

Pengaruh Perlakuan Awal Basa Terhadap Komposisi Lignoselulosa Kulit Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Effect of Treatment Early Bases Against Composition of Lignocellulose Cocoa Leather (*Theobroma cacao* L.)

Sucihati¹, Sutikno², dan Dewi Sartika²

¹) Mahasiswa Magister Teknologi Industri Pertanian Universitas Lampung

²) Dosen Program Studi Magister Teknologi Industri Pertanian Universitas Lampung

ABSTRACT

Cacao pod, soild waste of cacao, contains high lignocelluloses which can be converted into bioethanol after pretreatment and hidrolysis. Objectives of this research were to find out the effect of pretreatment with NaOH on cacao pod lignocellulose composition. Two factors in this reearch were arranged factorialy in completely random bock design with three repications. The first factor was heating duration with was consisted of 15 and 30 minutes. The second factor was NaOH concentrations consisting of 0, 0,5 1,0 , 1,5 dan 2,0 M. Data were analyzed using analysis of variance and orthogonal polynomial test. The best treatment was submerssion of cacao pod into 1,59 M NaOH solution at 121°C for 30 minutes. This treatment was able to decrease cacao pod lignin from 24,32% to 0,60%, decrease cacao hemicellulose from 21,59% to 9,54%, and increase cacao pod cellulose from 15,94% to 35,05%.

Keywords: cacao pod, lignocelluloses, pretreatment with NaOH, bioethanol.

Diterima: 18 Mei 2014, disetujui: 23 Mei 2014

PENDAHULUAN

Kebutuhan Bahan Bakar Minyak (BBM) saat ini meningkat. Pada tahun 2010 pemakaian BBM sebanyak 388.241 ribu barel perhari dan meningkat menjadi 394.052 ribu barel per hari pada tahun 2011 (Direktorat Jendral Migas, 2012). Sementara itu, Produksi BBM menurun setiap tahunnya. Produksi BBM pada tahun 2010, yaitu sebanyak 329.249 ribu barel per hari turun menjadi 163.633 ribu barel per hari pada tahun 2011 (Direktorat jendral Migas, 2012). Hal inilah yang menyebabkan Indonesia harus mengimpor BBM sebesar 230.419 ribu barel perhari pada tahun 2011.

Keterbatasan cadangan minyak bumi Indonesia yang hanya tersisa 7,73 milyar barel maka diperlukan sumber bahan bakar alternatif pengganti BBM. Pemerintah telah mencanangkan penggunaan energi alternatif pada Peraturan Menteri Energi Dan Sumberdaya Mineral No. 32 Tahun 2008 tentang Pentahapan Kewajiban Pemakaian Bahan Bakar Nabati (BBN). Oleh sebab itu, perlu adanya bahan alternatif yang dapat digunakan sebagai pengganti BBM karena kuantitas minyak bumi pada lapisan bumi semakin menipis akibat dari eksploitasi terus menerus dan sifat dari Bahan Bakar Minyak itu sendiri yang tidak mudah untuk diperbaharui. Salah satu energi alternatif Bahan Bakar Nabati (BBN) yang banyak dikembangkan saat ini adalah bioetanol.

Bioetanol merupakan etanol atau etil alkohol (C_2H_5OH) dari hasil fermentasi glukosa ($C_6H_{12}O_6$) yang berasal dari bahan baku nabati (Samah *et al.*, 2011). Perkembangan penelitian bioetanol sampai tahap ini sudah memasuki dua generasi yaitu generasi pertama dan generasi kedua. Bioetanol generasi pertama menggunakan bahan baku pati sebagai substrat fermentasi, namun Pemanfaatan bioetanol berbasis pati-patian dikhawatirkan akan mengganggu kestabilan pangan, mengingat Indonesia belum cukup mandiri untuk memenuhi kebutuhannya sendiri. Persaingan bahan baku untuk kebutuhan pangan dan energi tidak akan terhindarkan karena pangan dan energi merupakan 2 kebutuhan utama manusia yang saling terkait. Untuk mengatasi polemik tersebut maka dikembangkan bioetanol generasi kedua yang menggunakan limbah padat agroindustri sebagai bahan bakunya.

Buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terdapat cukup banyak di Indonesia. Menurut BPS dalam artikel Berita Industri Kemenperin, pada tahun 2012 produksi kakao Indonesia mencapai 700.000 ton (Anonim, 2013). Sama halnya dengan limbah hasil panen dan pengolahan pertanian lainnya, kulit atau cangkang buah kakao belum dimanfaatkan secara optimal. Selama ini, cangkang buah kakao hanya digunakan sebagai pakan ternak setelah melalui tahapan bioproses. Menurut Siswoputranto, 1983, buah kakao umumnya terdiri dari 73,73% bagian kulit (pod kakao), 24,40% biji (umumnya dalam 1 buah kakao terdiri dari 30–40 butir biji kakao) dan 2% plasenta (merupakan kulit ari pembungkus biji kakao).

Kulit kakao ini mengandung lignoselulosa yang tinggi. Hasil penelitian Ashadi (1998) menunjukkan bahwa serat kasar kulit kakao mengandung 20,11% lignin, 31,25% selulosa, dan 48,64% hemiselulosa. Dengan demikian, jika diasumsikan dari total buah kakao produksi Indonesia \pm 700 ribu ton (Anonim, 2013) dengan kandungan kulit dalam setiap buahnya 70-75% (\pm 510 ribu ton) kulit kakao yang memiliki kadar selulosa sebesar 31,25% maka jumlah selulosa yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan bioetanol yaitu sebanyak \pm 219 ton pertahun.

Bioetanol generasi kedua diproduksi melalui 4 tahap. Tahapan tersebut yaitu tahap perlakuan awal, tahap hidrolisis, tahap fermentasi, dan tahap destilasi. Tahap perlakuan awal merupakan tahapan yang penting dan mempengaruhi jumlah bioethanol yang dihasilkan. Oleh sebab itu, untuk menghasilkan bioetanol dari kulit kakao yang optimal perlu dilakukan langkah optimasi proses perlakuan awal untuk menghilangkan lignin.

METODE

Bahan baku yang digunakan sebagai sampel berupa limbah agroindustri kulit kakao yang diperoleh dari desa Jambu, Kecamatan kedondong, Kabupaten Pesawaran dan bahan kimia terdiri dari enzim sellulase (Sqzyme CS P-acid cellulase), Natrium Hidroksida (NaOH), air suling, asam sulfat (H_2SO_4), ragi roti (merk: Fermipan), Natrium thiopospat, Natrium bikarbonat, natrium karbonat anhidrat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, amonium molibdad $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ produksi PT. Merck diperoleh dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian.

Alat-alat yang digunakan antara lain waterbath (Polyscience), mikropipet 1000 μ L (Thermo Scientific, Tipe: Finnpiptette F3), oven (Philip Harris), timbangan 4 digit (Mettler M3000), ayakan (40 mesh), *hot plate* (Cimerec3), sentrifuge (Thermo Electron Corporation), autoklaf, spektrofotometer (Milton Ray Company), alat-alat gelas (merk pyrex) dan kromatografi gas.

Penelitian dilakukan secara faktorial dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan tiga kali ulangan. Faktor pertama yaitu waktu pemanasan yang terdiri atas 2 taraf 15 dan 30

menit. Faktor kedua yaitu konsentrasi NaOH yang terdiri atas 5 taraf, yaitu 0, 0,5, 1,0, 1,5, dan 2,0 M. Data dianalisis dengan sidik ragam untuk mendapatkan penduga ragam galat dan ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis lebih lanjut dengan polinomial ortogonal.

Persiapan bahan baku

Sampel kulit kakao yang digunakan adalah kulit kakao dari buah yang telah tua. Kulit kakao dikecilkan ukurannya dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 70⁰ C hingga kadar air konstan. Selanjutnya kulit kakao yang telah halus diayak menggunakan screen 40-60 mesh dan disimpan dalam kondisi kering pada suhu ruang sampai dengan akan digunakan pada proses perlakuan awal. Kulit kakao sebelum diberi perlakuan awal terlebih dahulu dilakukan analisis kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin.

