

## Enzim Selulase Kasar *Aspergillus niger* FNCC 6018 untuk Produksi Bioetanol melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak

### *Crude Cellulase Enzyme of Aspergillus niger FNCC 6018 for Bioethanol Production through Simultaneous Saccharification and Fermentation Process*

Rosyida VT<sup>1</sup>, Hayati SN<sup>1</sup>, Indrianingsih AW<sup>1</sup>, Maryana R<sup>2</sup>, Purwestri YA<sup>3</sup>, Ayesda CS<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kelompok Penelitian Proses Bahan Alam, Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, Lembaga Ilmu Pengtahuan Indonesia, Gunungkidul, D.I. Yogyakarta 55861

<sup>2</sup>Kelompok Penelitian Teknologi Kimia dan Lingkungan, Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam, Lembaga Ilmu Pengtahuan Indonesia, Gunungkidul, D.I. Yogyakarta 55861

<sup>3</sup>Dosen Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Sleman, D.I. Yogyakarta 55281

<sup>4</sup>Alumni Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Sleman, D.I. Yogyakarta 55281

Rosyida VT, Hayati SN, Indrianingsih AW, Maryana R, Purwestri YA, Ayesda CS. 2018 – Enzim Selulase Kasar *Aspergillus niger* FNCC 6018 untuk Produksi Bioetanol melalui Proses Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak. Jurnal Mikologi Indonesia 2 (2): 77–89

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mendapatkan kondisi pertumbuhan optimum pH, suhu, dan waktu inkubasi dari *Aspergillus niger* FNCC 6018 untuk produksi enzim selulase kasar dengan aktivitas spesifik maksimum pada substrat bagas tebu. Aktivitas spesifik maksimum *A. niger* FNCC 6018 dioptimasi dengan perlakuan variasi pH 5, 6, 7; suhu 27, 37, 50°C dan waktu inkubasi 5, 7, 9 hari. Kondisi optimum yang diperoleh digunakan untuk memproduksi enzim selulase kasar dan selanjutnya digunakan dalam proses produksi bioetanol. Produksi bioetanol dilakukan dengan metode *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) pada suhu ruang, pH 5, selama 5 hari menggunakan substrat bagas tebu, enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018, khamir *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012, dan medium SSF. Pada akhir tahap SSF, kadar glukosa diukur dengan metode *DNS* (*Dinitro Salisilat*) sedangkan kadar etanol diukur dengan metode *Gas Chromatography*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk produksi enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 berada pada pH 5, suhu 37°C, waktu inkubasi 9 hari dengan aktivitas spesifik selulase kasar sebesar 0.107 U/mg. Kadar glukosa dan etanol maksimal dengan metode SSF adalah 0.59 mg/mL dan 1.217%. Metode ini cukup potensial untuk produksi bioetanol dari bagas tebu.

**Kata kunci** – bagas tebu – *Saccharomyces cerevisiae* – kadar glukosa – kadar etanol – biofuel

## Abstract

The purpose of this research was to obtain the optimum growth condition of pH, temperature, and incubation time of *Aspergillus niger* FNCC 6018 to produce crude cellulase enzyme from sugarcane bagasse, that used for bioethanol production. Optimization for a crude enzyme production was conducted at pH variation of 5, 6, 7; temperature variation of 27°C, 37°C, 50°C; and time incubation variation of 5, 7, 9 days. Bioethanol was produced using Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) method. Sugarcane bagasse was incubated at room temperature, pH 5, during 5 days by adding *A. niger* FNCC 6018 crude enzyme, *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012, and SSF medium. Glucose concentration was measured by DNS method (Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar). Ethanol concentration was measured by Gas Chromatography method. The result showed that the optimum condition of crude cellulase enzyme activity from *A. niger* FNCC 6018 was achieved at pH 5, 37°C and 9 days incubation. The maximum cellulase specific activity was 0.107 U/mg. The highest glucose and ethanol concentrations produced through SSF method using this method was 0.590 mg/mL and 1.217%, respectively. This method is potential for bioethanol production from sugarcane bagasse.

