



POTENSI MIKROBA SIMBION
USUS RAYAP *Macrotermes gilvus* Hagen
SEBAGAI AGENSIA DEGRADATOR SELULOSA
DALAM PEMBUATAN BIOETANOL

Skripsi

disusun sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
Program Studi Biologi

Oleh

Dewi Susilowati

4411412058

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

2018

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Potensi Mikroba Symbion Usus Rayap *Macrotermes gilvus* Hagen sebagai Agen Degradator Selulosa dalam Pembuatan Bioetanol”** disusun berdasarkan hasil penelitian saya dengan arahan dosen pembimbing. Sumber informasi atau kutipan yang berasal dari karya yang diterbitkan telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir skripsi ini. Skripsi ini belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar dalam program sejenis di perguruan tinggi manapun.

Semarang, 8 Desember 2017



Dewi Susilowati
4411412058

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Potensi Mikroba Symbion Usus Rayap *Macrotermes gilvus* Hagen sebagai

Agensia Degradator Selulosa dalam Pembuatan Bioetanol

disusun oleh

Dewi Susilowati

4411412058

telah dipertahankan di hadapan sidang Panitia Ujian Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang pada tanggal 15 Desember 2017.



Prof. Dr. Zaenuri, S.E., M.Si., Akt.
NIP 196412231988031001

Sekretaris

Dra. Endah Peniati, M.Si.
NIP 196511161991032001

Ketua Penguji

Prof. Dr. Retno Sri Iswari, S.U.
NIP 195202071979032001

Anggota penguji I/
Dosen Pembimbing I

Dr. Niken Subekti, M. Si.
NIP. 197302141999032001

Anggota Penguji I/
Dosen Pembimbing II

Dr. Dra. Siti Harnina Bintari, MS.
NIP 196008141987102001

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

MOTTO:

Man Jadda Wajada,

Siapa bersungguh-sungguh pasti berhasil

Man Shabara Zhafira

Siapa yang bersabar pasti beruntung

Man Sara Ala Darbi Washala

Siapa menapaki jalan-Nya akan sampai ke tujuan

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan...”

(QS. Al-Insyirah: 6)

PERSEMBAHAN:

- Untuk Bapak, Ibu dan Adik-adik saya yang tidak pernah letih mencurahkan kasih sayangnya.

PRAKATA

Alhamdulillah kehadiran Allah SWT atas segala karunia dan rahmat yang dilimpahkan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Potensi Mikroba Simbion Usus Rayap *Macrotermes gilvus* Hagen sebagai Agensia Degradator Selulosa dalam Pembuatan Bioetanol”**

Penyusunan skripsi ini untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

Dalam penyusunan, penulis tidak lepas dari berbagai hambatan dan kesulitan. Namun berkat bimbingan, bantuan dan dukungan berbagai pihak, penulis dapat menyelesaikannya. Maka penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memfasilitasi dan memberikan dana PKM P Tahun 2015.
2. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan untuk belajar serta memberikan segala fasilitas.
3. Dekan FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kemudahan dalam perijinan.
4. Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang yang telah memberi kemudahan dalam perijinan penelitian skripsi.
5. Staf Tata Usaha Jurusan Biologi Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan pengarahan dan bantuan.
6. Andin Irsani, S.Pd., M.Si. sebagai Dosen wali yang telah memberikan pengarahan, bantuan saran serta motivasi bagi penulis.

7. Dr. Niken Subekti, M.Si. sebagai Dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, saran dan motivasi bagi penulis.
8. Dr. Dra. Siti Harnina Bintari, MS. sebagai Dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran dan motivasi bagi penulis.
9. Prof. Dr. Retno Sri Iswari, S.U. sebagai Dosen penguji skripsi yang telah berkenan menguji, memberikan saran dan nasehat bagi penulis.
10. Kepala dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan ijin penelitian dan fasilitas selama penelitian.
11. Ibu Jumiati dan Bapak Karsipan tercinta dan Adik-adik saya Siti Shofiatun dan Wahyu Sri Lestari yang saya sayangi atas doa, dukungan dan semangat yang tidak pernah berhenti.
12. Serta segenap pihak lainnya yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu. Terimakasih atas bantuan dan doanya.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga karya sederhana ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan pembaca pada umumnya.

Semarang, 8 Desember 2017

Penulis

ABSTRAK

Susilowati, D. 2018. *Potensi Mikroba Symbion Usus Rayap Macrotermes gilvus Hagen sebagai Agensia Degradator Selulosa dalam Pembuatan Bioetanol*. Skripsi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. Dr. Niken Subekti, M.Si dan Dr. Dra. Siti Harnina Bintari, MS.