Perlakuan awal basa dengan NaOH

Kulit kakao ditimbang sebanyak 4 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 100 ml, lalu diberi larutan NaOH dengan konsentrasi 0, 0,5, 1, 1,5 dan 2,0 M sebanyak 80 mL (1:20 b/v) (Septiyani, 2011). Larutan tersebut dihomogenisasi menggunakan shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit dan dipanaskan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 dan 30 menit. Setelah proses pemanasan, kulit kakao tersebut disaring dan dibilas menggunakan air suling sebanyak 800 mL (1 : 200 mL) (Septiyani, 2011). Kemudian residu dikeringkan dalam oven pada suhu 60⁰C selama 24 jam dan dianalisa kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin menggunakan metode chesson dalam Datta (1981).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan awal dengan NaOH bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu pemanasan dan konsentrasi NaOH terhadap komponen lignoselulosa kulit kakao dan menemukan perlakuan yang mampu menurunkan kadar lignin tertinggi. Kulit kakao yang telah dikeringkan hingga berat konstan direndam dalam 0 - 2,0 M larutan NaOH, kemudian dipanaskan pada suhu 121⁰C selama 15 dan 30 menit. Setelah proses perlakuan awal dengan NaOH dianalisis kadar lignin, selulosa dan hemiselulosanya. Hasil dan pembahasan kadar lignin, hemiselulosa dan selulosa diuraikan secara terperinci di bawah ini :

Kadar Lignin

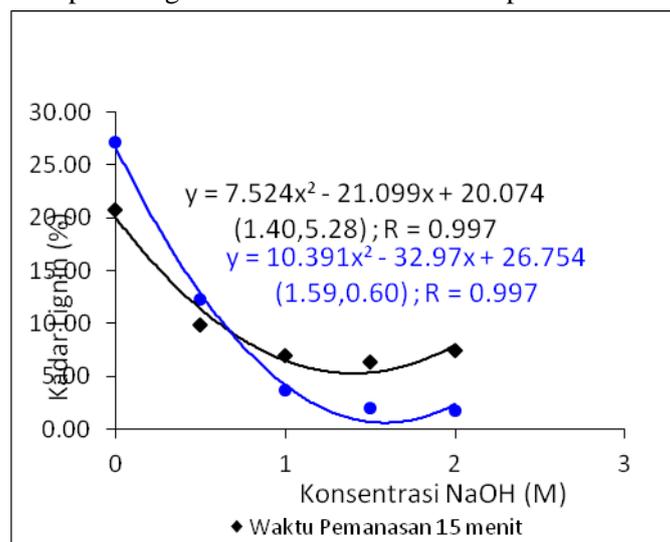
Data kadar lignin ini diuji homogenitasnya dengan Levent Test. Berdasarkan hasil Levent test diperoleh p-value = 0,560 lebih besar dari nilai $\alpha = 0,05$. Hal ini dapat dikatakan bahwa H0 diterima, yang bearti ragam data lignin homogen.

Untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan, data kadar lignin dianalisis dengan menggunakan sidik ragam. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi NaOH, waktu pemanasan, dan interaksi antar keduanya berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar lignin dari kulit kakao.

Perlakuan yang paling optimum pada penelitian ini dapat dilihat dengan uji lanjut polinomial ortogonal (Gambar 1) di bawah ini. Hasil penelitian dengan perlakuan pemanasan 15 menit dan konsentrasi NaOH 0-2,0 M disajikan pola persamaan kuadrat $Y = 7,524X^2 - 21,099X + 20,074$ dengan titik optimum penurunan lignin menjadi 5,28% terjadi pada perlakuan NaOH 1,40 M. Waktu

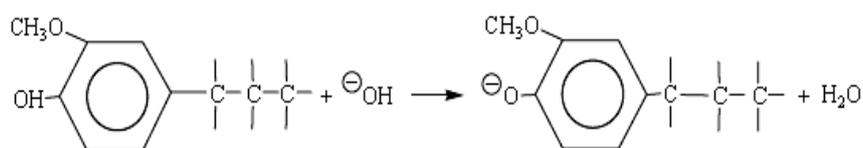
pemanasan 30 menit yang diberi perlakuan konsentrasi NaOH dari 0 M – 2,0 M menghasilkan suatu persamaan kuadrat $Y = 10,391X^2 - 32,97X + 26,754$ dengan titik optimum penurunan kadar lignin menjadi 0,60% terjadi pada perlakuan konsentrasi NaOH 1,59 M.

