

Potensi Alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv) dalam Produksi Etanol Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis*

Sevy Dwi Kartikasari, Sri Nurhatika, dan Anton Muhibuddin

Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111

E-mail: nurhatika@bio.its.ac.id

Abstrak—Sumber selulosa yang murah dan melimpah dapat diperoleh dari gulma alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv). Produksi etanol dari bahan baku selulosa alang-alang umumnya difermentasikan oleh *yeast*. Pada penelitian ini fermentasi dilakukan menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis*. Penelitian dilakukan pada bulan November 2012 hingga Mei 2013 di laboratorium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, ITS. Penelitian bertujuan untuk mengetahui potensi alang-alang (*I. cylindrica* (L.) Beauv.) dalam produksi etanol menggunakan bakteri *Z. mobilis* pada konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi yang optimum. Penelitian ini dilakukan dalam tiga langkah utama yaitu *pretreatment* substrat, hidrolisis enzimatis oleh *Penicillium* sp., dan fermentasi etanol oleh *Z. mobilis*. Fermentasi dilakukan menggunakan berbagai perlakuan konsentrasi inokulum (0, 5, 10, dan 15%) dan lama fermentasi (0, 3, 5, 7, dan 9 days) serta dianalisa menggunakan uji *Analysis of Varians* (ANOVA). Masing-masing perlakuan dilakukan 2 kali pengulangan, sehingga diperoleh 40 unit percobaan dengan parameter yang diamati adalah kadar etanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa alang-alang (*I. cylindrica* (L.) Beauv.) berpotensi untuk dijadikan sebagai bahan baku produksi etanol dengan konsentrasi etanol tertinggi diperoleh dari interaksi antara 10% konsentrasi inokulum *Z. mobilis* dan waktu fermentasi 7 hari yaitu sebesar 9,02 % (v/v).

Kata Kunci—alang-alang, etanol, *Imperata cylindrica* selulosa, *Zymomonas mobilis*.

I. PENDAHULUAN

Alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv) merupakan tumbuhan rumput menahun yang tersebar hampir di seluruh belahan bumi dan dianggap sebagai gulma pada lahan pertanian. Garrity [1] di wilayah Asia Tenggara dapat dijumpai sekitar 35 juta ha, dan sekitar 8,5 juta ha tersebar di Indonesia. Sejauh ini, alang-alang dimanfaatkan sebagai bahan baku obat-obatan, bahan baku kertas, pupuk, selebihnya dipotong dan dibuang karena menghambat pertumbuhan tanaman utama. Dilihat dari kandungan kimianya, gulma tersebut mengandung α -selulosa 40,22%, holoselulosa 59,62%, hemiselulosa (pentosan) 18,40%, dan lignin 31,29% [2]. Kandungan selulosa yang lebih dari 40% ini berpotensi sebagai bahan baku untuk energi terbarukan, yaitu bioetanol.

Selulosa ditemukan terikat kuat dengan hemiselulosa dan dilapisi oleh lignin membentuk kompleks lignoselulosa sehingga untuk membebaskan ikatan tersebut diperlukan tahapan awal yang penting yaitu *pretreatment*. Setelah perlakuan awal, selulosa dari alang-alang akan diubah menjadi

glukosa dengan hidrolisis enzim. Hidrolisis enzim ini memanfaatkan kapang penghasil enzim selulase, *Penicillium* sp. kode T1.2, koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, ITS. Penggunaan kapang ini berdasarkan pada kemampuannya menghasilkan endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase dalam jumlah yang tinggi [3]-[4].

