



PERLAKUAN PRETREATMEN SECARA FISIK, KIMIA DAN BIOLOGI PADA PELEPAH POHON SALAK

Devi*, Muhammad Nur Cahyanto**, Titiek F. Djaafar***

*Prodi Teknologi Produksi Tanaman Perkebunan, Politeknik Lamandau

**Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281, Indonesia

***Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta,

Jl. Stadion Maguwoharjo No. 22 Wedomartani, Ngemplak Sleman Yogyakarta

Email: devidede550@gmail.com *

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan fisik, kimia dan biologis pada proses pretreatment pelepas salak; untuk mengetahui degradasi lignin, hemiselulosa dan selulosa. Perlakuan pretreatment pelepas pohon salak pada penelitian ini meliputi fisik, kimia dan biologi. Perlakuan fisik menggunakan steam explosion, perlakuan kimia menggunakan NaOH dan perlakuan biologis menggunakan Trichoderma reesei FNCC 6012. Perlakuan Pretreatment menggunakan Steam Explosion memiliki aras yaitu besarnya suhu mulai dari 120 0C, 140 0C, dan 1600C. Perlakuan menggunakan NaOH terdiri dari konsentrasi 2 %, 4%, dan 6%, sedangkan perlakuan menggunakan Trichoderma reesei berdasarkan waktu fermentasi selama 5 hari, 10 hari, 15 hari. Perlakuan pendahuluan tersebut berfungsi untuk mengurangi kadar lignin yang ada pada pelepas salak. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kandungan lignin, hemiselulosa dan selulosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan menggunakan Steam Explosion dengan suhu 140 0C dan 160 0C mampu menurunkan kadar lignin sebesar 16.03% dan 15,90%. Perlakuan menggunakan Steam explosion suhu 160 0C dan Trichoderma reesei 15 Hari mampu meningkatkan kadar Hemiselulosa sebesar 35, 84 % dan 36,21%. Perlakuan menggunakan Steam Explosion dengan suhu 160 0C memberikan pengaruh yang terbaik pada selulosa sebesar 51.09%..

Kata kunci: *Pretreatment, Steam Explosion, NaOH, Trichoderma reesei, Pelepas Salak.*

This publication is licensed under a



Pendahuluan

Salak merupakan tanaman asli Indonesia yang dibudidayakan sebagai tanaman perkebunan (Rukman, 1999). Luasan panen tanaman salak di Indonesia tahun 2015 sebesar 23,556 Ha (Kementerian Pertanian Indonesia, 2017). Pada tahun yang sama, Kabupaten Sleman memiliki areal perkebunan salak sekitar 2500 Ha dengan jumlah rumpun produktif 4.831.559 (BPS Provinsi DIY, 2017). Pada masa pemeliharaan 4 bulan sekali, 3-4 kali pelepas akan dipotong per rumpun salak dan dibuang sebagai limbah (Tjahjadi, 1991). Sehingga diperkirakan limbah pelepas salak dihasilkan sebanyak 3-4 kali, sehingga diperkirakan limbah pelepas salak dihasilkan sebanyak 1368 ton/bulan (Adi,2008). Dalam satu rumpun tanaman salak (produktif) dapat menghasilkan 24 potongan pelepas salak, sehingga apabila dikalkulasikan dengan jumlah pohon salak yang ada maka dalam satu tahun pelepas salak yang belum termanfaatkan sekitar ± 23.000 truk.

Limbah salak kemudian sebagian dimanfaatkan petani sebagai bahan organik bagi tanaman salak, sebagian dibuang begitu saja, dibakar dan sebagian kecil dibuat kerajinan. Menurut penelitian Intani (2007), pelepas pohon salak digunakan sebagai bahan baku tekstil yang dapat dikembangkan dalam dunia industri. Menurut shibata dan Osman (1988), serat alam merupakan suatu komposit yang tersusun atas hemiselulosa, pektin dan lignin sebagai matriks dan selulosa sebagai penguat matriks. Pelepas pohon salak memiliki kandungan 31,7%, hemiselulosa 33,9 %, lignin 17,4% dan silika 0,6%. Sedangkan dengan komposisi inilah, maka kandungan selulosa yang tinggi pada pelepas pohon salak dapat diproses lebih lanjut dengan

berbagai perlakuan pretreatment yang sesuai sehingga mampu mendegradasi lignoselulosa.

