

Pengaruh Detoksifikasi dan Konsentrasi Substrat Terhadap Produksi Biohidrogen dari Hidrolisat Ampas Tahu

Amir Husin^{1,2*}, Sarto², Siti Syamsiah², dan Imam Prasetyo²

¹Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Sumatera Utara

²Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Gadjah Mada
Jl. Grafika 2, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

Abstract

The effect of detoxification and substrate concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures was investigated in batch experiments using tofu solid waste (TSW) hydrolysate as substrate. TSW as the by product of tofu processing industry was hydrolyzed using diluted hydrochloric acids as catalyst (0.5% wt HCl, 104°C and 30 minutes). After neutralized by Ca(OH)₂ (aq) and then treated by activated carbon for one hour, the hydrolysate was used for biohydrogen production. The experimental results show that, during fermentative hydrogen production under mesophilic condition and initial pH 6.5 were influenced both substrates without/with detoxification. The maximal hydrogen yield of 4.9 mmol/g reducing sugar (RS) were obtained at detoxified substrate concentration of 2 g GT/L. Detoxification has also shown to shortened lag phase of fermentation (λ). Adaptation time of microbes during fermentation was reduced from 20 into 13.25 hours for fermentation without/with detoxification respectively at initial substrate concentration of 2 g GT/L.

Key words : hydrolysate, tofu solid waste, detoxification, hydrogen, fermentation

Abstrak

Pengaruh detoksifikasi dan konsentrasi substrat terhadap produksi hidrogen fermentatif dengan kultur campuran diinvestigasi dalam percobaan *batch* menggunakan hidrolisat ampas tahu sebagai substrat. Ampas tahu sebagai produk samping industri pengolahan tahu dihidrolisis menggunakan katalis asam encer (0,5% berat HCl, 104°C dan 30 menit). Setelah dinetralkan dengan larutan Ca(OH)₂ dan dikenakan perlakuan dengan karbon aktif (1,5% berat/volum), hidrolisat siap digunakan untuk produksi hidrogen. Hasil percobaan menunjukkan, bahwa pada kondisi mesofilik dan pH awal 6,5, produksi hidrogen meningkat dan yield (mmol H₂/g gula tereduksi) menurun dengan meningkatnya konsentrasi substrat awal, baik pada system tanpa detoksifikasi maupun dengan detoksifikasi. Yield H₂ maksimum 4,9 mmol H₂/g gula tereduksi (GT) diperoleh bila hidrolisat tanpa detoksifikasi diinkubasi pada konsentrasi substrat awal 2 g GT/L. Hasil ini 25% lebih tinggi jika dibandingkan dengan substrat yang tanpa detoksifikasi. Proses detoksifikasi hidrolisat menggunakan karbon aktif mempengaruhi kinerja proses fermentasi dengan berkurangnya lama waktu fase adaptasi mikroba (λ). Pada konsentrasi substrat 2 g/L, lama waktu fase adaptasi mikroba berkurang dari 20 menjadi 13,25 jam berturut-turut untuk hidrolisat tanpa detoksifikasi dan dengan detoksifikasi.

Kata kunci : hidrolisat, ampas tahu, detoksifikasi, hidrogen, fermentasi

Pendahuluan

Gas hidrogen (H₂) merupakan salah satu kandidat energi alternatif yang menjanjikan karena memiliki nilai kalor yang tinggi dan hanya menghasilkan air ketika dibakar (Nath dan Das, 2004), serta dapat diproduksi dari bahan-bahan organik seperti lignoselulosik melalui proses fermentasi (Saratale dkk., 2008). Permasalahan utama produksi biohidrogen dari bahan-bahan lignoselulosik adalah kelarutannya yang rendah dalam air karena karakteristik bahan yang kompleks,

yang memiliki komponen utama selulosa, hemiselulosa dan lignin (Redondo-Cuenca dkk., 2008). Struktur dan karakteristik bahan biomassa selulosik yang kompleks, membuat biomassa ini sulit terdegradasi oleh aksi enzimatik atau mikroorganisme (Kumar dkk., 2008).

