

PRODUKSI ENZIM SELULASE OLEH AKTINOMISET MENGGUNAKAN FROND SAGU

Sumarni Nampo^a, Anja Meryandini^{b,c}, Titi Candra Sunartid^{*}

^a*Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, IPB, Jl. Raya Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680*

^b*Departemen Biologi, IPB, Jl. Raya Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680*

^c*Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati & Bioteknologi, IPB, Jl. Raya Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680*

^d*Departemen Teknologi Industri Pertanian, IPB, Jl. Raya Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680*

^{*}*E-mail: titi-cs@apps.ipb.ac.id*

ABSTRAK

Fronde sagu adalah pucuk batang sagu yang masih dibungkus oleh pelepah dan tidak dimanfaatkan oleh industri pengolahan sagu. Frond sagu memiliki kandungan serat dengan kandungan selulosa yang tinggi sehingga berpotensi dijadikan bahan baku untuk produksi selulase. Enzim selulase diproduksi melalui kultivasi substrat padat dan kultivasi substrat cair frond sagu oleh *Actinomiset*. Substrat berupa tepung frond sagu dan ampas frond sagu, diinokulasi oleh isolat HJ4(3b) dan HJ4(5b). Kedua isolat diremajakan dalam medium ISP-4 selama 5 hari, kemudian diinokulasikan ke dalam media tepung frond sagu dan ampas frond sagu dan diinkubasi dalam shaker pada suhu ruang selama 9 hari. Kedua isolat *Actinomiset* mampu menghasilkan enzim selulase pada kedua substrat dan metode kultivasi. Isolat HJ4(3b) dan HJ4(5b) pada perlakuan kultivasi substrat padat ampas frond sagu menghasilkan aktivitas spesifik endoglukanase (CMCase) tertinggi yaitu 0.314 U mg⁻¹ dan 0.294 U mg⁻¹ dan aktivitas spesifik enzim eksoglukanase (FPase) yaitu 0.269 U mg⁻¹ dan 0.258 U mg⁻¹, sedangkan pada perlakuan kultivasi substrat padat menggunakan tepung frond sagu dihasilkan aktivitas spesifik endoglukanase masing-masing sebesar 0.258 U mg⁻¹ dan 0.254 U mg⁻¹ serta aktivitas spesifik eksoglukanase 0.205 U mg⁻¹ dan 0.198 U mg⁻¹.

Kata Kunci: *Actinomiset*, endoglukanase, eksoglukanase, kultivasi substrat padat, kultivasi substrat cair.

ABSTRACT

Sumarni Nampo, Anja Meryandini, dan Titi Candra Sunarti. 2019. Production Of Cellulase Enzym By Actinomiset Using Sagu Frond

Sago frond is the upper part of sago trunk which is still wrapped by leaflet, and is not used by the sago processing industry. Sago frond contains fiber with high cellulose content that could potentially be used as raw material for cellulase production. Cellulase enzymes were produced through both solid-state and submerged cultivations of sago frond by *Actinomycetes*. Two substrates, sago frond flour and pulp of sago fronds, were inoculated by isolate HJ4 (3b) and HJ4 (5b). Both isolates were rejuvenated in ISP-4 medium for 5 days, then were inoculated into the substrate of frond flour and hampas, and were incubated in a shaker at room temperature for 9 days. Both *Actinomycetes* isolates were able to produce cellulase enzymes by using both substrates and cultivation methods. The isolates of HJ4 (3b) and HJ4 (5b) by using pulp and solid-state cultivation produced the highest endoglukanase (CMCase) specific activity of 0.294 U mg⁻¹ and 0.276 U mg⁻¹ and exoglukanase (FPase) substrate specific activity of 0.252 U mg⁻¹ and 0.241 U mg⁻¹, while in the solid-state cultivation and by using sago fronds flour resulted in specific endoglukanase activities which were 0.242 U mg⁻¹ and 0.238 U mg⁻¹ and exoglukanase specific activities 0.192 U mg⁻¹ and 0.185 U mg⁻¹, respectively.

Keywords: *Actinomycetes*, endoglukanase, exoglukanase, solid-state cultivation, submerged cultivation.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang mempunyai area tanaman sagu terluas di dunia, yakni sekitar 5.5 juta ha yang tersebar di Papua, Maluku, Sulawesi, Kalimantan, Sumatera, Kepulauan Riau dan Mentawai (Bintoro et al. 2017). Sagu (*Metroxylon sago*) merupakan sumber pangan yang memiliki kandungan pati tinggi sekitar 81.51% - 84.72% yang berada pada bagian empulur batang (Fujii et al. 1986). Pada tanaman sagu terdapat bagian yang disebut frond sagu, yaitu bagian pucuk sagu yang batangnya masih dibungkus oleh pelepah berwarna hijau dan belum dimanfaatkan secara optimal. Frond sagu selama ini hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan dinding dan atap rumah, pakan hewan serta media tanam jamur (Flach 1997). Frond sagu memiliki kandungan serat sebesar 34.20%-34.40% sedangkan bagian empulur batang sagu yaitu sebesar 3.34% (Sunarti et al. 2018). Menurut Singhal et al. (2008) kandungan serat frond sagu ternyata dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan pulp. Hal ini yang menjadi dasar untuk mengembangkan dan memanfaatkan kandungan serat yang terdapat pada frond sagu.

Serat terdiri atas selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa merupakan polimer glukosa yang berbentuk rantai linier dan dihubungkan oleh ikatan β -1,4-D-glikosidik. Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut serta bersifat tidak mudah didegradasi secara kimia dan mekanis (Kim et al. 2004), namun selulosa dapat didegradasi secara sempurna dengan bantuan enzim. Menurut Rulianah et al. (2017) bahan dengan kandungan selulosa yang tinggi berpotensi dijadikan bahan baku untuk produksi selulase. Saat ini, enzim selulase merupakan salah satu kelas terbesar di industri enzim yang dimanfaatkan secara luas dalam industri makanan (Kuhad et al. 2011), tekstil (Arja 2007), pulp dan kertas (Singh et al. 2016) serta industri biofuel (Srivastava et al. 2015). Enzim selulase dapat diproduksi melalui proses kultivasi substrat padat dan kultivasi substrat cair. Proses ini mampu menghasilkan enzim dengan biaya yang lebih rendah (Pandey et al. 2000; Silva et al. 2016).

