



## Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* Secara Fermentasi dalam Medium Kultur Padat

Sri Wahyu Murni, Gunarto, Titik Sudewi dan Anggara Jaka S.

Prodi Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri UPN "Veteran" Yogyakarta  
Jl SWK 104 (Lingkar Utara) Condong Catur Yogyakarta-55283, Indonesia  
Telp/Fax. 0274-486889, E-mail: [wahyuswm@yahoo.com](mailto:wahyuswm@yahoo.com)

### Abstract

Bioethanol made from lignocellulosic biomass is currently being developed. The main obstacle production of bioethanol from lignocellulosic materials is at the stage of the process of hydrolysis of lignocellulosic material to form sugars. Enzymatic hydrolysis using cellulase enzyme is plagued by an expensive price. In the previous studies have been carried out production of *Trichoderma reesei* cellulase enzymes, in this research conducted using *Aspergillus niger* by solid substrate fermentation method. Enzyme production studies conducted in two stages in, there were in the aerated Erlenmeyer flask and rotary drum fermenter (RDF). The results showed that the production of cellulase enzymes in the rice straw substrate has resulted in enzyme activity similar to sawdust from the wood sengon. Water content effect on enzyme activity. The best results were obtained on a substrate of rice straw at 60% moisture content and fermentation time of 6 days, the CMC-ase activity of FP-ase was 0.00229 and 0.00095U /ml respectively. The best results in sengon sawdust substrate is reached at 70% moisture content and fermentation time of 7 days, obtained CMC-ase and FP-ase activity 0.00257 and 0.00133 U/ml respectively. Productivity of the enzyme in the RDF is similar to the Erlenmeyer flask. At RDF, obtained CMC-ase and FP-ase of 0.00243 and 0.00105 U / ml for rice straw substrate, and 0.00224 and 0.00125 U / ml for sengon sawdust substrate.

**Key words:** aktivitas enzim, fermentasi, substrat padat, selulosa, selulase

### Pendahuluan

Produksi etanol dari biomassa lignoselulosa meliputi tiga tahapan yaitu: *pretreatment*, hidrolisis (sakarifikasi), dan pembentukan etanol. Tahapan yang paling menentukan keberhasilan proses ini adalah hidrolisis biomassa untuk menghasilkan gula. Hidrolisis asam dan hidrolisis enzim, telah dikembangkan untuk hidrolisis biomassa. Keuntungan metode enzimatik yaitu, proses dapat dilakukan pada kondisi ruangan dan tanpa menghasilkan limbah beracun (berupa asam). Akan tetapi sampai saat ini produksi etanol berbahan biomassa belum mencapai tahapan komersial. Kendala yang dihadapi adalah mahalnya biaya produksi enzim selulase. Salah satu upaya untuk menurunkan biaya adalah menggunakan bahan baku yang murah, yang berupa limbah. Dalam penelitian ini akan dilakukan produksi enzim selulase menggunakan bahan limbah pertanian melalui fermentasi media kultur padat secara *batch* menggunakan jamur *Aspergillus niger* dan beberapa substrat selulosa, yaitu jerami padi dan serbuk kayu sengon.

### Bahan Lignoselulosa

Bahan lignoselulosa mempunyai kandungan utama berupa tiga macam polimer yang berbeda, yaitu: lignin, hemiselulosa, dan selulosa, yang saling berikatan membentuk satu kesatuan yang utuh. Besarnya kandungan masing-masing komponen bergantung pada jenis biomassa, umur, dan kondisi lingkungan tempat biomassa tersebut tumbuh dan berkembang. Jerami padi mempunyai kandungan selulosa (32-47%), hemiselulosa terutama polimer dari xilosa (19-27%), dan lignin (5-24%). (Binod et. al, 2009) Menurut Bailey dan Ollis (1986), komposisi kayu keras tersusun atas 40-55 % selulosa, 24-40% hemiselulosa, dan 18-25% lignin. Kayu sengon memiliki kandungan lignin yang rendah (25,7%),  $\alpha$ -selulosa 46,0% dan holo-selulosa 74,9%. (Atmosuseno, 1996) Kemampuan bahan lignoselulosa untuk terdegradasi sangat dipengaruhi oleh komposisi kimia ketiganya. Selulosa  $(C_6H_{10}O_5)_n$  merupakan homopolimer dari 1,4- $\beta$ -D-glukopiranos, merupakan komponen utama bahan



lignoselulosa. Struktur selulosa secara umum berbentuk kristalin, tetapi terdapat bagian-bagian yang amorf. Tingkat kekristalan selulosa mempengaruhi kemampuan hidrolisis baik secara enzimatis maupun kimiawi. (Silvi Octavia, 2011)