Kelarutan bahan-bahan selulosik dalam air dapat ditingkatkan melalui perlakuan awal bahan tersebut. Di antara metode pra-perlakuan yang ada, hidrolisis secara kimia merupakan metode yang paling umum diaplikasikan untuk biomassa lignoselulosik (Taherzadeh dan Karimi, 2008). Dengan

* Alamat korespondensi: amirhusinika@yahoo.com

hidrolisis kimia, laju konversi yang tinggi dapat dicapai dalam waktu yang singkat baik dengan menggunakan asam ataupun alkali. Pada proses ini akan terjadi peningkatan solubilitas bahan secara dan pembentukan gula tereduksi sebagai produk akhir (Camacho dkk., 1996).

Salah satu bahan lignoselulosik yang potensial adalah ampas tahu, yang merupakan limbah organik padat yang dihasilkan oleh industri pengolahan tahu berbahan dasar kacang kedelai (*Glycine max.*). Diperkirakan ada sekitar 2.750 ton ampas tahu yang dihasilkan setiap harinya di seluruh Indonesia (Menristek, 2010). Limbah ini merupakan bahan baku yang potensial untuk produksi biohidrogen, karena selain ketersediaannya yang melimpah dan terbarukan, ampas tahu dalam basis kering masih mengandung 40–60% karbohidrat. Upaya untuk memanfaatkan ampas tahu sebagai bahan untuk produksi biohidrogen sudah pernah dilakukan, diantaranya Noike dan Mizuno (2000) dan Kim dkk. (2010). Mereka melaporkan yield biohidrogen berturut-turut 2,54 dan 1,87 mol/mol heksosa dari hidrolisat ampas tahu yang difermentasi menggunakan kultur campuran. Upaya untuk meningkatkan yield tersebut terus dilakukan sehingga potensi ampas tahu sebagai bahan baku biohidrogen dapat dimaksimalkan.

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh detoksifikasi dan konsentrasi substrat terhadap potensi produksi hidrogen dari hidrolisat ampas tahu. Hidrolisis ampas tahu dengan menggunakan asam berpotensi menghasilkan bahan-bahan yang memiliki daya inhibitor proses fermentasi, sehingga perlu upaya untuk mengurangi pengaruhnya tersebut dengan cara detoksifikasi. Selain itu, konsentrasi hidrolisat (hasil proses hidrolisis) akan berpengaruh pada proses fermentasi juga. Pada penelitian ini, detoksifikasi dilakukan dengan menambahkan karbon aktif ke dalam hidrolisat pada rasio 1,5% (berat/volume). Fermentasi biohidrogen dilakukan secara *batch* menggunakan kultur campuran pada kondisi mesofilik (35°C) pada pH awal 6,5.

Metode Penelitian

Pra-perlakuan Ampas Tahu dengan Asam

Proses pra-perlakuan ampas tahu ini didasarkan pada percobaan Kim dan Lee (2010). Mula-mula 250 mL larutan 0,5% berat HCl dipanaskan dalam reaktor hidrolisis

hingga mencapai titik didihnya, kemudian ditambahkan ampas tahu kering pada rasio 1:20 (g TS/volume larutan). Proses hidrolisis dilakukan selama 30 menit. Hasil proses ini kemudian dinetralkan dengan larutan 10% berat $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hingga mencapai pH netral. Campuran ini kemudian disaring dengan menggunakan penyaring kain kasa, dan filtrat yang diperoleh (hidrolisat) dianalisis kandungan gula tereduksi, COD dan furfuralnya dan selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan dalam percobaan selanjutnya. Analisis kandungan gula tereduksi dilakukan dengan menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic Acid*) (Miller, 1972), sedangkan kandungan furfural dianalisis menggunakan metode White (1979), dan COD menggunakan metode open refluks sesuai dengan metode standar.