Kata kunci: agensia degradator selulosa, bioetanol, *Macrotermes gilvus* Hagen, mikroba symbion usus rayap

Pengembangan bioetanol berbahan baku eceng gondok dalam pemanfaatannya memerlukan tahapan yang lebih kompleks dan memerlukan jumlah enzim selulase relatif banyak. Sehingga perlu dicari alternatif pengganti enzim komersial seperti memanfaatkan mikroba symbion usus rayap *Macrotermes gilvus* Hagen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi mikroba symbion usus rayap *Macrotermes gilvus* Hagen sebagai agensia degradator selulosa berbantuan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan bioetanol secara *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF). Penelitian dilakukan dengan menggunakan faktor optimum hasil optimasi faktor pada tahap SSF dengan *central composite design* (CCD) yaitu pH (6,95), suhu (37 °C) dan *agitasi* (150 rpm). Sementara ko-kultur *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* (rasio, 1:1), digunakan sebagai kontrol positif. Tepung eceng gondok 2,5 g yang diSSF dengan mikroba symbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*, berturut-turut menghasilkan gula pereduksi sebanyak 25,93 mmol/L dan 24,41 mmol/L serta etanol sebanyak 0,002% dan 0,008%. Hasil uji Tukey's HSD menunjukkan bahwa sampel mikroba symbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* tidak berbeda secara nyata. Sehingga dapat disimpulkan bahwa mikroba symbion usus rayap *Macrotermes gilvus* memiliki kemampuan yang sama dengan *Aspergillus niger* sebagai degradator selulosa dalam pembuatan bioetanol berbahan dasar eceng gondok. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengatasi permasalahan krisis energi dengan memanfaatkan bahan baku yang ramah lingkungan dan terbarukan seperti gulma eceng gondok dan mikroba symbion usus rayap *Macrotermes gilvus* Hagen, serta faktor optimum SSF (pH 6,95, suhu 37 °C dan *agitasi* 150 rpm) dapat digunakan sebagai solusi alternatif dalam menekan biaya produksi etanol.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
PENGESAHAN	iii
MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Penegasan Istilah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Eceng gondok sebagai bahan baku bioetanol	7
2.2 Mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus</i> Hagen	9
2.3 Aktivitas enzim selulase.....	11
2.4 Hipotesis	12

BAB 3 METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	14
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian	14
3.3 Variabel Penelitian	14
3.4 Rancangan Penelitian	15
3.5 Alat dan Bahan Penelitian	16
3.6 Prosedur Penelitian	19
3.7 Metode Pengumpulan Data	25
3.8 Metode Analisis Data	25
BAB 4 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	28
4.2 Pembahasan	30
BAB 5 PENUTUP	
5.1 Simpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN-LAMPIRAN	45

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Deskripsi level faktor penelitian pada CCD	15
3.2 Desain penelitian SSF dengan CCD	15
3.3 Rancangan penelitian SSF dengan pengacakan RKAL	16
3.4 Spesifikasi alat-alat penelitian	16
3.5 Spesifikasi bahan-bahan penelitian	18
3.6 Pembuatan <i>buffer</i> pH (KH ₂ PO ₄ -NaOH)	22
4.1 Nilai aktual dan nilai prediksi untuk densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL) dan gula pereduksi (mmol/L)	28
4.2 Nilai densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL), gula pereduksi (mmol/L), konsentrasi etanol (%) dan nyala api	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Nilai absorbansi untuk densitas sel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus</i> (OD _{600 nm})	46
2 Nilai absorbansi untuk densitas sel <i>Aspergillus niger</i> (OD _{600 nm}) ...	47
3 Densitas sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{600 nm})	48
4 Produk <i>delignifikasi</i> (hemiselulosa, selulosa, lignin, abu dan kandungan lain)	49
5 <i>Output</i> pembacaan absorbansi secara spektrofotometrik untuk densitas sel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{600 nm}) pada SSF optimasi faktor	50
6 <i>Output</i> pembacaan absorbansi secara spektrofotometrik untuk gula pereduksi mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> (OD _{477 nm}) pada SSF optimasi faktor	51
7 <i>Output</i> pembacaan absorbansi secara spektrofotometrik untuk glukosa standar (OD _{477 nm})	52
8 Kurva standar untuk glukosa standar	53
9 Nilai absorbansi untuk densitas sel (sel/mL) dan gula pereduksi (mmol/L) dari sampel SSF optimasi faktor	54
10 Sebaran F pada taraf uji 5% dan derajat bebas pembilang (db1) serta derajat bebas penyebut db 2	55
11 ANOVA untuk (a) nilai densitas sel (sel/mL), (b) aktivitas enzim endoglukanase (U/mL) dan gula pereduksi (mmol/L)	56
12 <i>Student's t-test</i> untuk nilai densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL) dan gula pereduksi (mmol/L)	57
13 ANOVA hasil perbaikan model untuk (a) nilai densitas sel (sel/mL), (b) aktivitas enzim endoglukanase (U/mL) dan gula pereduksi (mmol/L)	58

14	Plot kontur untuk nilai densitas sel, aktivitas enzim endoglukanase dan gula pereduksi	59
15	Kurva plot permukaan untuk nilai densitas sel, aktivitas enzim endoglukanase dan gula pereduksi	60
16	<i>Output</i> pembacaan absorbansi untuk densitas sel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> pada SSF dengan faktor optimum (OD _{600 nm})	61
17	<i>Output</i> pembacaan untuk densitas sel <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i> pada SSF dengan faktor optimum (OD _{600 nm})	62
18	<i>Output</i> pembacaan untuk gula pereduksi <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i> dan mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> pada SSF dengan faktor optimum (OD _{477 nm})	63
19	<i>Output</i> pembacaan untuk etanol mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i> pada SSF dengan faktor optimum (OD _{600 nm})	64
20	<i>Output</i> pembacaan absorbansi untuk etanol standar (OD _{600 nm})	65
21	Kurva standar etanol	66
22	Nilai densitas sel, aktivitas enzim endoglukanase, gula pereduksi dan etanol pada kondisi optimum	67
23	Uji normalitas untuk nilai respon dari pengujian sampel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i>	68
24	Uji homogenitas untuk nilai respon dari pengujian sampel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i>	69
25	Uji <i>two-way</i> ANOVA untuk nilai respon dari pengujian sampel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i>	70

