

OPTIMASI WAKTU INKUBASI PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH *Aspergillus niger* MENGGUNAKAN FERMENTASI SUBSTRAT PADAT

*(Optimization of Incubation Time on Cellulase Enzyme Production Using *Aspergillus niger* Under Solid State Fermentation)*

Sukma Budi Ariyani, Asmawit dan Pramono Putro Utomo

Baristand Industri Pontianak, Jl. Budi Utomo No. 41, Pontianak 78243, Indonesia

e-mail: sukma_ariyani@yahoo.co.id

Naskah diterima 31 Desember 2013, revisi akhir 17 Januari 2014 dan disetujui untuk diterbitkan 20 Januari 2014

ABSTRAK. *Selulase adalah enzim penting dalam industri yang dapat diperoleh dari limbah pertanian yang murah. Kalimantan Barat khususnya kota Pontianak, menghasilkan limbah kulit durian selama masa panen raya setiap tahunnya. Dalam penelitian ini digunakan kulit durian (material yang mengandung selulosa) sebagai substrat dan mikroba A. niger untuk memproduksi enzim selulase. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui waktu optimal fermentasi substrat kulit durian oleh A. niger dalam memproduksi enzim selulase. Metode penelitian meliputi persiapan substrat, pretreatment substrat, proses fermentasi, pengambilan enzim dan uji kadar protein serta aktivitas enzim. Variabel waktu yang digunakan adalah 48, 72, 96, 120 dan 144 jam. Enzim selulase tertinggi dihasilkan pada waktu fermentasi 120 jam yang ditunjukkan dengan kadar protein sebesar 0,3960%. Hasil uji aktivitas enzim pada variabel tersebut adalah 1.069,01 ppm.*

Kata kunci: *A. niger, fermentasi substrat padat, selulase*

ABSTRACT. *Cellulase is an important enzyme for industry which can be obtained from cheap tropical agrowastes such as durian peel. West Kalimantan, in particular Pontianak city produces tons of durian peel waste during harvest season each year. This study used durian peel waste as substrates and A. niger to produce cellulase. The aim of this study is to determine the optimum incubation time in producing cellulase under solid state fermentation. Different incubation time (48, 72, 96, 120 and 144 hours) were applied for the production of cellulase. The optimum cellulase production was 120 hours of incubation, giving protein content of 0.3960% and enzyme activity of 1,069.01 ppm, respectively.*

Keywords: *A. niger, cellulase, solid state fermentation*

1. PENDAHULUAN

Limbah pertanian merupakan salah satu sumber pencemar lingkungan. Kulit durian sebagai salah satu limbah pertanian, banyak dihasilkan di Kalimantan Barat, khususnya kota Pontianak pada masa panen raya buah durian. Produksi durian di Kalimantan Barat pada tahun 2009 mencapai 32.388 ton (BKPM, 2012). Kulit durian yang keras dan berduri umumnya masih diperlakukan sebagai sampah tak bernilai dan pemanfaatannya masih terbatas sebagai bahan bakar atau kompos.

Limbah pertanian umumnya merupakan sumber selulosa yang murah dan penghasil berbagai jenis produk yang bermanfaat dalam proses industri salah satunya adalah enzim selulase. Produksi enzim selulase dari limbah pertanian secara ekonomi lebih menguntungkan dibandingkan selulosa murni (Chahal, 1985).

Selulase adalah sekelompok enzim yang memecah selulosa menjadi monomer glukosa (Yi, *et.al.*, 1999). Enzim selulase yang berasal dari hasil samping bakteri dan fungi dibedakan dalam tiga kelas

berdasarkan kemampuannya untuk mengubah *carboxy methylated cellulose* (CMC) yaitu endoglukonase, eksoglukonase dan β -glukosidase, dimana endoglukonase menjadi enzim yang paling efisien (Henriksson, *et.al.*, 1999).

Enzim selulase memegang peranan penting dalam aplikasi-aplikasi di bidang industri (Bhat, 2000) diantaranya digunakan untuk proses bioremediasi, penanganan air limbah, pengolahan kopi, industri pulp dan kertas, suplemen dalam industri pakan ternak, produksi protein sel tunggal, produksi protoplas, teknik genetik dan lain-lain (Trek and Nagwa, 2007; Beguin and Anbert, 1994; Coughlan, 1985; Mandels, 1985). Enzim ini juga penting dalam bidang farmasetikal, industri tekstil terutama dalam hal aplikasi deterjen untuk mengembalikan sifat-sifat tekstil yang berkaitan dengan selulosa, serta produksi biofuel dari biomassa berselulosa (Ali dan Saad, 2008).