Detoksifikasi Hidrolisat dengan Karbon Aktif

Hidrolisat yang diperoleh dari hidrolisis ditambahkan karbon aktif dengan rasio karbon/cairan sebesar 1,5% (berat/volume). Campuran diaduk selama satu jam menggunakan motor pengaduk, kemudian campuran disaring menggunakan kain kasa untuk memisahkan padatan dari campuran. Filtrat yang diperoleh disimpan dalam lemari pendingin pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ sebelum digunakan untuk percobaan selanjutnya.

Uji Potensi Produksi Biohidrogen Mikroorganisme

Inokulum yang digunakan untuk uji produksi H_2 adalah *sludge* yang diperoleh dari buangan instalasi pengolahan limbah cair tahu yang memproduksi biogas. Sebelum digunakan, *sludge* disaring terlebih dahulu untuk menyisihkan kotoran kasar (seperti pasir atau bahan-bahan padat kasar lainnya). Inokulum disimpan pada kondisi anaerobik sebelum digunakan. Untuk menyeleksi bakteri penghasil hidrogen dari *sludge* anaerobik, dilakukan perlakuan-panas yaitu dengan cara mendidihkannya pada suhu 100°C selama 30 menit (Dong dkk., 2009). Konsentrasi *total solid* dan COD inokulum yang digunakan berturut-turut 5,7 g/L dan 3,35 g/L.

Produksi H_2 dengan Fermentasi Gelap

Uji potensi produksi H_2 dari hidrolisat ampas tahu dilakukan dalam reaktor 250 mL dengan volume kerja 100 mL. Ke dalam

masing-masing reaktor ditambahkan hidrolisat sebagai substrat (dengan dan tanpa proses detoksifikasi) dengan konsentrasi gula tereduksi yang divariasi (0, 2, 4 dan 8 g/L) seperti ditunjukkan dalam Daftar 1. Sebanyak 10 mL inokulum yang telah mengalami perlakuan panas dan 14 mL nutrient dan buffer, serta akuadest ditambahkan ke dalam tiap reaktor sehingga diperoleh volume campuran akhir menjadi 100 mL. Nilai pH campuran diatur menjadi 6,5 dengan penambahan HCl 5M atau NaOH 5M (Dong dkk., 2009). Untuk mencapai kondisi fermentasi anaerob, gas O₂ dalam reaktor dihilangkan dengan menggelembungkan gas N₂ ke dalam larutan. Percobaan untuk produksi H₂ dilakukan dengan menginkubasi larutan pada kondisi mesofilik (35–37°C) dalam *water bath*. Produksi bersih gas H₂ dari inokulum ditentukan dalam analisis blanko (0 g/L substrat), dengan medium nutrient dan buffer serta air tanpa substrat/ hidrolisat. Produksi gas diambil pada waktu tertentu dengan menggunakan syringe dan dianalisis kadar hidrogennya dengan menggunakan *gas chromatography* (GC). Pada akhir percobaan, kandungan gula tereduksi dalam cairan dianalisis untuk menentukan derajat konversi substrat menjadi H₂. Percobaan dilakukan selama 168 jam (7 hari).

Daftar 1. Kondisi Substrat untuk Studi Produksi Biohidrogen

Konsentrasi substrat (g GT/L)	Variasi	
	D0	D1
0	D0S0	D1S0
2	D0S1	D1S1
4	D0S2	D1S2
8	D0S3	D1S3

Keterangan : D0 = substrat tanpa detoksifikasi, D1 = substrat setelah detoksifikasi, GT = gula tereduksi.

