

# PRODUKSI ETANOL DARI HIDROLISAT CARBOXY METHYL CELLULOSE (CMC)

Masfufatun

Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

Abstrak

*Carboxy Methyl Cellulose (CMC) merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air. Oleh karena itu CMC mudah dihidrolisis menjadi gula-gula sederhana oleh enzim selulase dan selanjutnya difermentasi menjadi etanol oleh bakteri.*

*Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari pola fermentasi *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 yang menggunakan hidrolisat Carboxy Methyl Cellulose (CMC) sebagai substrat dalam produksi etanol. Kadar etanol dari proses fermentasi dianalisa dengan Kromatografi Gas (GC). Setelah fermentasi berlangsung selama 10 jam laju konsumsi glukosa (hidrolisat CMC) *Zymomonas mobilis* meningkat dengan tajam yaitu sebesar 0,0967 g glukosa/L per jam. Sedangkan laju konsumsi glukosa murni *Zymomonas mobilis* lebih besar dan lebih cepat yaitu 0,2581 g glukosa/L per jam setelah fermentasi berlangsung 5 jam. Laju konsumsi hidrolisat CMC maupun glukosa murni mulai konstan pada saat fermentasi berlangsung selama 30 jam. Fermentasi dengan menggunakan Hidrolisat Carboxy Methyl Cellulose (CMC) sebagai substrat dihasilkan etanol sebesar 0,457 g/g glukosa atau yield etanol sebesar 89,6% dibanding teori (0,0283 g etanol/g CMC).*

*Kata Kunci: Hidrolisis, hidrolisat Carboxy Methyl Cellulose, selulase, etanol*

## ETHANOL PRODUCTION FROM HYDROLYSED CARBOXYMETHYL CELLULOSE (CMC)

Masfufatun

Lecturer Faculty of Medicine, University of Wijaya Kusuma Surabaya

Abstract

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) is a derivative of cellulose soluble in water. Therefore, CMC easily hydrolyzed into simple sugars by cellulase enzymes and subsequently fermented into ethanol by bacteria.

The purpose of this research was to study the pattern of fermentation of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 using hydrolysed carboxy methyl Cellulose (CMC) as substrate in ethanol production. Levels of ethanol from the fermentation process is analyzed by Gas Chromatography (GC). After fermentation lasted for 10 hours the rate of consumption of glucose (hydrolysed CMC) *Zymomonas mobilis* by a sharp increase in the amount of 0.0967 g glucose / L per hour. While the rate of consumption of pure glucose and *Zymomonas mobilis* bigger faster is 0.2581 g glucose / L per hour after fermentation lasted 5 hours. The rate of consumption of pure glucose hydrolyzed CMC and began constant during fermentation lasted for 30 hours. Fermentation by using hydrolysed carboxy methyl Cellulose (CMC) as substrate produced ethanol at 0.457 g / g glucose or ethanol yield of 89.6% compared to theory (0.0283 g ethanol / g CMC).

Keywords: Hydrolysis, hydrolysed carboxy methyl Cellulose, cellulase, ethanol

### 1. Pendahuluan

Kebutuhan energi bahan bakar minyak, sampai saat ini masih disuplai oleh bahan yang berasal dari fosil. Dengan deposit terbatas dan tidak dapat diperbaharui, cepat atau lambat pasti habis. Keterbatasan ini mendorong usaha penghematan dan mencari sumber energi pengganti. Alternatif penggunaan etanol sebagai bahan bakar, salah satu pemecahan masalah. Keuntungan dari penggunaan etanol, dapat diproduksi terus menerus, ramah lingkungan serta dapat digunakan sebagai bahan baku industri kimia, kosmetik dan farmasi

Produksi etanol di berbagai negara telah dilakukan dengan menggunakan bahan baku yang berasal dari hasil pertanian dan perkebunan. Dengan demikian akan menimbulkan pertentangan antara kebutuhan produksi bahan bakar dan penggunaan sebagai bahan pangan dan pakan. Oleh karena itu dilakukan upaya mencari bahan baku alternatif lain dari sektor non pangan untuk pembuatan etanol. Salah satunya adalah dari bahan selulosa.

