

Optimasi Suhu dan Waktu SSF untuk Produksi Bioetanol dari Sampah Daun Menggunakan *Trichoderma Viride* dan *Zymomonas Mobilis*

Wulan Fitriani Safari^{1*}

¹ Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan dan Teknologi, Universitas Binawan, Jakarta, Indonesia

* Corresponding author: wulan.fitriani@binawan.ac.id

ABSTRACT

*Foliage from gardens or parks is biomass whose organic fraction can be decomposed. Foliage can be utilized by converting it into bioethanol. Various studies have shown that *Trichoderma viride* and *Zymomonas mobilis* play a role in the production of bioethanol from biomass, but until now there has been no report on the production of bioethanol from foliage using a mixture of *T. viride* and *Z. mobilis*. The purpose of this study was to determine the optimal SSF temperature and time for bioethanol production from foliage using *T. viride* and *Z. mobilis*. The fermentation process used the Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) method with a mixture of *T. viride* and *Z. mobilis* with a composition of 5% : 5% (w/v). SSF was carried out at several variations of time and temperature, 60 hours, 72 hours, 80 hours and 96 hours for times and temperatures used are 32°C, 35°C and 38°C. The fermented bioethanol was purified by distillation and finally, the ethanol content was tested with GC. Bioethanol was successfully produced from foliage using *T. viride* and *Z. mobilis* with the highest ethanol content obtained in SSF with a temperature of 35°C and a time of 72 hours, which is 0.2151%.*

Keywords: Bioethanol, Foliage, SSF, *Trichoderma viride*, *Zymomonas mobilis*

ABSTRAK

Sampah dedaunan dari kebun atau taman merupakan biomassa yang fraksi organiknya dapat terurai. Sampah dedaunan ini dapat dimanfaatkan dengan mengubahnya menjadi bioetanol. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa *Trichoderma viride* dan *Zymomonas mobilis* berperan dalam produksi bioetanol dari biomassa namun sampai saat ini belum ada laporan produksi bioetanol dari sampah organik daun kering menggunakan campuran *T. viride* dan *Z. mobilis*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui suhu dan waktu SSF optimal untuk produksi bioetanol dari sampah daun kering menggunakan campuran *T. viride* dan *Z. mobilis*. Proses fermentasi menggunakan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) dengan campuran *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan komposisi 5% : 5% (w/v). SSF dilakukan pada beberapa variasi waktu dan suhu, untuk waktu yaitu 60 jam, 72 jam, 80 jam dan 96 jam dan untuk suhu digunakan yaitu 32°C, 35°C dan 38°C. Bioetanol hasil fermentasi dimurnikan dengan destilasi dan terakhir pengujian kadar etanol dengan GC. Bioetanol berhasil diproduksi dari sampah daun menggunakan campuran *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan kadar etanol tertinggi didapat pada SSF dengan suhu 35°C dan waktu selama 72 jam yaitu sebesar 0,2151 %.

Kata Kunci: Bioetanol, Sampah Daun Kering, SSF, *Trichoderma viride*, *Zymomonas mobilis*

PENDAHULUAN

Sampah organik menjadi masalah yang dihadapi oleh negara berkembang seperti Indonesia. Seiring dengan pertambahan jumlah dan aktifitas penduduk, produksi sampah organik juga semakin meningkat terutama di daerah perkotaan. Sampah organik di daerah perkotaan antara lain berasal dari sampah kebun atau taman, dapur dan juga sisa makanan. Jenis sampah ini menyumbang sepertiga dari total sampah yang dihasilkan (Prasoulas *et al.*, 2020). Sampah kebun atau taman dianggap sebagai salah satu jenis sampah kota karena fraksi organiknya yang dapat terurai (Khalib *et al.*, 2018). Sampah taman juga dihasilkan oleh kampus Universitas Indonesia (UI) Depok yang sebagian besar wilayahnya ditanami dengan jenis yang beragam. Kampus UI Depok menghasilkan sampah taman berupa dedaunan. Selama ini, sampah tersebut sebagian kecil dimanfaatkan sebagai pupuk kompos dan sebagian besar dikumpulkan kemudian dibakar. Untuk menghindari pembuangan sampah daun dengan cara pembakaran terbuka, sampah dedaunan ini dapat dimanfaatkan dengan mengubahnya menjadi bioetanol.