### Enzim Selulase

Enzim selulase termasuk dalam golongan enzim hidrolase. Ada 3 (tiga) jenis utama selulase yang diproduksi oleh jamur, yaitu: (1) endoglukonase, yang menghidrolisis polimer selulosa secara acak di bagian dalam menjadi oligosakarida dengan panjang rantai bervariasi, (2) selobiohidrolase (*cellobiohydrolase*), memecah selulosa dari ujung non-reduksi dan membebaskan unit-unit selobiosa, serta (3)  $\beta$ -glukosidase (BGL), memecah selobiosa menghasilkan glukosa sebagai hasil akhir. (Ward, 1985)

Penelitian tentang enzim selulase sampai saat ini sudah banyak dilakukan. Beberapa jenis mikroba penghasil enzim selulase antara lain: *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, dan *Rhizopus sp.* (Ward, 1985). (Ward, 1985) menyatakan bahwa *T.reesei* merupakan producer selulase yang bekerja efektif pada selulosa kristal. Sukumaran (2009) menginformasikan bahwa selulase dari *aspergillus niger* didominasi oleh  $\beta$ -glukosidase (BGL).

### Metodologi

#### Mikroorganisme and persiapan inokulum

Biakan *Aspergillus niger* dengan kode *strain* dalam media agar miring diperoleh dari Laboratorium Fakultas Pertanian UPN “Veteran” Yogyakarta. Biakan *A. niger* diinokulasi dalam medium *potato dextrose* agar dan dibiakkan selama 5 hari. Untuk persiapan inokulasi jamur, sekitar 2 ml air suling steril yang mengandung 0,1% *Tween 80* dikontakkan ke spora yang terlepas ke cairan menggunakan pipet. Suspensi spora *Aspergillus niger* diatur sedemikian sehingga mempunyai konsentrasi  $\sim 10^7$  spora/ml

#### Medium garam mineral untuk fermentasi

Medium garam mineral untuk produksi selulase memiliki komposisi dalam g/L: urea, 0,3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3; peptone, 0,75; yeast extract, 0,25;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,

0,4; and *trace elements*:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0016,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0014; and  $\text{CoCl}_2$ , 0,002.

#### Pretreatment bahan baku

Jerami padi dan serbuk kayu sengon sebagai substrat dikeringkan pada suhu  $70^\circ\text{C}$  dalam oven untuk menghilangkan kelembaban, kemudian dihaluskan (dicacah) sampai lolos ayakan 20 *mesh*. Selanjutnya bahan dicampur dengan larutan NaOH 1 % dengan perbandingan 1:10 (g/mL) dan dilakukan pemasakan selama 1 jam pada tekanan 1,2 atm dan suhu  $120^\circ\text{C}$  dalam panci bertekanan. Setelah didinginkan, sampel dicuci beberapa kali dengan aquades untuk menetralkan pH. Sampel dikeringkan di dalam oven dengan suhu  $80^\circ\text{C}$  dan diuji kandungan airnya. Bahan yang telah mengalami perlakuan awal selanjutnya disimpan dalam wadah kedap udara untuk digunakan dalam proses fermentasi.

#### Produksi enzim dalam labu Erlenmeyer

Jerami padi dan serbuk gergaji dari kayu sengon digunakan sebagai substrat untuk produksi enzim secara fermentasi kultur padat. Di dalam labu Erlenmeyer, 5 g substrat dibasahi dengan media garam mineral sampai diperoleh kadar air berturut-turut 60%, 70%, dan 80% untuk produksi enzim selulase. Selanjutnya, ke dalam labu Erlenmeyer diinokulasikan 1 ml suspensi spora *A. niger*. Campuran diaduk hingga merata dan diinkubasi pada suhu ruang dan diaerasi dengan laju alir udara 4,8 ml/detik. Inkubasi dilakukan dalam rentang waktu 7 hari. Setelah waktu inkubasi tercapai, enzim diekstraksi menggunakan 50 ml larutan 0,1 N *buffer* sitrat (pH 4,8). Hasil ekstraksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$  dan digunakan sebagai sampel enzim kasar (*crude enzyme*).