Di alam, selulosa banyak dijumpai sebagai selulosa natif yang masih berikatan dengan senyawa lainnya seperti lignin dan selulosa. Adapula selulosa yang telah dijadikan serbuk bahkan dimurnikan

dengan derajat kristalinitas tinggi seperti avisel. Avisel lebih sukar larut dibandingkan serbuk selulosa. Selain itu dikenal juga beberapa senyawa turunan selulosa, diantaranya adalah *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC). *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) merupakan kopolimer dua unit  $\beta$ -D glukosa dan  $\beta$ -D-glukopiranosida 2-O-(karboksilmetil)-garam monosodium yang terikat melalui ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) memiliki kelarutan lebih tinggi daripada selulosa, sehingga mudah dihidrolisis.

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menjadi gula-gula sederhana dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, enzim maupun mikroba selulolitik. Dari penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa hidrolisis CMC secara enzimatik lebih menguntungkan dibandingkan dengan menggunakan asam maupun mikroba. Selain tidak menimbulkan korosi, hidrolisis secara enzimatik dapat berlangsung lebih cepat pada kondisi mild ( $T=50^{\circ}\text{C}$  dan  $\text{pH}=5,2$ ) dan kadar glukosa yang dihasilkan lebih tinggi (Masfufatun, 2009). Selanjutnya Hidrolisat CMC yang mengandung glukosa sebagai hasil hidrolisis enzimatik dijadikan sebagai bahan baku dalam pembuatan etanol melalui proses fermentasi. Berbagai mikroba telah digunakan dalam fermentasi etanol. Diantaranya adalah bakteri *Zymomonas mobilis*.

Beberapa penelitian fermentasi etanol dari berbagai substrat dengan menggunakan mikroba *Zymomonas mobilis* telah dilakukan, diantaranya menggunakan substrat glukosa dengan *Zymomonas mobilis* mutan oleh Muspahaji (2008) dan Alfena (2009), glukosa dengan *Zymomonas mobilis* amobil (Pancasning, 2008), sukrosa dengan *Z. mobilis* ATCC 10988 oleh Hany (2009), sari buah pisang dengan *Zymomonas mobilis* FNCC 0056 oleh Imamah (2006), sari buah pepaya oleh Sujito, (2008), limbah karet alam oleh Ttripetchul dkk (1992), buah dan limbah nanas dengan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 oleh Tanaka dkk, (1999)

Oleh karena itu dalam penelitian akan dilakukan fermentasi etanol dari substrat hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988. Tujuan

dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pola fermentasi hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menjadi etanol oleh *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.

## 2. Eksperimen

### Pembuatan Hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC)

Disediakan labu erlenmeyer 250 mL dan diisi dengan 100 mL larutan *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dengan konsentrasi optimum 4% dalam bufer asetat pH optimum 5,2. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 40 mL larutan enzim selulase yang diisolasi dari bekicot (*Achatina fulica*) kemudian diinkubasi pada suhu optimum  $50^{\circ}\text{C}$  selama 22 jam dengan kecepatan 160 rpm. Untuk menghentikan proses hidrolisis dilakukan pemanasan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$ . Kadar glukosa dalam hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) ditentukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

### Proses Fermentasi etanol dari Hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Tanaka, 1999)

- Regenerasi *Zymomonas mobilis* pada media padat (Agar Miring)

Sebanyak 1 ose *Zymomonas mobilis* diambil dengan menggunakan jarum ose. Kemudian digoreskan di atas permukaan agar miring dengan pola zig-zag. Semua pemindahan dilakukan di dalam ruang steril (*laminary air flow*) dekat dengan api spiritus. Hasil pemindahan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam.

- Produksi biomassa

Inokulum dibuat dengan memindahkan sel *Zymomonas mobilis* dari media agar miring ke labu 250mL yang mengandung 50 mL media cair pH 5,5. Media yang telah diinokulasi ini kemudian diinkubasi selama 20 jam pada suhu  $30^{\circ}\text{C}$  dan *dishaker* 125 rpm. Inokulum yang diperoleh ditransfer ke labu 1 liter yang mengandung 450mL media cair diinkubasi dan *dishaker* pada kecepatan 125 rpm. Setelah 17-18 jam inkubasi dihentikan sehingga diperoleh biomassa/starter biakan *Zymomonas mobilis* yang dipakai sebagai inokulat pada proses fermentasi.

- Proses Fermentasi

Sebanyak 200mL starter *Zymomonas mobilis* disentrifus pada kecepatan 4000

rpm selama 30 menit. Biomassa yang diperoleh disuspensikan dalam air steril dan dimasukkan dalam labu 100 mL yang berisi media fermentasi yang menggunakan hidrolisat CMC sebagai sumber karbonnya. Media yang telah dinokulasi ini diinkubasi pada suhu 30°C selama beberapa jam dan *dishaker* pada kecepatan 50 rpm. Sebagai kontrol dilakukan fermentasi dengan menggunakan glukosa murni sebagai sumber karbonnya. Setiap interval 5 jam diuji kadar gula dan etanol. Sebelum dianalisa, hasil fermentasi disentrifuge terlebih dahulu. Residu glukosa dianalisa dengan metode Somogyi-Nelson dan etanol yang dihasilkan dianalisa dengan kromatografi gas.