**Key words** – Sugarcane bagasse – *Saccharomyces cerevisiae* – glucose concentration – ethanol concentration – biofuel

## Pendahuluan

Kelangkaan bahan bakar fosil sebagai bahan baku utama bahan bakar minyak (BBM) dan adanya efek pemanasan global serta pencemaran lingkungan yang ditimbulkan dari penggunaan BBM berbahan bakar fosil mendorong banyak dilakukannya pencarian bahan bakar alternatif yang bersifat terbarukan dan ramah lingkungan. Salah satu bahan bakar alternatif tersebut adalah bioetanol (Samsuri *et al.* 2006, Amores *et al.* 2013). Bioetanol merupakan senyawa alkohol yang salah satunya dapat diperoleh melalui proses fermentasi biomassa dengan bantuan mikrob, khususnya oleh kelompok khamir (Suharni *et al.* 2004). Bioetanol dihasilkan dari konversi pemanfaatan energi biomassa. Biomassa yang dimanfaatkan tersebut dapat berasal dari tanaman pertanian dan perkebunan, limbah domestik, dan limbah pertanian (Siwarasak *et al.* 2012).

Bagas merupakan biomassa dari limbah pertanian, sumber material yang murah untuk produksi bioetanol, tersedia banyak, dan memiliki kandungan karbohidrat yakni selulase tinggi dan lignin yang rendah (Samsuri *et al.* 2006). Kadar lignin yang rendah ini memudahkan dalam proses delignifikasi atau penghilangan lignin sebelum nantinya selulosa dapat dikonversi secara biologis menjadi etanol. Bagas memiliki struktur kompleks, terdiri atas 25% lignin, 25% hemiselulosa, dan 40-50% selulosa (Ray *et al.* 2011), ketiga komponen tersebut disebut lignoselulosa (Souza *et al.* 2011). Komponen bagas tersebut dapat dihidrolisis menjadi glukosa yang nantinya akan difermentasikan menjadi etanol oleh mikrob. Glukosa menyusun 60% bagian dari selulosa (Souza *et al.* 2011), sehingga semakin tingginya selulosa yang terdegradasi menjadi glukosa diharapkan semakin tinggi pula produksi bioetanol. Komponen penyusun bagas menjadikan bagas sulit untuk didegradasi secara alami (Stone 1951, Ahmed *et al.* 2012), sehingga jika terus terjadi penumpukan, akan menyebabkan pencemaran lingkungan. Penggunaan bagas sebagai biomassa dalam produksi bioetanol tentu dapat mengurangi pencemaran lingkungan.

Konversi bagas menjadi glukosa untuk difermentasi menjadi etanol dapat dilakukan melalui pemanasan, secara kimiawi dengan enzim sintetis atau secara biologis melalui hidrolisis enzim dari mikrob (Ray *et al.* 2011). Penggunaan enzim sintetis dalam produksi bioetanol kurang efisien karena tingginya biaya pembelian atau produksi enzim sintetis tersebut. Produksi enzim selulase mengambil total biaya sebesar 40% dalam proses sintesis

bioetanol (Gutierrez-Correa *et al.* 1999). Salah satu cara yang dapat digunakan untuk menekan biaya produksi bioetanol adalah memanfaatkan enzim selulase kasar dari mikroba (Siwarasak *et al.* 2012). Salah satu mikroba yang mampu menghasilkan enzim selulase adalah jamur *Aspergillus niger* (Gunam *et al.* 2010, Souza *et al.* 2011, Oyeleke *et al.* 2012).

Enzim selulase merupakan jenis *inducible-enzyme* yang akan diproduksi oleh mikroba selama terdapat substrat selulosa dalam lingkungan pertumbuhan mikroba tersebut. Demikian pula pada *A. niger*, enzim selulase akan dihasilkan untuk menghidrolisis substrat lignoselulosa menjadi monomer penyusunnya (glukosa) sehingga dapat digunakan untuk pertumbuhan (Hurst 1977, Singhanian *et al.* 2013). Aktivitas enzim selulase kasar penghidrolisis komponen bagas menjadi glukosa yang dimiliki *A. niger* sangat menentukan jumlah produksi bioetanol karena glukosa yang dihasilkan dari aktivitas enzim selulase tersebut akan dikonversi menjadi bioetanol dengan bantuan khamir melalui proses fermentasi. Salah satu khamir yang umum digunakan dalam proses fermentasi etanol ialah *Saccharomyces cerevisiae* (Samsuri *et al.* 2006). Menurut Samsuri *et al.* (2006), proses fermentasi untuk menghasilkan etanol dengan dibantu enzim selulase kasar dari mikroba dalam proses hidrolisis substrat lebih efektif dilakukan secara *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) atau sakarifikasi dan fermentasi serentak.