Bioetanol adalah etanol (alkohol) yang dihasilkan melalui fermentasi karbohidrat dari tanaman atau ganggang menggunakan mikroba (Tse *et al.*, 2021). Bioetanol merupakan bahan bakar cair terbarukan untuk kendaraan bermotor yang dapat menggantikan penggunaan bahan

bakar fosil dan dapat digunakan langsung di kendaraan atau dicampur dengan bensin (Choudhary *et al.*, 2016), (Edeh, 2021). Bioetanol dianggap ramah lingkungan karena tingkat pembakaran bahan bakar yang lebih tinggi dan menghasilkan pengurangan kadar karbon monoksida dalam gas buang (Bušić *et al.*, 2018). Produksi dan konsumsi bioetanol secara global telah mencapai batas satu miliar liter per tahun, dan tren ini akan terus meningkat di masa mendatang (Maroufpour *et al.*, 2019). Hal ini terjadi karena bioetanol dianggap ramah

Trichoderma viride dan *Zymomonas mobilis* dilaporkan berperan dalam fermentasi biomassa menjadi bioetanol. *T. viride* adalah fungi yang dapat menghasilkan enzim selulase dan dapat menghidrolisis selulosa dari berbagai bahan baku menjadi glukosa (Ndapamuri *et al.*, 2021). *Z. mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu memanfaatkan sukrosa, glukosa dan fruktosa sebagai sumber energi (Kusmiyati *et al.*, 2016). *T. viride* digunakan untuk produksi etanol dari jerami (State *et al.*, 2018), ampas tebu (Mizar *et al.*, 2020), tongkol jagung (Syawala, 2013), limbah kulit buah kakao (Oktavianis & Sofiyanita, 2017). *Z. mobilis* dimanfaatkan dalam produksi bioetanol dari kulit jeruk (Chandra *et al.*, 2013), limbah kepala bunga matahari (Sivasakthivelan *et al.*, 2014).

Produksi bioetanol terdiri dari dua metode yaitu *Separated Hydrolysis and*

Fermentation (SHF) dan *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF). Metode SSF dianggap sebagai proses yang lebih baik daripada SHF karena produksi etanol yang cepat dan konsentrasi etanol yang dihasilkan lebih tinggi (Dahnum *et al.*, 2015). *T. viride* juga dimanfaatkan dalam produksi bioetanol dengan metode SSF dengan *Saccharomyces cerevisiae* dari pulp Gula Bit (Sh. El-Gendy *et al.*, 2015), namun sampai saat ini belum ada laporan produksi bioetanol dari sampah daun menggunakan campuran *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan metode SSF. Oleh karena itu, penulis ingin mengetahui suhu dan waktu optimal untuk produksi bioetanol dari sampah daun menggunakan campuran *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan metode SSF.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari sampah daun di lingkungan Universitas Indonesia yang diambil dari Laboratorium Parangtopo, Fakultas MIPA, isolat *T. viride* dan *Z. Mobilis* yang didapatkan dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Daya Saing Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan.

Persiapan Bahan Baku

Sampah daun yang sudah dikumpulkan kemudian dikeringkan dan dihaluskan dengan menggunakan blender.

Persiapan Kultur

T. viride dikultur pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 9 hari (Mizar *et al.*, 2020). *Z. mobilis* diinokulasi dalam medium cair mengandung 20 g glukosa, 1 g yeast extract, 0,5 g pepton, 0,1 g (NH₄)₂SO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,05 g FeSO₄ dan 0,05 g KH₂SO₄.7H₂O dalam 100 mL air suling dan diinkubasi pada suhu 30 ° C (Kusmiyati *et al.*, 2016), (Puspita *et al.*, 2019).

Pretreatment (Delignifikasi) Daun Kering dengan Larutan Amonia

Sampel daun kering halus sebanyak 30 g direndam dengan 150 ml larutan amonia (NH₃) 32% pada suhu ruang selama 24 jam. Sampel dicuci dengan akuades untuk menghilangkan larutan NH₃, kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven pada suhu 105°C sampai tercapai berat konstan, modifikasi dari metode (Gunam *et al.*, 2019).

Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak/Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)

SSF dilakukan dengan kultur batch 150 mL, terdiri dari 50 mM Yeast Peptone Sitrat Buffer (YP-CB) dan daun kering halus (10% b/v). Inokulum *T. viride* dan *Z. mobilis* ditambahkan pada substrat dengan komposisi 5% : 5% (w/v) dan diinkubasi pada shaking incubator dengan kecepatan 150 rpm. SSF dilakukan pada beberapa variasi waktu dan suhu. Waktu yang digunakan yaitu

60 jam, 72 jam, 80 jam dan 96 jam. Suhu yang digunakan yaitu 32°C, 35°C dan 38°C (Hung *et al.*, 2018).