Metoda Analisa

- Analisa kadar glukosa

Analisa kadar glukosa dilakukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson (Sudarmaji, 1984). Sebelum analisa kadar glukosa dilakukan, terlebih dahulu dibuat kurva standar glukosa. Dibuat larutan glukosa dengan kadar 20, 40, 60, dan 100 ppm. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi Nelson A. Semua tabung dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Semua larutan dalam tabung tersebut selanjutnya didinginkan dalam beker gelas yang berisi air dingin. Setelah dingin, kedalam masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1 mL peraksi Nelson B. Masing-masing tabung dikocok hingga semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut. Setelah semua endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  larut dan tidak terdapat buih, ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 7 mL air suling dan dikocok sampai homogen. Setelah homogen kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer Genesys pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar glukosa dibuat dengan membuat grafik hubungan antara kadar glukosa sebagai gula reduksi dengan absorbansi.

Penentuan kadar glukosa pada masing-masing sampel dilakukan dengan cara yang sama dengan penentuan kadar gula reduksi standar. Untuk penentuan kadar gula pada proses fermentasi, sampel diambil sebanyak 100 mL dalam setiap interval waktu 5 jam selanjutnya disentrifuse. Filtrat hasil sentrifuse diambil 1 mL untuk dilakukan pengukuran kadar glukosa. Absorbansi yang diperoleh diplotkan pada persamaan regresi linier kurva standar glukosa, sehingga diperoleh kadar glukosa.

- Analisa Kadar Etanol

Sebelum analisa kadar etanol dilakukan dengan menggunakan kromatografi gas, terlebih dahulu sampel disentrifuse untuk memisahkan biomasanya. Filtrat hasil sentrifuse dianalisa kadar etanolnya dengan menggunakan kromatografi gas.

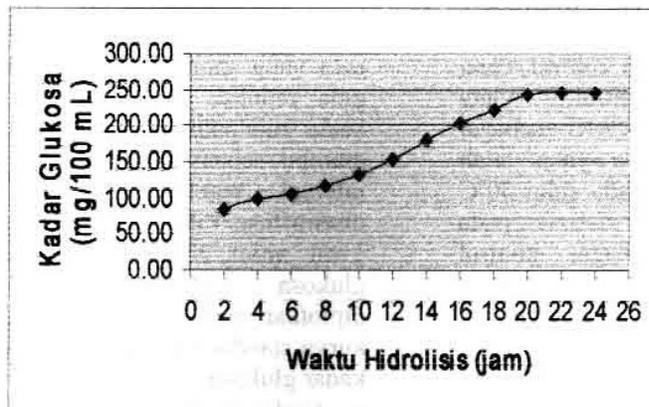
Kromatografi gas yang digunakan untuk menganalisa kadar etanol adalah kromatografi gas milik Universitas Surabaya (Ubaya) dengan spesifikasi sebagai berikut : Shimadzu GC 14 B, Kolom CBP 10 medially polar, detektor FID, integrator CR 6 cromatopac, temperatur kolom 180, temperatur injeksi 250°C dan waktu retensi 4,2 menit.

### 3. Pembahasan

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC)

- Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) secara Enzimatis

Hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* secara Enzimatis dilakukan dengan menggunakan enzim selulase dari bekicot (*Achatina fulica*) pada kondisi optimum (pH 5,2, temperatur 50°C, konsentrasi CMC 4% dan 10mL ekstrak enzim) dalam waktu tertentu. Gambar 3.1 menunjukkan bahwa aktivitas optimum ekstrak kasar enzim dicapai pada waktu hidrolisis 22 jam dengan kadar glukosa 245,8 mg/100mL (61,45 mg glukosa/g CMC).