Aktivitas enzim selulase kasar *A. niger* yang akan digunakan dalam proses SSF sangat dipengaruhi oleh suhu, pH, dan lama waktu inkubasi. Oleh sebab itu, perlu dilakukan optimasi suhu, pH, dan waktu inkubasi untuk mendapatkan aktivitas enzim selulase kasar yang optimum. Aktivitas enzim selulase *A. niger* yang maksimum tersebut diharapkan akan menghasilkan produk glukosa yang digunakan sebagai sumber karbon khamir *S. cerevisiae* dalam fermentasi untuk menghasilkan etanol. Kondisi optimum untuk menghasilkan enzim kasar dari *A. niger* FNCC 6018 pada substrat bagas tebu dan selanjutnya digunakan dalam proses produksi bioetanol belum banyak dilaporkan, sehingga perlu dilakukan penelitian terhadap hal ini. Oleh sebab itu, optimasi suhu, pH, dan waktu inkubasi untuk mendapatkan aktivitas spesifik enzim selulase kasar optimum dan kadar etanol yang dihasilkan perlu diteliti.

## Metoda Penelitian

### ***Tahap pertama penelitian: optimasi aktivitas enzim selulase kasar A. niger FNCC 6018***

#### ***Penyiapan kultur***

Kultur murni *A. niger* FNCC 6018 diperoleh dari Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Yogyakarta (PAU UGM). *A. niger* ditumbuhkan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 11 hari hingga jumlah spora memadai. Kultur murni dibiakkan dengan cara *streak plate* dalam cawan petri.

#### ***Penghitungan jumlah spora A. niger FNCC 6018***

Penghitungan spora dilakukan untuk mengetahui jumlah spora yang akan digunakan untuk produksi enzim. Penghitungan jumlah spora dilakukan dengan metode langsung menggunakan *haemocytometer*. Mula-mula *A. niger* FNCC 6018 yang telah ditumbuhkan secara *streak plate* dalam cawan petri selama 11 hari diberi 10 ml larutan 0,1 % tween 80 dan digoyang perlahan selama 2-3 menit hingga spora terlepas (Ahmed *et al.* 2012). Selanjutnya, dengan cara aseptis larutan spora diambil dengan pipet *eppendorf* sebanyak 1 mL, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades steril. Kultur dihomogenkan sehingga diperoleh seri pengenceran  $10^{-2}$ . Kemudian diambil sebanyak 100  $\mu$ L dan dituangkan ke dalam *haemocytometer*, dan dihitung dibawah mikroskop dengan *handcounter*.

**Produksi enzim selulase kasar tahap pertama**

Kultur murni *A. niger* FNCC 6018 yang telah ditumbuhkan secara *streak plate* dalam cawan petri selama 11 hari diberi 10 mL 0,1% larutan tween 80 dan digoyang perlahan selama 2-3 menit hingga spora terlepas, lalu diencerkan hingga  $10^{-2}$ . Jumlah spora untuk produksi enzim selulase kasar yang digunakan dalam penelitian ini sebesar  $\pm 59,5 \times 10^7/\text{mL}$ . Produksi enzim selulase kasar dalam penelitian ini menggunakan Medium Nutrisi Mandels cair dengan substrat bagas tebu sebesar 2% (Ahmed *et al.* 2012, Cunha *et al.* 2012). Pada substrat bagas tebu yang digunakan, sebelumnya telah dilakukan *pretreatment* secara biologis dengan jamur Shiitake. Proses *pretreatment* merupakan proses delignifikasi bagas.