26 Uji <i>post-hoc</i> Tukey's HSD untuk nilai respon dari pengujian sampel mikroba simbion usus rayap <i>Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae</i>	71
27 Dokumentasi penelitian	72

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bioetanol merupakan salah satu sumber energi potensial yang dapat dikembangkan sebagai bahan bakar terbarukan dan ramah lingkungan. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (2016) mengungkapkan bahwa pengembangan bioetanol dinilai belum signifikan karena bahan baku berupa molase lebih ekonomis diolah menjadi makanan. Oleh karena itu, pengembangan bioetanol saat ini telah beralih memanfaatkan biomassa lignoselulosa. Hal tersebut didasarkan pada pertimbangan keberadaannya yang melimpah dan tidak bersaing dengan bahan makanan seperti gulma eceng gondok (*Eichhornia carssipes*) (Das *et al.* 2016).

Sudiyani *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa biomassa lignoselulosa dalam pemanfaatannya harus di-*delignifikasi* untuk mendegradasi dan menghilangkan lignin serta hemiselulosa dari selulosa dan *sakarifikasi* untuk depolimerasi gula kompleks menjadi gula sederhana. Hasil penelitian Das *et al.* (2016) menunjukkan bahwa perlakuan *delignifikasi* dapat melarutkan hemiselulosa lebih banyak dan dapat meningkatkan kandungan selulosa sampel, dimana pada sampel *delignifikasi* diperoleh selulosa (35,4%) dan hemiselulosa (19,6%) sementara pada sampel *non-delignifikasi* diperoleh selulosa (24,7%) dan hemiselulosa (32,2%). Hal tersebut menunjukkan pentingnya *delignifikasi*, sehingga pada penelitian ini tepung eceng gondok di-*delignifikasi* dengan H_2SO_4

(2%, v/v) pada suhu 121 °C selama 20 menit sesuai penelitian Reales-Alfaro *et al.* (2013).

Sánchez *et al.* (2011) melaporkan bahwa depolimerisasi selulosa menjadi glukosa dan depolimerisasi hemiselulosa menjadi glukosa, manosa dan xilosa memerlukan peran enzim selulolitik kompleks. Hal tersebut menjadi pertimbangan dalam pengembangan bioetanol karena 40-60% dari total biaya produksi etanol merupakan biaya untuk pembelian enzim komersial (Dhillon *et al.* 2012). Oleh karena itu, saat ini telah banyak dilakukan penelitian untuk mendapatkan alternatif pengganti enzim komersial, seperti melakukan karakterisasi dan isolasi mikroba selulolitik simbiosis usus rayap.

Wong *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa rayap adalah salah satu contoh biokatalis karena memiliki mikroba simbiosis yang dapat memproduksi enzim untuk mengubah lignoselulosa menjadi produk seperti gula, hidrogen dan asetat. Ni & Takuda (2013) mengungkapkan bahwa rayap tingkat tinggi memiliki sistem selulolitik endogenus yang lebih kompleks dibandingkan rayap tingkat rendah. Ferbiyanto *et al.* (2016) mengungkapkan *Macrotermes gilvus* Hagen merupakan rayap tingkat tinggi, teridentifikasi dua mikroba simbiosis yang memiliki aktivitas selulolitik yang tinggi yaitu *Bacillus megaterium* dan *Paracoccus yeei*.

Salah satu upaya yang dikembangkan untuk menekan biaya produksi bioetanol yaitu menggabungkan tahap *sakarifikasi* dan fermentasi menjadi satu tahap atau lebih dikenal dengan *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF). Tahap ini dilaporkan Arokiasamy *et al.* (2016) lebih ekonomis jika dibanding dengan tahap *separate hydrolysis and fermentation* (SHF), karena

waktu yang diperlukan dalam merombak gula pereduksi relatif singkat dan tetap dapat meningkatkan laju hidrolisis dengan jumlah enzim yang relatif sedikit serta memiliki resiko kontaminasi yang rendah (Sudiyani *et al.* 2014; Scully & Orlygsson 2015). Sementara Deka *et al.* (2013), menekan biaya produksi bioetanol dengan mengoptimasi faktor pada tahap SSF dengan *central composite design* (CCD), adapun faktor yang dioptimasi yaitu pH, suhu dan *agitasi*.

Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian mengenai potensi mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus* Hagen sebagai agensia degradator selulosa berbantuan *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan bioetanol secara SSF penting untuk dilakukan. Penelitian dilakukan dengan menggunakan faktor optimum hasil optimasi faktor pada tahap SSF dengan CCD yaitu pH (6,95), suhu (37 °C) dan *agitasi* (150 rpm). Sementara ko-kultur *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* (rasio, 1:1), digunakan sebagai kontrol positif.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dikaji dalam penelitian ini yaitu

1.2.1 Bagaimana pengaruh pH (6,95), suhu (37 °C) dan *agitasi* (150 rpm) terhadap ko-kultur mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF?

1.2.2 Bagaimana hasil pengujian nilai densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL), nilai gula pereduksi (mmol/L), presentase etanol (%) dan ada tidaknya nyala api dari sampel mikroba simbion usus rayap *Macrotermes*

gilvus-Saccharomyces cerevisiae dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF?

