

TEKNOLOGI IMMOBILISASI SEL CA-ALGINAT UNTUK MEMPRODUKSI ETANOL SECARA FERMENTASI KONTINYU DENGAN *ZYMOMONAS MOBILIS* TERMUTASI

Tri Widjaja*, Natalia Hariani, R.Darmawan dan Setiyo Gunawan

Laboratorium Teknologi Biokimia
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri
Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya
Komplek ITS-Keputih, Sukolilo – Surabaya 60111Telp : 031-5946240
email: kajur_tkimia@its.ac.id atau natalia.hariani@yahoo.co.uk

Abstrak

Proses fermentasi pada umumnya dilakukan dengan proses batch. Namun, pada kenyataannya proses batch mempunyai kendala dengan adanya akumulasi dari produk etanol yang dapat meracuni mikroorganisme sehingga konsentrasi etanol yang dihasilkan rendah. Sebagai solusi, maka dalam penelitian ini dilakukan proses fermentasi secara kontinyu dalam bioreaktor packed bed secara immobilisasi sel dengan *Zymomonas mobilis* termutasi menggunakan Ca-Alginat yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perubahan konsentrasi glukosa terhadap konsentrasi, yield, dan produktivitas etanol.

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah molases dengan berbagai konsentrasi gula total yaitu, 14% w/v (178 g glukosa/L), 16% w/v (186 g glukosa/L), 18% w/v (205 g glukosa/L). Tahapan penelitian dimulai dengan pre-treatment molases, pembuatan starter, pengembangan kultur, pembuatan production medium, pembuatan bead sel Ca-Alginat (2% w/v), selanjutnya proses fermentasi continue dalam bioreaktor packed bed dengan flow rate 1 ml/menit (dilution rate 0,4/jam). Gula residu dianalisa menggunakan metode spektrofotometri dengan larutan DNS, sedangkan produk etanol dianalisa dengan metode Gas Chromatografi (GC).

Dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa fermentasi secara kontinyu mampu menghasilkan etanol maksimal yaitu pada konsentrasi glukosa 186 g/L dengan nilai konsentrasi etanol = 60,83 g/L, yield etanol = 41,94 %, produktivitas etanol = 24,33 g/L.jam sedangkan pada batch hasil maksimal pada konsentrasi glukosa 186 g/L dengan nilai konsentrasi etanol = 61,70 g/L, yield etanol = 39,53 %, produktivitas etanol = 0,86 g/L.jam

Kata kunci: bioreaktor packed-bed, Ca-Alginat, fermentasi kontinyu, immobilisasi sel, *Zymomonas mobilis* termutasi

1. Pendahuluan

Batch Fermentation banyak diterapkan dalam dunia industri, karena kemudahan dalam proses sterilisasi dan pengontrolan alat. Namun, proses ini juga memiliki kelemahan, yaitu: membutuhkan waktu fermentasi yang lama, dan konsentrasi etanol yang dihasilkan rendah akibat akumulasi produk etanol yang dapat meracuni mikroorganisme pada proses fermentasi. Akumulasi dari produk terlarut yang bersifat racun akan menurunkan secara perlahan-lahan dan selanjutnya menghentikan pertumbuhan mikroorganisme serta produksi etanol (Minier and Goma, 1982).

Untuk mengatasi inhibisi dalam produksi etanol dapat dilakukan dengan berbagai cara, yaitu: pertama, melakukan teknik fermentasi pada kondisi vakum. Teknik ini bertujuan agar ethanol inhibition dapat berpindah dengan teknik cell recycle. Kedua, teknik batch fermentasi konvensional yang dikombinasikan dengan proses ekstraksi atau yang biasa dikenal dengan *in situ fermentation*, yaitu ekstraksi fermentasi yang terjadi secara bersamaan dalam satu tangki. Tetapi cara ini pun terdapat kelemahan yaitu, adanya kelemahan proses fermentasi di atas menjadikan hal yang melatarbelakangi dilakukannya penelitian ini, yaitu teknik proses fermentasi secara kontinyu dengan teknik *immobilized cell* menggunakan Ca-Alginat sebagai *supporting matrice* dalam reactor packed-bed dan diharapkan mampu meningkatkan produktivitas dan menghasilkan konsentrasi etanol yang tinggi.