Sebanyak 50 mL Medium Nutrisi Mandels cair dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer berukuran 50 mL yang di dalamnya telah terdapat bagas tebu, kemudian disterilisasi dengan *autoclave* TOMMY SS-325 pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 2 atm selama 15 menit. Sebelum dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi bagas tebu, pH Medium Nutrisi Mandels dibuat dengan tiga variasi yakni pH 5, 6, dan 7 dengan penambahan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N dan diukur dengan pH-meter Eutech P70. Selanjutnya, ke dalam medium yang telah disterilisasi tersebut secara aseptis dimasukkan 1 mL suspensi spora sebesar  $\pm 59,5 \times 10^7/\text{mL}$ . Kemudian labu Erlenmeyer yang telah diberi suspensi spora tersebut diinkubasi dengan variasi suhu inkubasi yakni suhu  $27^\circ\text{C}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$  dalam inkubator Stuart Orbital Incubator SI500 dan inkubator (Memmert), serta variasi waktu inkubasi selama 5, 7, dan 9 hari. Secara keseluruhan terdapat 27 kombinasi dari variasi faktor pH, suhu, dan waktu inkubasi tersebut seperti pada Tabel 1.

**Tabel 1** Produksi enzim selulase kasar tahap pertama

pH	Suhu $^\circ\text{C}$	Waktu Inkubasi (Hari)		
		5	7	9
5	27	-	-	-
6		-	-	-
7		-	-	-
5	37	-	-	-
6		-	-	-
7		-	-	-
5	50	-	-	-
6		-	-	-
7		-	-	-

Keterangan: tanda – berisi nilai aktivitas spesifik enzim selulase kasar yang diperoleh

**Penghitungan aktivitas volum enzim selulase kasar (CMC-ase)**

Penghitungan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan mengukur glukosa yang dihasilkan dari proses hidrolisis selulosa oleh enzim selulase kasar dengan metode DNS (Miller 1976, Irfan *et al.* 2010). Substrat selulosa yang digunakan dalam penentuan aktivitas enzim selulase kasar ini adalah CMC. Aktivitas enzim selulase kasar ditentukan dengan cara sebagai berikut: dari tiap cairan produksi enzim diambil sampel sebanyak 1,5 mL untuk dimasukkan ke dalam *microtube*, sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$  dengan sentrifuge P selecta BL II. Selanjutnya, supernatan diambil sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup dan ditambahkan 0,5 ml substrat CMC 1% kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $50^\circ\text{C}$ . Setelah itu, ditambahkan 3 ml DNS dan dipanaskan selama 5 menit pada air

mendidih. Setiap larutan pada tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis Dynamica Holo RB-10 pada panjang gelombang 550 nm. Perhitungan untuk mendapatkan aktivitas volum enzim CMC-ase didasarkan pada 1  $\mu$ -mol glukosa = 0.18 mg dan 1 unit aktivitas CMC-ase adalah 1  $\mu$ -mol glukosa yang dihasilkan permenit.

Jika inkubasi dilakukan selama 30 menit maka 1 mg glukosa yang dihasilkan per mL adalah  $1(30 \times 0.18)$  unit = 0.185 unit, sehingga:

$$\text{Satu Unit Aktivitas Volum Enzim CMC-ase (U/ mL)} = \frac{\text{mg glukosa} \times 0.185}{\text{ml}}$$

### ***Penghitungan kandungan protein terlarut dengan Metode Lowry***

Penghitungan kadar total protein dilakukan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim selulase kasar. Penghitungan kadar total protein ini dilakukan bersamaan dengan penghitungan aktivitas enzim selulase kasar. Penghitungan kandungan total protein terlarut dilakukan dengan cara sebagai berikut: dari tiap cairan produksi enzim diambil sampel sebanyak 1,5 mL untuk dimasukkan ke dalam microtube, kemudian sampel disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C dengan sentrifuge P Selecta BL II. Selanjutnya, supernatan diambil sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup. Ke dalam tabung reaksi tertutup tersebut kemudian ditambahkan 0,5 mL Reagen D lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan 1,5 mL Reagen E dan diinkubasi pada suhu ruang selama 45 menit. Setelah itu, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis Dynamica Holo RB-10 pada panjang gelombang 750 nm. (Lowry *et al.* 1951, Irfan *et al.* 2010). Sehingga akan diperoleh nilai aktivitas spesifik enzim selulase kasar sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas spesifik enzim selulase kasar (IU/mg)} = \frac{\text{Aktivitas volum enzim selulase kasar (IU/ml)}}{\text{kandungan protein terlarut (mg/ml)}}$$