Kultivasi substrat padat merupakan proses yang berlangsung dalam substrat yang tidak terlarut untuk pertumbuhan mikroba tetapi mengandung air yang cukup sekalipun tidak mengalir bebas (Shweta 2015), sedangkan kultivasi media cair merupakan proses menggunakan substrat yang mengandung air bebas untuk pertumbuhan mikroba (Subramaniam dan Vimala 2012). Kultivasi

substrat padat dan kultivasi substrat cair lebih baik digunakan dalam produksi enzim selulase (Mrdula dan Murugammal 2011).

Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terbagi menjadi tiga kelompok berdasarkan aktivitas enzim yaitu endoglukanase (CMCase atau carboxymethyl cellulase), eksoglukanase (Avicelase atau selobiohidrolase), dan β -glukosidase atau selobiase. Kinerja enzim endoglukanase yaitu menghidrolisis ikatan internal β -1,4-glikosidik secara acak kemudian menghasilkan rantai glukosa dengan panjang yang berbeda (menghidrolisis selulosa menjadi oligosakarida), aktivitas ini dapat diukur dengan mengukur aktivitas CMCase. Enzim eksoglukanase menghidrolisis ujung rantai selulosa dan melepaskan β -selobiosa sebagai produk akhir, aktivitas ini dapat diukur dengan mengukur aktivitas filter paper-ase (FPase). Enzim β -glukosidase menghidrolisis β -selobiosa menjadi glukosa (Liang et al. 2012; Nagah et al. 2016).

Berbagai bakteri selulolitik yang dapat menghasilkan enzim selulase diantaranya adalah *Bacillus* sp. (Sadhu et al. 2013; Irfan et al. 2012), *Pseudomonas* sp., *Cellulomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. (Vinotha dan Maheswari 2014), serta kelompok aktinomisetes seperti *Streptomyces* sp. (Janaki 2017; Rathnan dan Ambili 2011). Aktinomisetes merupakan kelompok mikroorganisme yang mempunyai peranan penting dalam memproduksi enzim selulase dan jumlahnya melimpah di tanah (Das et al. 2014).

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait pemanfaatan hasil samping perkebunan sagu (frond sagu) yang dapat dijadikan substrat untuk memproduksi enzim selulase melalui kultivasi substrat padat dan kultivasi substrat cair oleh Aktinomiset.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah frond sagu (*Metroxylon sago*) bagian pucuk batang sagu yang diperoleh dari perkebunan rakyat di kampung Nambo kecamatan Ciomas kabupaten Bogor, dua isolat aktinomiset dengan kode isolat HJ4(3b) dan isolat HJ4(5b) yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi PPSHB.

Metode Penelitian

Karakterisasi Bahan Baku

Frond sagu yang digunakan berupa pucuk batang pohon sagu yang merupakan bagian yang masih dilapisi pelepah berwarna hijau. Frond sagu dipisahkan dari pelepah dan kulit kemudian dipotong menjadi beberapa fraksi setelah itu ukurannya diperkecil dan dijemur selama 3 hari. Pengecilan ukuran frond sagu dilakukan menggunakan disc mill hingga lolos pada saringan 40 mesh dan 100 mesh (Tasaso 2015). Tepung frond sagu diekstraksi patinya dengan cara ditambahkan aquadest hingga terendam dengan perbandingan 1:20 (b/v) kemudian dihidrolisis oleh 1.5 mL (2040 U/mL) Thermamyl alpha-amilase, kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 30 menit. Pemisahan hasil ekstraksi antara cairan yang mengandung maltooligosakarida (soluble fraction) dan ampas (insoluble fraction) menggunakan saringan 100 mesh. Ampas kemudian dikeringkan dan dilakukan pengecilan ukuran hingga lolos ayakan 100 mesh. Tepung dan ampas frond sagu berukuran lolos ayakan 100 mesh digunakan dalam penelitian dan dilakukan analisa komponen proksimat dengan metode AOAC (1995, 1998, 2000) serta komponen serat mengikuti metode Van Soest (1965).

Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Aktivitas Enzim

Dua Isolat aktinomiset HJ4(3b) dan HJ4(5b) diremajakan pada media padat ISP-4 yang memiliki komposisi: 10 g/L soluble starch, 1 g/L K₂HPO₄, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L NaCl, 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 2 g/L CaCO₃, Trace salts solution 1 mL/L (FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, Aquadest 100 mL), 20 g/L Agar. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama 5 hari. Kurva pertumbuhan didapat berdasarkan bobot kering biomassa sel. Prekultur dibuat dengan cara satu corckborer isolat diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi 5 mL media ISP-4 pada suhu ruang (27°C) selama 48 jam. Prekultur dimasukkan ke setiap Erlenmeyer berisi media ISP-4 50 mL mewakili hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11. Kultur dikocok pada kecepatan 120 rpm pada suhu ruang (27°C) selama 12 hari. Pemanenan sel dilakukan berdasarkan waktu yang telah ditentukan. Biomassa sel disaring dan dikeringkan dalam oven 60°C hingga kering, ditimbang biomassanya untuk selanjutnya diplotkan terhadap waktu inkubasi sehingga diperoleh kurva pertumbuhan kedua isolat.