1.3 Penegasan Istilah

Beberapa istilah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1.3.1 Potensi Mikroba Simbion

Mikroba simbion adalah mikroba yang dijumpai melimpah di *hindgut* rayap kasta pekerja. Ferbiyanto *et al.* (2016) mengungkapkan bahwa rayap *Macrotermes gilvus* Hagen teridentifikasi memiliki mikroba selulolitik penghasil enzim selulase yang tinggi yaitu *Bacillus megaterium* dan *Paracoccus yeei*. Pada penelitian ini menggunakan mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus* dengan densitas sel (OD_{600 nm}) yaitu $0,18 \pm 0,00$ sel/mL (Lampiran 1).

1.3.2 Rayap *Macrotermes gilvus* Hagen

Macrotermes gilvus Hagen merupakan rayap tanah yang termasuk kedalam rayap tingkat tinggi. Rayap *Macrotermes gilvus* bersifat kosmopolit sehingga banyak ditemukan di wilayah Indonesia (Nandika *et al.* 2015). Secara umum identifikasi jenis rayap dilihat dari kasta prajuritnya. Arinana *et al.* (2016) melaporkan bahwa kasta prajurit dari rayap *Macrotermes gilvus* memiliki karakteristik yaitu panjang kepala dengan mandibel $\pm 4,77$ mm, panjang kepala tanpa mandibel $\pm 3,0$ mm dan lebar kepala 2,73 mm, sementara Nandika *et al.* (2015) menyatakan bahwa kasta prajurit rayap *Macrotermes gilvus* memiliki kapsul kepala yang berwarna coklat tua atau kemerahan dan memiliki mandibel kanan dan kiri yang berbentuk simetris serta tidak memiliki gigi marginal. Pada

penelitian ini rayap *Macrotermes gilvus* Hagen yang digunakan yaitu kasta pekerja diperoleh dari hutan mini kampus Universitas Negeri Semarang sebanyak 100 ekor.

1.3.3 Agensia degradator selulosa

Agensia degradator selulosa yaitu mikroba simbiosis usus rayap *Macrotermes gilvus* yang berperan dalam perombakan selulosa menjadi glukosa. Sudiyani *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa glukosa dirombak oleh enzim selulase. Pada penelitian ini sumber selulosa sebanyak 42,24% (Lampiran 4) diperoleh dari biomassa eceng gondok (daun:batang, rasio 1:1) yang di-*delignifikasi* dengan menggunakan H₂SO₄ (2%, v/v) pada suhu 121 °C selama 20 menit.

1.3.4 Bioetanol

Bioetanol adalah bahan bakar alternatif yang bersifat terbarukan dan ramah lingkungan. Pada penelitian ini pembuatan bioetanol berbahan baku eceng gondok, dilakukan secara SSF dengan mikroba simbiosis usus rayap *Macrotermes gilvus* Hagen-*Saccharomyces cerevisiae* dan kontrol positif (*Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*) pada pH (6,95), suhu (37 °C) dan *agitasi* (150 rpm).

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka tujuan penelitian ini yaitu

1.4.1 Menganalisis pengaruh pH (6,95), suhu (37 °C) dan *agitasi* (150 rpm) terhadap ko-kultur mikroba simbiosis usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF.

1.4.2 Menganalisis hasil pengujian nilai densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL), nilai gula pereduksi (mmol/L), presentase etanol (%) dan ada tidaknya nyala api dari sampel mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF.

1.5 Manfaat Penelitian

Berdasarkan tujuan penelitian tersebut, maka manfaat penelitian ini yaitu

1.5.1 Memberikan informasi mengenai pengaruh pH (6,95), suhu (37 °C) dan agitasi (150 rpm) terhadap ko-kultur mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF.

1.5.2 Memberikan informasi mengenai hasil pengujian nilai densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL), nilai gula pereduksi (mmol/L), presentase etanol (%) dan ada tidaknya nyala api dari sampel mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Eceng gondok sebagai bahan baku bioetanol

Eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) merupakan tumbuhan gulma yang tumbuh melimpah di perairan. Hal tersebut berdampak pada sedikitnya biodiversitas perairan, berkurangnya kandungan oksigen terlarut serta perubahan komposisi kimia perairan (Guragain *et al.* 2011). Ganguly *et al.* (2012) mengungkapkan bahwa eceng gondok toleran terhadap *fluktuasi* jumlah air suatu perairan yang ekstrim, ketersediaan nutrisi yang terbatas, keberadaan senyawa toksik pada perairan, perubahan pH dan suhu yang ekstrim. Das *et al.* (2016) mengungkapkan bahwa pemanfaatan eceng gondok sebagai bahan baku pembuatan bioetanol dapat memberikan nilai guna gulma tersebut.

Eceng gondok merupakan biomassa lignoselulosa yang dilaporkan Das *et al.* (2016) terdiri atas 24,7% selulosa, 32,2% hemiselulosa dan 3,2% lignin. Sudyani *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa biomassa lignoselulosa dalam pemanfaatannya memerlukan tahapan yang lebih kompleks dibandingkan biomassa berpati atau bergula. Tahapan tersebut meliputi (1) tahap *delignifikasi*, bertujuan mendegradasi ikatan lignoselulosa dan menghilangkan lignin serta hemiselulosa dari selulosa, (2) tahap *sakarifikasi*, bertujuan depolimerisasi selulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n menjadi glukosa ($C_6H_{12}O_6$) dan depolimerisasi hemiselulosa menjadi gula bergugus C6 (glukosa, manosa) dan gula bergugus C5 (xilosa) (Sánchez *et al.* 2011), (3) tahap fermentasi, bertujuan mengubah glukosa menjadi

etanol (C_2H_5OH), dan (4) tahap pemisahan dan pemurnian, bertujuan meningkatkan *yield* etanol.