Glukosa yang diperoleh selanjutnya dilakukan proses fermentasi oleh bakteri *Z. mobilis*. Pemilihan bakteri fermentatif ini berdasarkan pada beberapa keunggulan yang dimiliki antara lain mampu tumbuh dan mengkonsumsi gula dengan cepat menggunakan jalur *Entner-Doudoroff* (ED) (sekitar 1 μ mol glukosa per menit per mg protein sel), toleran terhadap konsentrasi substrat tinggi hingga 30% glukosa [5], toleran terhadap suhu tinggi hingga 40°C [6], toleran terhadap kadar etanol tinggi hingga 16% v/v [5], dan mampu menghasilkan etanol hingga 13% w/v [7]. Oleh karena itu, penulis melakukan penelitian untuk mengetahui potensi dari alang-alang (*I. cylindrica* (L.) Beauv.) sebagai bahan baku dalam produksi etanol menggunakan bakteri *Z. mobilis* pada konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi yang optimum.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan November 2012 sampai Mei 2013 di Laboratorium Botani, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Laboratorium Mikologi, Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, serta Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga dan Laboratorium Penelitian, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya.

A. Persiapan Bahan dan Perlakuan Awal (*Pretreatment*)

Batang dan daun alang-alang diambil di daerah kampus ITS dan dikeringkan di bawah sinar matahari selama 12 jam. Alang-alang kering kemudian dipotong-potong dengan ukuran 2 cm, digiling dan diayak hingga diperoleh alang-alang berukuran 40 mesh, kemudian disimpan di tempat kering [8]. Alang-alang direndam di dalam NaOH 2% (wt) dengan perbandingan 1:20 (w/v) [9] pada suhu ruang selama 24 jam, dan dilakukan pemanasan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 1 jam. Setelah itu, dicuci dengan air kran hingga pH netral dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 65°C hingga diperoleh berat konstan [10].

B. Persiapan Kapang *Penicillium sp.* Kode T1.2 dan Proses Hidrolisis Enzimatik

Isolat kapang *Penicillium sp.* kode T1.2 diremajakan ke dalam tabung reaksi berisi medium PDA miring dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang [11]. Sebanyak 10 ml aquades steril dituangkan ke dalam biakan *Penicillium sp.* kode T1.2 usia 7 hari, dikocok menggunakan jarum ose agar spora terlepas ke dalam fase cair. Substrat alang-alang sebanyak 1% (b/v) dimasukkan dalam erlenmeyer 100 ml berisi medium Andreotti dan diatur pH 5, ditutup dengan sumbat kapas, disterilisasi pada 121°C selama 15 menit dalam autoklaf. Suspensi spora dipindahkan ke dalam medium dengan konsentrasi 10% (b/v) dan diinkubasi dalam suhu ruang secara aseptis di atas shaker selama 13 hari dengan kecepatan 120 rpm. Hasil hidrolisis dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 16 menit, dan filtrat disaring menggunakan kertas saring halus. Supernatan hasil sentrifugasi diambil 1 ml untuk dilakukan analisis gula reduksi awal [12]. Selanjutnya hasil hidrolisis disebut hidrolisat.

C. Pembuatan Kultur Stok, Kultur Kerja, dan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Isolat *Zymomonas mobilis* disubkultur dalam tabung reaksi yang berisi medium NA (*Nutrien Agar*) miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam [13]. *Z. mobilis* diambil 1 ose dan diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 50 ml ekstrak alang-alang steril yang telah diatur pH menjadi 4 dengan penambahan larutan HCl 30%. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam (Aktivasi I). Sebanyak 1 ml dari aktivasi I (10 %) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 9 ml ekstrak, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam (Aktivasi II). Sebanyak 5 ml dari aktivasi II (10%) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 45 ml ekstrak, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam yang disebut sebagai kultur fermentasi [14]-[15].

Dilakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-9} . Medium kultur diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril. Tabung reaksi yang berisi campuran tersebut divortex dengan vortex mixer, dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya. Perlakuan diulangi sampai pengenceran ke 10^{-9} . Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengukur absorbansi kultur *Z. mobilis* diukur dengan panjang gelombang 600 nm dengan interval tiap 1 jam sekali selama 24 jam. Dibuat grafik kurva pertumbuhan dari nilai absorbansi dan waktu fermentasi [16].