Pengamatan aktivitas enzim dilakukan dengan menumbuhkan kedua isolat pada media padat CMC 1 % dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang, kemudian prekultur dibuat dengan cara satu corckborer isolat diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi 5

mL media CMC 1 % kemudian diinkubasi selama 48 jam. Prekultur dimasukkan ke setiap Erlenmeyer berisi media 50 mL mewakili hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan 11. Kultur dikocok pada kecepatan 120 rpm suhu ruang (27 °C) selama 12 hari. Setiap hari dilakukan pengukuran aktivitas enzim selulase berdasarkan waktu yang telah ditentukan. Filtrat berupa EEK diuji aktivitas enzim selulase berdasarkan metode Miller (1959) menggunakan glukosa sebagai standar. Aktivitas enzim selulase diuji terhadap substrat CMC 1% dalam bufer fosfat 0.1 M pH 7. Gula pereduksi yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometer (λ 540 nm). Aktivitas enzim diukur pada setiap pengambilan sampel yang dilakukan sehingga dapat diketahui waktu produksi tertinggi. Aktivitas enzim selulase dinyatakan dalam satuan U mL⁻¹. Satu unit aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah μ mol glukosa yang dihasilkan oleh satu mL enzim setiap menit (Wahyuningtyas et al. 2013). Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas selulase (U/mL)} = \frac{(X_s - X_k) \times 1000 \times \text{FP}}{(t \times \text{BM glukosa})}$$

Keterangan :

X_s = Kadar gula sampel (mg/mL)

X_k = Kadar gula kontrol (mg/mL)

t = waktu inkubasi

BM glukosa = Bobot molekul glukosa (180 g/mol)

1000 = konversi dari mmol ke μ mol

Fp = faktor pengenceran

Produksi Enzim Selulase

Kultivasi Substrat Padat

Kultivasi dilakukan dengan cara menimbang 10 g substrat tepung frond sagu atau ampas frond sagu. Masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL dan ditambahkan 45 mL mineral ISP-4 (tidak mengandung air bebas) kemudian disterilkan pada suhu 121 °C selama 15 menit dan didinginkan. Setelah itu dilakukan inokulasi dengan 5 mL inokulum pada substrat kemudian diinkubasi selama batas waktu optimum (9 hari) pada suhu ruang (Yadav et al. 2016). Perubahan struktur morfologi substrat padat diamati dengan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) pada perbesaran 500x.

Kultivasi Substrat Cair

Kultivasi dilakukan dengan cara menimbang 10 g substrat tepung frond sagu atau ampas frond sagu ke dalam erlenmeyer 500 mL yang mengandung 145 mL media cair frond sagu kemudian disterilkan pada suhu

121 0C selama 15 menit dan didinginkan. Kemudian dilakukan inokulasi dengan 5 mL inokulum ke dalam media cair frond sagu. Kultur di inkubasi dengan di shaker pada kecepatan 120 rpm pada suhu ruang (27°C) selama batas waktu optimum (Shobana dan Maheswari 2013). Perubahan struktur morfologi substrat padat diamati dengan SEM (*Scanning Electron Microscopy*) pada perbesaran 500x.

Karakterisasi Cairan Fermentasi

Aktivitas Enzim

Pemanenan enzim ekstrak kasar dilakukan saat aktivitas tertinggi dari kurva aktivitas enzim. Aktivitas enzim dari sampel kultivasi media padat dilakukan dengan menambahkan 50 ml bufer fosfat 0.1 M pH 7. Setelah itu, sampel disentrifugasi pada 8000 rpm selama 15 menit dan supernatan diuji untuk mengetahui aktivitas enzim CMC-ase (endoglukanase) dan FP-ase (eksoglukanase), sedangkan untuk kultivasi media cair dilakukan pengambilan sampel kemudian disentrifugasi pada 8000 rpm menggunakan centrifuge TOMY MRX-152 selama 15 menit dan supernatan diuji untuk mengetahui aktivitas enzim CMCase dan FPase.

Aktivitas CMCase diukur dengan mereaksikan 1 mL enzim terhadap 1 mL substrat CMC 1% dalam bufer fosfat 0.1 M pH 7 kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, sedangkan aktivitas FP-ase dilakukan dengan mereaksikan 1 mL enzim terhadap 1 mL bufer fosfat 0.1 M pH 7 dan kertas saring Whatman No.1 berukuran 1 cm x 6 cm kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Penentuan gula reduksi dengan menggunakan dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller 1959; Ghose 1987).

Kadar Protein

Pengukuran kandungan protein terlarut diukur dengan metode Bradford (Bradford 1976) menggunakan standar larutan BSA (*Bovine Serum Albumine*) pada konsentrasi 0-0.10 mg/mL.

Aktivitas Spesifik Selulase

Aktivitas spesifik enzim selulase adalah jumlah unit aktivitas enzim selulase per mg protein enzim selulase pada kondisi optimum. Menurut Kiio *et al.* (2016) bahwa pengukuran aktivitas spesifik selulase dapat diperoleh dengan cara seperti di bawah ini :

Aktivitas spesifik enzim (U/mg)= (Unit enzim (U/mL))/(Kadar protein (mg/mL))

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Bahan Baku

Frond sagu mempunyai komposisi senyawa penyusun bahan yang terdiri atas air, abu, lemak kasar, protein kasar, serat kasar (selulosa, hemiselulosa dan lignin) serta karbohidrat. Analisa ini dapat menjadi dasar pemanfaatan bahan berdasarkan potensi yang terdapat pada komponen hasil proksimat. Analisa kandungan proksimat dan komponen serat tepung frond sagu dan ampas frond sagu disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1 dan tabel 2 menunjukkan perbedaan kandungan proksimat pada tepung frond sagu dan ampas frond sagu. Hasil memperlihatkan bahwa kandungan serat kasar dan karbohidrat merupakan komponen utama pada tepung frond sagu dan ampas frond sagu dengan komponen serat kasar sebesar 48,49% dan 60,37% serta komponen karbohidrat sebesar 30,96% dan 10,22%.