Destilasi

Destilasi dilakukan untuk memisahkan etanol dengan campurannya. Distilasi dilakukan dengan menggunakan alat distilasi (Witeg, Jerman) yang dilakukan pada suhu 78-80°C. Larutan hasil masing-masing SSF disaring kemudian filtratnya dimasukkan ke labu destilasi untuk dimurnikan, selanjutnya uap yang dihasilkan didinginkan dengan kondenser sehingga produk yang murni tertampung dalam wadah pemisah (Yesmin *et al.*, 2020).

Pengujian Kadar Etanol dengan GC

Kadar etanol ditentukan dengan menggunakan alat GC di Laboratorium Avilasi, Departemen Kimia, FMIPA UI. GC menggunakan flame ionization detector dan kolom RTX WAX 906952. Suntikkan 1 µl masing-masing sampel yang telah didestilasi menggunakan mikro syringe. Oven kolom dioperasikan pada suhu 150°C. Suhu injektor dan detektor dipertahankan pada 180°C dan 200°C, masing-masing. Aliran kolom 0,65 mL/menit dan aliran total 55,5 mL/menit digunakan selama proses pengujian. Kadar etanol yang dihasilkan dilihat dari waktu retensi dan luas kromatogramnya serta membandingkannya dengan kurva standar senyawa murni. Etanol terdeteksi pada waktu retensi 2,8-3,0 menit (Wistara *et al.*, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Waktu dan Suhu SSF Terhadap Kadar Etanol

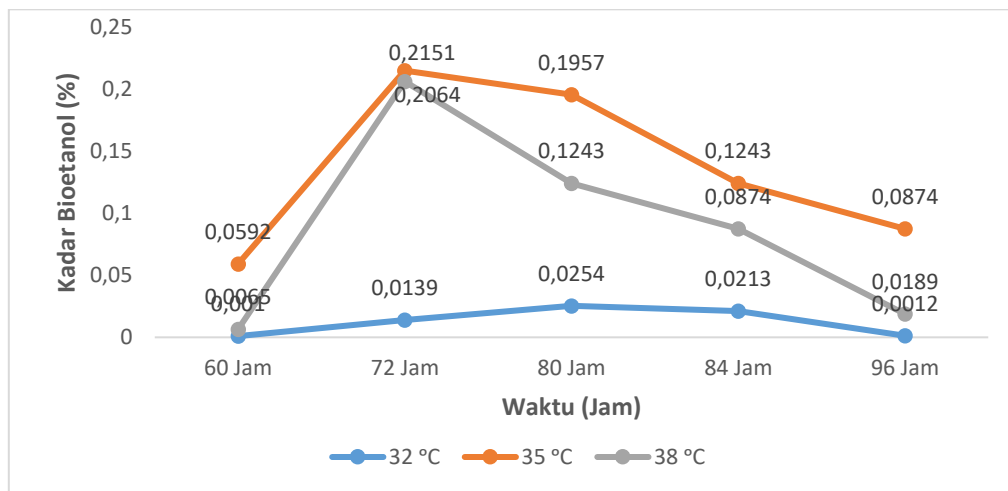
Bioetanol diproduksi menggunakan sampah daun yang diberikan *Pretreatment* (Delignifikasi). Delignifikasi adalah proses pemecahan lignoselulosa menjadi lignin, selulosa, dan hemiselulosa (Deivy Andhika Permata *et al.*, 2021). Delignifikasi bertujuan untuk menghilangkan lignin, meningkatkan ketersediaan selulosa dan hemiselulosa untuk hidrolisis dan fermentasi, meningkatkan porositas dan luas permukaan struktur biomassa serta membuat selulosa dan hemiselulosa lebih rentan terhadap hidrolisis enzimatis (Tsegaye *et al.*, 2019), (Mikulski & Kłosowski, 2022). Delignifikasi pada penelitian ini menggunakan larutan NH₃ (Amonia) 32%. Amonia yang bersifat basa bekerja dengan memecah kristalinitas ikatan selulosa dan asetil dalam struktur kimia dinding sel biomassa lignoselulosa (Latif *et al.*, 2018).

