



## Effect of Pretreatment and Composition of *Trichoderma viride* and *Zymomonas mobilis* Consortium on Bioethanol Production from Leaf Litter

Wulan Fitriani Safari\*, Mohamad Syafaat

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

\*Corresponding Author: wulan.fitriani@binawan.ac.id

### ABSTRACT

Bioethanol is an alternative biofuel that is widely produced in bulk to replace and complement petroleum-based fuels. Bioethanol is produced through the alcoholic fermentation of sucrose or simple sugars. One of the potential sources for bioethanol production that has not been studied is leaf litter. Various studies have shown that *T. viride* and *Z. mobilis* can be used for bioethanol production, but there has been no report on the production of bioethanol from leaf litter using a consortium of *T. viride* and *Z. mobilis* using the SSF method. This study aims to examine the effect of pretreatment and composition of the consortium of *T. viride* and *Z. mobilis* on the production of bioethanol from leaf litter. Leaf litter was dried and mashed, then pretreatment was carried out with 32%  $\text{NH}_3$  solution. The bioethanol production process using the SSF method was arranged as a consortium of *T. viride* and *Z. mobilis* with a composition of 5%: 5%, 10%: 5%, 5%: 10% and 10%: 10% (w/v). SSF was carried out for 72 hours at a temperature of 35°C and pH 5. The bioethanol was purified by distillation and the ethanol content was tested with GCMS. Higher levels of bioethanol were found in leaf litter with pretreatment. The highest ethanol content (0.6721%) was obtained from SSF with consortium composition of *T. viride* : *Z. mobilis* (10% : 10%) from leaf litter with pretreatment. Pretreatment and composition of the consortium *T. viride* and *Z. mobilis* affect the production of bioethanol from leaf litter

**Keywords:** Bioethanol, Leaf litter, SSF, *Trichoderma viride* , *Zymomonas mobilis*

### Abstrak

Bioetanol merupakan biofuel alternatif yang banyak diproduksi secara massal untuk menggantikan dan melengkapi bahan bakar berbasis minyak bumi (BBM). Bioetanol diproduksi melalui fermentasi alkohol sukrosa atau gula sederhana. Salah satu bahan baku potensial untuk produksi bioetanol yang belum dipelajari yaitu sampah daun. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa *T. viride* dan *Z. mobilis* dapat digunakan untuk produksi bioetanol namun sampai saat ini belum ada laporan produksi bioetanol dari sampah daun menggunakan konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan metode SSF. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh *pretreatment* dan komposisi konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* terhadap produksi bioetanol dari sampah daun. Sampah daun dikeringkan dan dihaluskan, selanjutnya dilakukan *Pretreatment* dengan larutan  $\text{NH}_3$  (amonia) 32%. Proses produksi bioetanol dengan metode SSF menggunakan konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan komposisi 5% : 5%, 10% : 5%, 5% : 10% dan 10% : 10% (w/v). SSF dilakukan selama 72 jam dengan suhu 35°C dan pH 5. Bioetanol hasil fermentasi dimurnikan dengan destilasi dan terakhir pengujian kadar etanol dengan GCMS. Kadar bioetanol lebih tinggi didapatkan pada sampah daun yang diberikan *pretreatment*. Kadar etanol tertinggi (0.6721%) didapat dari SSF dengan komposisi konsorsium *T. viride* : *Z. mobilis* (10% : 10%) dari sampah daun yang diberikan *pretreatment*. *Pretreatment* dan komposisi konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* mempengaruhi produksi bioetanol dari sampah daun.

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

## PENDAHULUAN

Bioetanol merupakan biofuel alternatif yang banyak diproduksi secara massal untuk menggantikan dan melengkapi bahan bakar berbasis minyak bumi (BBM) [1]. Keunggulan bioetanol dibandingkan BBM adalah *biodegradable*, mengandung oktan dan oksigen tinggi sehingga mudah terbakar dan mengurangi emisi pemanasan global [2]. Bioetanol diproduksi melalui fermentasi alkohol sukrosa atau gula sederhana [3].