Upaya pengembangan bioetanol telah banyak diteliti dan dimodifikasi untuk mendapatkan *yield* bioetanol maksimum, salah satunya dengan mengoptimasi faktor yang berpengaruh pada setiap tahapan pembuatan bioetanol. Reales-Alfaro *et al.* (2013) mengoptimasi tahap *delignifikasi* dengan CCD dan faktor optimasi yaitu biomassa (9,15-13,35%, w/v), konsentrasi H_2SO_4 (0,32-3,68%, v/v) dan lama waktu (11,59-28,40 menit), yang diautoklaf pada suhu $121\ ^\circ C$, 2 atm. Hasil optimasi menunjukkan bahwa kondisi optimum diperoleh pada biomassa 11,25% (w/v), konsentrasi H_2SO_4 (2%, v/v) dan lama waktu (20 menit) yang diautoklaf pada suhu $121\ ^\circ C$, 2 atm. Kondisi optimum tersebut selanjutnya digunakan sebagai dasar dalam pelaksanaan *delignifikasi* pada penelitian ini. Sementara Deka *et al.* (2013) mengoptimasi produksi selulase dari *Bacillus* sp. dengan CCD melalui SSF berbantuan *Zymomonas mobilis* dengan faktor optimasi yaitu pH (5,9-8,0), suhu ($30-44\ ^\circ C$) dan *agitasi* (120-240 rpm). Metode tersebut kemudian digunakan sebagai dasar optimasi faktor pada penelitian ini dengan faktor optimasi berupa pH, suhu dan *agitasi* namun menggunakan ko-kultur dan biomassa yang berbeda. Arokiasamy *et al.* (2016) mengungkapkan bahwa SSF dinilai lebih ekonomis jika dibanding dengan *separate hydrolysis and fermentation* (SHF), karena waktu yang diperlukan dalam merombak gula pereduksi relatif singkat dan tetap dapat meningkatkan laju hidrolisis dengan jumlah enzim yang relatif sedikit serta memiliki resiko kontaminasi yang lebih rendah (Sudiyani *et al.* 2014; Scully & Orlygsson 2015).

2.2 Mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus* Hagen

Mikroba simbion rayap dilaporkan Wong *et al.* (2014) berperan dalam pencernaan lignoselulosa dan metabolisme nitrogen. *Macrotermes gilvus* Hagen merupakan rayap tingkat tinggi dari famili Termitidae, subfamili Macrotermitinae. Ni & Tokuda (2013) menyatakan bahwa rayap tingkat tinggi merupakan kelompok rayap yang dalam ususnya tidak dijumpai adanya simbion protista berflagel.

Ni & Tokuda (2013) mengungkapkan bahwa secara umum usus rayap dibagi menjadi 3 yaitu *foregut*, *mindgut* dan *hindgut*. *Foregut* merupakan saluran esofagus yang berasal dari ektodermal dengan perluasan pada bagian anterior menjadi tembolok dan pada bagian posterior menjadi empedal, berperan dalam pencernaan secara mekanis. *Mindgut* merupakan tempat terjadinya pencernaan secara enzimatik dan absorpsi nutrisi. *Hindgut* rayap dilaporkan Brune & Ohkuma (2011) terbagi 5 bagian *proctodeal* (P) yaitu P1, P2, P3, P4 dan P5, di mana P3 merupakan tempat mikroba simbion rayap. Ni & Tokuda (2013) mengungkapkan bahwa rayap dari subfamili Macrotermitinae, Sphaerotermitinae dan Foraminitermitinae memiliki *hindgut* dengan *mixed segment* antara bagian *mindgut* dan *hindgut*.

Wong *et al.* (2014) mengungkapkan bahwa rayap *Macrotermes gilvus* termasuk dalam rayap tingkat tinggi yang membangun kebun jamur dalam sarang, serta bersimbiosis dengan kapang *Termitomyces* sp. (Ni dan Tokuda 2013). Rayap tersebut teridentifikasi memiliki enzim selulolitik yaitu (1) endo- β -1-4-glukanase (EG, endo- β -1-4-D-glukan 4-glukanohidrolase; EC 3.2.1.4), (2) ekso- β -1-4-

glukanase atau selobiohidrolase (CBH, ekso-1,4- β -glukanase; EC 3.2.1.9) dan (3) β -glukosidase (BG, EC 3.2.1.21) (Ni dan Tokuda 2013). König *et al.* (2013) melaporkan bahwa EG berfungsi menghidrolisis ikatan 1,4- β secara acak dari rantai selulosa. CBH berfungsi memotong unit selobiosil dari ujung yang tidak merata dari rantai selulosa. BG berfungsi memotong unit glukosil dari ujung yang tidak merata selo-oligosakarida. Enzim lain yang berperan dalam pemecahan hemiselulosa seperti xilanase (endo-1,4- β -D-xilanohidrolase, EC 3.2.1.8) dijumpai pada *mindgut* rayap dari subfamili Macrotermitinae. Sementara enzim lakase yang berperan dalam modifikasi lignin hanya sedikit dijumpai pada *mindgut* rayap *Macrotermes gilvus*, hal tersebut terjadi karena pH *mindgut* 5-8,5 yang tidak cocok untuk kapang lignolitik (Ni & Tokuda 2013).