Produksi bioetanol pada penelitian ini menggunakan metode SSF. Salah satu keuntungan metode SSF yaitu dapat mempersingkat proses pembuatan bioetanol karena proses enzimatis yang menghidrolisis lignoselulosa menjadi gula dan fermentasi gula menjadi bioetanol dilakukan secara bersamaan (Permatasari *et al.*, 2020), (Zhang *et al.*, 2016). Produksi bioetanol dengan metode SSF pada penelitian ini memanfaatkan *T. viride* pada proses

hidrolisis lignoselulosa menjadi gula. *T. viride* dilaporkan menghasilkan enzim selulase dan xilanase (Bhardwaj *et al.*, 2019). Selulase adalah multi enzim yang mendegradasi selulosa. Selulase terdiri dari endoglukanase (EG) yang memecah selulosa secara acak menjadi oligosakarida, selobiohidrolase, (CBH) yang selanjutnya mendegradasi selulosa dengan melepaskan selobiosa, dan unit -glukosidase (BG) yang memecah unit glukosa dari unit non-pereduksi. ujung selo-oligosakarida dan selobiosa (Mukesh Srivastava, 2015), (Agustina *et al.*, 2019). Xilanase adalah enzim kompleks hemiselulolitik yang bekerja pada rantai pusat hemiselulosa, sehingga menurunkan derajat polimerisasinya secara drastis (Costa *et al.*, 2019). Proses fermentasi gula menjadi

etanol memanfaatkan *Z. mobilis*. *Zymomonas* dilaporkan memiliki tingkat penyerapan gula yang tinggi serta mengubah gula menjadi etanol secara teoritis maksimum mencapai 97%, tumbuh lebih cepat dan menunjukkan produktivitas etanol tertinggi selama fermentasi bila dibandingkan dengan organisme fermentasi lainnya (Puspita *et al.*, 2019), (Behera *et al.*, 2012).

Beberapa variabel dapat dioptimalkan dalam proses SSF, seperti enzim, suhu, ragi, nutrisi, komposisi, waktu inkubasi, dan lain-lain (Wahono *et al.*, 2015). Penelitian ini dilakukan dalam beberapa variasi suhu dan waktu SSF untuk mengetahui suhu dan waktu optimal sehingga produksi bioetanol menjadi efisien. Kadar bioetanol dengan variasi waktu dan suhu SSF terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Produksi Bioetanol dengan Metode SSF Menggunakan *T. viride* dan *Z. mobilis* pada Variasi Suhu dan Waktu

Gambar 1 menunjukkan proses SSF pada suhu 32°C menghasilkan kadar etanol

tertinggi pada waktu 80 jam (0,0254 %) selanjutnya terus mengalami penurunan.

Proses SSF pada suhu 35°C dan 38°C menghasilkan kadar etanol tertinggi pada waktu pada waktu 72 jam (0,0254 %) selanjutnya terus mengalami penurunan. Kadar tertinggi etanol didapat pada SSF

dengan suhu 35°C pada semua waktu SSF. Nilai rata-rata, nilai minimum dan maksimum masing-masing suhu dan waktu SSF tersaji pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Kadar Bioetanol Berdasarkan Suhu dan Waktu SSF

		Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Suhu	32°C	0,012560	0,0112442	0,0010	0,0254
	35°C	0,136340	0,0674859	0,0592	0,2151
	38°C	0,088700	0,0817790	0,0065	0,2064
Waktu	60 jam	0,022233	0,0321320	0,0010	0,0592
	72 jam	0,145133	0,1137346	0,0139	0,2151
	80 jam	0,115133	0,0855193	0,0254	0,1957
	84 jam	0,077667	0,0521853	0,0213	0,1243
	96 jam	0,035833	0,0455265	0,0012	0,0874

Data pada tabel 1 menunjukkan bahwa nilai rata-rata tertinggi kadar etanol yaitu pada suhu 35°C (0,136340%) sedangkan untuk waktu SSF pada 72 jam yaitu sebesar

0,145133%. Kondisi optimasi SSF kemudian diuji *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan hasil seperti yang terlihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Hasil Uji ANOVA Kadar Bioetanol Dengan Variasi Suhu dan Waktu SSF

ANOVA SUMMARY						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Suhu	Between Groups	0,039	2	0,019	5,143	0,024
	Within Groups	0,045	12	0,004		
	Total	0,084	14			
Waktu	Between Groups	0,032	4	0,008	1,548	0,262
	Within Groups	0,052	10	0,005		
	Total	0,084	14			

Hasil uji ANOVA pada taraf 5% pada tabel 2 menunjukkan pada suhu, hasil berbeda nyata, dengan nilai Sig 0,024<0,05, sehingga dilakukannya uji lanjut dengan menggunakan Uji Nyata Jujur (Tukey) yang disajikan pada tabel 3. Hasil uji ANOVA untuk waktu menunjukkan hasil tidak berbeda nyata, dengan nilai Sig 0,262>0,05.