Analisis Data

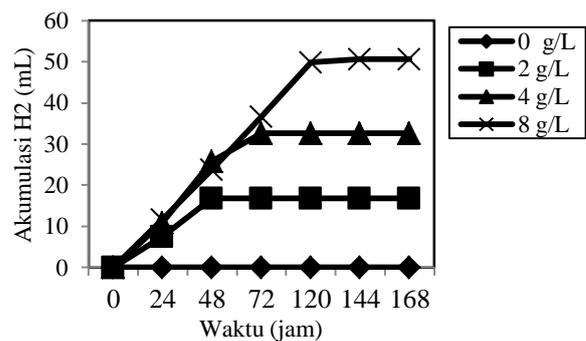
Hasil pengukuran produksi hidrogen dianalisis dengan menggunakan persamaan Gompertz (persamaan 1) untuk memprediksi pengaruh faktor perlakuan terhadap parameter proses antara lain laju produksi biogas maksimum (R_m), potensi produksi biogas (H_{maks}) dan waktu adaptasi mikroorganisme (*lag time*, λ) dalam memproduksi biohidrogen (Cui dkk., 2010).

$$H(t) = H_{maks} \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m e}{H_{maks}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \dots (1)$$

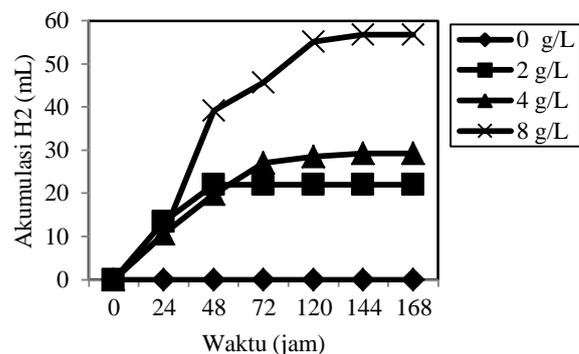
Hasil dan Pembahasan

1. Pengaruh konsentrasi substrat

Profil produksi hidrogen kumulatif dari masing-masing substrat dengan konsentrasi awal gula tereduksi 0, 2, 4 dan 8 g/L ditunjukkan dalam Gambar 1 untuk substrat yang tidak mengalami detoksifikasi dan Gambar 2 untuk substrat yang mengalami detoksifikasi. Pada kedua sistem tersebut, sampel dengan konsentrasi awal gula tereduksi 0 g/L tidak menghasilkan gas (0 mL) selama fermentasi. Sedangkan sampel dengan konsentrasi awal 2–8 g/L menghasilkan gas dengan cepat selama 24 jam pertama kemudian mencapai keadaan konstan pada waktu inkubasi yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa inokulum tidak mengandung bahan yang berpotensi menghasilkan biohidrogen atau biohidrogen hanya dihasilkan dari hidrolisat saja.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi awal substrat tanpa detoksifikasi pada produksi akumulatif biohidrogen dari hidrolisat ampas tahu



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi awal substrat dengan detoksifikasi pada produksi akumulatif biohidrogen dari hidrolisat ampas tahu.

Seperti dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2, produksi biohidrogen meningkat dengan meningkatnya konsentrasi awal substrat. Hal ini sesuai dengan fenomena fermentasi pada umumnya. Sampai dengan konsentrasi awal substrat 8 g GT/L belum menunjukkan adanya penghambatan oleh substrat.

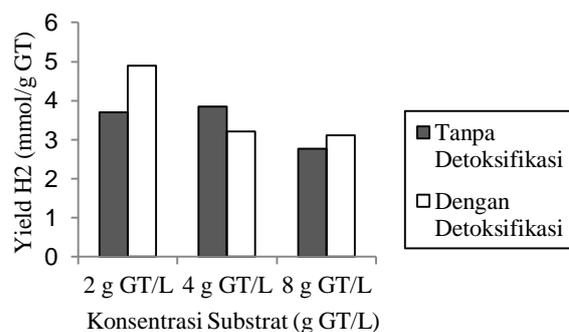
Produksi hidrogen kumulatif dalam 24 jam pertama dari substrat non detoksifikasi dengan konsentrasi awal gula tereduksi 2, 4 dan 8 g/L berturut-turut adalah 52%, 34% dan 21% dari nilai maksimumnya. Produk maksimum didasarkan pada akumulasi biohidrogen ketika tidak terjadi perubahan yang signifikan. Sedangkan untuk substrat dengan detoksifikasi, produksi hidrogen kumulatif dalam 24 jam pertama untuk konsentrasi awal substrat 2, 4 dan 8 g/L berturut-turut adalah 52%, 30% dan 18%. Hal ini menunjukkan bahwa produksi hidrogen pada tahap awal (24 jam pertama) tidak terlalu dipengaruhi oleh konsentrasi substrat awal dan ada tidaknya proses detoksifikasi.