D. Pembuatan Starter

Isolat *Zymomonas mobilis* masing-masing diambil 1 ose dan diinokulasi ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi masing-masing 5 ml ekstrak alang-alang yang telah diatur pH menjadi 4 dengan penambahan larutan HCl 30%. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam (Aktivasi I). Sebanyak 1 ml dari aktivasi I (10 ml) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer 50 ml yang berisi 9 ml ekstrak, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam (Aktivasi II). Sebanyak 5 ml dari aktivasi II (10%) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam erlenmeyer

100 ml yang berisi 45 ml ekstrak, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C sampai jam dimana fase log *Zymomonas mobilis* terjadi (sesuai kurva pertumbuhan) (Aktivasi III) [14] [15].

E. Proses Fermentasi

Sebanyak 50 mL hidrolisat dimasukkan ke dalam botol fermentor 100 mL dan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian ditambahkan starter *Zymomonas mobilis* dengan konsentrasi sesuai dengan rancangan penelitian (0, 5, 10, dan 15%), dan diamati kadar etanol untuk 0, 3, 5, 7, dan 9 hari pada suhu kamar. Fermentasi dilakukan secara anaerob dengan teknik Hungate yaitu mengalirkan gas nitrogen selama 5 menit ke fermentor serta ditutup rapat dengan penutup karet kedap udara. Hasil fermentasi kemudian dilakukan pasteurisasi pada suhu $\pm 80^\circ\text{C}$ selama 10 menit, untuk selanjutnya dilakukan pengukuran kadar etanol dan konsentrasi gula reduksi akhir [17].

F. Pengukuran Kadar Etanol

Tabung distilasi dan labu gondok 250 ml dipersiapkan, selanjutnya 50 ml cairan sampel hasil fermentasi menggunakan labu ukur 50 ml, dan dimasukkan ke dalam tabung distilasi. Dididihkan dengan hati-hati untuk menghindari buih yang berlebihan, destilasi campuran alkohol dan air sampel dapat dikumpulkan tepat 50 ml distilat [18].

Sementara dilakukan destilasi, piknometer dikalibrasi. Piknometer diisi aquades destilasi dan ditutup. Piknometer dan akuades ditimbang, berat yang didapat adalah W_2 . Kemudian piknometer dikosongkan, akuades yang tersisa diabsorpsi dengan aseton. Tabung piknometer dikeringkan dengan oven. Piknometer yang telah kering ditimbang, berat yang didapatkan adalah W_1 . Berat akuades (W) dihitung dengan cara $W_2 - W_1$ [18].

Distilat dipindahkan ke dalam gelas beker kering. Distilat diaduk supaya homogen sebelum diisikan ke piknometer. Piknometer kering diisi dengan distilat, permukaan luar piknometer dikeringkan dan ditimbang. Hasil yang didapat adalah W_3 . Berat distilat adalah $W_3 - W_1 = L$. Berat air (L) dihitung dengan "specific gravity" atau $spg = L/W$. Nilai spg ditentukan menggunakan tabel AOAC (Analysis of Association of Official Analytical Chemists) dan selanjutnya persentase etanol dihitung [18].

G. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi inokulum *Zymomonas mobilis* yang terdiri dari 5 level (0, 5, 10, dan 15%). Faktor kedua adalah lama waktu proses fermentasi yang terdiri dari 5 level (0, 3, 5, 7, 9 hari). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali, sehingga diperoleh 40 unit percobaan.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Hasil Pretreatment dan Hidrolisis

Perlakuan awal dilakukan secara mekanik, fisik, dan kimiawi. Perlakuan mekanik meliputi pengeringan,

potongan, dan penggilingan bertujuan untuk memperkecil ukuran substrat sehingga memperbesar kontak enzim ke dalam serat. *Pretreatment* fisik-kimia dilakukan dengan perendaman dalam NaOH 2% dan pemanasan suhu 121°C selama 1 jam untuk membebaskan lignin dari ikatan lignoselulosa sehingga diperoleh selulosa.