Kombinasi optimum antara konsentrasi NaOH dan waktu pemanasan dalam perlakuan awal kulit kakao untuk menurunkan kadar lignin terjadi pada konsentrasi NaOH 1,59 M dan waktu pemanasan selama 30 menit. Pada kondisi tersebut menghasilkan penurunan kadar lignin menjadi 0.60%. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi NaOH dan semakin lama waktu pemanasan maka energi kinetik molekul NaOH akan menjadi lebih tinggi sehingga laju reaksi pemutusan ikatan pada komponen lignoselulosa akan semakin cepat.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi NaOH terhadap kadar lignin pada waktu pemanasan 15 dan 30 menit.

Konsentrasi NaOH berpengaruh secara signifikan terhadap penurunan kadar lignin disebabkan oleh konsentrasi NaOH yang tinggi akan memberikan kontribusi OH^- yang tinggi pula untuk memutus ikatan ester lignin-selulosa dalam larutan sehingga mempercepat pemutusan pada ikatan intra molekul lignin. Proses pemasakan dalam larutan NaOH menyebabkan polimer lignin kulit kakao akan terdegradasi dan kemudian larut dalam larutan pemasak yang disebabkan oleh terjadinya transfer ion hidrogen dari gugus hidroksil pada lignin ke ion hidroksil dari NaOH (Lim dkk., 2012). Reaksi lignin dengan NaOH disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi lignin dari gugus NaOH pada proses delignifikasi (Lim dkk., 2012).

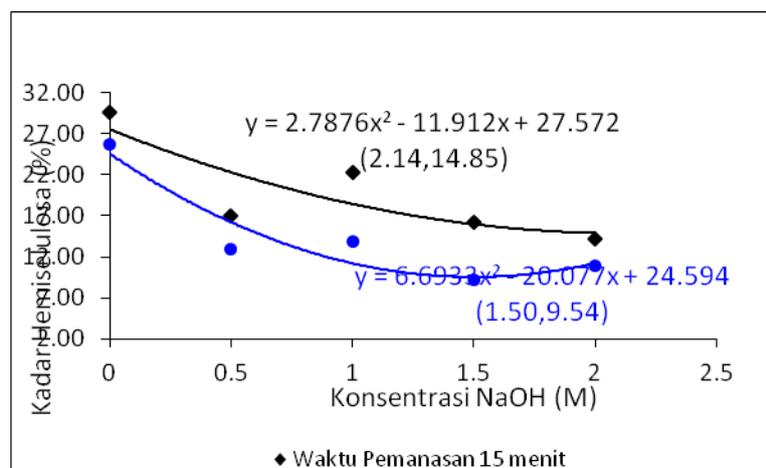
Kadar Hemiselulosa

Hasil penelitian menunjukkan kadar Hemiselulosa kulit kakao setelah perlakuan awal dengan NaOH berkisar antara 9,15% – 29,61% . Data kadar hemiselulosa ini diuji homogenitasnya dengan Levent Test. Berdasarkan hasil Levent test diperoleh p-value = 0,270 lebih besar dari nilai $\alpha = 0,05$. Hal ini dapat dikatakan bahwa H_0 diterima, yang berarti ragam data hemiselulosa homogen.

Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, data kadar hemiselulosa yang homogen menurut Levent Test tersebut dianalisis sidik ragamnya. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi NaOH, waktu pemanasan dan interaksi antar keduanya memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan kadar hemiselulosa dari kulit kakao.

Perlakuan yang paling optimum pada penelitian ini dapat dilihat dengan uji lanjut polinomial ortogonal. Pada uji lanjut dengan polinomial ortogonal menunjukkan kadar hemiselulosa kulit kakao pada waktu pemanasan 30 menit yang diberi perlakuan konsentrasi NaOH dari 0 M – 2,0 M menghasilkan suatu persamaan kuadrat $Y = 2,7833X^2 - 20,077X + 24,594$ dan didapatkan konsentrasi NaOH 1,5 M yang efektif menurunkan kadar hemiselulosa menjadi 9,54%. Hasil penelitian dengan perlakuan waktu pemanasan 15 menit dan konsentrasi NaOH berkisar 0 M – 2,0 M didapatkan suatu persamaan kuadrat $Y = 2,7876X^2 - 11,912X + 27,572$. Berdasarkan persamaan tersebut didapat titik konsentrasi NaOH optimum yaitu 2,14 M yang efektif menurunkan kadar hemiselulosa menjadi 14,85%.