Teknik immobilisasi sel dapat digambarkan sebagai pembatasan gerak fisik atau lokalisasi dari sel pada suatu wilayah ruang dengan preservasi aktivitas katalis yang diinginkan. Keunggulan teknik immobilisasi sel yaitu dapat meningkatkan produktivitas volumetrik, meningkatkan konsentrasi produk dalam aliran keluaran, mampu menurunkan konsentrasi substrat dalam aliran keluaran, dan mencegah terjadinya *wash out* pada aliran keluar produk (Goksungur, Y, dan Zorlu, N, 2001). Teknik immobilisasi sel dengan alginat sebagai *supporting matrice* dipilih karena aktivitas enzyme yang dijebak dalam matrice alginat lebih stabil dibandingkan jenis polimer lainnya (Wada, M., dkk., 1979).

Adapun mikroorganisme yang digunakan untuk memproduksi ethanol dalam penelitian ini adalah bakteri *Zymomonas mobilis* termutasi, dimana biasanya disebut *Zymomonas mobilis* A₃, yaitu bakteri *Zymomonas mobilis* yang dimutasi menggunakan mutagen hydroxylamine yang diseleksi pada media asam sehingga membentuk karakteristik tahan terhadap asam. Kelebihan *Zymomonas mobilis* A₃ yaitu, memiliki toleransi suhu yang tinggi,

kemampuan untuk mencapai konversi yang lebih cepat, lebih tahan terhadap kadar ethanol yang tinggi yang dihasilkan pada proses fermentasi apabila dibandingkan *Zymomonas mobilis* yang tak termutasi (Putra, S.R dan Chrisnawati, A., 2008).

Penelitian sebelumnya dilakukan Caylak dan Vardar (1998), Penelitian ini membandingkan produksi ethanol dengan berbagai proses fermentasi yaitu, batch, kontinyu, fed-batch, dan semi-kontinyu menggunakan glukosa sebagai substrat dengan konsentrasi substrat 220 g/L dan bakteri *Saccharomyces cerevisiae* baik yang *freecells* maupun immobilisasi sel. Dari penelitian yang dilakukan nilai konsentrasi ethanol dan yield ethanol tertinggi yaitu dengan menggunakan proses fed-batch masing- masing sebesar 267,76 g/L dan 49,07%. Sedangkan proses batch konsentrasi ethanol yang dihasilkan 96,71 g/L dengan yield 43,96%.

Goksungur dan Zorlu (2001), Production of Ethanol from Beet Molases by Ca-Alginate Immobilized *Zymomonas mobilis* Sels in a Packed-Bed Bioreaktor. Percobaan ini dilakukan untuk menaikkan yields dan menurunkan konsentrasi glukosa sisa. Dimana temperatur di jaga pada suhu 30°C, rate larutan 0,22 jam⁻¹. Maximum ethanol (4,62%), yield teoritis (82,9%) dan volumetric productivity (10,16 gL⁻¹jam⁻¹) didapat dari beet molasses yang mengandung 10,90% glukosa total dengan 2,0-2,4 mm diameter beads yang berasal dari larutan sodium alginate 2%. Sebagai perbandingan untuk rate larutan constant 0,22 jam⁻¹ untuk 25 hari, konsentrasi ethanol (3,94%), yield teoritis (70,7%) dan produktivity (8,67 gL⁻¹jam⁻¹) di dapat didalam continuous stirred bioreactor.

Putra, S.R dan Chrisnawati, A. (2008) melakukan penelitian produksi ethanol dengan menggunakan mutan *Zymomonas mobilis* dengan teknik immobilisasi agarosa dimana didapatkan hasil terbaik untuk fermentasi adalah pada media kompleks dengan konsentrasi optimal agarosa adalah 4% per 1,16 x 10¹⁰sel/mL. Konsentrasi glukosa optimum untuk fermentasi adalah 10%. Sel amobil Z. Mobilis masih memiliki aktivitas setelah empat kali perulangan fermentasi sebesar 90,11%. Sel amobil Z. *Mobilis* mampu disimpan selama 10 hari dengan aktivitas yang menurun sebesar 47,33%.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh perubahan konsentrasi glukosa terhadap konsentrasi ethanol, yield ethanol, dan produktivitas ethanol.