Tabel 1 Komponen proksimat frond sagu

Table 1. Proximate component of frond sago

Komponen Proksimat/ <i>Proximate component</i>	Tepung Frond Sagu (%)/ <i>Sago frond flour (%)</i>	Ampas Frond Sagu (%)/ <i>Pulp of sago frond (%)</i>
Air/ <i>moisture</i>	11,05	11,51
Abu/ <i>ash</i>	5,35	7,26
Lemak Kasar/ <i>crude lipid</i>	2,64	6,08
Protein Kasar/ <i>crude protein</i>	1,51	4,55
Serat Kasar/ <i>crude fiber</i>	48,49	60,37
Karbohidrat by difference/ <i>carbohydrate by difference</i>	30,96	10,22

Tabel 2. Komponen serat frond sagu

Table 2. Components of sago frond fiber

Komponen/ content	Tepung Frond Sagu (%)/ frond sago flour(%)	Ampas Frond Sagu (%)/ pulp of frond sago (%)
Selulosa/ cellulose	23,70	25,26
Hemiselulosa/ hemicellulose	26,14	27,86
Lignin/lignin	29,70	31,66

Tabel 2 menunjukkan Kandungan selulosa yang merupakan komponen serat kasar frond sagu memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif sumber serat alami. Selain itu, frond sagu mempunyai kandungan lignin sebesar 29,70% dan 31,66% pada tepung dan ampas. Kandungan lignin pada tepung dan ampas frond sagu yang rendah akan dapat mempermudah proses pemanfaatan selulosa. Kandungan lignin ini lebih rendah dibandingkan dengan bahan lain yang memiliki kadar lignin yang lebih tinggi seperti kelapa sawit sebesar 32.4 % (Megashah et al. 2018), namun kandungan lignin frond sagu lebih tinggi dibandingkan dengan tongkol jagung 11.9% (Pointner et al. 2014) serta tongkol jagung varietas Hawaii 16.14% dan varietas Bisma 23.74% (Meryandini et al. 2008).

Komponen pati merupakan senyawa karbohidrat yang dapat memperlambat kerja hidrolisis enzim selulase. Penambahan α -amilase pada proses ekstraksi (perebusan) mampu mengurangi kandungan pati pada ampas frond sagu sehingga menurunkan kandungan karbohidrat (Tabel 1). Hilangnya kandungan pati juga menyebabkan ampas frond sagu mampu menginduksi enzim selulase lebih maksimal (Adri et al. 2013).

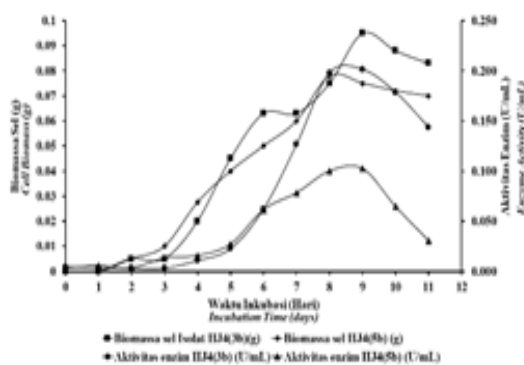
Kurva Tumbuh dan Aktivitas Enzim Selulase

Kedua Isolat potensial ditumbuhkan dari media padat ke dalam media cair ISP-4. Isolat tersebut dipindahkan dari media padat ke media cair dengan tujuan untuk menghasilkan sel-sel yang lebih aktif yang biasa disebut dengan inokulum. Proses pengaktifan

sel-sel tersebut dilakukan dengan cara aerasi melalui pengocokan. Hal ini bertujuan untuk menyuplai kadar oksigen secara terus menerus selama pertumbuhan sel berlangsung. Proses pertumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode berat kering (biomassa sel). Metode berat kering merupakan salah satu metode yang digunakan dalam mengukur kurva pertumbuhan mikroorganisme berdasarkan bertambahnya jumlah dan berat sel tersebut (Murni et al. 2011).

Aktivitas produksi enzim selulase dari kedua isolat yang digunakan diuji dengan metode CMCase menggunakan reagen DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) yang diamati berdasarkan jumlah gula pereduksi yang terbentuk. Enzim selulase berfungsi untuk menghidrolisis substrat selulosa menjadi monomer gula pereduksi berupa glukosa. Jumlah gula pereduksi yang terbentuk akan dikonversi ke dalam bentuk U (Unit). Satu unit (U) artinya jumlah enzim selulase yang diperlukan untuk mengkatalisis pembentukan 1 μ mol gula pereduksi per menit dalam kondisi pengukuran tertentu (Wahyuningtyas et al. 2013). Kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim selulase kedua isolat dapat dilihat pada Gambar 1.

Grafik kurva pertumbuhan memperlihatkan pertumbuhan sel isolat HJ4(3b) dan isolat HJ4(5b) dari hari ke-2 mulai mengalami fase eksponensial (Gambar 1). Fase eksponensial merupakan fase pertumbuhan sel yang ditandai dengan meningkatnya jumlah sel yang signifikan karena proses pembelahan sel terjadi secara maksimal. Fase ini merupakan fase terbaik dalam



Gambar 1. Perubahan bobot biomassa sel dan aktivitas enzim selulase (CMCase) isolat HJ4(3b) dan isolat HJ4(5b).

Figure 1. Changes of biomass and cellulase enzyme activity (CMCase) isolate HJ4(3b) and isolate HJ4(5b).

penentuan waktu optimal inkubasi inokulum (Maryanty *et al.* 2010).

Isolat HJ4(3b) dan HJ4(5b) memiliki aktivitas selulase tertinggi pada hari ke-9, kemudian pada hari ke-10 telah mengalami penurunan aktivitas. Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian Ayona *et al.* (2016) inkubasi selama 9 hari merupakan waktu optimum untuk produksi enzim selulase oleh isolat aktinomiset strain M1. Waktu optimum aktivitas selulase tertinggi pada hari ke-9 isolat HJ4(3b) sebesar 0.2013 U/mL dan isolat HJ4(5b) sebesar 0.1024 U/mL (Gambar 1) selanjutnya digunakan sebagai waktu panen untuk produksi selulase pada media frond sago.

Produksi selulase dengan menggunakan substrat CMC mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu inkubasi hingga mencapai titik optimum pada hari ke-9. Setelah mencapai titik optimum secara perlahan aktivitas enzim selulase mulai menurun. Hal tersebut disebabkan adanya kematian sel yang berdampak pada menurunnya aktivitas enzim yang terjadi sehingga glukosa yang dihasilkan semakin berkurang selain itu berkurangnya nutrisi yang terdapat dalam media menyebabkan tekanan fisiologis pada mikroorganisme dan mekanisme sekresi enzim selulolitik berkurang (Junior *et al.* 2015).