Fungi penghasil selulase termasuk didalamnya genus *Aspergillus* (Ali dan Saad, 2008) seperti *A. niger* dan *A. Terreus*. Selain itu fungi lain penghasil selulase diantaranya *Rhizopus stolonifer* (Pothiraj, 2006) *Trichoderma*, *Penicillium* dan *Botrytis neurospora* (Pandey, *et.al.*, 1999). Fungi dapat mendekomposisi selulosa, hemiselulosa dan lignin pada tanaman dengan memproduksi beraneka kelompok enzim hidrolitik dan oksidatif (Abd-Elhazer dan Fadel, 2010).

Pada penelitian ini digunakan *A. niger* karena spesies ini termasuk fungi berfilamen penghasil selulase. Fungi tersebut sangat efisien dalam memproduksi selulase serta penanganannya mudah dan murah. *A. niger* banyak dipakai dalam proses produksi asam sitrat di dalam industri. Sedangkan di dalam laboratorium, digunakan untuk mempelajari tentang metabolisme pada jamur dan kegiatan enzimatik. Produksi enzim selulase memerlukan substrat yang biasanya berasal dari bahan berselulosa. Dalam penelitian ini, kulit durian berperan sebagai substratnya. Kulit durian mengandung elemen pati 5%, lignin 5% dan selulosa sekitar 50-60% (Hatta, 2007). Kandungan selulosa yang tinggi, membuat kulit durian

bisa dijadikan substrat dalam produksi enzim selulase melalui fermentasi dengan bantuan kapang. Dasar penggunaan substrat kulit durian yakni karena buah durian banyak dihasilkan di Kalimantan Barat, sehingga banyak pula limbah kulit durian yang dihasilkan dan penelitian-penelitian terdahulu menggunakan bahan berselulosa tinggi selain kulit durian untuk memproduksi enzim selulase. Beberapa limbah agro yang mempunyai kandungan selulosa, dapat dilihat pada Tabel 1. Kadar selulosa pada kulit durian lebih tinggi daripada kadar selulosa pada jerami padi, kulit pisang dan kulit nanas. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan produksi enzim selulase dengan fermentasi substrat kulit durian sehingga dapat menambah nilai dan fungsi dari limbah kulit durian.

Tabel 1. Kadar selulosa dalam beberapa limbah agro

No.	Limbah Agro	Kadar Selulosa (%)
1.	Jerami Padi	39,00
2.	Kulit Pisang	17,36
3.	Kulit Nanas	33,25
4.	Kulit Durian	50-60

Sumber: Setyaningrum dan Sa'adah (2010); Kiantoro (2011); Mangunwidjaja dkk. (2011); dan Hatta (2007)

Fermentasi adalah proses baik secara aerob maupun anaerob yang menghasilkan berbagai produk yang melibatkan aktivitas mikroba atau ekstraknya dengan aktivitas mikroba terkontrol (Yulneriwarni, 2009). Fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sistem fermentasi padat. Sistem fermentasi padat memiliki lebih banyak manfaat dibandingkan dengan sistem fermentasi cair, diantaranya tingkat produktivitasnya tinggi, tekniknya sederhana, biaya investasi rendah, kebutuhan energi rendah, jumlah air yang dibuang sedikit, *recovery* produknya lebih baik dan busa yang terbentuk sedikit. Sistem fermentasi padat ini dilaporkan lebih cocok digunakan di negara-negara berkembang. Manfaat lain dari sistem fermentasi padat adalah murah dari segi

biaya serta substratnya mudah didapat, diantaranya produk pertanian dan industri makanan. Sistem fermentasi padat cocok untuk pengembangan fungi dan tidak cocok untuk proses kultur bakteri karena membutuhkan air yang lebih banyak (Tanyildizi, *et.al.*, 2007). Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan fungi yaitu konsentrasi substrat, sumber nutrisi (*nutrient*), aerasi, pH, temperatur inkubasi, waktu fermentasi dan kadar air (*moisture content*).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui waktu optimal fermentasi substrat kulit durian oleh *A. niger* dalam memproduksi enzim selulase menggunakan metode fermentasi substrat padat. Pendekatan dari penggunaan kulit durian untuk produksi selulase adalah memproduksi enzim dengan biaya rendah. Pengurangan biaya dari segi enzim diharapkan menurunkan biaya untuk mengubah selulosa menjadi glukosa yang dijumpai pada industri bioetanol dan menurunkan biaya proses dalam industri yang menggunakan enzim selulase seperti kertas dan farmasi.