König *et al.* (2013) mengungkapkan bahwa aktivitas EG pada rayap tingkat tinggi seperti *Nasutitermes takasagoensis* dan *Nasutitermes walker* dijumpai dalam *mindgut*. Hal tersebut dibuktikan dengan hasil konfirmasi analisis imunohistokimia yang menginterpretasikan bahwa enzim selulolitik pada *Nasutitermes takasagoensis* diproduksi dari epitelium *midgut*-nya (Tokuda *et al.* 2012). Sementara rayap *Macrotermes barneyi* menunjukkan aktivitas endogenus *glycoside hydrolase family* (GHF1, yang berfungsi melepaskan glukosa) BG dijumpai dalam *midgut* (Wu *et al.* 2012).

Hasil karakterisasi dan identifikasi rayap tingkat tinggi menunjukkan bahwa mikroba simbion usus rayap merupakan mikroba kapang-bakteri. Kamsani *et al.* (2015) menyatakan bahwa kapang (*Aspergillus* sp., *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus aculeatinus*, *Aspergillus ellipticus*, *Aspergillus ibericus*, *Aspergillus*

brasiliensis dan *Trichocoma paradoxa*) dan bakteri (*Bacillus* sp. B1, *Bacillus cereus*, *Bacillus* sp. B2, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wethenstephanensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus oryzaecorticis*, *Bacillus marisflavi*, *Brevibacillus* sp. Br3, *Brevibacillus choshinensis*, *Brevibacillus limnophilus*, *Brevibacillus invocatus* dan *Desulfotomaculum kuznetsovii*) diidentifikasi dijumpai pada usus rayap dari subfamili Nasutitermitinae. Sementara Ferbiyanto *et al.* (2016) melaporkan bakteri selulolitik (*Bacillus megaterium*, *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus koreensis*, *Bacillus abyssalis*, *Bhargavaea cecembensis*, *Paenisporosarcina indica*, *Planococcus rifietoensis*, *Paracoccus huijuniae*, *Paracoccus aminovorans*, *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus thiocyanatus*, *Paracoccus yeei*, *Oceanicolamarinus*, *Sulfitobacter donghicolai* dan *Donghicola eburneus*) dijumpai pada rayap *Macrotermes gilvus* Hagen. Berdasarkan uraian tersebut, menunjukkan bahwa mikroba simbiosis rayap tingkat tinggi dapat dimanfaatkan sebagai enzim lignoselulolitik alternatif pengganti enzim komersial.

2.3 Aktivitas enzim selulase

Selulase merupakan salah satu enzim yang mengkatalis reaksi air dengan selulosa untuk melepaskan ikatan pendek dan akhirnya melarutkan gula pereduksi (Yang *et al.* 2011). Degradasi selulosa menjadi glukosa secara umum terjadi akibat aksi sinergi dari ketiga tipe selulase yaitu endo- β -1,4 glukonase (endo- β -1,4-D-glukan 4-glukanohidrolase, EC 3.2.1.4), selobiohidrolase atau ekso- β -1,4 glukonase (exo- β -1,4-D-glukan 4-selobiohidrolase, EC 3.2.1.91) dan β -

glukosidase (EC 3.2.1.21) (Sudiyani *et al.* 2014). Enzim tersebut sangat penting untuk menghidrolisis biomassa lignoselulosa.

Zhang *et al.* (2016) mengungkapkan bahwa dalam proses pembuatan bioetanol diperlukan selulase dalam jumlah yang besar untuk meningkatkan proses hidrolisis. Besarnya jumlah selulase yang diperlukan berdampak pada tingginya biaya produksi yang mencapai 40-60% (Dhillon *et al.* 2012). Optimasi faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, merupakan salah satu upaya yang telah banyak dikembangkan untuk menekan tingginya biaya produksi. Deka *et al.* (2013) mengungkapkan bahwa salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi enzim endoglukanase yaitu suhu, pH dan *agitasi*. Arokiasamy *et al.* (2016) mengungkapkan bahwa suhu mempengaruhi aktivitas selulase, ketika suhu optimum maka aktivitas selulase meningkat dan turun ketika sudah melewati suhu optimum bersamaan dengan meningkatnya reaksi energi kinetik. pH dari medium pertumbuhan dilaporkan berpengaruh terhadap reaksi beberapa enzim dengan mempengaruhi transpor kimia produk dan enzim melalui sel membran (Liang *et al.* 2010). Laju *agitasi* meningkatkan konsumsi gula dan mengurangi inhibitor etanol pada sel (Zabed *et al.* 2014).

2.4 Hipotesis

Berdasarkan kajian pustaka tersebut maka hipotesis yang disusun dalam penelitian ini yaitu

2.4.1 Derajat keasaman (pH 6,95), suhu (37 °C) dan *agitasi* (150 rpm) berpengaruh terhadap ko-kultur mikroba simbiosis usus rayap *Macrotermes gilvus*-

Saccharomyces cerevisiae dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF.

2.4.2 Hasil pengujian nilai densitas sel (sel/mL), aktivitas enzim endoglukanase (U/mL), nilai gula pereduksi (mmol/L), presentase etanol (%) dan ada tidaknya nyala api dari sampel mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae* pada tahap SSF menunjukkan adanya persamaan.