2. Bahan dan Metode Penelitian

2.1 Bahan

- | | |
|--|---|
| a. Molases 66,458% (w/w) | g. MgSO ₄ .7H ₂ O |
| b. Strain <i>Zymomonas Mobilis</i> termutasi | h. CaCl ₂ |
| c. Na-Alginat | i. NaCl |
| d. H ₂ SO ₄ | j. NaK-Tartat |
| e. (NH ₄) ₂ SO ₄ | k. Na-metabisulfit |
| f. KH ₂ PO ₄ | l. Aquadest |

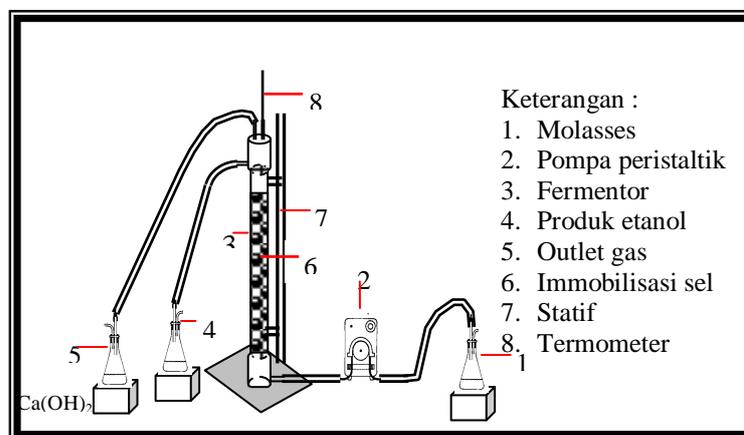
2.2 Kondisi Operasi

Tipe reaktor yang akan dipakai yaitu *Bioreaktor Packed-Bed* untuk proses fermentasi kontinyu. Reaktor *batch stirrer* untuk fermentasi batch. Kondisi pada proses fermentasi yaitu pada suhu operasi : 30°C, pH : 4 -5, konsentrasi immobil (% w/v) : 2%, rate feed molases : 1 ml/menit.

2.3 Variabel

Dalam penelitian ini dilakukan dengan berbagai konsentrasi gula total dalam molases yaitu, 178 g/L, (14% v/v), 186 g/L (16% v/v), 205 g/L (18% v/v), sebagai *Supporting matrice* immobilisasi sel adalah Ca-Alginat menggunakan bakteri *Zymomonas mobilis* termutasi.

2.4 Gambar Alat



Gambar 1. Peralatan *Bioreaktor Kontinyu Packed-Bed*

2.5 Prosedur Penelitian

A. Pretreatment molases

Memanaskan molases dengan konsentrasi gula total tertentu pada suhu 80°C selama 20 menit, kemudian mendinginkannya hingga suhu ruangan (pemanasan dan pendinginan dilakukan sebanyak 2 kali). Kemudian larutan tersebut ditambahkan dengan H₂SO₄ sampai pH 4–5. Melakukan sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 15 psia selama 2 jam, kemudian mendinginkannya hingga suhu ruangan. Menambahkan (NH₄)₂SO₄ 5,19 g/L, KH₂PO₄ 1,53 g/L, dan MgSO₄·7H₂O 0,55 g/L (*production medium*).

B. Pembuatan Starter

Mengambil biakan murni *Zymomonas mobilis* termutasi dengan kawat ose steril pada biakan agar miring yang telah diinokulasikan. Menanamkan biakan tersebut sebanyak 6 ose ke dalam 100 mL media nutrisi (*yeast extract* 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1,0g/L, KH₂PO₄ 1,0 g/L, dan MgSO₄·7H₂O 0,5g/L) dengan konsentrasi glukosa tertentu. Membiakkan dalam inkubator shaker pada suhu 30°C selama 24 jam. Melakukan pengamatan terhadap jumlah bakteri yang terdapat dalam larutan tersebut. Melakukan pengamatan jumlah bakteri menggunakan *haemocytometer neubacter* dan mikroskop untuk mengetahui saat terjadinya fase pertumbuhan logaritmik pada bakteri.