#### Fermentasi dalam Rotary Drum Fermenter (RDF)

Proses fermentasi dalam RDF dilakukan dengan menggunakan substrat dan media garam mineral yang sama dengan fermentasi dalam labu Erlenmeyer pada kondisi terbaiknya. Kondisi percobaan pada masing-masing tempuhan disajikan pada Tabel 1. Fermentasi dalam RDF dilangsungkan secara aerob dengan laju aerasi 4,81 ml/menit dan laju putaran rotor 10,5 rpm.

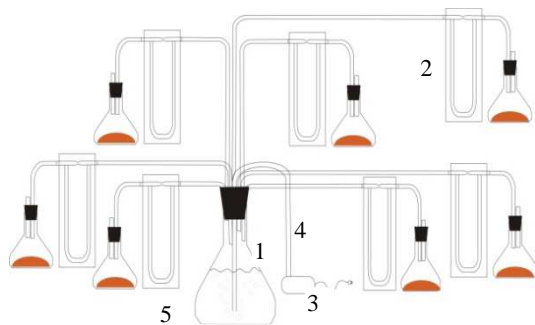
Tabel 1. Kondisi percobaan pada fermentasi dalam RDF

Substrat	Jerami Padi	Serbuk Kayu Sengon
Berat substrat (g)	20	30
Kadar air(%)	60	70

Volume inokulum (ml)	4	6
Konsentrasi spora (spora/ml)	$1,8 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$

### Alat

Peralatan utama yang digunakan untuk memproduksi enzim selulase dalam penelitian ini berupa rangkaian peralatan fermentasi dalam fermentor labu Erlenmeyer yang disusun secara paralel (Gambar 2), serta sebuah *rotary drum fermenter (RDF)* yang disajikan pada Gambar 3. RDF ini mempunyai spesifikasi berupa: panjang = 24 cm, diameter dalam = 9 cm, diameter luar = 11,5 cm, jumlah *baffle* = 4 buah, panjang *baffle* = 19 cm, dan lebar *baffle* = 1,5 cm.



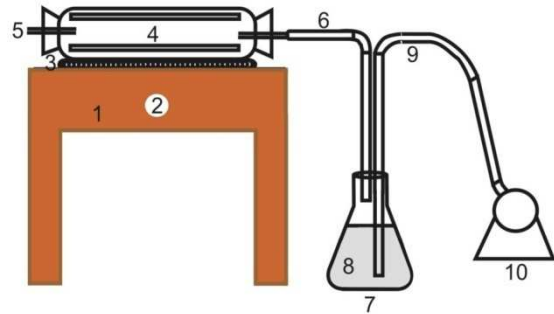
#### Keterangan alat:

1. Erlenmeyer berisi larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%
2. Pipa U
3. Pompa
4. Pipa pemasukan udara
5. Fermentor labu erlenmeyer

**Gambar 2. Fermentor labu erlenmeyer**

### Metode analisa

Aktivitas enzim selulase dalam penelitian ini dievaluasi melalui uji aktivitas kertas saring (*filter paper assay*, FP-ase) dan *carboxy methyl celcucose assay* (CMC-ase), menggunakan metode Ghose (1987). Satu unit aktivitas enzim selulase sebanding dengan 1 μmol substrat yang dihidrolisis per menit. Penentuan kandungan gula pereduksi dilakukan dengan metode DNS (*dinitro salicylic acid*).



#### Keterangan alat:

1. Meja
2. Pengatur putaran fermentor
3. Rotor
4. Fermentor (RDF)
5. Lubang keluaran udara
6. Selang pemasukan udara
7. Labu Erlenmeyer
8. Larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%
9. Selang pemasukan udara
10. Pompa