BAB 5

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan tersebut maka dapat disimpulkan

5.1.1 Derajat keasaman (pH 6,95), suhu 37 °C dan *agitasi* 150 rpm tidak berpengaruh secara nyata terhadap ko-kultur mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*.

5.1.2 Nilai densitas sel, aktivitas enzim endoglukanase, gula pereduksi dan konsentrasi etanol tidak berbeda secara nyata antara mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus-Saccharomyces cerevisiae* dan *Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*.

5.2 Saran

Berdasarkan simpulan tersebut menunjukkan bahwa pembuatan bioetanol dapat beralih memanfaatkan bahan baku yang ramah lingkungan dan bersifat terbarukan seperti gulma eceng gondok dan mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus*. Pemanfaatan eceng gondok sebagai bahan baku juga dapat menjadi solusi dalam penanganan masalah pendangkalan perairan akibat gulma tersebut. Sementara pemanfaatan mikroba simbion usus rayap *Macrotermes gilvus*

sebagai alternatif pengganti enzim komersial diharapkan dapat menekan biaya produksi bioetanol.

DAFTAR PUSTAKA

- [BPPT] Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. 2016. *Outlook energi Indonesia 2016 pengembangan energi untuk mendukung industri hijau*. Jakarta: BPPT.
- Arinana, Aldina, R., Nandika, D., Rauf, A., Harahap, I. S., Sumertajaya, I. M. & Bahtiar, E. T. 2016. Termite diversity in urban landscape, South Jakarta, Indonesia. *Insects*, 7(20):1-18.
- Arokiasamy, W. J., Xavier, V. A. J., Sivasabkaran, C., Ramanujam, P. K., Alagurajan, S. & Rajkumar, R. 2016. Simultaneous saccharification and fermentation of rice bran and ground nut shell for the production ethanol. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9(1): 202-205.
- Black, J. G. & Black, L. J. 2015. *Microbiology principles and explorations*. Ninth edition. Amerika: John Wiley & Son.
- Brune, A. & Ohkuma, M. 2011. Diversity, structure and evolution of the termite gut microbial community. *Biology of Termite: a Modern Synthesis*, 413-438.
- Chansoliya, P. R., Anand, R. & Sharma, S. 2016. Analysis of bioethanol production from newspaper by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. *International Journal of Engineering Development and Research*, 4(2):517-519.
- Das, A., Priyanka, G., Tanmay, Uma, G., Bikas, R. P. & Keshab, C. M. 2016. Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *3 Biotech*, 6:70.
- Datta, R. 1981. Acidogenic fermentation of lignocellulose-acid yield and conversion of components. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIII: 2167-2170.
- Deka, D., Das, S. P., Sahoo, N., Das, D., Jawed, M., Goyal, D. & Goyal, A. 2013. Enhanced cellulase production from *Bacillus subtilis* by optimizing physical parameters for bioethanol production. *Hindawi Publishing Corporation ISRN Biotechnology*, 2013:1-11.
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., Metahni, S. & M'hamdi, N. 2012. Lactoserum as moistening medium and crude inducer for fungal cellulose and hemicellulose induction through solid-state fermentation of apple pomace. *Biomass Bioenergy*, 41:165-174.

- Dickerman, J. M. & Starr, T. J. 1951. A medium for the isolation of pure cultures of cellulolytic bacteria. *J bacterial*, 62:133-134.
- Ferbiyanto, A., Rusmana, I. & Raffiudin, R. 2016. Characterization and identification of cellulolytic bacteria from gut worker *Macrotermes gilvus*. *Hayati Journal of Biosciences*, XXX:1-4.
- Ganguly, A., Chatterjee, P. K. & Dey, A. 2012. Studies on ethanol production from water hyacinth- a review. *Renewable Sustainable Energy Rev*, 16:966-972.
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Jamaluddin Khan, Awasthi, M. K. & Sarsaiya, S. 2011. Optimization for the production of cellulose enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology Research International*, 2011:1-8.
- Guragain, Y., Coninck, J. D., Husson, F., Durand, A. & Rakshit, S. K. 2011. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. *Bioresour Technol*, 98:2034-2042.
- Hu, H. L., Brink, J. van den, Gruben, B. S., Wösten, H. A. B., Gu, J. D. & Vries, R. P. de. 2011. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65:248-252.
- Jumiyati, Bintari, S. H. & Mubarak, I. 2012. Isolasi dan identifikasi khamir secara morfologi di tanah kebun wisata pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika: Journal of Biology & Biology Education*, 4(1):27-35.
- Kamsani, N., Salleh, M. M., Yahya, A. & Chong, C. S. 2015. Production of lignocellulolytic enzyme by microorganism isolated from *Bulbitermes* sp. termite gut solid-state fermentation. *Waste Biomass Valor*, 1-15.
- König, H., Li, L., & Fröhlich, J. 2013. The cellulolytic system of the termite gut. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:7943-7962.
- Lai, L. W., Yahya, S. S. M., Nor, N. M. & Sulong, M. R. 2015. Enzymatic saccharification on ammonia pre-treated oil palm trunk biomass for glucose production: an optimization using response surface methodology. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 20(1):21-30.
- Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J. & Blackburn, J. W. 2010. Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus* sp. 527. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6):1841–1852.