Pretreatment merupakan tahapan yang penting dalam konversi biokimia dari biomassa lignoselulosa menjadi contohnya biofuel. Tahapan tersebut mengharuskan untuk merubah struktur biomassa selulosa agar akses ke selulosa menjadi lebih tinggi untuk enzim supaya dapat merubah menjadi gula yang dapat difерментasi. Proses pretreatment dilakukan untuk proses perlakuan pendahuluan pada bahan lignoselulosa dari segi struktur maupun ukuran dengan memecah dan mengurangi kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan (Sun dan Cheng, 2002).

Pretreatment secara kimiawi mempunyai tujuan utama untuk meningkatkan biodegradasi selulosa dengan menghilangkan lignin dan atau hemiselulosa. Metode ini juga bertujuan menurunkan tingkat polimerisasi dan kristalinitas komponen selulosa. Pretreatment kimia ini awalnya dikembangkan di industri kertas untuk delignifikasi bahan selulosa agar dihasilkan produk kertas berkualitas (Menon dan Rao 2012). Pretreatment berbagai biomassa lignoselulosa seperti jerami gandum, rumput, kayu keras, dan kayu lunak menggunakan NaOH juga mampu mengurangi kadar lignin menjadi kurang dari 26% (Zhao et al., 2008).

Pretreatment secara biologis menggunakan Trichoderma reesei yang digunakan secara luas dalam industri karena kemampuannya menghasilkan enzim hydrolase ekstraselular untuk degradasi lignoselulosa dalam jumlah besar (Miettinen,2004).

Pretreatment menggunakan *Trichoderma reesei* menghasilkan endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80% tetapi β -glukosidasenya lebih rendah sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa (Ahmed dan Vermette, 2008; Martins, et al., 2008).

Bahan dan Metode

Bahan Penelitian

Bahan baku yang bahan baku utama dalam pembuatan pelelah Salak diperoleh dari Turi kab Sleman Yogyakarta dan jamur *Trichoderma reesei* FNCC 6012 dan *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012 diperoleh dilaboratorium mikrobiologi PAU Universitas Gadjah Mada. Sedangkan bahan baku tambahan yang digunakan adalah tepung gandum, aquadest, larutan mineral mandel yang terdiri dari $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Kertas saring, plastik, karet gelang, NaOH 1 %, larutan 0,1 % tween 80, asam DNS, media PDA, kertas pH, kertas saring Whatman No. 1, larutan fenol, larutan H_2SO_4 pekat, larutan buffer sitrat 0,05 M pH 4,8.

Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam produksi pencacah choper, steam explosion, autoklaf, labu takar 1000 ml, tabung reaksi, pompa vacuum, laminar, gelas ukur, gelas bekker, thermometer 100 °C, erlenmeyer 250 ml, bunsen, oven, timbangan analitik, inkubator, sentrifuge, homogenizer, blue tipo, mikro pipet, kompor listrik, petridish, spatula, gelas ukur 100 ml, labu takar 100 ml, pipet ukur, waterbath, stopwatch, tabung reaksi, vortex, ose, statif, buret.