Gambar 1. Kurva Hubungan antara Kadar Glukosa dengan Waktu Hidrolisis Menggunakan Enzim Selulase

Dalam gambar 3.1 menunjukkan penambahan waktu hidrolisis akan meningkatkan kadar glukosa. Sisi aktif enzim dalam mengikat substrat secara optimum membutuhkan waktu yang cukup. Jika waktu yang dikondisikan pada enzim dan substrat kurang dari cukup, maka sisi aktif enzim belum optimal dalam mengikat substrat, sehingga produk yang terbentuk masih sedikit pada saat reaksi dihentikan. Pada saat waktu hidrolisis optimum, substrat terikat secara maksimum oleh sisi aktif enzim, sehingga pada saat ini dihasilkan produk yang melimpah. Produk glukosa yang dihasilkan dari reaksi enzimatis sebanding dengan lama waktu hidrolisis, tetapi jika sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat, maka lama waktu hidrolisis kurang berpengaruh, sehingga produk yang dihasilkan hanya mengalami peningkatan yang relatif kecil.

Hasil hidrolisis enzimatis ini lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil penelitian yang telah dilaporkan Saryono (1991). Hidrolisis selulosa ampas nanas dengan menggunakan bekicot dalam waktu 6 jam menghasilkan glukosa dengan kadar 660 mg/mL. Hal ini disebabkan karena enzim selulase yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak kasar belum dimurnikan dan belum dipekatkan sehingga aktivitas lebih rendah.

#### Fermentasi

##### • Penyiapan Sel *Zymomonas mobilis*

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Zymomonas mobilis* ATCC 10988

*Zymomonas mobilis* ini memiliki karakteristik sebagai bakteri Gram negatif, anaerob tetapi toleran terhadap oksigen atau biasa disebut anaerob fakultatif, mampu memfermentasi glukosa, fruktosa dan sukrosa menghasilkan sejumlah etanol dan CO<sub>2</sub>, tetapi tidak dapat memfermentasikan manitol dan laktosa, mampu menghasilkan enzim katalase, tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon serta tidak memiliki enzim triptofanase dan gelatinase (Hany, 2009).

Media pertumbuhan bakteri *Zymomonas mobilis* terdiri dari glukosa, yeast ekstrak, ammonium sulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Kalium Dihidrogen Posfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Magnesium Sulfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Glukosa berfungsi sebagai sumber karbon, yeast ekstrak dan garam amonium berfungsi sebagai sumber nitrogen. Sedangkan garam-garam yang lain seperti kalium dan magnesium berfungsi sebagai aktivator dalam kerja enzim (Schlegel, 1994)

Penyediaan biakan *Zymomonas mobilis* meliputi 2 tahap yaitu penanaman dalam media padat dan selanjutnya penanaman dalam media cair. Penanaman dalam media padat bertujuan untuk memperbanyak stok biakan murni. Biakan *Zymomonas mobilis* mampu tahan dalam media padat selama dua minggu, sehingga perlu diregenerasi/diremajakan setiap dua minggu sekali. Pemindahan biakan *zymomonas mobilis* dari media padat ke media cair dengan tujuan untuk memperoleh inokulum yang sudah beradaptasi dengan lingkungan fermentasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya

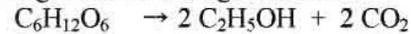
(Hani,2009), telah ditentukan kurva pertumbuhan *Zymomonas mobilis*. Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui fase log atau eksponensial bakteri *Z. mobilis*. Pada fase log, pertumbuhan bakteri berlangsung paling cepat. Dengan demikian fase ini merupakan fase yang paling baik untuk dijadikan inokulum dalam proses fermentasi. Biomassa dipanen pada saat pertumbuhan bakteri mencapai fase akhir logaritma yaitu pada 17-18 jam. Pada fase ini diharapkan mampu bekerja lebih baik dalam proses fermentasi setelah mengalami adaptasi dan memiliki ukuran yang lebih seragam.

- Menentukan Pola Fermentasi Etanol

Fermentasi etanol dilakukan menggunakan proses anaerob, yaitu dengan *shaker* sangat pelan 50 rpm. *Shaker* pelan hanya difungsikan sebagai penghomogenan larutan supaya bakteri tidak mengendap dibawah untuk mengoptimalkan proses fermentasi. Hal ini karena *Z. Mobilis* bersifat anaerob fakultatif (mampu tumbuh dalam lingkungan tanpa atau dengan oksigen). Dalam hal ini oksigen akan menekan fermentasi dan menguntungkan respirasi (Schlegel, 1994). Media fermentasi menggunakan glukosa hasil hidrolisis *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) secara enzimatis sebagai sumber karbonnya dengan konsentrasi 0,19%. Sedangkan sumber nitrogen dan garam-garam lain sama dengan media cair. Sebagai kontrol, media fermentasi menggunakan glukosa murni sebagai sumber karbon. Fermentasi dilakukan pada media fermentasi pH optimum 5,5 (Hani, 2009). Pola fermentasi etanol menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 ditentukan dengan memantau pola konsumsi glukosa dan produksi etanol setiap 5 jam selama 30 jam.