Tabel 3. Hasil Uji Tukey Kadar Bioetanol dengan Variasi Suhu SSF

	Suhu	Std. Error	Sig.
32°C	35°C	0,0389334	0,020
	38°C	0,0389334	0,166
35°C	38°C	0,0389334	0,462

Hasil uji Tukey pada taraf 5% yang terlihat pada tabel 3 menunjukkan bahwa kadar bioetanol terdapat perbedaan nyata antara suhu 32°C dengan 35°C dengan nilai Sig 0,020<0,05 sedangkan kadar bioetanol tidak terdapat perbedaan nyata antara suhu 32°C dengan 38°C (0,166>0,05) dan antara suhu 35°C dengan 38°C (0,462>0,05).

Hasil penelitian pada tabel 1 menunjukkan bahwa suhu terbaik untuk produksi bioetanol dengan metode SSF menggunakan *T. viride* dan *Z. mobilis* adalah 35°C. Hasil uji ANOVA dan uji Tukey membuktikan bahwa kadar bioetanol pada suhu SSF, terdapat perbedaan nyata antara suhu 32°C dengan 35°C. Suhu merupakan faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis dan fermentasi pada metode SSF. Suhu

optimum hidrolisis enzimatis biasanya lebih besar dari suhu fermentasi dalam proses SSF, oleh karena itu perlu dicari titik kesetimbangan dimana proses akan bekerja dengan baik (Miah *et al.*, 2022). Suhu sakarifikasi enzimatis yang optimal adalah 50-55°C sedangkan fermentasi oleh mikroorganisme sekitar 35°C (Wang *et al.*, 2012), (Sharma *et al.*, 2021).

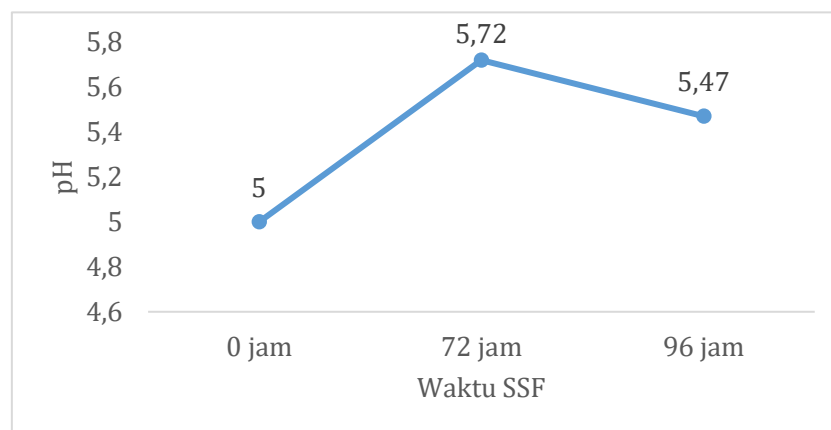
T. viride dan *Z. mobilis* memiliki suhu pertumbuhan optimal yang berbeda. *T. viride* dapat tumbuh pada kisaran suhu antara 20°C -30°C (Mishra & Khan, 2015). Pertumbuhan sel *Z. mobilis* dilaporkan lebih tinggi pada suhu inkubasi 34°C dibandingkan dengan suhu 30°C dan 38°C (Anggraini *et al.*, 2016). Suhu mempengaruhi kerja enzim yang dihasilkan oleh *T. viride* selama proses SSF (Nathan *et al.*, 2014). B, 2018 melaporkan bahwa aktivitas selulase yang dihasilkan *T. viride* diamati optimum pada suhu 35°C sedangkan Xilanase dari *T. viride* memiliki aktivitas maksimal pada suhu 50°C (Fortkamp, & Knob, 2014). Suhu optimal fermentasi oleh *Z. mobilis* untuk produksi bioetanol menunjukkan hasil beragam untuk jenis biomassa yang berbeda. Suhu optimum produksi bioetanol *Z. mobilis* dari iles-iles adalah 30°C, sedangkan dari tetes tebu pada suhu 34°C, dari tepung singkong pada suhu 35°C, dari biji Shorea robusta berada pada suhu 37°C (Kusmiyati *et al.*, 2016), (Asif *et al.*, 2015), (Ona *et al.*, 2019), (Choudhary *et al.*, 2016).