Metode Penelitian

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari satu faktor perlakuan (Gomez dan Gomez, 1984). Yang terdiri dari perlakuan fisik, kimia dan biologis. Perlakuan fisik menggunakan Steam Explosion (SE) A1 suhu 120 °C, A2 suhu 140°C, dan A3 suhu 160 °C. Perlakuan kimia menggunakan NaOH , A4 konsentrasi 2%, A5 konsentrasi 4%, dan A6 Konsentrasi 6%. Perlakuan biologi menggunakan jamur *Trichoderma reesei* (T.r), A7 selama 5 hari, A8 selama 10 hari dan A9 selama 15 hari. Masing-masing perlakuan ini diulangi 3 kali sebagai blok/ulangan sehingga didapat $9 \times 3 = 27$ satuan eksperimentasi. Hasil pengamatan dianalisis statistik dengan ANAKA, dan bila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji jarak berganda duncan (JBD) pada jenjang nyata 5% (Gomez and Gomez, 1984).

Persiapan Bahan

Pelelah pohon salak hasil pemanenan diambil di daerah Turi, Kabupaten Sleman Yogyakarta. Pelelah dibersihkan dari kotoran kemudian dilakukan pengecilan ukuran menggunakan pencacah choper, untuk memperkecil luas permukaan, menggunakan kabinet dryer 50 °C sehingga kadar air dibawah 10 % (wb) (Maas dan Zhang, 2008).

Pelelah salak yang kering digiling menggunakan disk mill (60 mesh) dan serbuk pelelah hasil gilingan diayak menggunakan elektromagnetic shaker ($7\mu\text{m}$).

Serbuk yang lolos ayakan dijadikan bahan pada proses perlakuan pretreatment. Serbuk pelelah salak dilakukan analisa lignin, hemiselulosa dan selulosa unruk mengetahui pesentase kandungan sebelum dilakukan pretreatment.

Perlakuan pretreatment

1. Perlakuan fisik

Pada penelitian ini menggunakan steam explosion (SE). Serbuk pelelah salak diambil sebanyak 100 gr, kemudian ditambahkan air sebanyak 700 ml dan dimasukan kedalam steam explosion. Steam explosion dipanaskan sesuai dengan perlakuan suhu 120 °C tekanan 2 bar, suhu 140 °C tekanan 4 bar dan suhu 160 °C tekanan 6 bar dan dilakukan explosion sehingga menghasilkan bubuk. Bubuk yang dihasilkan disaring menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat. Proses terakhir dilakukan pengujian kandungan lignin, hemiselulosa dan selulosa.

2. Perlakuan kimia

Serbuk pelelah salak diambil sebanyak 28 gr, kemudian ditambahkan NaOH dengan variasi konsentrasi 2%, 4% dan 6% sebanyak 150 ml dan dilakukan perendaman selama 104 jam dengan pH 9. Setelah perendaman selama 104 jam, pH dinetralkan menggunakan HCl, dan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Proses terakhir dilakukan pengujian kandungan lignin, hemiselulosa dan selulosa.

3. Perlakuan biologis

Pada perlakuan biologis dilakukan peremajaan isolat *Trichoderma reesei* FNCC 6012, diremajakan pada media Potato Dextros Agar (PDA) miring dalam tabung reaksi, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30 °C didalam inkubator selama 7 hari, kemudian disimpan dalam lemari pendingin dan digunakan untuk proses perlakuan prtreatment. Pada penelitian ini limbah padat pelelah salak diambil sebanyak 28 gram dimasukkan ke dalam gelas piala dengan ditambahkan nutrisi yang terdiri dari 2% w/w tepung gandum (2 gr), 35% v/w, aquadest (35 gr) dan 30 % v/w larutan nutrien (30 gr) (Mandels and Weber, 1969). Selanjutnya diaduk sampai homogen dan disterilisasi pada suhu 1210°C tekanan 1 atm, setelah dingin ditambahkan 5ml larutan spora *Trichoderma reesei* kemudian diinkubasi dengan variasi waktu selama 5 hari ,10 hari dan 15 hari. Proses terakhir dilakukan pengujian kandungan lignin, hemiselulosa dan selulosa.