2. Pengaruh detoksifikasi

Gambar 2 menunjukkan pengaruh detoksifikasi pada produksi hidrogen kumulatif pada berbagai konsentrasi awal substrat. Data menunjukkan bahwa sampai dengan konsentrasi awal substrat 2 g GT/L, penambahan karbon aktif (untuk detoksifikasi) tidak memberikan pengaruh pada produksi hidrogen. Hasil yang berbeda ditunjukkan pada penggunaan konsentrasi substrat awal yang lebih tinggi (4 dan 8 g GT/L). Selain itu, hasil tersebut tidak menunjukkan kecenderungan yang sama. Pada konsentrasi substrat awal 4 g GT/L, hidrogen yang diperoleh pada kondisi tanpa detoksifikasi lebih tinggi dibandingkan dengan hidrogen yang diperoleh pada kondisi dengan detoksifikasi. Pada substrat dengan konsentrasi awal 8 g GT/L, hasil menunjukkan kecenderungan sebaliknya. Penambahan karbon aktif dimaksudkan untuk mengurangi atau menghilangkan furfural dan senyawa lain hasil hidrolisis yang diperkirakan dapat menghambat proses fermentasi dalam produksi hidrogen. Ada kemungkinan karbon aktif juga mempengaruhi konsentrasi gula tereduksi dalam hidrolisat, sehingga proses fermentasi pada kondisi tanpa dan dengan detoksifikasi ini terjadi pada konsentrasi substrat yang berbeda. Hal ini perlu diverifikasi lebih lanjut.

3. Yield biohidrogen

Potensi yield biohidrogen dari fermentasi gelap ampas tahu yang mengalami pra-perlakuan asam encer dengan konsentrasi awal substrat 2, 4 dan 8 g/L ditunjukkan dalam Daftar 2 dan Gambar 3. Dalam percobaan menggunakan substrat tanpa maupun dengan detoksifikasi dijumpai, bahwa yield biohidrogen yang diproduksi semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Yield biohidrogen untuk substrat tanpa detoksifikasi adalah 82,80 dan 62,08 (mL H₂/g gula tereduksi) atau 3,70 dan 2,77 (mmol H₂/g gula tereduksi) berturut-turut untuk konsentrasi substrat 2 dan 8 g/L. Sementara untuk substrat dengan detoksifikasi adalah 107,88, 72,01 dan 69,84 (mL H₂/g gula tereduksi) atau 4,89, 3,22 dan 3,11 (mmol H₂/g gula tereduksi) berturut-turut untuk konsentrasi substrat 2, 4 dan 8 g/L.



Gambar 3. Yield biohidrogen sebagai fungsi konsentrasi awal substrat pada kondisi tanpa dan dengan detoksifikasi

Berdasarkan Daftar 2, substrat dengan konsentrasi 4 g GT/L menghasilkan yield biohidrogen 86,17 mL H₂/g GT awal atau 3,84 mmol H₂/g GT awal. Nilai ini lebih tinggi dibanding yield biohidrogen dari substrat dengan konsentrasi 2 g GT/L. Hal ini diduga berhubungan dengan proses hidrolisis bahan ampas tahu menggunakan asam encer dan diikuti dengan pemanasan selain meningkatkan kelarutan karbohidrat juga meningkatkan kelarutan senyawa-senyawa meningkat. Oleh karena itu, keseimbangan rasio karbohidrat terhadap protein (rasio C/N) semakin meningkat. Akibatnya, kemampuan mikroorganisme dalam mencerna substrat karbohidrat menjadi produk-produk seperti hidrogen dan asam-asam volatil semakin