- Manavalan, T., Manavalan, A. & Heese, K. 2015. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Curr Microbiol*, 70:485-498.
- Montgomery, D. C. 2013. *Design and analysis of experiments- eighth edition*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Muwawa, E. M., Budambula, L. M., Osiemo, Z. L., Boga, H. I. & Mokonde, H. M. Isolation and characterization of some gut microbial symbionts from fungus-cultivating termites (*Macrotermes* and *Odontotermes* spp.). *African Journal of Microbiology Research*, 10(26):994-1004.
- Nandika, D., Rismayadi, Y. & Diba, F. 2015. *Rayap Biologi dan Pengendaliannya*. Edisi ke-2. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Press.
- Ni, J. & Tokuda, G. 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termite and their symbiotic microbiota. *Biotechnology Advances*, 31:838-850.
- Peng, T. Y. & Don, M. M. 2013. Antifungal activity of *in-vitro* grown *Earliella sabrosa*, a Malaysian fungus on selected wood-degrading fungi of rubberwood. *Journal of Physical Science*, 24(2):21-33.
- Prescott. 2014. *Prescott's Microbiology*. Tenth edition. Amerika: John Wiley & Son.
- Quay, D. H. X., Bakar, F. D. A., Rabu, A., Said, M., Illias, M., Mahadi, N. M., Hassan, O. & Murad, A. M. A. 2011. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, EglA, in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*, 10(11):2101-2111.
- Reales-Alfaro, J. G., Trujillo, L. T., Arzuaga, G., Castaño, H. & Polo, A. 2013. Acid hydrolysis of water hyacinth to obtain fermentable sugars. *CT&F-Ciencia, Tecnologia y Futuro*, 5(2): 101-112.
- Sakolvaree, J. & Deevong. 2016. Isolation and characterization of cellulose producing bacteria from the gut of higher termite. *Proceedings of the Burapha University International Conference 2016, 28-29 July 2016, Bangsaen, Chonburi, Thailand*: 193-203.
- Sambo, S., Faruk, U. Z. & Shahida, A. A. 2015. Ethanol production from fresh and dry water hyacinth using ruminant microorganisms and ethanol producers. *Global Advanced Research Journal of Biotechnology*, 4(1):023-029.

- Sánchez, O., Sierra, R. & Alméciga-Díaz, C. J. 2011. Delignification process of agro-industrial wastes an alternative to obtain fermentable carbohydrates for producing fuel. In Dr Maximo Manzanera (ed), *Alternative fuel*. Intech.
- Scully, S. M. & Orlygsson, J. 2015. Recent advances in second generation ethanol production by Thermophilic bacteria. *Energies*, 8:1-30.
- Sharma, D., Joshi, B., Bhatt, M. R., Joshi, J., Malla, R., Bhattarai, T. & Sreerama, L. 2015. Isolation of cellulolytic organisms from the gut contents of termites native to Nepal and their utility in saccharification and fermentation of lignocellulosic biomass. *Journal of Biomass to Biofuel*, 2:11-20.
- Subekti, N. & Febriana, F. 2016. The role of gut microorganisms from the subterranean termite *Macrotermes gives* Hagen during composting process. *Proceedings of the 11th Pacific Rim Termite Research Group Conference Kunming, China*.
- Sudiyani, Y., Sembiring, K. C. & Adilina, I. B. 2014. Bioethanol G2: production process and recent studies. *Biomass and Bioenergy: Processing and Properties*, 345-364.
- Tay, B. Y., Lokesh, B. E., Lee, C. Y. & Sudesh, K. 2010. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Accumulating Bacteria From The Gut of Higher Termite *Macrotermes carbonarius* (Blattodea : Termitidae). *Journal Microbiology Biotechnology*, 26(6):1015-1024.
- Tokuda, G., Watanabe, H., Matsumoto, T. & Noda, H. 1997. Cellulose digestion in wood-eating higher termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo- β -1,4-glucanase. *Zoological Science*, 14: 83-93.
- Tokuda, G., Watanabe, H., Hojo, M., Fujita, A., Makiya, H., Miyagi, M., Arakawa, G. & Arioka, M. 2012. Cellulolytic environment in the midgut of the wood-feeding higher termite *Nasutitermes takasagoensis*. *J Insect Physiol*, 58:147-154.
- Wagiman, Ainuri, M., Gusvita, R. & Jumeri. 2016. Design process of hydrolysis and fermentation bioethanol production from seaweed *Eucheuma cottonii* to renewable energy sovereignty. *KnE Life Sciences*, 3:107-113.
- Wong, L. J., H'ng, P. S., Wong, S. Y., Lee, S. H., Lum, W. C., Chai, E. W., Wong, W. Z. & Chin. 2014. Termite digestomes as a potential source of symbiotic mikrobiota for lignocelluloses degradation: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(8):956-963.

- Wu, Y., Chi, S., Yun, C., Shen, Y., Tokuda, G. & Ni, J. 2012. Molecular cloning and characterization of an endogenous digestive β -glucosidase from the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*. *Insect Mol Biol*, 21:604–14.
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S. & Wyman, C. E. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4):421-450.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R. & Boyce, N. 2014. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*, 2014:1-11.
- Zamani, A. 2015. Introduction to lignocellulose-based products. In Karimi (ed), *Lignocellulose-Based Bioproducts, Biofuel and Biorefinery Technologies*. Springer.
- Zhang, Q., Weng, C., Huang, H., Achal, V. & Wang, D. 2016. Optimatization of bioethanol production using whole plant of water hyacinth as substrate in simultaneous saccharification and fermentation process. *Fontiers in Microbiology*, 6:1411.