Bahan baku yang melimpah untuk produksi bioetanol generasi kedua adalah biomassa lignoselulosa. Bahan baku ini diperoleh dari tanaman yang mengandung tiga bagian utama yaitu selulosa, hemiselulosa dan lignin [4]. Berbagai laporan menunjukkan banyak biomassa lignoselulosa yang dapat digunakan untuk produksi bioetanol seperti ampas tebu, kulit batang tebu, tongkol jagung, batang jagung, kulit jagung, jerami padi, jerami gandum, limbah apel, buah kiwi, dan buah persik, kulit wortel, kulit bawang, kulit kentang dan kulit bit, kulit pisang [5,6,7,8,9,10]. Sampah daun juga dapat digunakan sebagai sumber bahan baku bioetanol, beberapa yang telah dipelajari yaitu limbah daun pisang, daun Neem dan Moringa, daun agave serta daun pinus merkusi [11,12,13,14]. Salah satu bahan baku potensial untuk produksi bioetanol yang belum dipelajari yaitu sampah daun dari pertamanan. Selama ini sampah tersebut sebagian kecil dimanfaatkan sebagai pupuk kompos dan sebagian besar dikumpulkan kemudian dibakar. Pemanfaatan biomassa lignoselulosa sampah daun tersebut sebagai bahan baku produksi bioetanol membuat pengelolannya menjadi lebih ramah lingkungan.

Proses utama dalam produksi bioetanol dari biomassa lignoselulosa meliputi: (a) *pretreatment*, (b) hidrolisis dan (c) konversi gula menjadi bioetanol melalui fermentasi [15]. Hidrolisis gula diikuti dengan langkah fermentasi disebut hidrolisis dan fermentasi terpisah atau *Separate Hydrolysis and Fermentation* (SHF) dan yang menggabungkan proses hidrolisis dan fermentasi menjadi satu proses disebut sakarifikasi dan fermentasi simultan/ *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) [16]. Mikroba diketahui berperan pada proses hidrolisis dan fermentasi, di antaranya yaitu *Trichoderma viride* dan *Zymomonas mobilis*. *T. viride* merupakan jamur penghasil enzim selulase yang dapat mendegradasi selulase yang banyak digunakan

dalam produksi bioetanol [17]. *Z. mobilis* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang mampu memanfaatkan sukrosa, glukosa dan fruktosa sebagai sumber energi [18].

Penelitian mengenai produksi bioetanol dari limbah biomassa dengan menggunakan *T. viride* dan *Z. mobilis* sudah banyak dilakukan. *T. viride* digunakan untuk produksi etanol dari jerami, ampas tebu dan limbah kulit buah kakao [19,20,21]. *Z. mobilis* dimanfaatkan dalam produksi bioetanol dari limbah singkong, kulit kentang dan kulit buah delima [22,23,24]. Produksi bioetanol dengan metode SSF menggunakan konsorsium mikroba juga sudah banyak dilakukan, seperti produksi bioetanol dari limbah tahu menggunakan *Aspergillus niger* dan *Saccharomyces cerevisiae* [25], produksi bioetanol dari rumput laut menggunakan *Trichoderma reesei* dan *S. cerevisiae* [26], bioetanol dari tandan kosong kelapa sawit menggunakan *S. cerevisiae* dan *T. harzianum* [27]. Namun, sampai saat ini belum ada laporan produksi bioetanol dari sampah daun menggunakan konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* dengan metode SSF. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh *pretreatment* dan komposisi konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* terhadap produksi bioetanol dari sampah daun.

## METODE

### Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan sampah daun di lingkungan Universitas Indonesia yang diambil dari Laboratorium Parangtopo, Fakultas MIPA sebagai bahan baku. Proses SSF menggunakan isolat *T. viride* dan *Z. mobilis* yang didapatkan dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Daya Saing Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Alat-alat yang dipakai selama penelitian yakni *shaker incubator* dan labu Erlenmeyer untuk proses SSF, Destilator untuk pemurnian bioetanol dan GC untuk pengujian kadar bioethanol.