Daftar 2. Yield Hidrogen dari Berbagai Jenis Substrat

Perlakuan	Konsentrasi Substrat Awal (mg GT/L)	Jumlah GT yang Terkonsumsi (mg)	Volume H ₂ (mL)	Persentase H ₂ (vol/vol)	Yield H ₂	
					(ml H ₂ /g GT)	(mmol H ₂ /g GT)
D0	2	203,55	16,87	6,5865	82,8	3,70
D0	4	407,09	35,05	9,2705	86,17	3,84
D0	8	814,13	50,56	14,8585	62,08	2,77
D1	2	203,55	22,32	8,3890	107,88	4,90
D1	4	407,10	29,32	8,4795	72,01	3,22
D1	8	814,15	56,88	13,5235	69,84	3,12

Keterangan:

D0 : Hidrolisat tanpa perlakuan karbon aktif. D1 : Hidrolisat dengan perlakuan karbon aktif,

GT: Gula tereduksi (sebagai glukosa). 1 mmol H₂ (STP) = 22,4 mL H₂.

Daftar 3. Parameter kunci proses produksi hidrogen menggunakan Persamaan Gompertz

Jenis Substrat	Konsentrasi Substrat (gGT/L)	Parameter Persamaan Gompertz			
		λ (jam)	Rm (mL H ₂ /jam)	Hmaks (mL H ₂)	JKE
DOS1	2	20,10	1,90	16,86	$6,35 \times 10^{-5}$
DOS2	4	8,98	0,72	35,56	0,216
DOS3	8	8,15	0,62	52,28	7,779
D1S1	2	13,25	1,37	17,84	$9,04 \times 10^{-4}$
D1S2	4	4,80	0,52	29,26	3,388
D1S3	8	13,84	1,11	55,80	27,34

Hmaks : Potensi produksi hidrogen (mL), Rm : Laju produksi hidrogen maksimum (mL/jam),

λ : Waktu fase adaptasi (jam), JKE : Jumlah kuadrat error, D0 : Substrat tanpa detoksifikasi,

D1 : Substrat setelah detoksifikasi,

meningkat. Akan tetapi, bilamana konsentrasi substrat ditingkatkan menjadi 8 g/L, meskipun rasio C/N relatif tinggi namun kemampuan mikroorganisme untuk mencerna substrat menjadi berkurang akibat inhibisi substrat.

4. Analisis parameter kinetika

Untuk mempelajari fenomena ini lebih lanjut, Persamaan Gompertz termodifikasi digunakan untuk mengestimasi parameter kinetika proses fermentasi. Estimasi parameter kinetika dalam simulasi persamaan Gompertz termodifikasi dari masing-masing substrat ditunjukkan dalam Daftar 3. Berdasarkan Daftar 3, waktu adaptasi mikroorganisme dalam memproduksi hidrogen tergantung pada konsentrasi awal dari gula tereduksi, yaitu 20,10 jam, 8,90 jam dan 8,15 jam untuk konsentrasi awal 2, 4 dan 8 g GT/L. Peningkatan konsentrasi awal dari 2 g GT/L menjadi 4 g GT/L dan 8 g GT/L telah mempersingkat waktu adaptasi (*lag time*) masing-masing sebesar 55% dan 59%. Hal ini memberikan indikasi bahwa konsentrasi substrat awal yang lebih tinggi menyebabkan adaptasi pertumbuhan mikroorganisme lebih baik. Kecenderungan ini tidak terlihat pada sistem yang menggunakan detoksifikasi.

Pengaruh adanya detoksifikasi pada potensi produksi biohidrogen (Hmaks) tidak terlalu signifikan.

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Peningkatan konsentrasi substrat hidrolisat ampas tahu (pada kisaran 0 – 8 g GT/L) baik dengan detoksifikasi maupun tanpa detoksifikasi dapat meningkatkan produksi H₂.