C. Pembuatan Immobilisasi Sel

Melarutkan 1 gram Na-Alginat dalam 45 mL aquadest, kemudian mencampur 5 ml media nutrisi dengan 45 ml larutan Na-Alginat sehingga konsentrasi larutan campuran menjadi 2% (w/v). Setelah mengental, 50 mL larutan campuran tersebut dicetak dalam 1000 mL larutan CaCl₂ 2% hingga terbentuk *bead* yang diinginkan. *Bead* tersebut mengeras dalam waktu 15 menit. Lalu sel immobilisasi yang sudah terbentuk dicuci dengan 0,85 % larutan NaCl untuk mengurangi kelebihan ion-ion Ca dan dicuci kembali dengan aquadest. Untuk meningkatkan pertumbuhan sel, *bead* dimasukkan dalam *production medium* kemudian diinkubasi di dalam shaker inkubator selama 24 jam. *Bead* disimpan pada temperatur 4°C sampai digunakan.

D. Proses Fermentasi

Memasukkan *bead* immobilisasi sel sebanyak 250 gram dalam tray dalam fermentor. Mengalirkan molases steril dengan pompa peristaltik ke dalam fermentor dengan rate 1 mL/menit. Mengambil hasil fermentasi (*broth*) sebagai sampel setiap 6 jam selama 5 hari. Menganalisa hasil fermentasi (*broth*) dengan metode DNS dan *Gas Chromatography* (GC).

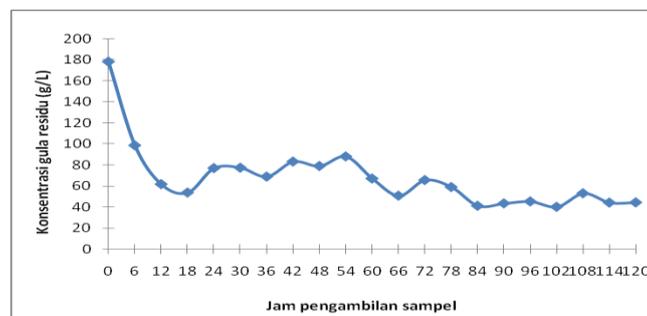
2.5 Metode Analisa:

- Perhitungan Jumlah Sel dengan metode *Counting Chamber*
- Analisa Kadar Glukosa Residu metode *Spektrofotometri* dengan larutan DNS
- Analisa Kadar Etanol menggunakan *Gas Chromatography*

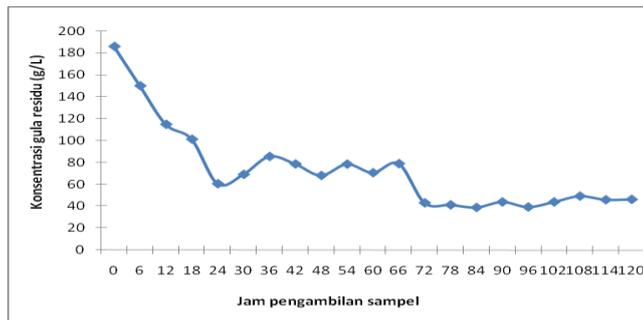
3. Hasil dan Pembahasan

Tabel 1. Data penelitian fermentasi secara kontinyu dan batch

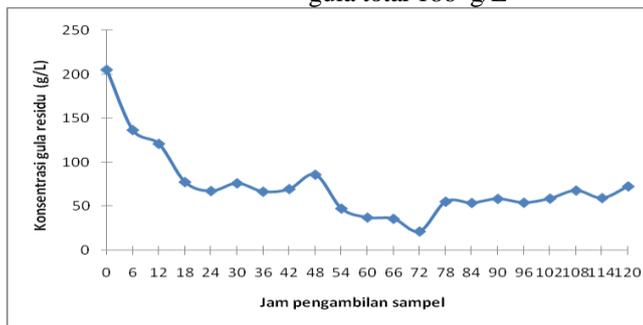
Keterangan	Fermentasi Kontinyu	Fermentasi Batch
Bioreaktor	Packed bed (D=3,2 cm; t =45 cm)	Stirred Batch
Volume reaktor	510 mL	1800 mL
Bead /carrier	Ca-Alginat 2% (w/v)	Sel bebas
Berat bead	250 g	-
Residence Time	2,5 jam	72 jam
Dilution rate	0,4 jam ⁻¹	-



Gambar 2. Hubungan konsentrasi gula residu (g/L) dengan konsentrasi etanol (g/L) pada konsentrasi gula total 178 g/L