### Persiapan Bahan Baku

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

### Analisis Kandungan Sampah Daun

Analisis kandungan sampah daun dilakukan untuk mengetahui kandungan komponen serat

sampah daun. Penentuan komponen kimia sampah daun kering dilakukan dengan menggunakan metode Chesson-Datta. Penentuan kadar hemiselulosa dilakukan dengan mencampur 1-2 gram sampel daun kering halus (a) dengan 150 ml aquades, selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam, disaring dengan kertas saring dan terakhir dibilas dengan aquades, bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (b). Selanjutnya sampel (a) dicampurkan dengan 150 ml larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N, dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam, difiltrasi dengan kertas saring dan terakhir dibilas dengan aquades, bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (c).

$$\text{Kadar Hemiselulosa} = \left( \frac{b-c}{a} \right) \times 100\%$$

Penentuan kadar selulosa dilakukan sampel yang sudah didapat dari penentuan kadar hemiselulosa (c) dicampur dengan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (v/v) sebanyak 10 ml pada suhu kamar selama 4 jam, kemudian diencerkan menjadi 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 ml dan direfluks pada suhu 100°C selama 2 jam (d).

$$\text{Kadar Selulosa} = \left( \frac{c-d}{a} \right) \times 100\%$$

Penentuan kadar lignin dilakukan dengan cara sampel yang didapat dari analisis kadar selulosa (d) difiltrasi dengan kertas saring dan terakhir dibilas dengan aquades. Kemudian bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (e).

$$\text{Kadar Lignin} = \left( \frac{d-e}{a} \right) \times 100\%$$

$$\text{Kadar Abu} = \left( \frac{e}{a} \right) \times 100\%$$

### **Pretreatment (Delignifikasi) Daun Kering dengan Larutan NH<sub>3</sub> 32%**

Bahan baku sampah daun kering halus dibagi menjadi dua bagian, satu bagian diberikan *pretreatment* dengan NH<sub>3</sub> 32% dan satu bagian tidak diberikan *pretreatment*.

Sampel daun kering halus sebanyak 30 g direndam dengan 150 ml larutan NH<sub>3</sub> (amonia) 32% pada suhu ruang selama 24 jam. Sampel dicuci dengan akuades untuk menghilangkan larutan NH<sub>3</sub>, kemudian dikeringkan kembali menggunakan oven.

### ***Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)***

SSF dilakukan dalam Erlenmeyer 250 ml dengan kultur *batch* 150 ml, terdiri dari 50 mM Yeast Peptone Sitrat Buffer (YP-CB) dan daun kering halus (10% b/v). Kultur padat *T. viride* dan *Z. mobilis* ditambahkan ke kultur *batch* dengan berbagai perbandingan komposisi (*T. viride* : *Z. mobilis*) yaitu 5% : 5%, 10% : 5%, 5% : 10% dan 10% : 10% (w/v), kemudian diberikan larutan HCl 0,05 N hingga pH 5,0. Kultur *batch* diinkubasi pada *shaking incubator* dengan kecepatan 150 rpm. SSF ini dilakukan selama 72 jam, dengan suhu 35°C.

### **Destilasi**

Etanol dipisahkan dari campurannya dengan cara destilasi. Pada proses ini menggunakan alat destilasi 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.

### **Pengujian Kadar Etanol**

Hasil destilat etanol diuji kadarnya menggunakan alat GC di Laboratorium Avilasi, Departemen Kimia, FMIPA UI. Suntikkan 1 µl masing-masing sampel yang telah didestilasi menggunakan mikro syringe. Kadar etanol yang dihasilkan dilihat dari waktu retensi dan luas kromatogramnya serta membandingkannya dengan kurva standar senyawa murni.

## **HASIL PENELITIAN**

### **Kandungan Sampah Daun Kering**

Hasil analisis kandungan sampah daun kering terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komponen Serat Sampah Daun

Komponen	Kadar (%)
Lignin	2.7
Selulosa	16.1
Hemiselulosa	79.2
Abu	0.87

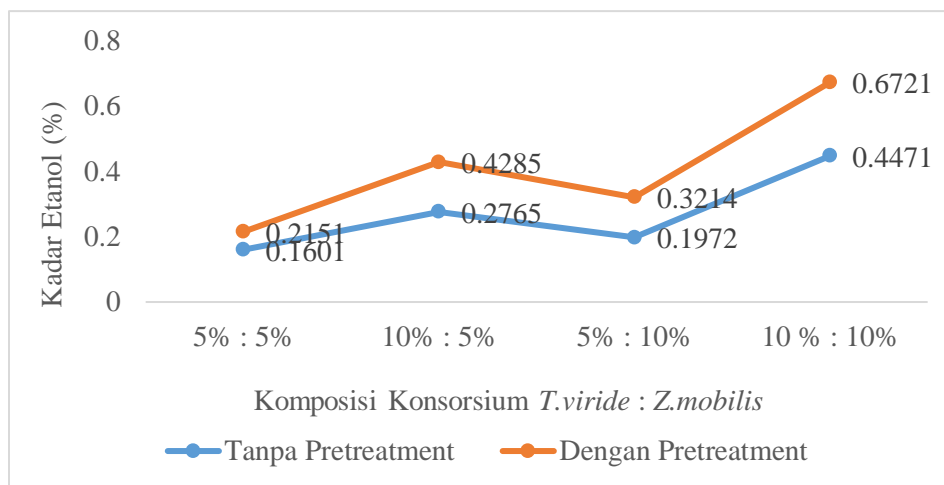
pada tabel 1 terlihat kandungan tertinggi sampah daun yaitu hemiselulosa sebesar 79.2% dilanjutkan dengan selulosa sebanyak 16.1 % dan lignin sebesar 2.7%.