### ***Tahap kedua penelitian: penggunaan enzim selulase kasar A. niger FNCC 6018 untuk produksi bioetanol***

#### ***Produksi enzim selulase kasar tahap kedua***

Produksi enzim tahap kedua ini dilakukan dengan perlakuan suhu, pH, dan waktu inkubasi untuk aktivitas enzim selulase kasar yang optimal berdasarkan percobaan tahap pertama. Proses produksi enzim selulase kasar tahap kedua ini sama dengan produksi enzim selulase kasar tahap pertama. Penghitungan aktivitas enzim CMC-ase spesifik dilakukan pada enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 yang digunakan untuk produksi etanol melalui SSF.

#### ***Pembuatan inokulum S. cerevisiae FNCC 3012***

Kultur murni *S. cerevisiae* FNCC 3012 yang diperoleh dari PAU UGM Yogyakarta ditanam dalam medium PDA secara *streak plate* dan diinkubasi selama 3 hari. Kemudian dari kultur tersebut diambil secara aseptis sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan ke dalam *microtube* berisi 1 mL medium inokulum cair lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, dari dalam *microtube* berisi biomassa *S. cerevisiae* FNCC 3012 tersebut secara aseptis diambil sebanyak 0,5 mL kemudian diinokulasikan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL medium inokulum cair dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam, dari dalam tabung reaksi tersebut diambil sebanyak 5 mL kemudian diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer berisi 100 mL medium inokulum cair. Setelah 24 jam, dari dalam Erlenmeyer 100 mL tersebut diambil sebanyak 5

mL kemudian diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer berisi 100 mL medium inokulum cair. Setelah 24 jam, dari dalam erlenmeyer 100 mL tersebut diambil 25 mL kemudian diinokulasikan ke dalam Erlenmeyer berisi 500 mL medium inokulum cair dan diinkubasi selama 24 jam, kemudian inokulum tersebut siap digunakan untuk proses produksi bioetanol.

### ***Produksi bioetanol dengan proses Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)***

Produksi bioetanol dilakukan di dalam *flask* berukuran 100 mL yang berisi total volume medium fermentasi sebanyak 80 ml dengan komposisi medium sebagai berikut: medium SSF sebanyak 12,5%; substrat bagas tebu sebanyak 2%; buffer sitrat pH 5 sebanyak 47,5%; inokulum *S. cerevisiae* FNCC 3012 25%, dan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 yang diperoleh dari tahap produksi enzim kedua sebanyak 15% (Wahono *et al.* 2014). Inokulum *S. cerevisiae* FNCC 3012 yang digunakan sebelumnya ditumbuhkan pada medium inokulum khamir. Selanjutnya, *flask* tersebut ditutup rapat dengan aluminium foil dan plastik seal, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang (Wahono *et al.*, 2014). Pada hari ke-5 dilakukan pengukuran kadar etanol menggunakan *Gas Chromatography* dan pengukuran gula reduksi dengan metode DNS (Miller 1976).

### ***Pengukuran Kadar Etanol***

Pengukuran kadar etanol dilakukan dengan cara hasil SSF disaring secara aseptis menggunakan kertas Whatmann No.41 steril dan dimasukkan ke dalam *flask*. Sampel cairan hasil proses penyaringan tersebut kemudian ditutup rapat dengan aluminium foil dan plastik seal. Selanjutnya, kadar etanol dari sampel tersebut diukur menggunakan *Gas Chromatography*.

### ***Pengukuran Gula Reduksi dengan Metode DNS (Miller, 1976)***

Sebanyak 0,5 mL larutan sampel hasil penyaringan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan reagen DNS sebanyak 3 mL. Selanjutnya, campuran larutan tersebut dihomogenkan dan kemudian dipanaskan selama 7 menit. Setelah itu, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis Dynamica Holo RB-10 pada panjang gelombang 550 nm. (Irfan *et al.* 2010).