2. METODE PENELITIAN

Bahan-bahan yang digunakan antara lain kulit durian, *A. niger*, *nutrient* dan bahan-bahan pembenihan inokulasi dan penyiapan inokulum. Alat-alat yang digunakan antara lain botol sampel kaca, inkubator, *autoclave*, sentrifuse dan spektrofotometer.

Penelitian ini menggunakan prosedur berupa modifikasi dari prosedur penelitian Setyaningrum dan Sa'adah (2010). Tahap awal yang dilakukan adalah proses pembenihan inokulasi. Fungi yang disiapkan dan digunakan yaitu *A. niger*. Pembenihan dilakukan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) secara zig-zag dengan menggunakan kawat inokulasi di dalam cawan petri secara aseptik. Mikroba diinkubasi pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ selama 120 jam.

Tahap selanjutnya adalah penyiapan inokulum, yaitu menyiapkan 100 mL media cair (media cair ini terdiri dari sukrosa 12,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,25%,

KH_2PO_4 0,2%, api bunsen dan kawat ose. pH media cair diatur dengan HCl hingga pH=3. Ujung kawat ose dicelupkan ke dalam alkohol 96% lalu dipanaskan pada api bunsen sampai berwarna merah. Biakan *A. niger* dari media PDA diambil dengan menggunakan kawat ose lalu dicelupkan beberapa saat pada media cair hingga tampak keruh. Media cair ditutup dengan kapas dan diinkubasi pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Pekerjaan ini dilakukan di ruang aseptik. Kemudian dilakukan tahap *pretreatment* bahan baku yaitu kulit durian dicuci, dicacah dan dipotong kecil-kecil ukuran 1 cm. Kemudian cacahan kulit durian dioven pada suhu 70°C selama 3 hari. Setelah 3 hari, cacahan kulit durian yang telah kering diblender. Proses berikutnya adalah cacahan dicampur dengan 5% (w/v) NaOH (20 mL per gram substrat), dimasukkan ke dalam *autoclave* suhu 121°C selama 1 jam. Substrat disaring, dicuci dengan akuades dan dinetralisasi dengan HCl 1 M. Pada akhir *pretreatment* substrat dicuci lagi dengan akuades dan dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C selama 3 hari. Substrat yang sudah kering diblender lagi agar substrat tidak menyatu dan berupa serat-serat kulit durian.

Setelah dilakukan *pretreatment*, substrat (kulit durian) dimasukkan ke dalam botol sampel kaca dengan nutrisi antara lain: urea 0,14 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g dan KH_2PO_4 0,2 g dalam media cair padat. Akuades ditambahkan, diatur hingga *moisture content* substrat 90%. Kemudian diatur pH=5 lalu media disterilkan di dalam *autoclave* pada suhu 120°C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan kemudian didinginkan. Suspensi spora ditambahkan dengan disebar merata pada media tersebut dengan perbandingan bagian suspensi spora dan bagian media = 1:10. Media diinkubasi pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ dengan waktu fermentasi 48, 72, 96, 120 dan 144 jam.

Hasil fermentasi disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit. Filtratnya dipisahkan dengan endapannya. Cairan yang diperoleh kemudian diambil untuk analisa protein, dan untuk variabel dengan kadar protein tertinggi dilakukan

uji aktivitas enzimnya. Untuk uji aktivitas enzim, prosedurnya adalah 2 mL sampel enzim diambil kemudian ditambahkan kapas 0,1 g. Kemudian diinkubasi 1 jam pada suhu kamar. Lalu 1 mL reagen DNS (1 g DNS dilarutkan dalam 100 mL akuades dan ditambah dengan 1 g NaOH, 18,2 g KNa tartrat dan 1 g Na_2SO_3) ditambahkan pada tiap tabung reaksi. Tabung reaksi dipanaskan di dalam *water bath* selama 15 menit agar terjadi reaksi antara glukosa dengan DNS. Absorbansi tiap larutan diukur pada 540 nm (Ceirwyn, 1995). Nilai absorbansi yang diperoleh diplotkan pada kurva standar untuk mengetahui konsentrasi glukosa pada sampel.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembenihan Inokulasi

Biakan *A. niger* yang digunakan diperoleh dari Institut Pertanian Bogor *Culture Collection*. Setelah dilakukan seperti pada prosedur pembenihan inokulasi, kapang *Aspergillus* mulai nampak pertumbuhannya pada hari ke-2 (48 jam). Semakin lama waktu, yakni hingga hari ke-5 (120 jam), pertumbuhan *A. niger* semakin banyak pula. Biakan awal dan setelah perbanyakan dapat dilihat pada Gambar 1.