### Pengaruh *Pretreatment* dan Komposisi Konsorsium *Trichoderma viride* dan *Zymomonas mobilis* Terhadap Produksi Bioetanol dari Sampah Daun

Produksi bioetanol pada penelitian ini menggunakan metode SSF dengan memanfaatkan *T. viride* pada proses hidrolisis lignoselulosa menjadi gula sedangkan proses fermentasi gula menjadi

etanol menggunakan *Z. mobilis*. SSF dilakukan dengan menggunakan bahan baku yang tidak diberikan *pretreatment* dan yang diberikan *pretreatment* dengan Larutan  $\text{NH}_3$  32%. Selain itu, produksi bioetanol menggunakan beberapa variasi komposisi konsorsium *T. viride* dan *Z. mobilis* Kadar bioetanol yang dihasilkan terlihat pada gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa kadar etanol pada semua variasi komposisi konsorsium lebih tinggi pada bahan baku yang sebelumnya telah diberikan *pretreatment* dengan menggunakan  $\text{NH}_3$  32% dibandingkan dengan bahan baku yang tidak diberikan *pretreatment*. Kadar etanol tertinggi didapat dari SSF dengan komposisi konsorsium *T. viride* : *Z. mobilis* (10% : 10%) diikuti dengan komposisi (10% : 5%), (5% : 10%) dan terendah (5% : 5%) baik dari sampah daun yang diberikan *pretreatment* maupun yang tidak diberikan *pretreatment*.



Gambar 1. Kadar etanol dari sampah daun

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampah daun mengandung hemiselulosa, selulosa dan lignin. Hal ini membuktikan sampah daun dapat dijadikan bahan baku untuk produksi bioetanol. Hemiselulosa, selulosa dan lignin merupakan komponen utama biomassa lignoselulosa yang banyak digunakan

sebagai bahan baku produksi bioetanol [28]. Hemiselulosa adalah kelompok polisakarida heterogen yang dapat terdiri dari pentosa (xilosa, arabinosa), heksosa (galaktosa, mannan, glukosa), dan gugus asetat dan glukuronil [29]. Unit monomer tersebut, disusun ulang dalam bentuk lain yang lebih kompleks termasuk glukukan, xyloglukan, xylan, arabinoksilans, mannan, dan glucogalactomannans

[30]. Xilan adalah komponen utama hemiselulosa dan merupakan bahan baku potensial untuk memperoleh gula yang dapat difermentasi yang dapat diubah menjadi beberapa produk berharga [31]. Selulosa adalah polimer alam yang berlimpah dan ada di mana-mana, menjadi penyusun utama dinding sel tumbuhan. Unit glukosa dihubungkan melalui ikatan -1,4-glikosidik membentuk polimer selulosa [32]. Glukosa dari selulosa dapat menjadi bahan untuk produksi bioetanol [33].

Penelitian ini mendapatkan hasil bahwa kadar etanol sampah daun yang diberikan *pretreatment* lebih tinggi daripada kadar etanol dari sampah daun yang tidak diberikan *pretreatment*. *Pretreatment* merupakan tahap utama keberhasilan pemanfaatan bahan baku lignoselulosa untuk menghasilkan bioetanol karena memfasilitasi hidrolisis oleh enzim [34,35]. Langkah *pretreatment* yang efisien diperlukan untuk mendapatkan gula, yang selanjutnya akan digunakan dalam fermentasi [36]. *Pretreatment* biomassa diperlukan untuk membuat biomassa rentan terhadap mikroorganisme dan enzim [37]. *Pretreatment* menyebabkan perubahan pada struktur mikro, struktur makro dan komposisi kimia lignoselulosa sehingga enzim dapat bekerja lebih baik [28]. Amoniak yang bersifat basa bekerja dengan memecah kristalinitas ikatan selulosa dan asetil dalam struktur kimia dinding sel biomassa lignoselulosa. Selain itu, dilaporkan bahwa residu amonia dari proses *pretreatment* dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri dalam fermentasi karena kandungan nitrogen yang tinggi dalam biomassa *pretreatment* [38].