### ***Rancangan Percobaan***

Penelitian ini pada tahap pertama menggunakan rancangan acak kelompok pola faktorial yang terdiri dari tiga faktor. Faktor pertama adalah suhu saat inkubasi produksi enzim selulase dengan 3 variasi, yakni 27°C, 37°C, dan 50°C. Faktor kedua yakni pH saat inkubasi produksi enzim selulase dengan 3 variasi yakni 5, 6, dan 7. Faktor ketiga adalah lama inkubasi produksi enzim selulase dengan 3 variasi yakni 5, 7, dan 9 hari. Kemudian pada tahap kedua menggunakan tiga faktor yakni pH, suhu, dan waktu inkubasi, masing-masing terdiri dari 2 variasi. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 ulangan. Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan dianalisis statistik dengan *Analysis of Variance* (ANOVA), apabila berpengaruh secara nyata terhadap parameter yang diamati dilanjutkan dengan uji Duncan. Analisis data dilakukan dengan program SPSS.

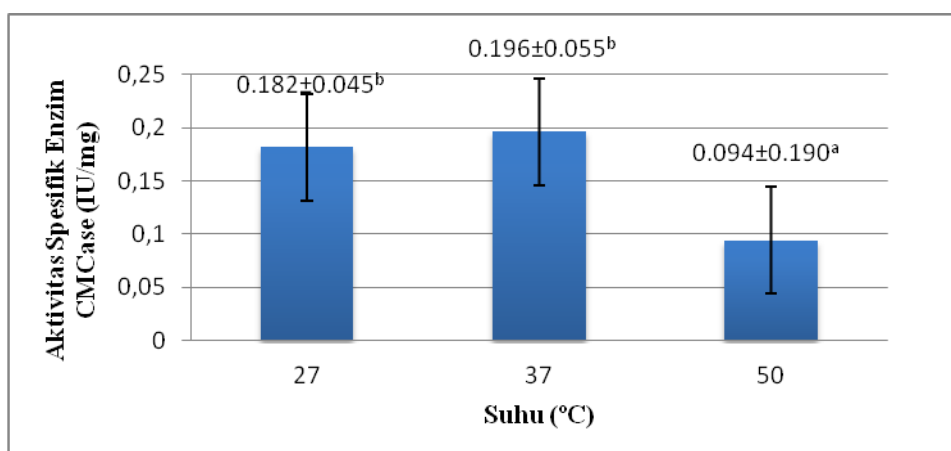
## **Hasil**

### ***Optimasi aktivitas enzim selulase kasar A. niger FNCC 6018***

Pada penelitian ini dilakukan dua tahapan. Tahapan pertama yakni optimasi aktivitas spesifik enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018. Optimasi dilakukan dengan cara menentukan pH awal medium, suhu inkubasi, dan waktu inkubasi *A. niger* FNCC 6018 dalam

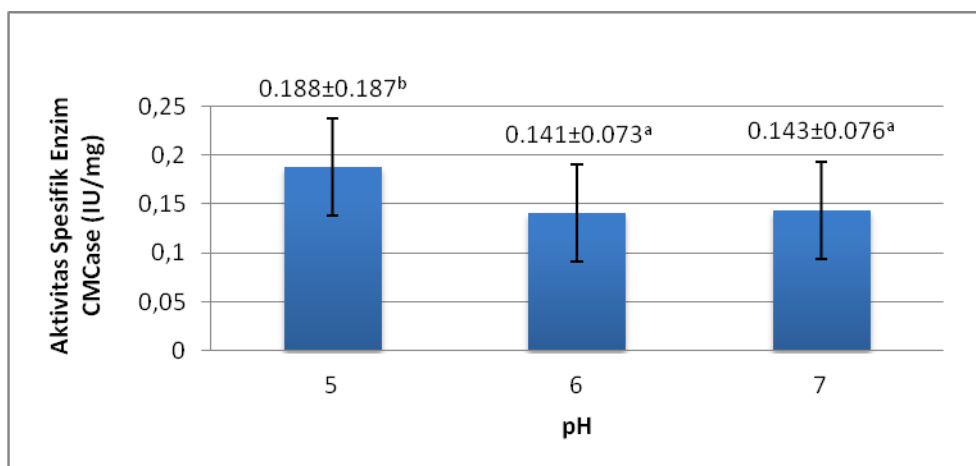
memproduksi enzim selulase kasar. Optimasi dilakukan untuk mendapatkan kondisi pH awal medium, suhu inkubasi dan waktu inkubasi yang menyebabkan aktivitas spesifik enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 optimum. Kondisi optimum ini akan digunakan untuk produksi enzim pada tahap kedua yang langsung digunakan dalam proses SSF produksi etanol.