Pada penelitian ini 100 tanaman dengan berat 1 kg diubah menjadi 500 g berat kering, dan setelah perlakuan NaOH, 500 g substrat kering diperoleh berat basah substrat 216,47 g. Berat basah setelah perlakuan NaOH diasumsikan mengandung selulosa, sehingga dalam penelitian ini 1 kg alang-alang bisa mengandung 433 g selulosa. Menurut Karimi [20] sebanyak 390 g selulosa secara teori dapat dikonversi menjadi 220 g atau 283 ml etanol. Maka secara teori, 433 g selulosa alang-alang dalam penelitian ini dapat dikonversi menjadi 244,2 g atau 314,2 ml.

Substrat alang-alang yang dihidrolisis menggunakan enzim selulase yang disekresikan oleh *Penicillium* sp. kode T1.2 menghasilkan kadar gula reduksi awal sebesar 10,37%, dengan kadar gula reduksi kontrol (tanpa penambahan kapang) sebesar 2,14%. Konsentrasi gula reduksi yang berbeda tersebut menunjukkan bahwa reaksi hidrolisis tersebut melibatkan kerjasama tiga komponen enzim yaitu enzim endoglukanase, eksoglukanase, dan β -glukosidase sehingga dihasilkan hasil akhir gula.

B. Hasil Fermentasi Menggunakan *Z. mobilis*

Hasil yang diperoleh berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa interaksi perlakuan konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi masing-masing berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap kadar etanol.

Berdasarkan tabel 2, dapat diketahui bahwa pada interaksi antara konsentrasi 0% dengan waktu fermentasi 0, 3, 5, 7, dan 9 hari berturut-turut adalah 0,00%, 0,04%, 0,09%, 0,17%, dan 0,17%. Namun berdasarkan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tukey dengan selang kepercayaan 95%, kadar etanol sebesar 0,00%, 0,04%, 0,09% dan 0,17% memberikan hasil yang tidak berbeda nyata (notasi a), sehingga meskipun terdapat kadar etanol pada konsentrasi inokulum 0% dan waktu fermentasi 3, 5, 7, 9 hari sebesar 0,04%, 0,09%, 0,17% dianggap tidak berbeda nyata dengan kadar etanol 0,00%. Tidak dihasilkannya etanol dikarenakan tidak adanya inokulum yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi, sehingga tidak ada mikroorganisme yang memanfaatkan substrat maupun nutrisi untuk difermentasikan menjadi etanol.

Pada interaksi antara semua konsentrasi inokulum dengan waktu fermentasi 0 hari diketahui tidak terdapat etanol pada medium fermentasi. Hal ini diduga karena bakteri masih mengalami adaptasi terhadap medium fermentasi yang baru, bakteri cenderung memanfaatkan nutrisi untuk sintesis sel daripada menghasilkan etanol. Menurut Thiel [20], bakteri yang dipindahkan dari medium lama ke medium baru perlu untuk mensintesis asam amino, enzim, dan vitamin sebelum memulai pertumbuhan. Selain itu pengaliran gas nitrogen baru dilakukan sehingga kondisi di dalam medium belum sepenuhnya anaerob. Breed [21], menyatakan *Z. mobilis* dapat tetap hidup pada kondisi aerob untuk membentuk massa sel

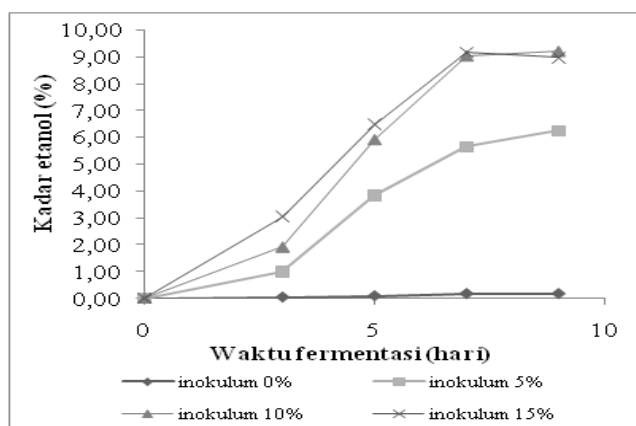
Tabel 1.
Hasil pretreatment alang-alang.