Produksi bioetanol dari sampah daun pada penelitian ini menggunakan metode SSF. Pada metode SSF, proses hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara bersamaan. Keuntungan utama dari proses SSF adalah hidrolisis pati dan fermentasi gula dapat diproses dalam satu tempat, meminimalkan efek penghambatan substrat dan mempersingkat waktu reaksi secara keseluruhan [39]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa etanol berhasil diproduksi dari sampah daun dengan metode SSF memanfaatkan *T. viride* dan *Z. mobilis*. Adanya

etanol yang dihasilkan membuktikan bahwa terjadi sakarifikasi dan fermentasi sampah daun.

*T. viride* terlibat dalam tahap sakarifikasi. Anggota Trichoderma dilaporkan memiliki potensi untuk sakarifikasi [40]. *T. viride* menunjukkan kemampuan untuk menghidrolisis polimer karbohidrat [41]. *T. viride* merupakan fungi yang menghasilkan enzim selulase dan xilanase [42]. Selulase adalah enzim yang mampu menghidrolisis bentuk organik kompleks selulosa menjadi gula sederhana atau glukosa [43]. Xilanase adalah enzim kompleks hemiselulolitik yang bekerja pada rantai pusat hemiselulosa [44]. Mizar (2020) melaporkan bahwa gula pereduksi dapat terbentuk karena adanya reaksi enzimatik oleh *T. viride* yang menghasilkan enzim selulase [20]. Gula pereduksi diproduksi melalui proses sakarifikasi dan selulosa sederhana diubah menjadi gula sederhana dalam bentuk glukosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat hubungan langsung antara konsentrasi gula yang dilepaskan dan peningkatan konsentrasi enzim selulase yang dihasilkan *T. viride* yang digunakan selama proses sakarifikasi [45]. Hasil penelitian melaporkan bahwa gula pereduksi yang dihasilkan setelah lima hari hidrolisis jerami padi menggunakan *T. viride* mencapai 26.60g/100g dan setelah diberikan *pretreatment*, serbuk gergaji disakarifikasi menggunakan *T. viride* pada suhu 35°C selama 48 jam menghasilkan gula sebesar 10,17% [46,47].

*Z. mobilis* berperan dalam tahap fermentasi. *Z. mobilis* merupakan bakteri penghasil etanol dari glukosa dan fruktosa [48]. *Z. mobilis* memanfaatkan sukrosa, glukosa dan fruktosa sebagai sumber energi dan dapat mengubah gula menjadi etanol dan CO<sub>2</sub> melalui glikolitik "Entner-Doudoroff", di mana oksigen tidak terlibat dalam proses fermentasi untuk menghindari penghambatan respirasi [18]. *Z. mobilis* memiliki banyak keunggulan dibandingkan ragi konvensional, termasuk kemampuan untuk mencapai tingkat fermentasi dan hasil etanol yang lebih tinggi, serta toleransi etanol yang sangat tinggi [49].

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin banyak inokulum yang ditambahkan pada proses SSF maka semakin tinggi kadar etanol yang didapatkan. Pada penambahan salah satu mikroba baik

penambahan *T. viride* maupun penambahan *Z. mobilis* akan meningkatkan produksi etanol. Penambahan inokulum *T. viride* akan meningkatkan jumlah glukosa yang dikonversi dari biomassa sampah daun dan penambahan inokulum *Z. mobilis* akan meningkatkan produksi etanol dari fermentasi glukosa. Kadar etanol tertinggi didapat ketika penambahan inokulum *T. viride* dan *Z. mobilis* dilakukan secara bersamaan. Hal ini membuat pada proses SSF terjadi peningkatan jumlah glukosa sekaligus terjadi peningkatan jumlah etanol yang dihasilkan. Penelitian serupa menunjukkan hasil yang tidak berbeda. Produksi bioetanol dari nira aren menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* semakin tinggi dengan semakin tingginya persentase inokulum yang digunakan [50].