Hasil analisis menunjukkan bahwa aktivitas spesifik enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 memiliki nilai yang berbeda pada tiap perlakuan suhu (Gb. 1). Pada suhu 27°C dan suhu 37°C menunjukkan hasil yang berbeda namun tidak signifikan, yakni sebesar  $0.18171 \pm 0.045$  U/mg pada suhu 27°C dan sebesar  $0.19642 \pm 0.055$  U/mg pada suhu 37°C, sedangkan pada suhu 50°C menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan suhu 27°C dan 37°C.



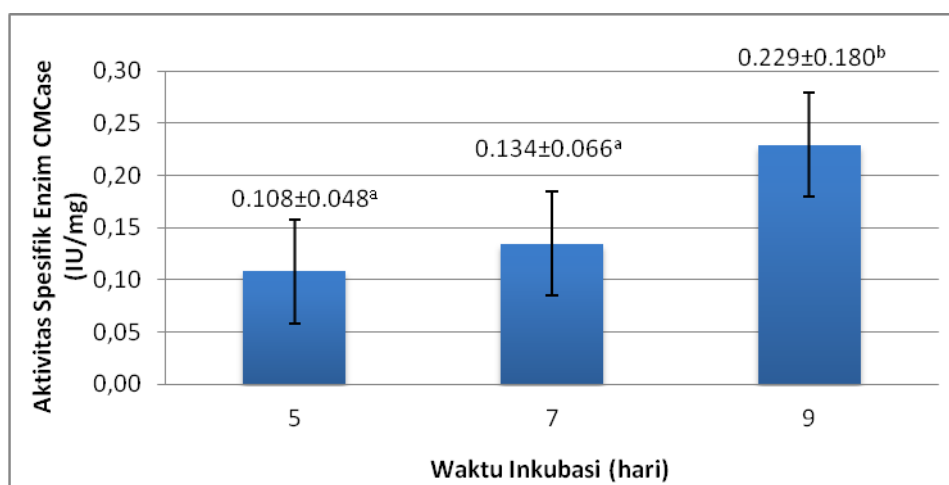
**Gambar 1** Rerata aktivitas spesifik enzim (U/mg) *A. niger* FNCC 6018 pada tiap variasi perlakuan suhu. Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, huruf yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ( $P > 0,05$ )

Pada hasil penelitian ini, terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim tidak berbeda nyata pada pH 6 dan pH 7, yakni sebesar  $0.141 \pm 0.073$  U/mg pada pH 6 dan  $0.143 \pm 0.076$  U/mg pada pH 7 (Gb. 2). Walaupun tidak berbeda nyata, namun pada pH 7 menunjukkan aktivitas spesifik enzim yang sedikit lebih tinggi. Oleh sebab itu, pada produksi enzim kedua untuk proses SSF produksi etanol digunakan variasi perlakuan pH 5 dan pH 7.



**Gambar 2** Rerata aktivitas spesifik enzim (U/mg) *A. niger* FNCC 6018 pada tiap variasi perlakuan pH. Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, huruf yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ( $P>0,05$ )

Pada hari ke-5, ke-7, hingga hari ke-9 waktu inkubasi terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim selulase (Gb. 3). Peningkatan aktivitas spesifik enzim tersebut menunjukkan semakin lama waktu inkubasi hingga mencapai waktu inkubasi optimum menyebabkan semakin lama enzim selulase menghidrolisis substrat bagas tebu untuk menghasilkan produk glukosa. Semakin banyak produk glukosa yang dihasilkan menunjukkan semakin meningkatnya aktivitas spesifik enzim selulase.