Produksi Enzim Selulase Aktivitas Enzim

Enzim selulase merupakan enzim kompleks yang terdiri atas endoglukanase (CMCase), eksoglukanase (FPase) dan β -glukosidase. Aktivitas endoglukanase dan aktivitas eksoglukanase pada substrat tepung frond sago

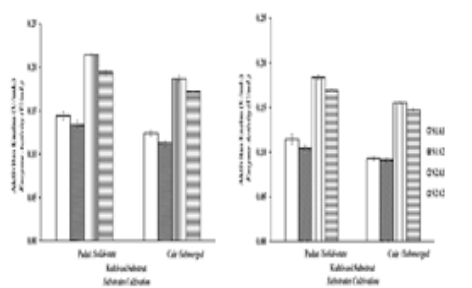
dan ampas frond sago dapat dilihat pada Gambar 2.

Keterangan/Remarks : S1A1 = tepung frond sago Isolat HJ4(3b)/S1A1 = sago frond flour Isolate HJ4(3b), S1A2 = tepung frond sago Isolat HJ4(5b)/ S1A2 = sago frond flour isolate HJ4(5b), S2A1 = ampas frond sago Isolat HJ4(3b)/ S2A1 = pulp of frond sago isolate HJ4(3b), S2A2 = ampas frond sago Isolat HJ4(5b)/ S2A2 = pulp of frond sago isolate HJ4(5b).

Aktivitas endoglukanase melalui kultivasi substrat padat dan substrat cair tepung frond sago oleh isolat HJ4(3b) yaitu sebesar 0,154 U g⁻¹ dan 0,132 U mL⁻¹ sedangkan aktivitas isolat HJ4(5b) yaitu sebesar 0,143 U g⁻¹ dan 0,121 U mL⁻¹. Aktivitas endoglukanase melalui kultivasi substrat padat dan substrat cair pada ampas frond sago oleh isolat HJ4(3b) yaitu sebesar 0,229 U g⁻¹ dan 0,200 U mL⁻¹ sedangkan aktivitas isolat HJ4(5b) sebesar 0,207 U g⁻¹ dan 0,183 U mL⁻¹.

Aktivitas endoglukanase isolat HJ4(3b) pada substrat ampas frond sago melalui kultivasi padat lebih tinggi dibandingkan aktivitas CMCase yang dihasilkan dari beberapa isolat seperti hasil penelitian Immanuel *et al.* (2006) dengan menggunakan *Cellulomonas sp.* (0.0336 U/mL), *Micrococcus sp.* (0.0152 U/mL), *Bacillus sp.* (0.0196 U/mL) pada substrat bubuk sabut. Namun lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Ladeira *et al.* (2015) dengan menggunakan *Bacillus sp.* SMIA-2 (0.29 U/mL) pada substrat ampas tebu dan cairan rendaman jagung serta hasil penelitian Goyal *et al.* (2014) menggunakan *Bacillus sp.* strain 313SI (3.08 U/mL) pada substrat jerami.

Aktivitas eksoglukanase yang dihasilkan dari kultivasi substrat padat dan substrat cair tepung frond sago



Gambar 2. (A) Aktivitas endoglukanase (CMCase) dan (B) aktivitas eksoglukanase (FPase) pada kultivasi substrat padat dan media kultivasi substrat cair tepung frond sago dan ampas frond sago pada suhu ruang, agitasi 120 rpm, inkubasi 9 hari.

Figure 2. (A) Endoglucanase activity (CMCase) and (B) exoglucanase activity (FPase) in solid-state cultivation and submerged cultivation frond sago flour and pulp of frond sago at room temperature, agitation 120 rpm, incubation 9 days.

Keterangan/Remarks : S1A1 = tepung frond sago Isolat HJ4(3b)/S1A1 = sago frond flour Isolate HJ4(3b), S1A2 = tepung frond sago Isolat HJ4(5b)/ S1A2 = sago frond flour isolate HJ4(5b), S2A1 = ampas frond sago Isolat HJ4(3b)/ S2A1 = pulp of frond sago isolate HJ4(3b), S2A2 = ampas frond sago Isolat HJ4(5b)/ S2A2 = pulp of frond sago isolate HJ4(5b).

oleh isolat HJ4(3b) yaitu sebesar 0,122 U g⁻¹ dan 0,099 U mL⁻¹ sedangkan aktivitas isolat HJ4(5b) yaitu sebesar 0,111 U g⁻¹ dan 0,098 U mL⁻¹. Aktivitas eksoglukanase melalui kultivasi substrat padat dan substrat cair ampas frond sagu oleh isolat HJ4(3b) yaitu sebesar 0,196 U g⁻¹ dan 0,166 U mL⁻¹ sedangkan aktivitas isolat HJ4(5b) sebesar 0,181 U g⁻¹ dan 0,157 U mL⁻¹.

Aktivitas eksoglukanase tertinggi diperoleh pada perlakuan kultivasi substrat padat ampas sagu oleh isolat HJ4(3b). Aktivitas eksoglukanase yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Liang et al. (2009) yang melaporkan aktivitas FPase *Brevibacillus* sp. JXL yaitu sebesar 0.02 U/mL. Namun lebih rendah dari hasil penelitian Asem et al. (2017) menggunakan *Serratia rubidaea* strain DBT4 yaitu sebesar 0.5 U/mL.

Kedua substrat memiliki kemampuan menginduksi pembentukan enzim yang berbeda dimana substrat ampas frond sagu dengan isolat HJ4(3b) mampu menginduksi enzim lebih baik dibandingkan dengan substrat tepung frond sagu. Hal ini dikarenakan pada substrat ampas sagu telah dilakukan proses pretreatment yaitu menggunakan alpha-amilase saat proses perebusan (ekstraksi) untuk menghilangkan kandungan pati yang terdapat pada substrat. Hilangnya kandungan pati ini menyebabkan ampas mampu menginduksi enzim selulase lebih maksimal (Adri et al. 2013).

Aktivitas Spesifik Enzim Selulase

Aktivitas spesifik enzim merupakan perbandingan unit aktivitas enzim dan kadar protein total yang terkandung di dalam sampel. Menurut McMillan et al. (2011) protein yang terlarut dalam media fermentasi perlu diukur untuk menghitung aktivitas spesifik enzim.