## KESIMPULAN

Sampah daun merupakan bahan baku potensial untuk produksi bioetanol. Kadar etanol yang lebih tinggi didapat pada sampah daun yang diberikan *pretreatment*. *T. viride* dan *Z. mobilis* dapat dimanfaatkan untuk produksi bioetanol dengan metode SSF dengan memperhatikan komposisi masing-masing. Studi lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui parameter SSF yang optimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Hung HC, Adeni DSA, Johnny Q, Vincent M. Production of bioethanol from sago hampas via Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). *Nusant Biosci.* 2018;10(4):240-245. doi:10.13057/nusbiosci/n100407
- [2] Permatasari NS, Zainuri M, Kusumaningrum HP, Mishbach I, Hastuti ED. Bioethanol production using the SSF method (simultaneous saccharification and fermentation) of microalgae *anabaena* sp. *J Phys Conf Ser.* 2020;1524(1). doi:10.1088/1742-6596/1524/1/012071
- [3] Nazia Hossain, Juliana Haji Zaini TMIM. A Review Of Bioethanol Production From Plant-Based Waste Biomass By Yeast Fermentation. *Int J Technol.* 2017;1(1):5-18.
- [4] Devi A, Bajar S, Kour H, Kothari R, Pant D, Singh A. Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a Circular Bioeconomy Approach. *Bioenergy Res.* Published online 2022. doi:10.1007/s12155-022-10401-9
- [5] Braide W, Kanu I, Oranusi U, Adeleye S. Production of bioethanol from agricultural waste. *J Fundam Appl Sci.* 2016;8(2):372. doi:10.4314/jfas.v8i2.14
- [6] Takano M, Hoshino K. Bioethanol production from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with statistical optimized cellulase cocktail and fermenting fungus. *Bioresour Bioprocess.* 2018;5(1). doi:10.1186/s40643-018-0203-y
- [7] Zhang Y, Wang C, Wang L, Yang R, Hou P, Liu J. Direct bioethanol production from wheat straw using xylose/glucose co-fermentation by co-culture of two recombinant yeasts. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2017;44(3):453-464. doi:10.1007/s10295-016-1893-9
- [8] Cutzu R, Bardi L. Production of bioethanol from agricultural wastes using residual thermal energy of a cogeneration plant in the distillation phase. *Fermentation.* 2017;3(2). doi:10.3390/fermentation3020024
- [9] Mushimiyimana I, Tallapragada P. Bioethanol production from agro wastes by acid hydrolysis and fermentation process. *J Sci Ind Res (India).* 2016;75(6):383-388.
- [10] Danmaliki GI, Muhammad AM, Shamsuddeen AA, Usman BJ. Bioethanol Production from Banana Peels. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* 2016;10(6):56-62. doi:10.9790/2402-1006025662
- [11] Suhag M, Kumar A, Singh J. Saccharification and fermentation of pretreated banana leaf waste for ethanol production. *SN Appl Sci.* 2020;2(8):1-9. doi:10.1007/s42452-020-03215-x
- [12] Priscilla PJ, Gnanavel G, Tech M. Waste Dried Leaves (Neem and Moringa) in the Production of Bioethanol using *Saccharomyces*. *IJRST.* 2018;3(4):566-568.
- [13] Murugan CS, Rajendran S. Bioethanol Production from Agave Leaves Using *Saccharomyces cerevisiae* (MTCC 173) and *Zymomonas mobilis* (MTCC 2427). *Int J*