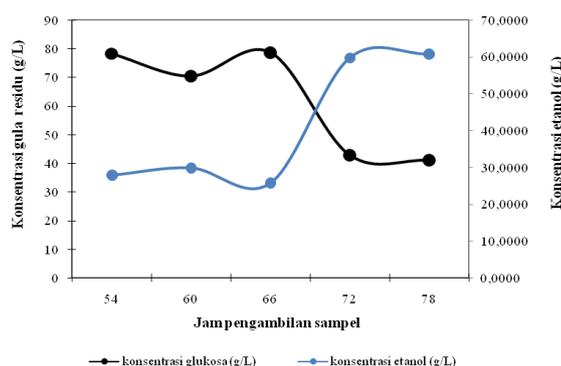


Gambar 3. Hubungan konsentrasi gula residu (g/L) dengan konsentrasi etanol (g/L) pada konsentrasi gula total 186 g/L



Gambar 4. Hubungan konsentrasi gula residu (g/L) dengan konsentrasi etanol (g/L) pada konsentrasi gula total 205 g/L

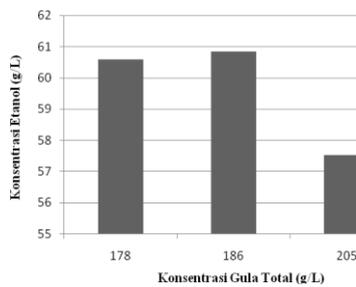
Dari gambar 2. terlihat bahwa pada saat awal percobaan konsentrasi gula residu terlihat fluktuatif yang menunjukkan belum tercapai kondisi *steady* hal ini dikarenakan pada saat awal percobaan bakteri *Z. mobilis* termutasi dalam bead immobilisasi sel Ca-Alginat masih dalam kondisi penyesuaian dengan substrat yang dimasukkan. Kondisi produk yang *steady* state dengan pemberian substrat secara kontinyu sangat sulit dicapai, namun pada pengambilan sampel yang ke-13 ($t = 78$ jam) konsentrasi gula residu mulai cenderung stabil (*steady* state). Hal ini disebabkan bakteri *Z. mobilis* termutasi telah mampu beradaptasi sehingga glukosa yang terkonversi menjadi etanol semakin banyak. Tetapi pada jam-jam pengambilan sample akhir, konsentrasi gula residu menjadi fluktuatif kembali. Kecenderungan yang sama juga ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4 untuk variabel konsentrasi glukosa awal 186 g/L maupun 205 g/L.



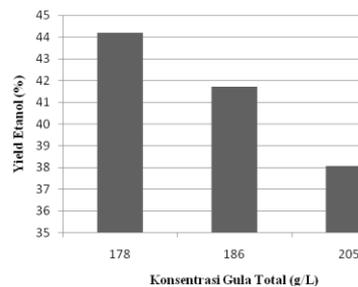
Gambar 5. Konsentrasi gula residu dengan waktu pengambilan sampel pada konsentrasi glukosa 186 g/L

Dari gambar diatas menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi gula residu maka semakin tinggi konsentrasi etanol yang dihasilkan dan begitu juga dengan produktifitasnya, Namun, pada konsentrasi glukosa 205 g/l terjadi penurunan. Hal ini disebabkan konsentrasi glukosa yang melampaui konsentrasi glukosa kritisnya (> 200 g/L) maka akan menjadi inhibitor substrat, sehingga bakteri *Z. mobilis* termutasi kurang maksimal dalam melakukan proses fermentasi, etanol yang dihasilkan pun menurun. Penambahan substrat glukosa pada fermentasi dapat

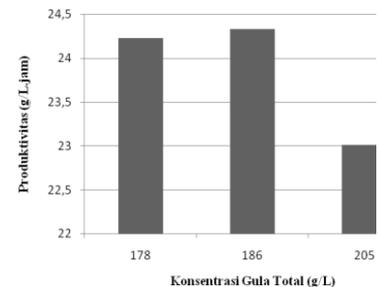
meningkatkan konsentrasi etanol, namun jika penambahan konsentrasi glukosa terus menerus hingga melampaui konsentrasi glukosa kritisnya maka akan terjadi penurunan konsentrasi etanol, menurunnya konsentrasi etanol pada fermentasi ini disebabkan adanya peristiwa substrat inhibitor selama proses fermentasi (Baros, M.R.A., dkk.,1986).