Pengaruh detoksifikasi terhadap produksi biohidrogen dari hidrolisat ampas tahu masih belum terlihat konklusif dan memerlukan verifikasi lebih detil terkait interaksi antara karbon aktif dengan senyawa-senyawa inhibitor dan gula tereduksi dalam hidrolisat.

Secara umum yield biohidrogen (mmol H₂/g GT) menurun dengan meningkatnya konsentrasi substrat awal, baik pada sistem dengan detoksifikasi maupun tanpa detoksifikasi. Yield maksimum diperoleh pada kondisi dengan detoksifikasi pada konsentrasi substrat awal 2 g GT/L yaitu 4,9 mmol H₂//g GT. Proses detoksifikasi hidrolisat

karbon aktif mampu memperpendek lama waktu fase adaptasi mikroba pada proses fermentasi dengan konsentrasi substrat awal 2 g GT/L.

Notasi

GT	: Gula tereduksi
H	: Volume biogas kumulatif (mL)
t	: Waktu reaksi (jam)
R _m	: laju produksi biogas maksimum (mL/jam)
H _{maks}	: Potensi produksi biogas (mL)
λ	: Waktu adaptasi (<i>lag time</i>) untuk memproduksi biogas (jam)

Daftar Pusaka

- Camacho, F. Gonzalez-Tello, P., Jurado, E., and Robles, A., 1996. Microcrystalline-Cellulose Hydrolysis with Concentrated Sulphuric Acid, *Chem. Tech. Biotechnol* 67, 350-356.
- Cui, M., Yuan, Z., Zhi, X., Wei, L., Shen, J., 2010. Biohydrogen production from poplar leaves pretreated by different methods using anaerobic mixed bacteria, *Int. J. of hydrogen energy* 35, 4041-4047.
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., Yu, Z., 2009. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation, *Int. J. of Hydrogen Energy* 34, 812-820.
- JianLong, W and Wei, W., 2008. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models, *Sci. China Series B: Chemistry* 51(11), 1110 – 1117.
- Kim, M.S., and Lee, D.Y., 2010. Fermentative hydrogen production from tofu-processing waste and anaerobic digester sludge using microbial consortium, *Bioresource Technology* 101, S48 – S52.
- Kim, M.S., Lee, D.Y., and Kim, D.H., 2010. Continuous hydrogen production from tofu processing waste using anaerobic mixed microflora under thermophilic conditions, *Int. J. of Hydrogen Energy* XXX, 1-7.
- Kumar, R., Singh, S., dan Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *J. of Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 377-391.
- Menristek, 2010. Biogas dari Limbah Tahu. News: 14 Mei 2010. Technology Indonesia. Mappitek E-Magazine (*online*) <http://www.mappitek/mappitek.ristek.go.id>. Data diakses 28 Oktober 2011.
- Miller, G.L., 1972. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 31(3), 426-428.
- Nath, K., and Das, D., 2004. Biohydrogen production as a potential energy resource – Present state of art., *J. of scientific and Industrial Research* 63, 729-738.
- Noike, T., and Mizuno, O., 2000. Hydrogen fermentation of organic municipal wastes, *Water Science and Technology* 42 (12), 155-162.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suarez, M.J., and Mateos-Aparicio, I., 2008. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods, *Food Chemistry* 108, 1099-1105.
- Saratale, G.D., Chen, S.D., Lo, Y.C., Saratale, R.G., and Chang, J.S., 2008. Outlook of biohydrogen from lignocellulosic feedstock using dark fermentation – a review, *J. of Scientific & Industrial Research* 67, 962 – 979.
- Taherzadeh, M.J., and Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production : A Review, *Int. J. of Molecular Sciences* 9, 1621 – 1651.
- White, J.W., 1979. Sugar and Sugar Product: Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in Honey, *J. Assoc. Off Analytical Chemistry* 62 (3), 509 – 514.