Berdasarkan teori kesetimbangan reaksi yang berlangsung secara anaerobik, glukosa secara enzimatis akan diubah menjadi etanol dan karbondioksida. Pada penelitian ini menggunakan glukosa sebagai kontrol dikarenakan glukosa

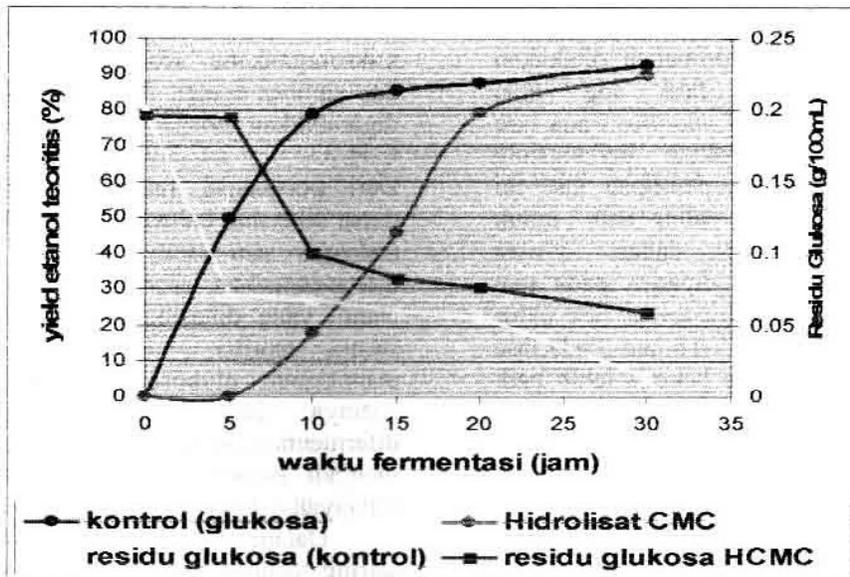
memiliki struktur yang sederhana sehingga lebih mudah dimanfaatkan oleh mikroorganisme sebagai sumber karbon dan sumber energi. Reaksi tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:



Dari persamaan reaksi tersebut diatas dapat diketahui bahwa jika 1 gram glukosa (sebagai satu-satunya sumber karbon) difermentasikan secara sempurna maka etanol yang dihasilkan atau *yield* etanol secara teoritis adalah 0,51 gram etanol/gram glukosa (El-Mansi, 2007). Artinya jika 10 gram glukosa difermentasikan secara sempurna (semua menjadi etanol) akan dihasilkan etanol sebanyak 5,1 gram.

Dalam setiap proses fermentasi seiring dengan berjalannya waktu akan terjadi peningkatan jumlah etanol yang dihasilkan dan penurunan jumlah residu glukosa. Hal ini karena glukosa yang tersedia sebagai substrat akan secara bertahap dimanfaatkan oleh mikroorganisme untuk diubah menjadi etanol. Penggambaran lebih jelas dapat dipahami dari gambar 2.

Dari Gambar 2 pola fermentasi menggunakan substrat hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) menunjukkan bahwa dalam waktu 5 jam belum nampak kenaikan kadar etanol dan penurunan kadar glukosa yang berarti. Hal ini dikarenakan selama waktu 5 jam *Zymomonas mobilis* melakukan adaptasi terhadap media fermentasi yang berbeda dengan media cair. Di dalam hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) selain glukosa juga terdapat senyawa lain seperti selobiosa, selotriosa, selotetrosa dan lain-lain (Sreenath, 2002). Setelah fermentasi berlangsung selama 10 jam laju konsumsi glukosa (hidrolisat CMC) *Zymomonas mobilis* meningkat dengan tajam yaitu sebesar 0,0967 g glukosa/L per jam. Sedangkan laju konsumsi glukosa murni *Zymomonas mobilis* lebih besar dan lebih cepat yaitu 0,2581 g glukosa/L per jam setelah fermentasi berlangsung 5 jam. Laju konsumsi hidrolisat CMC maupun glukosa murni mulai konstan pada saat fermentasi berlangsung selama 30 jam.