Peningkatan kadar protein ini disebabkan terinduksinya produksi enzim oleh substrat. Kadar enzim yang tinggi seharusnya akan meningkatkan kadar protein yang terlarut dalam medium seperti terlihat pada Tabel 3.

Kultivasi substrat padat dengan perlakuan substrat ampas frond sagu menggunakan isolat HJ4(3b) memiliki kadar protein yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu sebesar 0,729 mg g⁻¹. Tingginya kadar protein dikarenakan substrat dapat menginduksi produksi enzim dengan baik.

Aktivitas spesifik merupakan salah satu karakter suatu enzim. Aktivitas endoglukanase melalui kultivasi substrat padat ampas frond sagu isolat HJ4(3b) menghasilkan aktivitas enzim spesifik lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yaitu sebesar 0,314 U mg⁻¹. Perlakuan panas tidak menyebabkan serat terdegradasi, namun menyebabkan peningkatan fraksi amorf dari serat. Hal ini menyebabkan Aktinomiset dapat menginduksi produksi enzim endoglukanase. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Narasimha et al. (2006) bahwa CMC merupakan sumber karbon terbaik dalam menghasilkan enzim selulase. Selulase lebih tinggi ketika CMC berfungsi sebagai substrat untuk menginduksi enzim dan dikenal sebagai penginduksi universal sintesis selulase. Aktivitas spesifik enzim dapat dilihat pada Gambar 3.

Aktivitas spesifik yang diperoleh lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas endoglukanase dari isolat seperti hasil penelitian Kiio et al. 2016 sebesar 0.0698 U/mg oleh bakteri *Bacillus licheniformis*.

Gambar 4 memperlihatkan struktur pati dan serat pada substrat tepung frond sagu (a), namun setelah

Tabel 3. Kadar protein melalui kultivasi substrat padat dan kultivasi substrat cair pada frond sagu

Table 3. Protein content produced from solid-state cultivation and submerged cultivation using sago frond

Sampel/ sample	Kadar Protein (mg/mL)/protein content	
	Kultivasi Substrat Padat/ solid-state cultivation	Kultivasi Substrat Cair / submerged cultivation
S1A1	0,596±0,016	0,558±0,011
S1A2	0,563±0,022	0,528±0,004
S2A1	0,729±0,004	0,700±0,004
S2A2	0,704±0,003	0,672±0,004

Keterangan/Remarks : S1A1 = tepung frond sagu Isolasi HJ4(3b)/S1A1 = sago frond flour Isolate HJ4(3b), S1A2 = tepung frond sagu Isolasi HJ4(5b)/ S1A2 = sago frond flour isolate HJ4(5b), S2A1 = ampas frond sagu Isolasi HJ4(3b)/ S2A1 = pulp of sago frond isolate HJ4(3b), S2A2 = ampas frond sagu Isolasi HJ4(5b)/ S2A2 = pulp of sago frond isolate HJ4(5b).

ekstraksi pada ampas frond sagu (f) menggunakan α -amilase tidak terdeteksi adanya granula pati alami. Hal tersebut membuat perbandingan kandungan serat menjadi meningkat dari sebelum ekstraksi 48.49% menjadi 60.37% sebagaimana terlihat pada Tabel 1. Setelah inkubasi, substrat mengalami perubahan struktur morfologi (Peciulyte et al. 2016). Substrat tepung frond sagu isolat HJ4(3b) (b) dan substrat ampas frond sagu isolat HJ4(3b) kultivasi substrat padat (g) terlihat bahwa miselia mampu merusak permukaan substrat. Substrat ampas frond sagu mampu meningkatkan aktivitas enzim lebih baik dibandingkan pada substrat tepung frond sagu, hal ini dikarenakan komponen serat lebih banyak pada substrat ampas frond sagu. Substrat tepung frond sagu isolat HJ4(5b) (c) dan substrat ampas frond sagu isolat HJ4(5b) kultivasi substrat padat (h) terlihat juga bahwa miselia juga mampu merusak permukaan substrat dan kedua substrat berbentuk tidak teratur. Substrat tepung frond sagu isolat HJ4(3b) (d) dan substrat ampas frond sagu isolat HJ4(3b) kultivasi substrat cair (i) terlihat bahwa miselia panjang melekat pada permukaan substrat. Hal ini yang menyebabkan enzim belum bekerja secara optimal. Substrat tepung frond sagu HJ4(5b) (e) dan substrat ampas frond sagu isolat HJ4(5b) kultivasi substrat cair (j) menunjukkan miselia menempel pada permukaan substrat yang berbentuk rongga dengan ujung tertutup, kedua substrat ini menghasilkan aktivitas enzim yang rendah. Tipe kultivasi mempengaruhi pertumbuhan Aktinomiset pada substrat dapat dilihat pada Gambar 4.

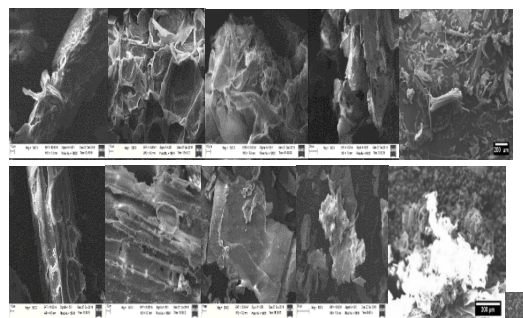
Miselia aktinomiset pada kultivasi substrat padat mampu berpenetrasi dan merusak permukaan

substrat frond sagu (b, c, g dan h) sedangkan miselia aktinomiset pada kultivasi substrat cair melekat pada permukaan substrat frond sagu (d, e, i dan j). Hal ini yang menyebabkan terjadinya degradasi selulosa selama proses inkubasi. Degradasi selulosa menyebabkan distorsi struktur morfologi lignoselulosa substrat. Jenis pengamatan ini sesuai dengan penelitian Sharma et al. (2016) yang mendegradasi lignoselulosa dengan pretreatment kimiawi. Miselia yang merusak substrat padat menyebabkan gula pereduksi yang dihasilkan lebih tinggi sehingga terjadi peningkatan aktivitas enzim.