Pretreatment Bahan Baku

Delignifikasi terhadap kulit durian dengan melakukan perendaman dalam 5% (w/v) NaOH (20 mL per gram substrat), larutan substrat di *autoclave* pada suhu 121°C selama 1 jam, disaring dan dikeringkan. Serat kulit durian sebelum digunakan dilakukan proses delignifikasi dengan NaOH untuk menghilangkan kandungan lignin yang ada di dalam kulit durian, dimana ikatan silang dari struktur aromatik lignin dapat memperlambat penetrasi oleh enzim sehingga mempengaruhi aktivitas enzim (Safaria, dkk., 2013).

Ion OH^- dari larutan NaOH dapat menyerang dan merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa

(Gunam dan Antara, 1999). Ion OH^- dari NaOH akan memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion Na^+ akan berikatan dengan lignin yang belum terputus ikatannya membentuk natrium fenolat. Garam fenolat ini bersifat mudah larut. Lignin yang terlarut ditandai dengan warna hitam pada larutan yang disebut lindi hitam (*black liquor*) (Safaria, dkk., 2013).



(a) Biakan awal *A. niger*



(b) Perbanyakan *A. niger*

Gambar 1. Pembenihan inokulasi

Hasil pengujian terhadap kandungan selulosa, lignin dan hemiselulosa sebelum dan setelah proses delignifikasi dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kadar lignin berkurang sebesar 2,42% sedangkan kadar selulosa bertambah sebesar 43,70%. Hal ini membuktikan dengan dilakukannya perlakuan awal, membuat kadar ligninnya semakin rendah dan kadar selulosanya semakin tinggi sehingga bahan tersebut semakin baik digunakan untuk substrat proses fermentasi oleh *A. niger* karena semakin banyak selulosa yang dapat diubah oleh *A. niger* menjadi enzim selulase.

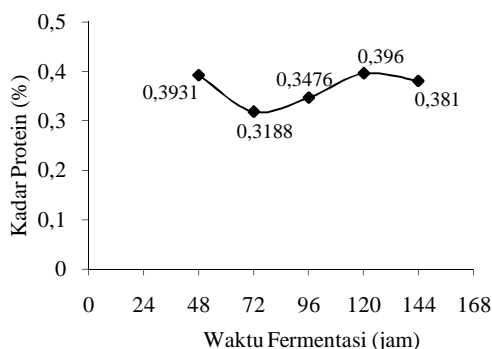
Tabel 2. Hasil Uji Kadar Selulosa, Lignin dan Hemiselulosa

Sampel	Hasil Uji		
	Kadar Selulosa	Kadar Lignin	Kadar Hemiselulosa
Sebelum delignifikasi	28,93%	10,81%	18,54%
Sesudah delignifikasi	72,63%	8,39%	18,36%

Kadar Protein

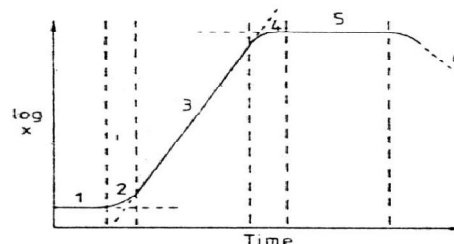
Peningkatan kandungan protein sejalan dengan pertumbuhan kapang (jamur) dikarenakan tubuh jamur terdiri dari elemen yang mengandung nitrogen. Selain itu enzim yang dihasilkan oleh jamur juga merupakan protein (Noferdiman, *et.al.*, 2008). Hal ini didukung oleh Garraway dan Evans (1984), yang menyatakan dinding sel jamur mengandung 6,3% protein, sedangkan membran sel pada jamur yang berhifa mengandung protein 25-45% dan karbohidrat 25-30%. Dalam pertumbuhannya jamur menggunakan karbon dan nitrogen untuk komponen sel tubuh jamur (Musnandar, 2003). Proses ini terjadi karena selama fermentasi, kapang *A.niger* menggunakan zat gizi (terutama karbohidrat) untuk pertumbuhannya dan kandungan protein meningkat.