Hasil penelitian pada tabel 1 menunjukkan bahwa waktu terbaik untuk produksi bioetanol dengan metode SSF menggunakan *T. viride* dan *Z. mobilis* adalah 72 jam. Namun, hasil uji ANOVA membuktikan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antar perlakuan waktu SSF. Waktu SSF terbaik 72 jam juga dilaporkan pada produksi bioetanol dari tandan kosong sawit menggunakan *S. cerevisiae* dan *T. harzianum*. Kadar etanol tertinggi didapat pada SSF selama 72 jam yaitu 90,63% (Paper, 2022). Hasil yang sama juga dilaporkan oleh (Syadiah *et al.*, 2018) di

mana produksi etanol maksimum dari ampas tebu sorgum manis menggunakan kultur bersama *S. cerevisiae* dan *Trichoderma reesei* diperoleh pada 72 jam fermentasi dengan hasil 6,60 g/L.

Perubahan pH selama Proses SSF

Hasil pengukuran menunjukkan terjadi perubahan pH pada proses SSF di suhu 35°C pada berbagai variasi waktu (Gambar 2).



Gambar 2. Perubahan pH pada Proses SSF Suhu 35°C

Hasil pada gambar 2 menunjukkan bahwa terjadi fluktuasi nilai pH selama SSF pada suhu 35°C, di jam ke-72 terjadi peningkatan pH dan mengalami penurunan kembali pada jam ke-96. Penurunan pH pada jam ke-96 disebabkan selama proses fermentasi, *Z. mobilis* akan menghasilkan berbagai asam, seperti asam piruvat dan asetaldehida yang akan mempengaruhi pH media fermentasi. Semakin banyak asam yang terbentuk

menyebabkan penurunan pH juga semakin tinggi (Sulfahri *et al.*, 2016).

KESIMPULAN

Bioetanol berhasil diproduksi dari sampah daun menggunakan *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan metode SSF. Kadar tertinggi etanol didapat pada kondisi SSF dengan suhu 35°C dan waktu selama 72 jam. Terdapat perbedaan nyata kadar bioetanol antara suhu SSF 32°C dengan 35°C dan tidak

terdapat perbedaan nyata kadar bioetanol pada variasi waktu SSF

DAFTAR PUSTAKA

Agustina, D., Surtiningsih, T., Manuhara, Y. S. W., Arifiyanto, A., & Malewa, M. (2019). Study of Cellulase Activity Produced by *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* on *Imperata cylindrica* (L.) Beauv. *Enrichment Media. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 253(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/253/1/012016>

Anggarini, S., Hindun Pulungan, M., Wignyanto, W., Hidayat, N., Nurika, I., & Ihwah, A. (2016). Effect of Temperature Stress and Metal Ion Supplement on Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Industria: Jurnal Teknologi Dan Manajemen Agroindustri*, 5(3), 125–131. <https://doi.org/10.21776/ub.industria.2016.005.03.2>

Asif, H. K., Ehsan, A., Kashaf, Z., Abeera, A. A., Azra, N., & Muneeb, Q. (2015). Comparative study of bioethanol production from sugarcane molasses by using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Biotechnology*, 14(31), 2455–2462. <https://doi.org/10.5897/ajb2015.14569>

B, B. (2018). Isolation, Production and Optimization of Cellulase from a Combination of *Aspergillus Niger* and *Trichoderma Viride* Isolated from Decaying Woods. *International Journal of Biochemistry & Physiology*, 3(4). <https://doi.org/10.23880/ijbp-16000139>

Behera, S., Mohanty, R. C., & Ray, R. C. (2012). Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 92 immobilized in *Luffa cylindrica* L. sponge discs and ca-alginate matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1499–1507. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400034>

Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>

Bušić, A., Mardetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Šantek, M. I., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>

Chandra, I., Abha, S., Bandyopadhyay, K. K., Shruti, S., Priya, P., Prachi, J., & Shubha, D. (2013). Bioethanol production by *Zymomonas mobilis* MTCC No. 2427 using orange peels as low cost substrates. *International Journal of ChemTech Research*, 5(6), 2787–2792.