Kombinasi optimum antara konsentrasi NaOH dan waktu pemanasan dalam perlakuan awal kulit kakao untuk menurunkan kadar hemiselulosa terjadi pada konsentrasi NaOH 1,5 M dan waktu pemanasan selama 30 menit. Pada kondisi tersebut menghasilkan penurunan kadar hemiselulosa menjadi 9,54%, ternyata lebih efektif penurunannya dibandingkan dengan perlakuan 15 menit (titik optimum pada konsentrasi NaOH 2,14) kadar hemiselulosa turun menjadi 14,85%.



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi NaOH terhadap kadar hemiselulosa pada waktu pemanasan 15 dan 30 menit.

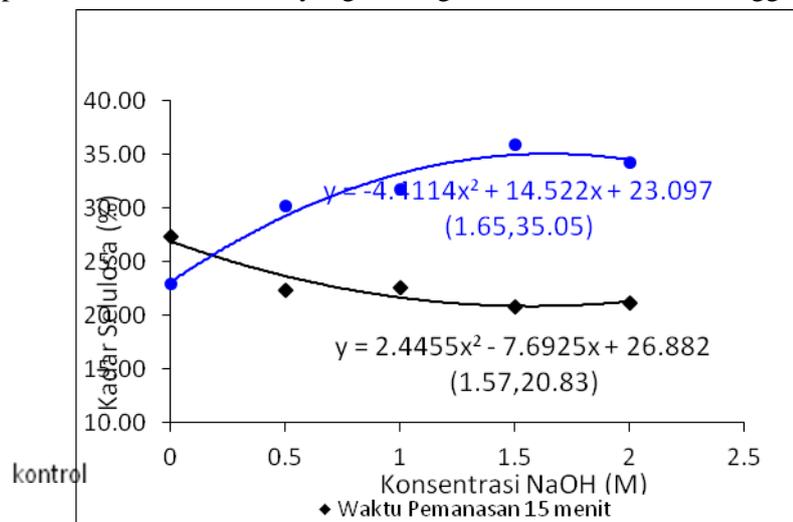
Perlakuan awal dengan NaOH akan menurunkan kadar hemiselulosa secara signifikan (Gambar 3). Peningkatan konsentrasi NaOH dan semakin lama waktu pemanasan akan memberikan kontribusi OH⁻ dan tumbukan yang lebih tinggi pula untuk melarutkan hemiselulosa pada larutan akibat meningkatnya energi aktivasi. Menurut Oktaveni (2009), reaksi yang terjadi selama perlakuan awal adalah ekstraksi dan pelarutan fraksi polisakarida berbobot molekul rendah, serta terjadinya reaksi pemutusan polimer melalui reaksi pengelupasan ujung reaktif aldehida hemiselulosa dan selulosa. Hal tersebut mengakibatkan persentase hemiselulosa menjadi rendah setelah dipanaskan dalam larutan NaOH.

Molekul NaOH akan melarutkan hemiselulosa dalam bubuk kulit kakao dan memutuskan ikatan hidrogen terutama ikatan intermolekul selulosa sehingga selulosa berada dalam keadaan tidak terikat. Molekul hemiselulosa yang larut dalam NaOH adalah rantai pendek dan rantai cabang serta terjadi asetilasi gugus substituen pada hemiselulosa, sedangkan ikatan glikosidik intra-molekul hemiselulosa sulit dihidrolisis. Jika serat hemiselulosa direaksikan dengan NaOH pada suhu tinggi maka dapat teroksidasi menjadi unit-unit yang sederhana kelompok gula pentosan seperti D-xilosa dan L-arabinosa serta gula heksosa seperti D-glukosa, D-galaktosa dan D-manosa yang sifatnya mudah larut dalam air (Fengel dan Wegener, 1984).

Kadar Selulosa

Data kadar selulosa ini diuji homogenitasnya dengan Levent Test. Berdasarkan hasil Levent test diperoleh p-value = 0,126 lebih besar dari nilai $\alpha = 0,05$. Hal ini dapat dikatakan bahwa H_0 tidak diterima, yang berarti ragam data selulosa homogen. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, data kadar selulosa tersebut dianalisis sidik ragamnya. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi NaOH, waktu pemanasan dan interaksi antar keduanya memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan kadar selulosa dari kulit kakao.