KESIMPULAN

Isolat HJ4(3b) dan Isolat HJ4(5b) mampu menghasilkan enzim selulase pada substrat tepung frond sagu dan ampas frond sagu melalui kultivasi substrat padat dan kultivasi substrat cair. Kultivasi substrat padat menghasilkan enzim selulase lebih tinggi dibandingkan dengan kultivasi substrat cair. Selain itu, Isolat HJ4(3b) mampu menghasilkan enzim selulase lebih tinggi dibandingkan dengan isolat HJ4(5b). Substrat ampas frond sagu menghasilkan enzim selulase yang lebih tinggi dibandingkan dengan substrat tepung frond sagu.

Isolat HJ4(3b) mampu menghasilkan enzim selulase dengan substrat padat ampas frond sagu pada waktu kultivasi hari ke-9 dan aktivitas enzim endoglukanase yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan eksoglukanase.



Gambar 4. Hasil pengamatan substrat tepung frond sagu dan ampas frond sagu dengan menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM).

Figure 4. The observation of the sago frond flour and hampas substrates by using Scanning Electron Microscope (SEM).

Keterangan/Remarks : a = substrat tepung frond sagu sebelum inkubasi/ sago frond flour before incubation, b=S1A1 kultivasi substrat padat, c= S1A2 kultivasi substrat padat, d = S1A1 kultivasi substrat cair, e = S1A2 kultivasi substrat cair, f = substrat ampas frond sagu/ hampas of sago frond, g = S2A1 kultivasi substrat padat, h = S2A2 kultivasi substrat padat, i = S2A1 kultivasi substrat cair, j = S2A2 kultivasi substrat cair. Pati tergelatinisasi pada kultivasi substrat padat, pati tergelatinisasi terlarut cairan pada kultivasi substrat cair.

UCAPAN TERIMA KASIH

Publikasi ini merupakan bagian dari penelitian yang didanai melalui program ABS Fund dari CRC 990 melalui Project B02 tahun 2017 untuk Anja Meryandini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adri W, Mardiah E, dan Afrizal. Produksi Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan Kemampuannya Menghidrolisis Jerami Padi. *Jurnal Kimia Unand*. 2013;2: 103-108.
- [AOAC] Association of Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 16th ed. Washington DC (US): Association of Analytical Chemist. 1995.
- [AOAC] Association of Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington DC (US): Association of Analytical Chemist; 1998.
- [AOAC] Association of Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. 17th ed. Washington DC (US): Association of Analytical Chemist. 2000.
- Arja MO. Cellulases in the Textile Industry. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Spain: Springer; 2007. p. 51:63.
- Asem D, Leo VV, Passari AK, Tonsing MV, Joshi JB, Uthandi S, et al. Evaluation of Gastrointestinal Bacterial Population for the Production of Holocellulose Enzymes for Biomass Deconstruction. *Plos One*. 2017;10:1-17.
- Ayona J, Pooja N, Athira SA, Lekshmi M. A Comparison of Selected Enzyme Activities by Marine Fungal and Mangrove Actinomycete Isolates. *Int J Sci Eng Res*. 2016; 7:1706-1708.
- Bintoro MH, Pratama AJ, Ahmad F, Nurulhaq MI, Mulyanto MR, Ayulia L. Pembangunan dan Pemberdayaan Masyarakat Pinggiran melalui Sagu. Bogor: IPB Press; 2017. 5 p.
- Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye-binding. *Anal Biochem*. 1976;72: 248-254.
- Das P, Solanki R, Khanna M. Isolation and Screening of Cellulolytic Actinomycetes from Diverse Habitats. *Int J Adv Biotechnol Res*. 2014;5:438-451.
- Flach M. Sago Palm: *Metroxylon Sagu* Rottb. Rome : International Plant Genetic Resource Institute. 1997.
- Fujii S, Kishihara S, Tamaki H, Komoto M. Studies on Improvement of Quality of Sago Starch Part II Effect of the Manufacturing Condition on the Quality of Sago Starch. *Sci Rept Fac Agr Kobe Univ*. 1986;17: 97-106.
- Goyal V, Mittal A, Bhuwal AK, Singh G, Yadav A, Aggarwal NK. Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus* sp. 313SI under Stationary and Shaking Conditions. *Biotechnol Res Int*. 2014;1-7.
- Ghose TK. Measurement of Cellulase Activities. *Int Union Pure & Appl Chem*. 1987;59(2): 257-268.
- Immanuel G, Dhanusha R, Prema P, Palavesam A. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int J Environ Sci Tech*. 2006;3(1): 25-34.
- Irfan M, Safdar A, Syed Q, Nadeem M. Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria from Soil and Optimization of Cellulase Production and Activity. *Turk J Biochem*. 2012;37(3):287-293.
- Janaki T. Enzyme from Actinomycetes-Review. *Int J Chemtech Res*. 2017;10(2):176-182.
- Junior GSF, Amorim MVF, Souza CG, Sousa DM, Sousa KA, Pinto GAS. Strategies to Increase Cellulase Production with Submerged Fermentation using Fungi Isolated from the Brazilian Biome. *Acta Sci Biol Sci*. 2015;37(1): 15-22.
- Kiio IK, Jackim MF, Munyali WB, Muge EK. Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* Strain Vic Isolated from Geothermal Wells in the Kenyan Rift Valley. *Open Biotechnol J*. 2016;10:198-207.
- Kim TI, Jeong KH, Ham JS, Yang CB, Chung IB, Kim MK, et al. Isolation and characterization of cellulase secreting bacterium from cattle manure: application to composting. *Compost Sci Util*. 2004;12(3):242-248.
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Res*. 2011;1-10.
- Ladeira SA, Cruz E, Delatorre AB, Barbosa JB, Martins MLL. Cellulase Production by Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its Detergent Compatibility. *EJB*. 2015;1-6.
- Liang X, Youshida T, Uryu Toshiyuki. Direct saccharification and ethanol fermentation of cello-oligosaccharides with recombinant yeast. *Carbohydr Polym*. 2012;91:157-161.
- Liang Y, Yesuf J, Schmitt S, Bender K, Bozzola J. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36 : 961-970.
- Maryanty Y, Pristiarti H, dan Ruliawati P. Produksi Crude Lipase dari *Aspergillus niger* pada Substrat Onggok Menggunakan Metode Fermentasi Fasa Padat. *Prosiding Seminar Rekayasa Kimia dan Proses*. 2010;1411-4216.
- McMillan JD, Jennings EW, Mohagheghi A, Zuccarello M. Comparative Performance of Precommercial Cellulases Hydrolyzing Pretreated Corn Stover. *Biotechnol Biofuels*. 2011;4(29): 1-17.
- Megashah LN, Ariffin H, Zakaria MR, Ando Y. Characteristics of cellulose from oil palm mesocarp fibres extracted by multi-step pretreatment methods. *IOP Conf Series: Materials Sci Eng*. 2018;1-9.
- Meryandini A, Sunarti TC, Naomi A, Mutia F. Using *Streptomyces* Xylanase to Produce Xylooligosaccharide from Corn cob. *Biotropia*. 2008;15: 119-128.

29. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959;31:426-428.
30. Mrdula S, Murugammal R. Production of Cellulose by *Aspergillus niger* under Submerged and Solid State Fermentation using Coir Waste as a Substrate. *Braz J Microbiol.* 2011;3:1119-1127.
31. Murni SW, Kholisoh SD, Tanti DL, dan Petrissia EM. Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”. 2011;1693-4933.
32. Nagah M, Abdel-Aziz MS, El-Sherbiny GM, Moghannem SAM, Shawky BT. Qualitative and Quantitative Screening of Cellulases from Different Local Egyptian Fungal Strains. *Mid East J App Sci.* 2016;6:579-587.
33. Narasimha G, Sridevi A, Viswanath B, M CS, B RR. Nutrient Effects on Production of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. *Afr J Biotechnol.* 2006;5:472-476.
34. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New Developments in Solid State Fermentation: I Bioprocesses and Products. *Process Biochem.* 2000;35:1153-1169.
35. Peciulyte A, Kiskis J, Larsson PT, Olsson L, Enejder A. Visualization of Structural Changes in Cellulosic Substrates during Enzymatic Hydrolysis using Multimodal Nonlinear Microscopy. *Cellulose.* 2016;23: 1521-1536.
36. Pointner M, Kuttner P, Obrlik T, Jager A, Kahr H. Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agric Res.* 2014;12(2) : 391-396.
37. Rathnan RK, Ambili M. Cellulase Enzyme Production by *Streptomyces* sp. Using Fruit Waste as Substrate. *Aust J Basic Appl Sci.* 2011;5:1114-1118.
38. Rulianah S, Irfan Z, Mufid, Prayitno. Produksi Crude Selulase dari Bahan Baku Ampas Tebu Menggunakan Kapang *Phanerochaete chrysosporium*. *J Tek Kim Ling.* 2017;1:17-27.
39. Sadhu S, Saha P, Sen SK, Mayilraj S, Miti T. Production, Purification and Characterization of Novel Thermotolerant Endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* Strain Isolated from Cow Dung. *Springerplus J India.* 2013;2(1):1-10.
40. Sharma S, Sharma V, Kuila A. Cellulase Production Using Natural Medium and its Application on Enzymatic Hydrolysis of Thermo Chemically Pretreated Biomass. *3 Biotech.* 2016;6: 1-11.
41. Shobana P, Maheswari NU. Production of Cellulase from *Aspergillus fumigatus* Under Submerged and Solid State Fermentation Using Agricultural Waste. *Int J Adv Pharm Biol Chem.* 2013;4:595-599.
42. Shweta A. Solid State Fermentation for Cellulase Production. *Biotechnol Res J.* 2015;1: 108-112.
43. Silva VCT, Coto ALS, Souza RC, Neves MBS, Gomes E, Bonilla-Rodriguez GO. Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and α -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterotha lica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation. *Biochem Res Int.* 2016;1-9.
44. Singh S, Singh VK, Aamir M, Dubey MK, Patel JS, Upadhyay RS, Gupta VK. Cellulase in Pulp and Paper Industry. In: Gupta V, editors. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.* 1st Ed. Ireland:Elsevier; 2016. p. 152-162.
45. Singhal R, Kennedy J, Gopalakrishnan SM, Kaczmarek A, Knill CJ, Akmar PF. Industrial production, processing, and utilization of sago palm-derived products. *Carbohydr Polym.* 2008;72:1–20.
46. Srivastava N, Srivastava M, Mishra PK, Singh P, Ramteke PW. Application of Cellulases in Biofuels Industries. *J Biofuels and Bioenergy.* 2015;1:55-63.
47. Subramaniam R, Vimala R. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: a Comparative Study. *Int J Sci Nature.* 2012;3: 480-486.
48. Sunarti TC, Derosya V, Yuliasih I. Acid Modification of Sago Hampas for Industrial Purposes. In: Ehara H, Toyoda Y, Johnson DV, editors. *Sago Palm: Multiple Contributions to Food Security and Sustainable Livelihoods.* Singapore: Springer; 2018. p.271-281.
49. Tasaso P. Optimization of reaction condition for synthesis of carboxymethyl cellulose from oil palm fronds. *Int J Chem Eng Appl.* 2015;6:101-104.
50. Van Soest PJ. Use of Detergent in Analysis of Fibrous Feeds III. *The Handbook of Dietary Fiber.* New York (US). 1965.
51. Vinotha T, Maheswari NU. Optimization of Cellulolytic Bacteria from Cellulose Waste Materials and its Activity. *Int J Pharm Sci.* 2014;57:333-337.
52. Wahyuningtyas P, Argo BD, dan Nugroho WA. Studi Pembuatan Enzim Selulase dari Mikrofungi *Trichoderma reesei* dengan Substrat Jerami Padi sebagai Katalis Hidrolisis Enzimatis pada Produksi Bioetanol. *J Bioproses Komoditas Tropis.* 2013;1: 21-25.
53. Yadav MPR, Chauhan MPB, Gahlout M, Prajapati MH. Isolation, Screening and Optimization of Process Parameters for Enhanced Production of Cellulase by Solid State Fermentation. *Int J Adv Res Bio Sci.* 2016;3: 21-27.