Analisis Lignin, Hemiselulosa Dan Selulosa Metode (Chesson (Datta, 1981)

Tahap pertama analisa ini yaitu perebusan sampel kering (a) dengan aquades pada suhu 150°C selama 1,5 jam dan disertai dengan pendingin balik menggunakan kondenser. Setelah itu, sampel disaring sehingga didapatkan filtrat dan residu. Residu ini kemudian dipindahkan ke dalam cawan porselin lalu dioven selama 24 jam dan ditimbang hingga bobotnya konstan (b). Setelah itu dapat dihitung komponen larut air panas dengan menghitung selisih bobot konstan sampel yang direbus dengan residu hasil perebusan.

Tahap kedua yaitu menghidrolisis residu hasil tahap 1 dengan 150 mL asam sulfat 1 N dan disertai dengan pendinginan balik menggunakan kondensor pada suhu 150°C selama 1,5 jam. Setelah perebusan selesai, sampel disaring dan residunya dicuci dengan air panas. Kemudian residu dikeringkan dalam oven selama 24 jam (c). Berat konstan yang diperoleh diigunakan untuk mengurangi residu tahap 1 sampel sehingga diketahui kadar hemiselulosa.

Tahap ketiga yaitu sampel di dalam cawan ditambah dengan 10 ml asam sulfat konsentrasi 72% (v/v), dan didiamkan selama 4 jam (penggoyangan cawan dengan hati-hati setiap 1 jam) pada suhu kamar. Selanjutnya sampel dihidrolisis dengan H₂SO₄ 1 N selama 1,5 jam pada suhu 150°C. Selanjutnya dilakukan penyaringan residu dengan menggunakan crucible filter sehingga diperoleh residu dan filtrat. Residu kemudian dibilas dengan akuades panas sampai volume akuades 300ml. Setelah itu, sampel dan filter crucible dioven dan ditimbang hingga bobot konstan (d). Berat konstan kemudian digunakan untuk mengurangi berat residu tahap 2 untuk mengetahui kadar selulosa bahan. Tahap terakhir adalah pengabuan. Sampel diabukan pada suhu 575 ± 25°C sampai menjadi abu. Abu kemudian dikonstakan dalam oven kemudian ditimbang (e). Selisih berat konstan hasil pengabuan dengan berat residu tahap 3 menjadi berat lignin dari sampel sehingga dapat dihitung kadar lignin dalam sampel.

Perhitungan :

Bahan larut air panas : (a-b)/a x100%

Hemiselulosa : (b-c)/a x 100%

Selulosa : (c-d)/a x 100%

Lignin : (d-e)/a x 100%

Keterangan : a : berat sampel kering; b : berat kering (konstan) tahap 1; c : berat kering (konstan) tahap 2; d : berat kering (konstan) tahap 3; e : berat kering (konstan) tahap 4

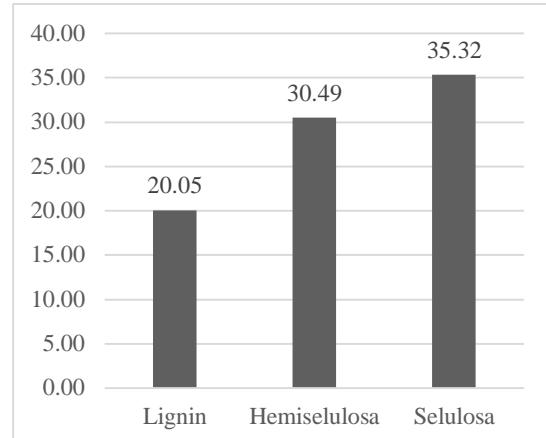
Hasil dan Pembahasan

Pretreatment

Proses Pretreatment dilakukan karena kandungan lignin dan hemiselulosa pada material lignoselulosa seperti pelepasan pohon salak membentuk struktur yang kuat melalui ikatan kovalen yang berfungsi melindungi sel tanaman dari serangan mikroorganisme. Struktur yang terbentuk dari ikatan kovalen antara lignin dan hemiselulosa melindungi selulosa sehingga selulosa sulit untuk dihidrolisis (Awatshi et al., 2013)