Gb 6. Hubungan Konsentrasi gula residu (g/L) dengan konsentrasi etanol (g/L)



Gb 7. Hubungan Konsentrasi gula residu (g/L) dengan yield etanol (%)



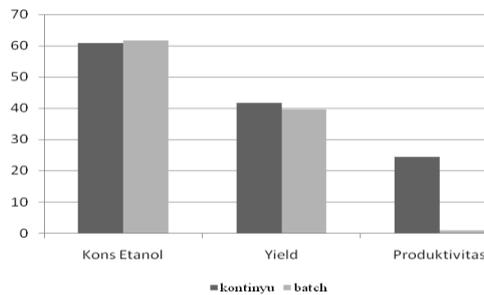
Gb 8. Hubungan Konsentrasi gula residu (g.L) dengan produktifitas (g.L.jam)

Pengaruh konsentrasi gula total terhadap konsentrasi, yield dan produktivitas etanol bisa dilihat pada Gambar 6 – 8. Konsentrasi etanol, yield etanol dan produktivitas etanol merupakan perhitungan yang diperoleh dari masing-masing variabel pada pengambilan sampel ke-13. Untuk konsentrasi etanol tertinggi dicapai pada konsentrasi gula reduksi 186 g/L yaitu sebesar 60,83 g/L, seperti yang terlihat pada gambar 6, dimana semakin tinggi konsentrasi gula total maka ketersediaan substrat tinggi sehingga konversi glukosa menjadi etanol juga tinggi. Pada konsentrasi gula total 186 g/L masih dapat dicapai kadar etanol tertinggi dikarenakan bakteri *Zymomonas mobilis* memiliki struktur hopanoid atau lipida membran yang kompleks sehingga menyebabkan membran menjadi lebih stabil dan memiliki kerapatan yang baik, sehingga molekul lain sulit untuk menembus sel tersebut, termasuk etanol. Tetapi pada konsentrasi gula reduksi 205 g/L konsentrasi etanol menjadi menurun. Hal ini dapat terjadi dikarenakan konsentrasi gula yang tinggi melebihi ketahanan bakteri dimana bakteri *Zymomonas mobilis* tahan pada konsentrasi glukosa 200 g/L, sehingga bakteri *Zymomonas mobilis* kurang maksimal dalam melakukan proses fermentasi. Penambahan substrat glukosa pada fermentasi dapat meningkatkan konsentrasi etanol, namun jika penambahan konsentrasi gula terus menerus hingga melampaui konsentrasi gula kritisnya maka akan terjadi penurunan konsentrasi etanol. Menurunnya konsentrasi etanol pada fermentasi ini disebabkan adanya peristiwa substrat inhibitor selama proses fermentasi (Yekta Goksungur dkk, 2001). Menurut Roukas (1996), penurunan kadar etanol pada konsentrasi gula yang berlebih terjadi sebagai akibat efek inhibisi dari substrat. Sedangkan untuk yield etanol tertinggi dicapai pada konsentrasi gula reduksi awal 178 g/L yaitu sebesar 44,19 %, yaitu 0,44 gram etanol dihasilkan dari 1 gram gula yang terkonsumsi, seperti pada Gambar 7. Yield etanol menurun pada konsentrasi gula total 186 g/L dan 205 g/L. Hal ini menunjukkan bahwa yield etanol tidak bergantung pada konsentrasi gula total. Namun pada penelitian ini yield yang dihasilkan telah mendekati yield teoritis dimana yield teoritis yang diharapkan sebesar 51,1111%. Yield teoritis didapatkan dari perhitungan secara stoikiometri sehingga 1 mol glukosa akan menghasilkan 2 mol etanol.

Dari Gambar 8, terlihat produktivitas etanol tertinggi dicapai pada konsentrasi gula total 186 g/L yaitu sebesar 24,33 g/L.jam. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi etanol maka akan tinggi pula konsentrasi dan produktivitas etanol yang dihasilkan. Namun tetapi, pada konsentrasi gula total 205 g/L produktivitas etanol menjadi menurun, hal ini dikarenakan konsentrasi etanol yang menurun. Dimana, produktivitas etanol merupakan konsentrasi etanol yang dihasilkan tiap satuan waktu. Sehingga, besarnya produktivitas etanol ini tergantung dari besarnya konsentrasi etanol yang dihasilkan, semakin besar konsentrasi etanol yang dihasilkan maka semakin besar pula produktivitas etanolnya.