Berat kering awal (g)	Berat kering setelah perlakuan NaOH (g)	Hasil Etanol (ml)	Penelitian
1000	390	283	Karimi [20]
1000	433	314,2	Penelitian ini.

Tabel 2.
Kadar etanol hasil fermentasi substrat alang-alang oleh *Z. mobilis*.

Konsentrasi inokulum <i>Z. mobilis</i>	Kadar etanol yang dihasilkan (%) dalam waktu				
	0 hari	3 hari	5 hari	7 hari	9 hari
0%	0,00 ^a	0,04 ^a	0,09 ^a	0,17 ^a	0,17 ^a
5%	0,00 ^a	0,98 ^{ab}	3,83 ^d	5,64 ^e	6,24 ^e
10%	0,00 ^a	1,90 ^{bc}	5,90 ^e	9,02 ^f	9,19 ^f
15%	0,00 ^a	3,04 ^{cd}	6,47 ^e	9,15 ^f	8,95 ^f

Keterangan : angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom dan baris menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Tukey pada selang kepercayaan 95%.



Gambar 1. Grafik kadar etanol hasil fermentasi substrat alang-alang oleh bakteri *Z. mobilis*.

asalkan tersedia gula sebagai sumber karbon.

Kadar etanol mengalami peningkatan pada semua konsentrasi inokulum dan waktu fermentasi 3 hari hingga 9 hari. Peningkatan kadar etanol seiring dengan waktu fermentasi menunjukkan adanya aktivitas sel bakteri yang aktif melakukan proses fermentasi menghasilkan etanol. Prescott and Dunn [22], menyatakan faktor yang mempengaruhi peningkatan kadar etanol selama proses fermentasi adalah ketersediaan substrat gula reduksi dan jumlah mikroorganisme *Z. mobilis*.

Faktor lingkungan fisik dan kimia yang optimal juga dapat meningkatkan hasil fermentasi, diantaranya suhu 30°C, pH 4, dan kondisi yang anaerob. Menurut Jungwoo [23], suhu dan pH mempengaruhi kinerja enzim-enzim dalam jalur *Entner-Doudoroff*, diantaranya enzim fosfoglukokinase yang mengkonversi glukosa menjadi glukosa 6-fosfat. Keberadaan oksigen dapat meningkatkan akumulasi asetaldehid, asam asetat, dan metabolit lain yang dapat menghambat

pembentukan etanol, sedangkan tanpa adanya oksigen terdapat peningkatan kinerja enzim *piruvat decarboxylase* dan *alcohol dehidrogenase* yang berperan dalam pembentukan etanol [24].

Kadar etanol mulai mengalami penurunan pada hari ke-9 dengan konsentrasi inokulum 15%. Hal ini disebabkan nutrisi yang semakin berkurang, dan kadar etanol yang semakin tinggi dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Hart dan Suminar [25], penurunan kadar etanol disebabkan adanya oksidasi alkohol menjadi aldehid dan keton. Pada oksidasi ini, nikotamida adenin dinukleotida (NAD) yang merupakan oksidator memicu enzim mengoksidasi alkohol menjadi senyawa-senyawa karbonil dan NAD tereduksi menjadi NADH. Etanol dapat dioksidasi menjadi asetaldehid yang bisa menghambat pertumbuhan *Z. mobilis*.