Perlakuan yang paling optimum pada penelitian ini dapat dilihat dengan uji lanjut polinomial ortogonal (Gambar 4). Hasil uji lanjut dengan polinomial ortogonal pada waktu pemanasan 30 menit dan konsentrasi NaOH 0 M – 2,0 M didapatkan persamaan kuadrat $Y = -4,4114X^2 + 14,522X + 23,097$, dari persamaan kuadrat tersebut didapatkan konsentrasi optimum untuk meningkatkan kadar selulosa yaitu pada konsentrasi 1,65 M yang meningkatkan kadar selulosa hingga 35,05%.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi NaOH terhadap kadar selulosa pada waktu pemanasan 15 dan 30 menit

Untuk waktu pemanasan 15 menit nilai optimum konsentrasi NaOH untuk menaikkan kadar selulosa yang didapat dari persamaan kuadrat $Y = 2,446X^2 - 7,6925X + 26,88$ adalah pada konsentrasi 1,57 M yang menghasilkan peningkatan kadar selulosa sampai dengan 20,83%.

Kombinasi perlakuan konsentrasi NaOH dan waktu pemanasan yang optimum adalah pada konsentrasi NaOH 1,65 M dengan waktu pemanasan selama 30 menit yang meningkatkan kadar selulosa hingga 35,05%. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi NaOH dan semakin lama waktu pemanasan maka energi kinetik molekul NaOH akan menjadi lebih tinggi sehingga laju

reaksi pemutusan ikatan pada komponen lignoselulosa akan semakin cepat dan komponen lain selain selulosa seperti lignin dan hemiselulosa dapat bereaksi dengan NaOH.

Pada waktu pemanasan 30 menit dan konsentrasi NaOH 0M – 1,5M, konsentrasi selulosa mengalami peningkatan dari 22,87% sampai dengan 35,97%. Akan tetapi, pada konsentrasi 2,0M kadar selulosa turun menjadi 34,23%. Kenaikan konsentrasi NaOH yang lebih tinggi (2.0 M) tidak berpengaruh terhadap kenaikan selulosa bahkan cenderung mengalami penurunan. Hal ini disebabkan selulosa sebagian ikut terlarut sehingga presentase bahan lain semakin besar.

Hidrolisis Enzimatis Dengan Enzim Selulase

Tahap hidrolisis enzimatis dalam penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan glukosa yang akan digunakan dalam proses fermentasi pembuatan bioetanol dari kulit kakao. Hasil Terbaik dari perlakuan awal yaitu dengan menggunakan NaOH 1,5 M dan waktu pemanasan 30 menit dilakukan hidrolisis menggunakan enzim selulase dengan konsentrasi substrat 4 gram (10% b/v) dan konsentrasi enzim 30 FPU pada suhu 50 °C selama 18 jam, kemudian dianalisa kadar gula reduksinya. Kadar gula reduksi yang dihasilkan dari proses hidrolisis 2,58 g/L.

Enzim selulase yang digunakan pada penelitian ini bertujuan untuk menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Degradasi selulosa menjadi glukosa, umumnya merupakan proses sinergis antara endoglukanase, eksoglukanase dan β -glukosidase yang ketiganya merupakan bagian dari selulase (Rabinovich *et al.*, 2002). Pada tahap awal Endoglukanase menghidrolisis ikatan 1,4 secara acak dan menyerang bagian yang sedikit kristalin pada serat selulosa sehingga dihasilkan 2 molekul oligosakarida. Selanjutnya eksoglukanase memotong rantai utama selulosa dengan menghasilkan beberapa unit selobiosa atau molekul-molekul disakarida. Terakhir selobiosa didegradasi menjadi unit yang lebih kecil yaitu molekul glukosa oleh enzim β -glukosidase (Taherzadeh dan Karimi 2007).