**Gambar 3. Rotary drum fermenter (RDF)**

### Hasil dan pembahasan

#### Fermentasi dalam labu Erlenmeyer

Substrat yang berupa jerami padi dan serbuk gergaji kayu sengon mengalami pretreatment dengan tahapan pengecilan ukuran hingga lolos ayakan 20 mesh, dan hidrolisis dengan NaOH 1% selama 1 jam, selanjutnya dicuci, dan dikeringkan. Tujuan dari *pretreatment* ini adalah untuk menghilangkan lignin dalam bahan (*delignifikasi*). Hasil fermentasi produksi enzim selulase dalam labu Erlenmeyer menggunakan jerami padi dan serbuk kayu sengon pada kadar air 60, 70, dan 80% disajikan pada Tabel 2 dan 3. Dalam penelitian ini enzim selulase disintesis oleh jamur *Aspergillus niger*. Jerami padi dan serbuk gergaji dari kayu sengon digunakan sebagai substrat. Hasil penelitian menunjukkan kadar air dan jenis substrat berpengaruh terhadap aktivitas enzim yang dihasilkan. Aktivitas selulase yang diukur dengan CMC lebih tinggi daripada filter paper (FP).

Tabel 2. Hasil fermentasi dalam labu Erlenmeyer

Kadar Air (%)	Hari ke-	1	2	3	4	5	6	7
60	Volume ekstrak enzim = 32 ml							
	Aktivitas CMC-ase (U/ml)	0,0029	0,0064	0,0010	0,0016	0,0014	0,0023	0,0023
	Aktivitas FP-ase (U/ml)	0,00006	0,00028	0,00056	0,00015	0,00117	0,00095	0,0013
	Kandungan gula pereduksi (mg/ml)	0,00068	0,00304	0,0061	0,0016	0,0127	0,0103	0,0141
70	Volume ekstrak enzim = 27 ml							
	Aktivitas CMC-ase (U/ml)	0,00019	0,00054	0,00078	0,00193	0,00196	0,00105	0,00154

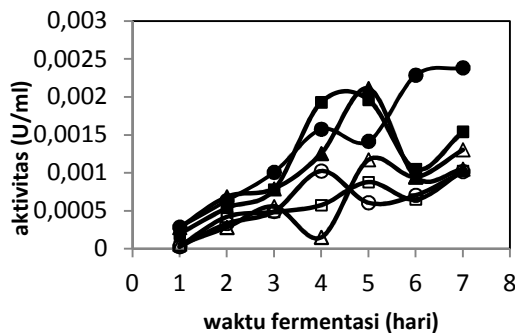
	Aktivitas FP-ase (U/ml)	0,00003	0,00042	0,00048	0,00057	0,00088	0,00065	0,00103
	Kandungan gula pereduksi (mg/ml)	0,00033	0,00454	0,00524	0,00621	0,00949	0,00702	0,01108
80	Volume ekstrak enzim = 28 ml							
	Aktivitas CMC-ase (U/ml)	0,00027	0,00068	0,00079	0,00125	0,00211	0,00094	0,00105
	Aktivitas FP-ase (U/ml)	0,00027	0,003324	0,004919	0,010236	0,00607	0,00705	0,01018
	Kandungan gula pereduksi (mg/ml)	0,0003	0,0036	0,00532	0,01107	0,00656	0,0076	0,011

**Tabel 3. Hasil fermentasi substrat serbuk kayu sengon (labu Erlenmeyer)**

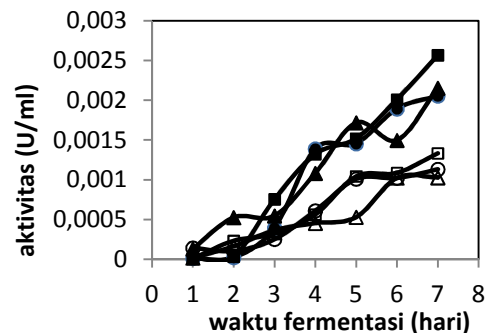
Kadar Air (%)	Hari ke-	1	2	3	4	5	6	7
60	Volume ekstrak enzim = 41 ml							
	Aktivitas CMC-ase (U/ml)	0,00013	0,000218	0,00039	0,01389	0,00146	0,00189	0,00206
	Aktivitas FP-ase (U/ml)	0,00014	0,00010	0,00025	0,00061	0,00101	0,00102	0,00113
	Kandungan gula pereduksi (mg/ml)	0,00153	0,00111	0,00272	0,0066	0,01093	0,01106	0,01224
70	Volume ekstrak enzim = 37 ml							
	Aktivitas CMC-ase (U/ml)	0,000009	0,00003	0,00075	0,00132	0,00152	0,00201	0,00257
	Aktivitas FP-ase (U/ml)	0,000006	0,00023	0,00032	0,00056	0,00104	0,00109	0,00133
	Kandungan gula pereduksi (mg/ml)	0,00006	0,0025	0,00344	0,00608	0,01129	0,01176	0,01442
80	Volume ekstrak enzim = 38 ml							
	Aktivitas CMC-ase (U/ml)	0,00013	0,00052	0,00055	0,00108	0,00172	0,0015	0,00215
	Aktivitas FP-ase (U/ml)	0,00006	0,00016	0,00037	0,00045	0,00053	0,00102	0,00103
	Kandungan gula pereduksi (mg/ml)	0,00018	0,00177	0,00395	0,00491	0,00573	0,01107	0,0111