- Microbiol Res.* 2013;4(1):23-26. doi:10.5829/idosi.ijmr.2013.4.1.66198
- [14] Widodo W, Aprilia N. Bioethanol Production Of Pine Merkusii Leaf With Select Enzyme Using Method ( SSF ). 2017;(12):41-45.
- [15] Tse TJ, Wiens DJ, Reaney MJT. Production of bioethanol—a review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation.* 2021;7(4):1-18. doi:10.3390/fermentation7040268
- [16] Rana V, Eckard AD, Ahring BK. Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. *J Korean Phys Soc.* 2014;3(1):1-13. doi:10.1186/2193-1801-3-516
- [17] Ndapamuri MH, Herawati MM, Meitiniarti VI. Production of Sugar From Sweet Sorghum Stems with Hydrolysis Method Using *Trichoderma viride*. *Biosaintifika J Biol Biol Educ.* 2021;13(1):121-127. doi:10.15294/biosaintifika.v13i1.25954
- [18] Kusmiyati, Hadiyanto H, Kusumadewi I. Bioethanol production from iles-iles (*Amorphopallus campanulatus*) flour by fermentation using *Zymomonas mobilis*. *Int J Renew Energy Dev.* 2016;5(1):9-14. doi:10.14710/ijred.5.1.9-14
- [19] Abo-State MA, Ragab AME, EL-Gendy NS, Farahat LA, Madian HR. Bioethanol Production from Rice Straw Enzymatically Saccharified by Fungal Isolates, *Trichoderma viride* F94 and *Aspergillus terreus* F98. *Soft.* 2014;03(02):19-29. doi:10.4236/soft.2014.32003
- [20] Mizar MA, Amin M, Hadi MS, Aziz M, Sulfahri. Bioethanol production from sugarcane bagasse pretreated by *Trichoderma viride*. *J Appl Eng Sci.* 2020;18(2):262-266. doi:10.5937/jaes18-25651
- [21] Wardana D, Ramadhan A, Amne DPF, Eddiyanto. Utilization of Glycerol from Used Oil as an Ester Glycerol Surfactant. *IJCST.* 2019;2(2):111-120.
- [22] Akponah E, Akpomie O, Ubogu M. Bioethanol production from cassava effluent using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from rafia palm. *Eur J Exp Biol.* 2013;3(4):247-253.
- [23] Maroufpour B, Rad FA, Yazdanseta S. Bioethanol production as biofuel from potato peel using *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 AND *Zymomonas mobilis* PTCC 1718. *Bioagro.* 2019;31(3):177-184.
- [24] Mazaheri D, Ahi M. D a evaluation and optimization of bioethanol production from pomegranate peel by *Zymomonas mobilis*. *J Appl Biotechnol Reports.* 2021;8(3):275-282. doi:10.30491/jabr.2020.232307.1231
- [25] Febrianti F, Syamsu K, Rahayuningsih M. Bioethanol Production From Tofu Waste. *Int J Technol.* 2017;5:898-908.
- [26] Hakim A, Chasanah E, Uju U, Santoso J. Bioethanol Production From Seaweed Processing Waste By Simultaneous Saccharification and Fermentation (Ssf). *Squalen Bull Mar Fish Postharvest Biotechnol.* 2017;12(2):41. doi:10.15578/squalen.v12i2.281
- [27] Derman E, Abdulla R, Marbawi H, Sabullah MK, Gansau JA, Ravindra P. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Empty Fruit Bunches of Palm for Bioethanol Production using microbial consortium of *S. cerevisiae* and *T. harzianum*. *Fermentation,* 2022;8(7):1-21.
- [28] Dimos K, Paschos T, Louloudi A, et al. Effect of various pretreatment methods on bioethanol production from cotton stalks. *Fermentation.* 2019;5(1):1-12. doi:10.3390/fermentation5010005
- [29] Vilcocq L, Crepet A, Jame P, Carvalho F, Duarte LC. Combination of Autohydrolysis and Catalytic Hydrolysis of Biomass for the Production of Hemicellulose Oligosaccharides and Sugars. *Reactions.* 2021;3(1):30-46. doi:10.3390/reactions3010003
- [30] Flórez-Pardo LM, González-Córdoba A, López-Galán JE. Characterization of hemicelluloses from leaves and tops of the CC 8475, CC 8592, and V 7151 varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *DYNA.* 2019;86(210):98-107. doi:10.15446/dyna.v86n210.75757
- [31] Malhotra G, Chapadgaonkar SS. Production and applications of xylanases – An overview. *Biotechnology.* 2018;99(1):59-72. doi:10.5114/bta.2018.73562
- [32] Zahra T, Irfan M, Nadeem M, et al. Cellulase Production by *Trichoderma viride* in Submerged Fermentation using Response Surface Methodology. *Punjab Univ J Zool.*