Vitamin C yang diukur pada panjang gelombang sinar tampak menunjukkan bahwa absorbansi maksimum berada pada panjang gelombang 516,40 nm. Analisis vitamin C menggunakan pereaksi 2,6-diklorofenol indofenol menghasilkan larutan berwarna, oleh karenanya panjang gelombang yang digunakan pada daerah sinar tampak. Panjang gelombang yang dihasilkan pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Widiastuti (2016). Panjang gelombang yang dihasilkan dalam penelitian Widiastuti diperoleh hasil panjang gelombang sebesar 516 nm. Pereaksi yang digunakan sama yaitu 2,6-diklorofenol indofenol. Berdasarkan hasil analisis serbuk pelepasan salak sebelum

pretreatment memiliki kandungan komponen lignin, hemiselulosa dan selulosa dapat dilihat pada Gambar 1.

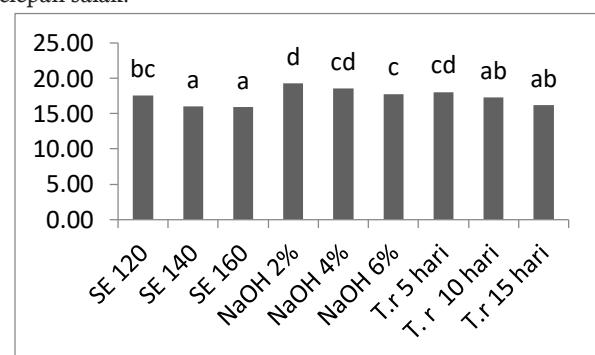


Gambar 1. Kandungan komponen Lignin, Hemiselulosa Dan Selulosa

Kandungan lignin, hemiselulosa dan selulosa Dari analisa lignin, hemiselulosa dan selulosa menunjukkan hasil masing-masing sebesar 20,05 %, 30,49 % dan 35,32%. Hasil ini lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Widyorini et al. (2015b) pada penelitian tersebut kandungan pelepasan salak lignin 25%, hemiselulosa 30%, dan alpa selulosa 45 %.

Lignin

Perlakuan pretreatment pelepasan salak menggunakan Steam Explosion (SE), Trichoderma reesei (T.r) dan NaOH, dapat dilihat pada Gambar 2. Menunjukkan grafik penurunan lignin pelepasan salak.



Gambar 2. Kandungan Komponen Lignin

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan menggunakan SE dengan suhu 1400C dan 1600C memiliki kandungan lignin paling rendah sebesar 16,03 % dan 15,90 %.

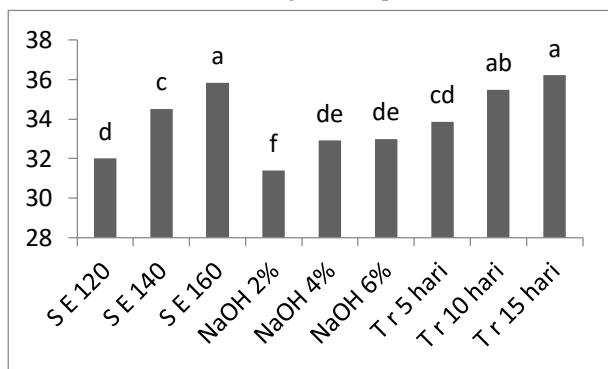
Hal ini disebabkan karena semakin lama waktu biomassa tersebut di dalam reaktor maka akan semakin lama pula kontak antara steam dengan biomassa sehingga struktur rigid lignin pada biomassa tersebut dapat terurai lebih banyak. semakin tinggi suhu perlakuan pretreatment maka semakin banyak lignin yang terdepolimerisasi. Hal ini disebabkan karena pada peningkatan temperatur, terjadi thermal softening pada polimer lignin yang menyebabkan kecepatan depolimerisasi lignin meningkat (Harmsen, 2010).