#### Pengaruh Kadar Air Substrat terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Kadar air berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* (Gambar 3 dan 4). Pada substrat jerami padi, aktivitas selulase tertinggi dicapai pada kadar air 60%, sedangkan aktivitas selulase tertinggi untuk substrat serbuk kayu sengon dicapai pada kadar air substrat 70%.



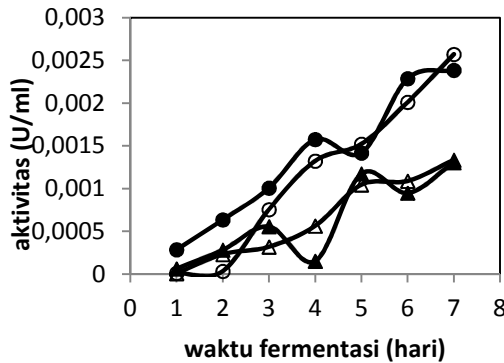
**Gambar 3. Pengaruh kadar air substrat pada aktivitas enzim selulase, dengan substrat jerami padi; ●CMC-ase (60%); ■CMC-ase (70%); ▲CMC-ase (80%); ○FP-ase (60%); □FP-ase (70%); △FP-ase (80%)**



**Gambar 4. Pengaruh kadar air substrat pada aktivitas enzim selulase, dengan substrat serbuk kayu sengon; ● CMC-ase (60%); ■ CMC-ase (70%); ▲ CMC-ase (80%); ○FP-ase (60%); □FP-ase (70%); △FP-ase (80%)**

#### Pengaruh Jenis Substrat terhadap Aktivitas Enzim Selulase

Gambar 5 memperlihatkan aktivitas selulase yang dihasilkan pada substrat jerami padi hampir sama dengan substrat serbuk kayu sengon, baik untuk CMC-ase maupun FP-ase. Fakta bahwa ekstrak enzim yang berasal dari substrat jerami padi dan serbuk kayu mengandung gula pereduksi yang hampir sama. (Gambar 6 dan 7) Aktivitas selulase tertinggi dicapai pada hari ke-6 untuk substrat jerami padi, dan pada hari ke-7 untuk substrat serbuk kayu sengon. Hal ini menunjukkan, substrat serbuk kayu membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mencapai aktivitas tertinggi.

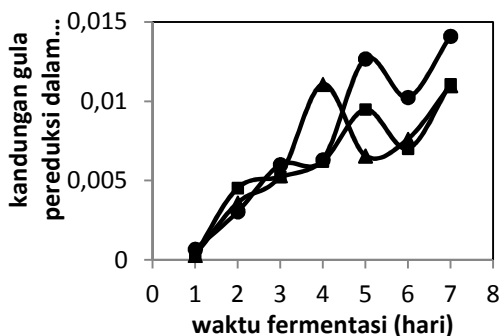


Gambar 5. Aktivitas CMC-ase dan FP-ase antara substrat jerami padi: ● CMC-ase (60%); ▲ FP-ase (60%); dan serbuk kayu sengon: ○ CMC-ase (70%); △ FP-ase (70%)

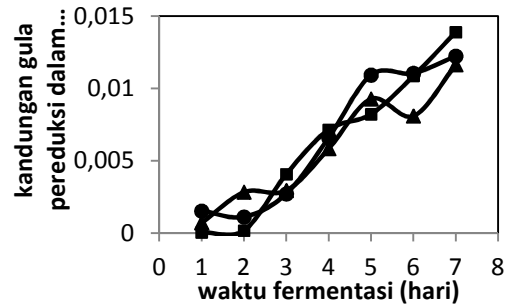
### Kandungan Gula Pereduksi dalam Media

Profil konsentrasi gula pereduksi terhadap waktu fermentasi yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* disajikan pada Gambar 6 dan 7. Gula pereduksi diproduksi oleh *A. niger* secara simultan selama mikroba tersebut merombak selulosa dari substrat jerami padi maupun serbuk kayu mahoni. Dalam hal ini, gula pereduksi juga merupakan produk fermentasi selain enzim selulase.