- 2020;35(2).  
doi:10.17582/journal.pujz/2020.35.2.223.228
- [33] Barahona PP, Mayorga BB, Martín-Gil J, Martín-Ramos P, Barriga EJC. Cellulosic ethanol: Improving cost efficiency by coupling semi-continuous fermentation and simultaneous saccharification strategies. *Processes*. 2020;8(11):1-13. doi:10.3390/pr8111459
- [34] Novia N, Said M, Jannah AM, Pebriantoni P, Bayu M. Aqueous Ammonia Soaking-Dilute Acid Pretreatment to Produce Bioethanol from Rice Hull. *Technol Reports Kansai Univ*. 2020;62(03).  
<https://www.kansaiuniversityreports.com/article/aqueous-ammonia-soaking-dilute-acid-pretreatment-to-produce-bioethanol-from-rice-hull>
- [35] Wardani AK, Tanaka NC, Sutrisno A. The conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol: Pretreatment technology comparison. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2020;475(1). doi:10.1088/1755-1315/475/1/012081
- [36] Demiray E, Karatay SE, Dönmez G, Aoki AR, Barana AC. Determination of Bioethanol Production from Apricot (*Prunus armeniaca*) Pomace. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2021;64:1-10. doi:10.1590/1678-4324-2021200781
- [37] Tayyab M, Noman A, Islam W, et al. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: A review. *Appl Ecol Environ Res*. 2018;16(1):225-249. doi:10.15666/aeer/1601\_225249
- [38] Latif AA, Harun S, Sajab MS, Markom M, Jahim JM. Ammonia-based pretreatment for ligno-cellulosic biomass conversion – an overview. *J Eng Sci Technol*. 2018;13(6):1595-1620.
- [39] Pinaki D, Lhakpa W, Joginder S. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), an efficient process for bio-ethanol production: An overview. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2015;12(1):87-100. doi:10.13005/bbra/1639
- [40] Syauqi A, Fatima S, Choiroh D. The delignification of plants residual for saccharification growth by the fungal consortium: A practical approach. *Int J Renew Energy Dev*. 2022;11(1):63-69. doi:10.14710/IJRED.2022.37768
- [41] Lailah R, Syauqi A, Santoso H. Aktivitas Jamur *Trichoderma viride* pada Substrat Pasta Tepung Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Bioscience-Tropic*. 2017;3(2):1-7.
- [42] Bhardwaj N, Kumar B, Verma P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresour Bioprocess*. 2019;6(1). doi:10.1186/s40643-019-0276-2
- [43] Mai AB, Burah B, Milala MA, Abbas MI. Isolation, Production and Optimization of Cellulase from a Combination of *Aspergillus Niger* and *Trichoderma Viride* Isolated from Decaying Woods. *Int J Biochem Physiol*. 2018;3(4). doi:10.23880/ijbp-16000139
- [44] Anand G, Leibman-Markus M, Elkabetz D, Bar M. Method for the production and purification of plant immuno-active xylanase from trichoderma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22084214
- [45] Mokatse KMP, Mogale MA, Van Wyk JPH. The influence of trichoderma viride cellulase enzyme concentration on saccharification of waste paper materials. *Online J Biol Sci*. 2021;21(4):279-287. doi:10.3844/ojbsci.2021.279.287
- [46] Christopher OO, Felix AA. Comparative Studies on Production of Bioethanol from Rice Straw Using *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* as Hydrolyzing Agents. *Microbiol Res J Int*. 2019;28(3):1-12. doi:10.9734/mrji/2019/v28i330134
- [47] Afzal A, Fatima T, Tabassum M, Nadeem M, Irfan M, Syed Q. Bioethanol production from saw dust through simultaneous saccharification and fermentation. *Punjab Univ J Zool*. 2018;33(2):145-148. doi:10.17582/journal.pujz/2018.33.2.145.148
- [48] Geetha S. Ethanol production from de-grained sunflower head waste by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *IJASR*. 2013;3(4):93-102.  
<http://www.cabdirect.org/abstracts/20133379548.html>
- [49] Vriesekoop F, Pamment NB. Acetaldehyde stimulation of the growth of *Zymomonas mobilis* subjected to ethanol and other environmental stresses: Effect of other



- metabolic electron acceptors and evidence for a mechanism. *Fermentation*. 2021;7(2). doi:10.3390/fermentation7020080
- [50] Ansar, Nazaruddin, Azis AD, Fudholi A. Enhancement of bioethanol production from palm sap (*Arenga pinnata* (Wurmb) Merr) through optimization of *Saccharomyces cerevisiae* as an inoculum. *J Mater Res Technol*. 2021;14:548-554. doi:10.1016/j.jmrt.2021.06.085