Menurut Setyaningrum dan Sa'adah (2010), pada awal fermentasi, aktivitas enzim masih sangat rendah. Sehingga dalam penelitian ini, kami menggunakan variabel waktu yang sama dengan penelitian Setyaningrum dan Sa'adah (2010), hanya berbeda substrat yang digunakan. Variabel waktu yang digunakan adalah 48, 72, 96, 120 dan 144 jam.



Gambar 2. Grafik hubungan antara waktu dengan kadar protein

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa kadar protein cenderung menurun pada awal fermentasi kemudian naik hingga hari ke-5 dan turun pada hari ke-6. Kadar protein tertinggi yakni 0,3960% diperoleh pada hari ke-5. Menurut Gandjar (2006), Setiap mikroorganisme mempunyai kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan fungi mempunyai beberapa fase, antara lain: (1) fase lag, yaitu fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat; (2) fase akselerasi, yaitu fase mulainya sel-sel membelah dan fase lag menjadi fase aktif; (3) fase eksponensial, merupakan fase perbanyakan jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel sangat meningkat, dan fase ini merupakan fase yang penting bagi kehidupan fungi. Pada awal fase-fase ini kita dapat memanen enzim-enzim dan akhir pada fase ini atau (4) fase deselerasi, yaitu waktu sel-sel mulai kurang aktif membelah, kita dapat memanen biomassa sel atau senyawa-senyawa yang tidak lagi diperlukan oleh sel; (5) fase stasioner, yaitu fase jumlah sel yang bertambah dan jumlah sel yang mati relatif seimbang. Kurva pada fase ini merupakan garis lurus yang horizontal. Banyak senyawa metabolit sekunder yang dapat dipanen pada fase ini. Selanjutnya pada tahap (6) fase kematian dipercepat, jumlah sel-sel yang mati lebih banyak daripada sel-sel yang masih hidup. Kurva pertumbuhan suatu fungi dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan fungi (Gandjar, 2006)

Berdasarkan Gambar 3 dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini, *A. niger* tumbuh optimal dengan kadar protein tertinggi yakni pada waktu fermentasi 120 jam (5 hari). Waktu fermentasi 120 jam merupakan fase eksponensial dimana pada fase tersebut perbanyak jumlah sel sangat banyak, aktivitas sel meningkat dan enzim banyak dihasilkan seperti yang telah dijelaskan di atas. Kondisi tersebut sesuai dengan yang dilaporkan oleh Menezes, *et.al.* (1973), yakni dalam menghasilkan enzim selulase dari mikroba, waktu inkubasi optimum adalah 3-5 hari.

Aktivitas Enzim

Hasil enzim dengan variabel waktu fermentasi 120 jam diuji aktivitasnya. Uji aktivitas enzim selulase dilihat dari berapa kadar glukosa yang dihasilkan saat enzim bekerja. Hasil yang diperoleh adalah kadar glukosa yang dihasilkan oleh enzim selulase dengan variabel waktu 120 jam sebesar 1.069,01 mg/L. Hasil yang diperoleh lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian Omojasola, dkk. (2008), dengan menggunakan fungi *A. Niger* dan substrat kulit nanas, kadar glukosa yang dihasilkan 820 mg/L.