Tabel 2.. Konsentrasi etanol, yield etanol, dan produktifitas etanol pada fermentasi kontinue

Fermentasi	K.Gula Total (g/L)	K.Etanol (g/L)	Yield (%)	Produktifitas (g/L.jam)
Kontinyu	178	60,58	44,19	24,23
	186	60,82	41,94	24,33
	205	57,53	38,07	23,01
Batch	178	63,47	43,79	0,88
	186	61,70	39,53	0,86
	205	53,14	32,5	0,74



Gambar 9. Perbandingan antara fermentasi kontinyu dan fermentasi batch pada konsentrasi gula total 186 g/L

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa proses fermentasi secara kontinyu menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi dibandingkan fermentasi batch. Hal ini dikarenakan residence time yang diperlukan pada sistem batch lebih lama dibandingkan pada sistem kontinyu, sehingga menyebabkan waktu kontak substrat dengan bakteri lebih pendek pada sistem kontinyu dibandingkan sistem batch. Selain itu konsentrasi substrat dalam reaktor akan terus turun karena terdegradasi oleh mikroba menjadi etanol. Produk etanol dalam sistem batch tidak dialirkan keluar, sehingga konsentrasi etanol dalam reaktor akan meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi. Sedangkan berdasarkan yield etanol, sistem kontinyu mampu mengungguli sistem batch dimana yield etanol pada sistem batch sebesar 39,53% sedangkan sistem kontinyu sebesar 41,94%. Produktivitas sistem batch 0,86 g/L.jam sedangkan produktivitas sistem kontinyu sebesar 24,33 g/L.jam. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa fermentasi secara kontinyu adalah proses fermentasi yang menawarkan keuntungan-keuntungan dibandingkan fermentasi secara batch yaitu produktivitas yang tinggi, peningkatan yield etanol, pengurangan biaya produksi, dan lain-lain (Guidoboni 1984, Verbelen et al. 2006).

5. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan analisa yang dilakukan maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

1. Konsentrasi gula total berpengaruh terhadap konsentrasi, yield dan produktivitas etanol yang dihasilkan.
2. Immobilisasi sel mampu mengurangi pengaruh substrat inhibitor yang meracuni sel pada proses fermentasi.
3. Fermentasi kontinyu mampu meningkatkan produktivitas etanol dibandingkan fermentasi batch.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada DP2M melalui pendanaan Hibah Bersaing dengan nomor kontrak : 0305/I27/PM/2010 tanggal 01 Maret 2010 dan para mahasiswa yang telah melakukan penelitian bersama di Laboratorium Teknologi Biokimia, Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS antara lain Fauziah Arini, Winda Savitri dan Emmanuel Topan A.

Daftar Pustaka

- Barros, M.R.A., J.M.S Cabra dan J.M.Novais, (1986), "Production Ethanol by Immobilized Saccharomyces Bayanus in an extractive Fermentation System", *Biotechnology and Bioengineering* Vol XXIX hal 1097-1104.
- Caylak, B. dan Vardar, S.F., (1998), "Comparison of Different Production Processes for Bioethanol", *Turk J Chem* 22, hal 351-359.
- Departemen ESDM RI, publikasi bulan Februari 2008.
- Goksungur, Y, dan Zorlu, N, (2001), "Production of Ethanol From Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor", *Turk J Biol*, 25, hal 265-275.
- Grote, W, K,J Lee dan P,L Rogers, (1980), "Continuous Ethanol Production By Immobilized Sels of Zymomonas Mobilis", *Biotechnology Letters*, vol 11, hal 481-486.
- Minier, M. dan Goma, G, (1982), "Etanol Production by Extractive Fermentation", *J Biotechnology and Bioengineering* 34, hal 1565-1579.
- Putra, S,R. dan Chrisnawati, A., (2008), "Produksi Etanol Menggunakan *Zymomonas mobilis* yang Dimutasi dengan Hydroxylamin", Kimia-MIPA, ITS Surabaya.
- Wada, M., Kato, J., dan Chibata, I., (1979), "A New Immobilization Of Microbial Cells", *European J Microbiol. Biotechnol* 8, hal 241-247.