Kadar etanol tertinggi 9,19% diperoleh pada konsentrasi inokulum 10% dan waktu fermentasi 9 hari. Namun berdasarkan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Tukey dengan selang kepercayaan 95%, hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan kadar etanol pada konsentrasi inokulum 10% dan waktu fermentasi 7 hari sebesar 9,02%, serta pada konsentrasi inokulum 15% dan waktu fermentasi 7 hari (notasi f). Konsentrasi inokulum 10% lebih baik digunakan dalam proses fermentasi dibandingkan dengan konsentrasi 15%. Hal ini dikarenakan semakin banyak inokulum yang ditambahkan pada medium, akan menyebabkan padatnya populasi di dalam medium, dan memicu kompetisi sel dalam memanfaatkan nutrisi. Waktu fermentasi 7 hari lebih baik dibandingkan 9 hari. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu fermentasi maka semakin banyak pula etanol yang terbentuk, konsentrasi etanol yang tinggi dapat menyebabkan pH medium semakin rendah. Azizah *et al.* [26], menyatakan bahwa alkohol bersifat asam sehingga menyebabkan pH substrat semakin rendah. pH yang rendah akan mempengaruhi aktivitas dan viabilitas *Zymomonas mobilis*.

IV. KESIMPULAN

Alang-alang (*Imperata cylindrica* (L) Beauv.) berpotensi sebagai bahan baku dalam pembuatan etanol yang difermentasikan oleh bakteri *Zymomonas mobilis*. Potensi tersebut ditunjukkan dengan hasil kadar etanol optimum sebesar 9,02% pada konsentrasi inokulum 10% dan waktu fermentasi 7 hari. Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu rentang waktu perolehan konsentrasi etanol yang optimum perlu dipersempit lagi dengan memperhatikan suhu, pH, dan kondisi fermentasi yang optimum bagi bakteri *Z. mobilis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis S.D. mengucapkan terima kasih Ibu dan Bapak tercinta yang telah memberikan doa restu dan segala bentuk pengorbanannya baik moril maupun materiil. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya yang telah mendukung penelitian ini, dan Ketua Departemen Kimia Farmasi Universitas Airlangga dan Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Surabaya atas izin yang diberikan dalam pemakaian alat.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] D. P. Garrity, Soekadi M., Van N., M. D. la Cruz, Pathak P., Gunasena H., Van S., Huijun G. and Majid N., "The Imperata Grasslands of Tropical Asia: Area, Distribution, and Typology," *Agroforestry Systems* 36 (1997) 3-29.
- [2] B. Sutiya, Wiwin T.I, Adi R., dan Sunardi, "Kandungan Kimia dan Sifat Serat Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) Sebagai Gambaran Bahan Baku Pulp dan Kertas," *Bioscientiae* Vol. 9, No. 1 (2012, Jan.) 8-19.
- [3] I. Liu and J. Yang, "Cellulase Production By *Trichoderma Koningii* AS3.4262 In Solid-State Fermentation Using Lignocellulosic Waste From The Vinegar Industry," *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4) (2007) 420-425.
- [4] C. Long, Y. Ou, P. Guo, Y. Li, J. Cui, M. Long dan Z. Hu, "Cellulase Production By Solid State Fermentation Using Bagasse With *Penicillium decumbens* L-06," *Annals of Microbiology* 59 (2009) 517-523.
- [5] J. Zaldivar, Nielsen J and Olsson L, "Fuel Ethanol Production from Lignocellulose: a Challenge for Metabolic Engineering and Process Integration," *Appl Microbiol Biotechnol.* 56 (2001) 17-34.
- [6] M.G. Garrity, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Departement of Microbiology and Molecular Genetics.* USA: Machigan State University. (2005).
- [7] P.L. Rogers, Lee K. J., M. Skotnicki and D. Tribe, "Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*," *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 23 (1982) 37-84.
