jika konsentrasi sel khamir masih rendah, maka enzim respirasi yang disintesis masih cukup untuk memetabolisme glukosa melalui jalur respirasi. Namun, jika konsentrasi sel sudah meningkat (fase log) maka sintesis enzim respirasi akan digantikan oleh enzim fermentatif. Hal ini menyebabkan jalur respirasi digantikan dengan fermentasi (Jung, *et. al.*, 2015). Pada kondisi aerob khamir menghasilkan biomassa yang lebih tinggi dibandingkan produksi etanol. Hal ini mengindikasikan pada kondisi aerob produk utama yang diinginkan (etanol) tidak terbentuk secara maksimal, karena sel lebih banyak menggunakan substrat untuk pertumbuhan dibandingkan untuk pembentukan produk. Pada jam 12-24 sel *Saccharomyces cerevisiae* meningkat signifikan dibandingkan jam sebelumnya. Hal ini diindikasikan selain melakukan respirasi sel khamir juga mulai mengkonversi gula menjadi bioetanol. Terbukti kadar etanol meningkat pada jam ke 12-24 yaitu dari 1.18 g L⁻¹ menjadi 3.02 g L⁻¹.

Selain menghidrolisis selulosa, kapang juga mengkonsumsi sumber energi lain yaitu gula-gula sederhana. Kapang membutuhkan sumber energi tersebut untuk melanjutkan aktivitas pertumbuhannya sehingga aktivitas hidrolisis selulosa tinggi. Hal ini menyebabkan kompetisi konsumsi gula antara kapang dan khamir. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* tidak mampu menghasilkan enzim selulase yang berfungsi menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana. Penggunaan dua jenis kultur yang terdiri dari *Trichoderma reesei* yang berperan untuk hidrolisis selulosa dan *Saccharomyces cerevisiae* yang berperan dalam mengkonversi gula menjadi bioetanol. Pemberian agitasi sebesar 150 rpm berdasarkan penelitian Lopes *et al.* (2016) dan Jain dan Agrawal (2018). Kecepatan agitasi memberikan pengaruh terhadap produk yang dihasilkan. Namun, jika kecepatan agitasi di atas 250 rpm tidak memberikan pengaruh nyata terhadap produksi etanol. Hal ini disebabkan karena keterbatasan metabolisme mikroba dalam menghasilkan produk (Lidiasari *et al.* 2006). Jumlah produk akhir etanol tergantung pada faktor-faktor atau parameter pada bioreaktor salah satunya adalah keterbatasan metabolisme khamir. Terhalangnya proses fermentasi, juga dipengaruhi suhu proses dan jenis khamir yang digunakan.

Kinetika Kultivasi

Pertumbuhan mikroba ditentukan oleh waktu yang diperlukan untuk menggandakan sel. Waktu yang diperlukan untuk menggandakan massa dan jumlah sel berbeda-beda, karena massa sel dapat meningkat tanpa penambahan jumlah sel. Namun apabila dalam suatu lingkungan tertentu interval antara penggandaan massa sel dan pertumbuhan jumlah sel dengan waktu berlangsung konstan, maka mikroba tumbuh pada laju eksponensial. Parameter kinetika kultivasi pada keadaan lingkungan tertutup (*batch*) meliputi: laju pertumbuhan spesifik maksimum gabungan dua mikroba (μ maks), laju pertumbuhan spesifik maksimum masing-masing mikroba (μ N maks), rendemen produk terhadap substrat (Y_p/s), dan laju produksi etanol.

Kecepatan reproduksi sel dalam proses kultivasi disebut dengan laju pertumbuhan spesifik maksimum (μ maks). Parameter kinetika kultivasi pada penelitian ini mengacu pada Jain dan Agrawal (2018) dengan modifikasi. Laju pertumbuhan spesifik gabungan (μ_x maks) untuk SSF konvensional sebesar 0.02/jam. Laju pertumbuhan spesifik tergolong rendah karena pada penelitian ini menggunakan dua kultur yang berbeda. Nilai Y_p/s adalah nilai pembentukan produk etanol terhadap substrat. Dengan bioreaktor sistem *batch* untuk memproduksi bioetanol, nilai Y_p/s yang dihasilkan sebesar 0.17±0.01 g bioetanol/g substrat dan laju produksi sebesar 0.09±0.00 g L⁻¹ jam⁻¹.

KESIMPULAN

Teknik sakarifikasi dan fermentasi simultan (SSF) konvensional atau tanpa rekayasa dapat menghasilkan produk akhir etanol sebesar 6.60 ± 0.28 g L⁻¹. Proses pada SSF konvensional merupakan tipe fermentasi secara aerobik. Fermentasi aerobik atau aerasi penuh menggunakan siklus *Crab tree* dalam memproduksi etanol, namun memiliki kekurangan yaitu proses respirasi lebih tinggi dibandingkan proses fermentasi. Proses SSF konvensional dapat menghasilkan rendemen produk terhadap substrat (Yp/s) sebesar 0.17 ± 0.01 g bioetanol/g substrat selulosa dan laju produksi bioetanol sebesar 0.09 ± 0.00 g L⁻¹ jam⁻¹.

DAFTAR PUSTAKA

- Correia JADC, Jose EMJ, Luciana RBG, Maria VPR. (2013). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production : Study of parameters. *Bioresource Technology*. 139:249-256. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.153>.
- Dahnum D, Tasum S O, Triwahyuni E, Nurdin M, Abimanyu H. (2015). Comparison of SHF and SSF Processes Using Enzyme and Dry Yeast for Optimization of Bioethanol Production from Empty Fruit Bunch. *Energy Procedia*. 68:107-116. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.238>
- Gomes DG, Serna-Loaiza S, Cardona CA, Gama M, Domingues L. (2018). Insights into the economic viability of cellulases recycling on bioethanol production from recycled paper sludge. *Bioresource Technology* 267:347-355. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.056>
- Jain L, Agrawal D. (2018). Performance evaluation of fungal cellulases with dilute acid pretreated sugarcane bagasse: a robust bioprospecting strategy for biofuel enzymes. *Renewable Energy*, 115:978–988. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.09.021>
- Jung YR, Park JM, Heo S, Hong W, Lee S, Oh B, Park S, Seo J, Kim C. (2015). Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy*, 76:66–71. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.10.064>
- Lopes ML, Paulillo SCDL, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC, Bernardino CD, Amorim Neto HB, Amorim HV. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47:64–76. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
- Mood SH, Golfeshan AH, Tabatabaei M, Jouzani GS, Najafi GH, Gholami M, Ardjmand M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable Sustainable Energy Rev*, 27:77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Pramasari DA, Haditjaroko L, Sunarti TC, Hermiati E, Syamsu K. (2017). The Effectiveness of Physical and Alkali Hydrothermal Pretreatment in Improving Enzyme Susceptibility of Sweet Sorghum Bagasse. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 117-131 <https://doi.org/10.15294/jbat.v6i2.9910>
- Song C, Qiu Y, Liu Q, Ji N, Zhao Y, Kitamura Y, Hou X. (2018). Process intensification of cellulosic ethanol production by waste heat integration. *Chemical Engineering Res Des* 132:115–122. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.01.016>
- Wu L, Arkane M, Ike M, Wada M, Takai T, Gau M. (2011). Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic Digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology*. 102(7): 4793-4799. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.023>
- Zhang J, Xingxing M, Jianliang Y, Xu Z, Tianwei T. (2011). The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse [Short Communication]. *Bioresource Technology*. 102 : 4585-4589. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.093>