4. KESIMPULAN

A. niger (*Aspergillus niger*) bekerja optimal dalam menghasilkan enzim selulase dengan substrat padat berupa kulit durian pada waktu fermentasi 120 jam dan kadar protein yang dihasilkan sebesar 0,3960%. Aktivitas enzim selulase yang diperoleh adalah sebesar 1.069,01 mg/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elzaher, F.H. & Fadel, M. (2010). Production of Bioethanol Via Enzymatic Saccharification of Rice Straw by Cellulase Produced by *Trichoderma reesei* Under Solid State Fermentation. *New York Sci*, 3 (4), 72-78.
- Ali, U.F. & Saad El-Dein, H.S. (2010) Production and Partial Purification of Cellulase Complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* Grown on Water Hyacinth Blend. *J Applied Sci. Res*, 4 (7), 875-891.
- BKPM. (2012). *Data Potensi Durian di Kalimantan Barat*. Badan Koordinasi Penanaman Modal. www.regionalinvestment.bkpm.go.id. Diakses 13 Februari 2012.
- Beguín, P. & Anbert, J.P. (1994). The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1), 25-58.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18, 355-383.
- Ceirwyn, J.S. (1995). *Analytical Chemistry of Food*. London: Blackie Academic and Professional.
- Chahal, D.S. (1985). Solid State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulose Production. *Appl Environ Microbiol.* 49 (1), 205-210.
- Coughlan, M.P. (1985). Cellulases: Production Properties and Applications. *Biochem. Soc. Trans*, 13, 405-406.
- Gandjar dan Indrawati. (2006). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia..
- Garraway, M.O. & R.C. Evans. (1984). *Fungal Nutrition and Physiology*. New York, John Wiley and Sons.
- Gunam, I.B.W. & Antara, N.S. (1999), Study on Sodium Hydroxide Treatment of Corn Stalk to Increase Its Cellulose Saccharification Enzymatically by Using Culture Filtrate of *Trichoderma reesei*. *Gitayana. Agric. Technol. J.*, 5(1), 34-38.
- Hatta, V.H. (2007), *Manfaat Kulit Durian Selezat Buahnya*. Jurusan Teknik Hasil Hutan, Fakultas Kehutanan Unlam, Lampung.
- Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Staehelberg, J., Johansson, G. & Pettersson, G. (1999). Endoglucanase 28 (Cel12A), A New *Phanerochaete chrysosporium* cellulose. *Eur. J Biochem*, 259(1-2), 88-95.
- Kiantoro, A. (2011). *Pembuatan Asam Oksalat Dari Limbah Kulit Pisang Dengan Pengaruh Waktu dan Konsentrasi Asam Nitrat (HNO₃)*. Jurusan Teknik Kimia,

- Politeknik Negeri Sriwijaya, Palembang.
- M.S., Tanyildizi, Dursun, Özer & Murat, Elibol. (2007). Production of Bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* Under Solid Substrate Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 37 (3), 294-297.
- Mangunwidjaja, D., T.E. Sukmaratri dan C. Setiyarto. (2011). *Peningkatan Kadar Protein Kasar Ampas Kulit Nanas Melalui Fermentasi Media Padat*. Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mandels, M. (1985). Applications of cellulases. *Biochem. Soc. Trans*, 13 (2), 414-416.
- Menezes, J.C.S.S., Silva, R.A., Acre, I.S., & Scheneider, I.A.H. (1973). Production of Poly-ferric Sulphate Chemical/Coagulant by Selective Precipitation of Iron from Acidic Coal Mine drainage. *Mine water Environ*, 28 (4), 311-314.
- Musnandar, E. (2003). *Reput Hayati Sabut Kelapa Sawit Oleh Jamur Marasmius dan Implikasinya Terhadap Performan Kambing*. Disertasi. Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Noferdima, Y.Rizal, Mirzah, Y. Heryanti & Y. Marlida. (2008). Penggunaan Urea Sebagai Sumber Nitrogen Pada Proses Biodegradasi Substrat Lumpur Sawit Oleh Jamur *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan* . 11 (4), 175 –182.
- Omojasola, P. Folakemi, Omowumi, Priscilla, Jilani, & S.A. Ibiyemi. (2008). Cellulase Production by some Fungi Cultured on Pineapple Waste. *Nature & Science*, 6 (2), 64-75.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., & Nigam, P. (1999). Solid State Fermentation for Production of Industrial Enzymes. *Curr Sci*, 77 (1), 149–162.
- Pothiraj, C., Balaji, P. & Eyini, M. (2006). Enhanced Production of Cellulases by Various Fungal Cultures in Solid State Fermentation of Cassava Waste. *African J Biotechnol*, 5 (20), 1882-1885.
- Safaria, S., N. Idiawati & T.A. Zaharah. (2013). Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *JKK*. 2013, 2 (1), 46-51.
- Setyaningrum, N.I & Z. Sa'adah. (2010). *Produksi Enzim Selulase oleh Aspergillus niger Menggunakan Substrat Jerami dengan Sistem Fermentasi Padat*. Skripsi. Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Tarek, A.A.M. & Nagwa, A.T. (2007). Optimization of Cellulase and Glucosidase Induction by Sugarbeet Pathogen *Sclerotium rolfsii*. *Afr. J. Biotechnol*, 6 (8), 1048-105.
- Yi, J.C., Sandra, J.C., John, A.B. & Shu, T.C. (1999). Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the Cellulolytic System of *Volvariella volvaceae*, The Edible Straw Mushroom. *Appl. Environ. Microbiol*. 65 (2), 553-559.
- Yulneriwarni, Sulastri & L. Tuti. (2009). Fermentasi Keju dari Berbagai Jenis Kacang Menggunakan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Nenas. *Vis Vitalis*, 2 (1), 32-42.