Choudhary, A., Tiwari, S., Jadhav, S. K., & Tiwari, K. L. (2016). *Bioethanol Production from Shorea robusta (Sal) Seeds using Zymomonas mobilis MTCC92*. 10(3), 9–14. <https://doi.org/10.14456/sustj.2016.7>

Costa, A. C. da, Cavalheiro, G. F., Vieira, E. R. de Q., Gandra, J. R., de Goes, R. H. de T. e. B., Paz, M. F. da, Fonseca, G. G., & Leite, R. S. R. (2019). Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19(June), 101161. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101161>

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>

Deivy Andhika Permata, Anwar Kasim, Alfi Asben, & Yusniwati. (2021). Delignification of Lignocellulosic

- Biomass. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 12(2), 462–469. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.12.2.0618>
- Edeh, I. (2021). Bioethanol Production: An Overview. *Bioethanol Technologies*, December 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94895>
- Fortkamp, D., & Knob, A. (2014). High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its application in pulp biobleaching. *African Journal of Biotechnology*, 13(22), 2248–2259. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.13479>
- Gunam, I. B. W., Antara, N. S., Anggreni, A. A. M. D., Setiyo, Y., Wiguna, I. P. E., Wijaya, I. M. M., & Putra, I. W. W. P. (2019). Chemical pretreatment of lignocellulosic wastes for cellulase production by *Aspergillus niger* FNU 6018. *AIP Conference Proceedings*, 2155(September). <https://doi.org/10.1063/1.5125544>
- Hung, H. C., Adeni, D. S. A., Johnny, Q., & Vincent, M. (2018). Production of bioethanol from sago hampas via Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). *Nusantara Bioscience*, 10(4), 240–245. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n100407>
- Khalib, S. N. B., Zakarya, I. A., & Izhar, T. N. T. (2018). Composting of garden waste using indigenous microorganisms (IMO) as organic additive. *International Journal of Integrated Engineering*, 10(9), 53–59. <https://doi.org/10.30880/ijie.2018.10.09.026>
- Kusmiyati, Hadiyanto, H., & Kusumadewi, I. (2016). Bioethanol production from ilses-iles (*Amorphopallus campanulatus*) flour by fermentation using *zymomonas mobilis*. *International Journal of Renewable Energy Development*, 5(1), 9–14. <https://doi.org/10.14710/ijred.5.1.9-14>
- Latif, A. A., Harun, S., Sajab, M. S., Markom, M., & Jahim, J. M. (2018). Ammonia-based pretreatment for ligno-cellulosic biomass conversion – an overview. *Journal of Engineering Science and Technology*, 13(6), 1595–1620.
- Maroufpour, B., Rad, F. A., & Yazdanseta, S. (2019). Bioethanol production as biofuel from potato peel using *saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 AND *Zymomonas mobilis* PTCC 1718. *Bioagro*, 31(3), 177–184.
- Miah, R., Siddiq, A., Chakraborty, U., Tuli, J. F., Barman, N. K., Uddin, A., Aziz, T., Sharif, N., Dey, S. K., Yamada, M., & Talukder, A. A. (2022). Development of high temperature simultaneous saccharification and fermentation by thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07589-3>
- Mikulski, D., & Kłosowski, G. (2022). Delignification efficiency of various types of biomass using microwave-assisted hydrotropic pretreatment. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08717-9>
- Mishra, P. K., & Khan, F. N. (2015). *Effect of Different Growth Media and Physical Factors on Biomass Production of Trichoderma Viride*. 8(2), 11–17.
- Mizar, M. A., Amin, M., Hadi, M. S., Aziz, M., & Sulfitri. (2020). Bioethanol production from sugarcane bagasse pretreated by *trichoderma viride*. *Journal of Applied Engineering Science*, 18(2), 262–266. <https://doi.org/10.5937/jaes18-25651>
- Mukesh Srivastava, S. P. (2015). *Trichoderma species Cellulases Produced by Solid State Fermentation*. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 06(02), 2–5. <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000170>
- Nathan, V. K., Rani, M. E., Rathinasamy, G., Dhiraviam, K. N., & Jayavel, S. (2014). Process optimization and production kinetics for cellulase production by *Trichoderma viride* VKF3. *SpringerPlus*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3->