Dalam penelitian ini diperoleh fakta bahwa konsentrasi gula pereduksi semakin meningkat dengan semakin lama fermentasi. Dengan semakin lama fermentasi, maka jumlah sel semakin meningkat pula, sehingga jumlah enzim yang dihasilkan semakin besar, dan pada gilirannya jumlah selulosa yang terhidrolisis juga semakin meningkat.



Gambar 6. Profil kandungan gula pereduksi dengan substrat jerami padi pada berbagai kadar air (%): ● (60); ■ (70); ▲ (80)



Gambar 7. Profil kandungan gula pereduksi dengan substrat serbuk kayu sengon pada berbagai kadar air (%): ●(60) ■ (70) ▲(80)

Konsentrasi gula pereduksi pada substrat jerami padi untuk berbagai kadar air memiliki pola yang sama, meningkat sejak awal fermentasi. Pada kadar air 60% secara umum diperoleh kandungan gula pereduksi yang paling tinggi. Fakta ini menunjukkan bahwa kadar air 60% telah mampu mendukung terjadinya proses degradasi selulosa. Sementara itu konsentrasi gula pereduksi untuk substrat kayu sengon pada kadar air 60 dan 70% sampai hari ke-2 belum ada peningkatan yang berarti, setelah hari ke-dua barulah konsentrasi gula pereduksi meningkat dengan cepat. Ini berbeda dengan pada kadar air 80%, dimana pada hari ke dua telah mengalami peningkatan yang cukup berarti. Ini menunjukkan bahwa pada kadar air yang lebih tinggi perombakan selulosa pada kayu sengon berlangsung lebih cepat. Secara umum dapat dinyatakan bahwa kayu sengon membutuhkan waktu yang sedikit lebih lama untuk dirombak atau didegradasi menjadi gula pereduksi dibandingkan dengan jerami padi. Namun demikian karena kandungan lignin kayu sengon hanya sedikit lebih tinggi dibanding jerami padi, maka hanya mengalami sedikit perbedaan.

### Aktivitas Enzim Selulase dalam Rotary Drum Fermenter (RDF)

Selulase hasil fermentasi dalam labu Erlenmeyer dan RDF menunjukkan aktivitas yang hampir sama, baik CMC-ase maupun FP-ase. (Tabel 4) Baik dalam fermentor labu Erlenmeyer maupun RDF dilakukan aerasi dengan kecepatan yang sama untuk memenuhi kebutuhan oksigen bagi pertumbuhan jamur *A. niger* yang bersifat aerob. Yang berbeda adalah campuran fermentasi dalam *drum fermenter* diputar laju putaran yang relatif rendah. Fakta ini menunjukkan bahwa aerasi lebih berpengaruh pada sintesis enzim dari pada putaran yang berfungsi menghomogenkan medium.



RDF dalam penelitian ini beroperasi pada suhu ruang, tekanan atmosferik, laju aerasi 4,81 ml/menit, dan laju putaran rotor 10,5 rpm. Seperti yang terlihat dalam Tabel 4, pada kondisi

ini diperoleh aktivitas enzim selulase yang masih relatif sangat rendah (yaitu dalam rentang 0,00105 – 0,00125 U/ml untuk FP-ase, serta 0,00224 – 0,00243 U/ml untuk CMC-ase).

Tabel 4. Perbandingan aktivitas enzim selulase hasil fermentasi dalam labu Erlenmeyer dengan rotary drum fermenter (RDF)

Substrat	Labu Erlenmeyer		RDF	
	CMC-ase (U/ml)	FP-ase (U/ml)	CMC-ase (U/ml)	FP-ase (U/ml)
Jerami padi	0,00229	0,00095	0,00243	0,00105
Serbuk kayu sengon	0,00257	0,001334	0,00224	0,00125

#### Perbandingan hasil antara *A.niger* dengan *T. reesei*

Pada penelitian sebelumnya, Sri Wahyu Murni dkk (2011) telah melakukan studi produksi selulase menggunakan *T. reesei*. Diperoleh hasil bahwa fermentasi substrat padat jerami padi dan serbuk kayu sengon oleh *T. reesei* menghasilkan selulase lebih tinggi dibandingkan dengan *A. niger*. Fakta ini sesuai yang dinyatakan oleh Ward (1985), bahwa *T. reesei* merupakan produser selulase yang paling aktif pada medium berselulosa.