- [8] C. Ashary, "Produksi Enzim Selulase dan Hidrolisis Enzimatik pada Jerami Padi dengan Menggunakan Buffer Sitrat," Tugas Akhir, Teknik Kimia, FTI, ITS (2011).
- [9] Y. S. Lin, and W. Lee, "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Alkali-Prereated Cogongrass for Bioethanol Production," *BioResources* 6(3) (2011) 2744-2756.
- [10] C. Pasha, Chand, B.C Sekhar, B.Srinivas, K. Balakrishna, and N. Hanumalal, "Sequential Cellulase Production, Saccharification and Ethanol Fermentation Using Rice Straw," *Journal of Scientific and Industrial Research*, Vol. 71 (2012, sept) 616-620.
- [11] I. Alfiah dan N.D Kuswyasari, "Produksi Enzim Selulase oleh *Penicillium* sp. pada Suhu, pH, dan Limbah Pertanian yang Berbeda," Paper Tugas Akhir. Jurusan Biologi, FMIPA, ITS (2012).
- [12] Gunam, Ida B., Ketut B., I. M. Yoga S., "Pengaruh Perlakuan Delignifikasi dengan Larutan NaOH dan Konsentrasi Substrat Jerami Padi terhadap Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus Niger* Nrrl A-li, 264," *Jurnal Biologi* XIV (1) (2010) 55 – 61.
- [13] T. Struch, Neuss B., B. Mayer, and Sahn H., "Osmotic Adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solution," *Journal Application of Microbiology and Biotechnology* (1991).
- [14] M. L. Cazetta, Celligoi M.A.P.C, Buzato J.B, and Scarmino I.S., "Fermentation of Molasses by *Zymomonas mobilis*: Effect of Temperature and Sugar Concentration on Ethanol Production," *Journal Bioresource and Technology*. Vol. 98 (2007) 2824-2828.
- [15] K. Zhang, and Feng H., "Fermentation Potentials of *Zymomonas mobilis* and its Application in Ethanol Production from Low-cost Raw Sweet Potato," *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9 (37) (2010) No. 6122-6128.
- [16] O Obire, "Activity of *Zymomonas mobilis* Species in Palm-sap Obtained from Three Areas in Edo State, Nigeria," *Journal of Application Science and Environment. Mgt.* Vol. 9 (1) (2005) No. 25-30.
- [17] E. Sunarto, "Fermentasi Selulosa Batang Jagung (*Zea mays* L.) oleh *Zymomonas mobilis* dengan Penggunaan Enzim Selulase Melalui Metode Separate Enzymatic Hidrolysis and Fermentation (SHF)," Tugas Akhir. Jurusan Biologi, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (2012).
- [18] Purwanto, "Aktivitas Fermentasi Alkoholik Cairan Buah," *Jurnal Universitas Widya Mandala Madiun*. No.1 (2004) XXXII.
- [19] S. Sudarmadji, B. Haryono, dan Suhardi, *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Yogyakarta: Liberty (1984).
- [20] T. Thiel, *Introduction to Bacteria*, Class Module, Departement of Biology, University of Missouri (1999).
- [21] R. S. Breed, E. G. D Murray, and N. R. Smith, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed, USA: The Williams and Wilkins Company (1957).
- [22] M. C. Presscott, and C. G. Dunn, *Industrial Microbiology*. London: McGrawHill Book (1959).
- [23] Y. Jungwoo, "Enhanced Bioethanol Production by *Zymomonas mobilis* in Response to the Quorum Sensing Molecules AI-2," Thesis, Durham University (2011).

- [24]S. Yang, Timothy J. T., Nancy L. E., Sue L. C., Stanton L. M., Brian H. D., Anthony V. P., Miguel R., and Steven D. B, "Transcriptomic and Metabolomic Profiling of *Zymomonas mobilis* during Aerobic and Anaerobic Fermentations". *Journal of Bioedical Central genomics*, Vol. 10 (2009) No.34.
- [25]A. Hart, dan A. Suminar, *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat*, Jakarta: Penerbit Erlangga (1983).
- [26]N. Azizah, A.N. Al--Baarri, dan S. Mulyani, "Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey dengan Substitusi Kulit Nanas". *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, Vol.1 No. 2 (2012).