92

- Ndapamuri, M. H., Herawati, M. M., & Meitiniarti, V. I. (2021). Production of Sugar From Sweet Sorghum Stems with Hydrolysis Method Using *Trichoderma viride*. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 13(1), 121–127. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v13i1.25954>
- Oktavianis, T., & Sofiyanita. (2017). Making Bioethanol from Cocoa Fruit Skin Waste By Hydrolysis Process Using *Trichoderma Viride* Mold. *IJCST*, 53(7), 401–405.
- Ona, I. J., Agogo, H. O., & Iorungwa, M. S. (2019). Production of Bioethanol from Cassava using *Zymomonas mobilis*: Effect of Temperature and Substrate concentration. *Nigerian Annals of Pure and Applied Sciences*, 1, 153–160. <https://doi.org/10.46912/napas.40>
- Paper, A. (2022). *Simultaneous Saccharification and Fermentation of Empty Fruit Bunches of Palm for Bioethanol Production using microbial consortium of S . cerevisiae and T . harzianum*. 1–21.
- Permatasari, N. S., Zainuri, M., Kusumaningrum, H. P., Mishbach, I., & Hastuti, E. D. (2020). Bioethanol production using the SSF method (simultaneous saccharification and fermentation) of microalgae *anabaena* sp. *Journal of Physics: Conference Series*, 1524(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1524/1/012071>
- Prasoulas, G., Gentikis, A., Konti, A., Kalantzi, S., Kekos, D., & Mamma, D. (2020). Bioethanol production from food waste applying the multienzyme plasma at laboratory and bench-scale levels and its application as a starter culture in a meat product. *Fermentation*, 6(2). <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6020039>
- Puspita, P., Hsieh, C.-W., & Chang, Y.-S. (2019). Production of Ethanol by *Zymomonas Mobilis* Mutant: The Effects of Sodium Acetate at pH 5 and No Control pH. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 10(3), 80–86. <https://doi.org/10.18178/ijcea.2019.10.3.745>
- Sh. El-Gendy, N., R. Madian, H., N. Nassar, H., & S. Abu Amr, S. (2015). Response Surface Optimization of the Thermal Acid Pretreatment of Sugar Beet Pulp for Bioethanol Production Using *Trichoderma viride* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Recent Patents on Biotechnology*, 9(1), 50–62. <https://doi.org/10.2174/1872208309666150916092450>
- Sharma, S., Jha, P. K., & Panwar, A. (2021). Production of bioethanol from wheat straw via optimization of co-culture conditions of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Discover Energy*, 1(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s43937-021-00004-4>
- Sivasakthivelan, P., Saranraj, P., & Sivasakthi, S. (2014). Production of Ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* Using Sunflower Head Wastes -A Comparative Study. *International Journal of Microbiological Research*, 5(3), 208–216. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajejr.2015.10.5.8476>
- State, I., Polytechnic, I. S., & State, I. (2018). *Comparative study of bioethanol production from agricultural wastes by Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae*. 6, 50–60.
- Sulfahri, Amin, M., Sumitro, S. B., & Saptasari, M. (2016). Bioethanol production from algae *Spirogyra hyalina* using *Zymomonas mobilis*. *Biofuels*, 7(6), 621–626. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1168028>
- Syadiah, E. A., Haditjaroko, L., & Syamsu, K. (2018). Bioprocess engineering of bioethanol production based on sweet sorghum bagasse by co-culture technique using *Trichoderma reesei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 209(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/209/1/012018>
- Syawala, D. (2013). Production Of Bioethanol

- From Corn cob And Sugarcane Bagasse With Hydrolysis Process Using *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 5(4), 49–56. <https://doi.org/10.9790/2402-0544956>
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of bioethanol—a review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Tsegaye, B., Balomajumder, C., & Roy, P. (2019). Microbial delignification and hydrolysis of lignocellulosic biomass to enhance biofuel production: an overview and future prospect. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0094-x>
- Wahono, S. K., Rosyida, V. T., Darsih, C., Pratiwi, D., Frediansyah, A., & Hernawan. (2015). Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation Incubation Time Using Cellulose Enzyme for Sugarcane Bagasse on the Second-generation Bioethanol Production Technology. *Energy Procedia*, 65, 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.01.061>
- Wang, Y., Bian, X., & Zhou, L. (2012). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose from lignocellulose for 2 nd bioethanol production: A review. *Advanced Materials Research*, 512–515(May 2012), 464–467. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.512-515.464>
- Wistara, N. J., Sitanggang, V. J., & Hermiati, E. (2013). Ethanol Production Using SSF Method from Paper-Based Material Exposed to Various Physical Treatments. *Teknologi Industri Pertanian*, 23(3), 184–189.
- Yesmin, M. N., Azad, M. A. K., Kamruzzaman, M., & Uddin, M. N. (2020). Bioethanol Production from Corn, Pumpkin and Carrot of Bangladesh as Renewable Source using Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Chemica Malaysia*, 4(2), 45–54. <https://doi.org/10.2478/acmy-2020-0008>
- Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V., & Wang, D. (2016). Optimization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous saccharification and fermentation process. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01411>