#### Kesimpulan

Berdasarkan hasil-hasil yang telah diuraikan sebelumnya, dapat disimpulkan bahwa enzim selulase dapat diproduksi oleh *Aspergillus niger* menggunakan substrat jerami padi dan serbuk kayu sengon yang mengalami pretreatment berupa hidrolisis menggunakan NaOH 1%. Aktivitas enzim yang diukur menggunakan CMC lebih tinggi dibandingkan dengan filter paper (kertas saring). Aktivitas enzim dengan substrat jerami dan substrat serbuk kayu sengon hampir sama. Kadar air berpengaruh terhadap produktivitas enzim selulase. Hasil fermentasi dalam labu erlenmeyer teraerasi hampir sama dengan dalam RDF. Fermentasi dalam labu Erlenmeyer dengan substrat jerami padi diperoleh produktivitas tertinggi pada kadar air 60% dan waktu fermentasi 6 hari, serta diperoleh aktivitas CMC-ase dan FP-ase masing-masing sebesar 0,00229 dan 0,00095 U/ml, sedangkan substrat serbuk kayu sengon berturut-turut 0,00257 dan 0,00133 U/ml pada fermentasi 7 hari. Pada RDF diperoleh CMC-ase dan FP-ase berurut-turut 0,00243 dan 0,00105 U/ml untuk substrat jerami padi serta 0,00224 dan 0,00125 U/ml untuk substrat serbuk kayu sengon.

#### Daftar Pustaka

- Atmosuseno, 1996, Komposisi Kimia Kayu, Jakarta, Djambatan
- Bailey, J.E, and D. F. Ollis, 1986, “Biochemical Engineering Fundamentals”, 2<sup>nd</sup> Edition, McGraw-Hill, New. York
- Frost, G.M. dan G. Moss, D. A., 1987, “Production of Enzymes by Fermentation”, di dalam “Biotechnology: Enzyme Technology”, H. Rehm dan G. Reed (ed), Vol. 7a, UHC Publisher
- Ghose, T.K., 1987, “Measurement of Cellulase Activities”, Pure Appl. Chem, 59 (2), 257-268
- Miller, G.M., 1959, “Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar”, Anal. Chem, 31: 426-428
- Silvi Octavia, Tatang H. Soerawidjaja, Ronny Purwadi, dan I.D.G. Arsa Putrawan, 2011, “Review: Pengolahan Awal Lignoselulosa Menggunakan Amoniak untuk Meningkatkan Perolehan Gula Fermentasi”, Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan” 2011, Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, UPN “Veteran” Yogyakarta, Yogyakarta
- Sri Wahyu Murni dan Siti Diyar Kholisoh, 2011, “Cellulase Enzyme Production by *Trichoderma reesei* Through a Solid Substrate Fermentation Process”, Proceeding ACIKITA International Conference of Science and Technology, Jakarta
- Sukumuran, R. K., Reeta Rani Singhania, Gincy Marina Mathew, and Ashok Pandey, 2009, “Cellulase Production Using Biomass Feedstock and Its Application in Lignocellulose Saccharification for



*Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan" 2012*  
**Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia**

Yogyakarta, 6 Maret 2012

ISSN: 1693-4393

- Bioethanol Production*", Renewable Energy, 34 (421-424)
- Wang, D. I, C. C. Coney, A. L. Demain, P. Dunhill, A. F. Humprey dan M. D. Lilly, 1979, "*Fermentation and Enzyme Technology*", John Wiley and Sons, New York, 57-97
- Ward, O.P., 1985, "*Hydrolytic Enzymes*", di dalam "*Comprehensive Biotechnology*", Murray Moo-Young, Volume 3, 1<sup>st</sup> Ed., Pergamon Press, New York
- Wyman, C., 1999, "*Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges*" di dalam Socolow R., Andeson D, Harte J. (Editors), Ann. Rev. Energy Environ, 24, pp. 189-226. Annual Reviews, Palo Alto, CA