Fermentasi Hidrolisat Kulit Coklat

Gula reduksi hasil hidrolisis enzimatis dengan enzim selulase pada suhu 50°C selama 18 jam difermentasi dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dari ragi roti dengan konsentrasi starter 10 % pada suhu 30°C selama 72 jam yang dilakukan sebanyak 3 kali ulangan, dihasilkan kadar etanol ulangan 1, 2 dan 3 secara berturut-turut adalah 0,4%, 0,29%, 0,3% dan rata-rata ketiga ulangan tersebut adalah 0,33%. Yield etanol terhadap gula reduksi pada kulit coklat adalah 89,41% dan yield etanol terhadap kadar selulosa kulit coklat adalah 0,07%.

Konsentrasi etanol yang semakin tinggi akan mempengaruhi ketahanan *S. cereviceae*. Konsentrasi etanol 1-2 % (v/v) dapat mengganggu fermentasi dan pada konsentrasi etanol 10% (v/v) laju pertumbuhan khamir akan berhenti karena khamir merupakan mikroorganisme yang peka terhadap etanol (Clark dan Mackie, 1984). Menurut Prescott dan Dunn (1981), kadar etanol maksimal yang bisa dihasilkan sebelum fermentasi benar-benar berhenti adalah 13% (v/v). Jika kadar etanol pada penelitian ini ditingkatkan maka masih pertumbuhan *S. cerevisiae* tidak terganggu hingga mencapai konsentrasi 13%. Oleh karena itu, proses hidrolisis perlu dioptimalkan agar kadar etanol yang dihasilkan menjadi lebih tinggi.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum perlakuan awal kulit coklat didapatkan pada perlakuan konsentrasi NaOH 1,5% dengan suhu

121°C selama 30 menit akan menurunkan lignin dari 24,32% menjadi 0,60%, menurunkan kadar hemiselulosa dari 21,59% menjadi 9,54% dan meningkatkan kadar selulosa dari 15,94% menjadi 35,05%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2013. Pemerintah Genjot Industri Kakao. Kemenperin. <http://www.Kemenperind.go.id>. Diakses Pada Tanggal 5 Februari 2013.
- Ashadi, R.W. 1988. Pembuatan Gula Cair dari Pod Kakao Dengan Menggunakan Asam Sulfat, Enzim, Serta Kombinasi Keduanya. Skripsi. Fakultas teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Clark, T and K.L. Mackie. 1984. Fermentation Inhibition in World Hydrolisates Derived From the Softwood Pinus Radiate. *J. Chem. Biootechnol.* Vol.34B Hal : 101-110.
- Datta, R 1981. Acidogenic Fermentation of Linocellulose Acid Yield and Conversion of Components. *Biotechno.* Dioeng 23. Hlm 2167-2170.
- Direktorat Jendral Migas. 2012. Produksi Minyak Bumi. <http://www.migas.esdm.go.id>. Diakses pada tanggal 14 Desember 2012.
- Fengel, D. and G. Wegener. 1984. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions.* Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Lim, M., Wirtanto, E.dan Masyithah,Z. 2012. Kajian Karakteristik dan Pengaruh Nisbah Pereaksi, Ph Awal Reaksi Dan Suhu Reaksi Terhadap Berat Rendemen Natrium Lignosulfonat. *Jurnal Teknik Kimia USU*, Vol. 1.
- Oktaveni. 2009. Lignin Terlarut Asam dan Delignifikasi pada Tahap Awal Proses Pulping Alkali. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Jawa Barat.
- Prescot, S.C and G Dunn.1981. *Industrial Microbiology*, 3rd ed, Mc graw Hill Book Co Inc, New York
- Rabinovich, M., Melnick, M.S. and Bolobova, A.V. 2002. The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes. *Biochemistry (Moscow)*. vol:67. Hal:850-871.
- Samah, O., Sias, S., Hua, Y., dan Hussin, N. 2011. Production of Ethanol from Cocoa Pod Hydrolysate. *ITB Journal of Science*. 43A(2):87-94.
- Septiyani, R. 2011. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi Enzim Selulase Terhadap Kadar Gula Reduksi Ampas Tebu. Skripsi. Universitas Lampung. Lampung.
- Siswoputranto, Y.S. 1983. Prospek percoklatan dunia dan Kepentingan Indonesia. Makalah Konverensi Coklat Nasional II, 15 Oktober 1983, Medan.
- Taherzadeh, M.J., and Karimi, K. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials : A review. *BioResources* 2 (3) : 472-499.