Hemiselulosa

Perlakuan pretreatment pelepas salak menggunakan Steam Explosion (SE), Trichoderma reesei (T.r) dan NaOH, dapat dilihat pada Gambar 3. Menunjukan grafik kenaikan hemiselulosa pelepas salak.

Perlakuan pendahuluan menggunakan Steam Explosion suhu 160 °C dan Trichoderma reesei selama 15 hari memiliki kandungan Hemiselulosa paling tinggi sebesar 35, 84 % dan 36,21%. Hal ini disebabkan *Pretreatment* Steam explosion merupakan sebuah alat yang dirangkai menggunakan tekanan dan suhu yang tinggi, sehingga mampu memecah lignin dan hemiselulosa menghasilkan selulosa yang tinggi dan meningkatkan porositas bahan, memecah hemiselulosa dan polimerisasi hemiselulosa (Sun & Cheng, 2002).

Gambar 3. Kandungan komponen Hemiselulosa



Sehingga Semakin tinggi suhu maka semakin meningkat kadar hemiselulosa yang diperoleh. Hal ini disebabkan karena selama steam explosion berlangsung, xylan (salah satu komponen penyusun hemiselulosa) terdepolimerisasi menjadi xylose, lalu kemudian terdehidrasi menjadi purfural (Yanni, 2015).

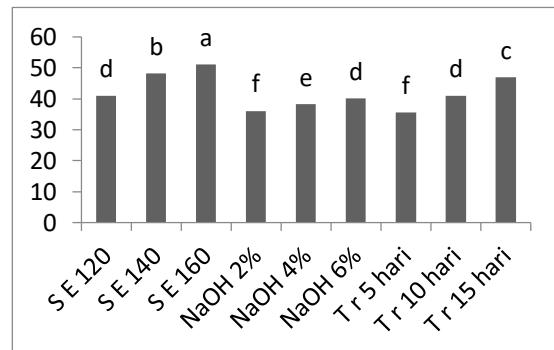
Pada perlakuan menggunakan T.reesei selama 15 hari sebesar 36,21% merupakan perlakuan paling tinggi. Hal ini disebabkan komponen hemiselulosa seperti gugus asetil ikut terlarut selama pretreatmen. Terlarutnya gugus asetil akan mengurangi steric hidrance yang merupakan penghambat bagi aktivitas enzim xilanase sehingga semakin lama waktu fermentasi semakin besar degradasi hemiselulosa (Moiser, et al., 2005).

Selulosa

Perlakuan pretreatment pelepas salak menggunakan Steam Explosion (SE), Trichoderma reesei (T.r) dan NaOH, dapat dilihat pada Gambar 4. Menunjukan grafik meningkatkan kandungan selulosa pelepas salak.

Perlakuan pretreatment menggunakan Steam Explosion suhu 160 °C memiliki kandungan selulosa tertinggi sebesar 51.09%. Hal ini disebabkan serat selulosa merupakan serat yang lunak dan lebih pendek sehingga sangat mudah terdegradasi. Pada proses pelepasan uap secara cepat, uap dan air panas pada bahan akan keluar secara cepat sehingga mengakibatkan terdegradasi nya struktur pada bahan (Yu et al., 2012). Proses ini juga akan memberikan efek modifikasi sifat fisik bahan (luas permukaan

spesifik, kapasitas rentensi air, warna, tingkat kristalinitas selulosa), hidrolisis komponen hemiselulosa dan modifikasi struktur kimia lignin (Jacquet et al., 2015). Semakin tinggi tekanan kelarutan akan semakin meningkat. Tekanan yang semakin tinggi dapat mempercepat laju reaksi hidrolisis sehingga pada proses Steam akan menurunkan pKw sehingga air akan bersifat asam (Sui dan Chen, 2016) dan memperbesar tekanan dalam reaktor Steam Explosion sehingga saat proses pelepasan tekanan secara cepat tersebut menghasilkan gaya potong yang lebih tinggi sehingga biomassa dapat terpotong (Jacquet et al., 2015).