Gambar 2. Pola produksi etanol dan Konsumsi Glukosa pada Fermentasi

Fermentasi etanol selama 30 jam dengan menggunakan glukosa murni 0,199% sebagai substrat (kontrol) menghasilkan etanol adalah 0,47 g etanol/g gula reduksi, artinya memberikan *yield* etanol sebesar 92,38% dibanding teori. Sedangkan fermentasi dengan menggunakan hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai substrat menghasilkan etanol sebesar 0,457 g etanol/g gula reduksi, artinya memberikan *yield* etanol sebesar 89,6 % dibanding teori. Yield etanol yang dihasilkan dari fermentasi menggunakan hidrolisat CMC tidak berbeda jauh jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa hidrolisat CMC hanya berpengaruh pada awal fermentasi saja.

Berdasar data hasil penelitian tersebut diatas maka dapat dikatakan bahwa hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) dapat dijadikan sebagai substrat alternatif pengganti glukosa dalam pembuatan etanol.

#### KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa Fermentasi dengan menggunakan hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai substrat selama 30 jam dihasilkan etanol sebesar 0,457 g/g glukosa atau *yield* etanol sebesar 89,6 % dibanding teori (0,028g etanol/g CMC) dengan laju konsumsi hidrolisat CMC

tertinggi sebesar 96,7 mg glukosa/L per jam pada saat fermentasi berlangsung 10 jam.

Dengan demikian hidrolisat *Carboxy Methyl Cellulose* memiliki potensi sebagai bahan baku untuk pembuatan etanol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alfena, (2009), "Produksi Etanol Menggunakan Mutan *Zymomonas mobilis* yang Dimutasi dengan Hidroksilamin", Skripsi, ITS, Surabaya.
- Bhat, M.K., (1997), Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Applications, Food Macromolecul Science Departement, Institute pf Food Research. Biotechnology Advances. Vol.15. 583-620
- Doelle, M. B & Doelle, H. W. (1989). "Ethanol Production from Sugar Cane Syrup using *Zymomonas mobilis*". *J. Biotechnol.* 11: 25-36
- Dipardo, J., (2000), Outlook for biomass ethanol production. Energy information administration. Available from <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysis/paper/biomass.html>.
- Fardiaz, S. (1987), *Fisiology Feementasi*, PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor
- Gunasekaran, P & Raj, K.C.(1999) Ethanol Fermentation Technology- *Zymomonas mobilis*, Departemen of microbial Technology, School of Biological Sciences, Mandurai Kamaraj University, India.
- Hanny,S.H., (2009), Penentuan pH Optimum dalam Produksi Bioetanol dengan Menggunakan *Zymomonas mobilis* ATCC 19088, Skripsi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya.
- Hermiati, Euis dan Endang Sukara, (2005), *Konversi Bahan Berlignoselulosa menjadi Bioenergi Etanol*, dalam seminar Nasional Biomassa Ligno-Selulosa. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga Surabaya
- Imamah Anisah, (2006), *Pemanfaatan Sari Buah Pisang Sebagai Substrat Untuk Pembuatan Etanol Dengan Menggunakan Zymomonas Mobilis*, Thesis Magister, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Muspahaji (2008). *Pembuatan mutan Zymomonas mobilis yang tahan terhadap asam untuk produksi etanol dengan mutagen HNO<sub>2</sub>*, Thesis, Jurusan Kimia FMIPA, ITS Surabaya
- Saryono,(1991), *Hidrolisa Selulosa Ampas Nanas, Ananas comucus dengan Enzim Selulase dari Bekicot, Achatina fulica*, Master theses, Departemen Teknik Sipil ITB, Bandung.
- Silaban, Ramlan., (1999), *Enzim Selulolitik pada Bakteri Pseudomonas alchaligenes PaAf-18*, PhD Theses from JBPTITBPP, Bandung
- Schlegel, H.G, (1994), *Mikrobiologi Umum*, Gajah Mada University Press.
- Sudarmadji, S., Haryono,B., Harsono., (1984), *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberti, Yogyakarta
- Tanaka, K. Hilary, Z. D., & Ishizaky, (1999) *A Investigation of the Utility of Pineapple Juice and Pineapple Waste Material as Low-Cost Substrate for Ethanol Fermentation by Zymomonas mobilis*, *J.Biosci Bioeng* Vol 87 No 5: 642-646.
- Tripetchkul, S., Tonokawa, M., dan Ishizaki, A. (1992) " *Ethanol Production by Zymomonas mobilis Using Natural Rubber Waste as a Nuritional Source*" *J. Ferment. Bioeng* Vol. 74, No.6: 384-388.