Gambar 4. kandungan komponen selulosa

Kesimpulan

Perlakuan Pretreatment menggunakan Steam Explosion Suhu 140 dan 160 °C mampu menurunkan kadar lignin sebesar 16.03% dan 15,90 %. Perlakuan menggunakan Steam explosion suhu 160 °C dan Trichoderma reesei 15 Hari mampu meningkatkan kadar Hemiselulosa sebesar 35, 84 % dan 36,21%. Perlakuan menggunakan Steam Explosion suhu 160 °C memberikan pengaruh yang terbaik pada selulosa sebesar 51.09 %.

Daftar Pustaka

- Adi, I. R. (2008). Intervensi komunitas ; pengembangan masyarakat sebagai upaya pemeberdayaan masyarakat.
- Ahmed, A. P. Vermette (2008), "Culture-based Strategies to Enhance Cellulase Enzyme Production from Trichoderma reesei RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions", Biochemical Engineering Journal 40: 399-407.
- Awatshi, M., Kaur, J., and Rana, S. (2013). Bioethanol production through water hyacinth Eichornia crassipes via optimazation of the pretreatment condition. International journal of emerging technologi and advanced Engineering. 3(3):42-46
- Harmsen P F H et al. (2010) Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. Food & Biobased Research.Energy Research Centre of the Netherlands. p. 8-12
- Intani, 2007, Uly Nalurita. (2007). Pemanfaatan Batang salak tua dari kecamatan Cianem, kabupaten Tasik malaya jawa barat sebagai salah satu bahan baku tekstil.

- Jacquet, N., Maniet, G., Vanderghem, C., Delvigne, F. Dan Richel, A. (2015) applicattion of steam explosion as pretreatmen on lignocellulosic material : A review, industrial and engineering Chemistry research, 54 (10), hal. 2593-2598. Doi :10.1021/ie503151g.
- Moiser, N., Wyam. C., dale, B., Elander, R., dan Lee., Y.Y., 2005. Feature of promosing technologies for pretreatmen of lignocelulotic Biomass. Biosource Technology. 96:673-686
- Rukmana, R. (1999). Salak Prospek Agribisnis dan Teknik Usaha Tani. Jakarta: Penerbit Kansius. Hlm . 18.
- Shibata, M dan A. H. Osman. 1988. Feeding Value of Oil Palm by-product 1. Nutrient Intake and Physiological Responses of Kedah-Kelantan Cattle. Jarq 22: 77-84.
- Sui, W. Dan Chen, H. (2016) " effec water state on steam explosion of lignocellulosic biomass, " bioresource technology. Elsevier Ltd, 199, hal. 155-163. Doi; 10.1016/j.biortech. 2015.09.001.
- Sun, Y. Dan Cheng J, 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: A review. Bioresour Technol 83:1-11
- Tjahjadi, N. (1989). Panduan Praktis Pemerhati Salak. Jakarta: Penerbit Kansius. Hlm. 27.
- Yanni S., Joko W, Andika P R., Prasetyo P., dan Novia, (2015). Pengaruh Temperatur Dan Waktu Tinggal Pada Perlakuan Awal Bagas Sorgum Dengan Metode Steam Explosion.
- Yu, Z., Zhang, B., Yu, F., Xu, G dan Song, A (2012) "Bioresource technology a real explosion : the requirement of steam explosion pretratmen,"bioresource technology. Elsevier Ltd, 121, hal. 335-341. Doi: 10.1016/j.biortech. 2012.06.055.
- Zhao, X., Zhang, L., dan Liu, D (2007) comparative study on chemical pretreatment metods for improving enzymatic digestability of crofton weed steam. Bioresource Technology. 99(9): 3729-3736