**Gambar 3** Rerata aktivitas spesifik enzim (U/mg) *A. niger* FNCC 6018 pada tiap variasi perlakuan waktu inkubasi. Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, huruf yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ( $P>0,05$ )

### ***Penggunaan enzim selulase kasar A. niger FNCC 6018 untuk produksi bioetanol melalui SSF***

Tahapan kedua dalam penelitian adalah produksi bioetanol dengan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018. Produksi bioetanol dilakukan melalui SSF. Dalam proses SSF terjadi dua tahapan yakni proses hidrolisis substrat bagas tebu oleh enzim selulase kasar dari *A. niger* menjadi glukosa kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi glukosa oleh *S.*



*cerevisiae* FNCC 3012 menjadi etanol. Metode SSF ini digunakan agar glukosa hasil hidrolisis langsung difermentasikan oleh *S. cerevisiae*, sehingga tidak ada glukosa yang telah terhidrolisis kembali lagi menjadi polisakarida. Pada tahap kedua penelitian ini diperoleh hasil aktivitas spesifik enzim paling maksimal pada perlakuan pH 5, suhu 37°C, waktu inkubasi 9 hari yakni sebesar 0,10732 U/mg (Tabel 2). Uji Duncan pada data aktivitas enzim menunjukkan nilai aktivitas enzim pada perlakuan pH 5 suhu 37°C waktu inkubasi 9 hari tersebut berbeda nyata dengan nilai aktivitas enzim pada perlakuan lainnya

**Tabel 2** Rerata aktivitas spesifik enzim *A. niger* FNCC 6018 (IU/mg) tahap kedua penelitian

Variasi Perlakuan		Waktu Inkubasi (Hari)	
pH	Suhu (°C)	7	9
5	27	0.05245 <sup>a</sup>	0.09887 <sup>b,c</sup>
7	27	0.04953 <sup>a</sup>	0.09332 <sup>b,c</sup>
5	37	0.09729 <sup>b,c</sup>	0.10732 <sup>c</sup>
7	37	0.04764 <sup>a</sup>	0.07534 <sup>b</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, huruf yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ( $P>0,05$ ).

Aktivitas spesifik enzim pada perlakuan perlakuan pH 5, suhu 37°C, waktu inkubasi 9 hari merupakan yang paling tinggi, namun kadar glukosa paling tinggi terdapat pada penggunaan enzim perlakuan perlakuan pH 5, suhu 27°C, waktu inkubasi 9 hari (Tabel 3).

**Tabel 3** Rerata kadar glukosa (mg/mL) hasil proses SSF menggunakan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018

Variasi Perlakuan		Waktu Inkubasi (Hari)	
pH	Suhu (°C)	7	9
5	27	0,472 <sup>a,b</sup>	0,619 <sup>b</sup>
7	27	0,427 <sup>a</sup>	0,485 <sup>a,b</sup>
5	37	0,387 <sup>a</sup>	0,590 <sup>b</sup>
7	37	0,416 <sup>a</sup>	0,511 <sup>a,b</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, huruf yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ( $P>0,05$ ).

**Tabel 4** Rerata kadar etanol (%) hasil proses SSF menggunakan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018

Variasi Perlakuan		Waktu Inkubasi (Hari)	
pH	Suhu (°C)	7	9
5	27	1,217 <sup>a</sup>	1,022 <sup>a</sup>
7	27	1,059 <sup>a</sup>	0,729 <sup>a</sup>
5	37	1,082 <sup>a</sup>	1,068 <sup>a</sup>
7	37	1,081 <sup>a</sup>	0,991 <sup>a</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata, huruf yang sama menunjukkan perbedaan tidak signifikan ( $P>0,05$ ).

Kadar Etanol hasil SSF dengan enzim selulase kasar *A. niger* 6018 dan *S. cerevisiae* FNCC 3012 paling tinggi pada perlakuan penggunaan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 dengan perlakuan pH 5 suhu 27°C waktu inkubasi 7 hari yakni sebesar 1,217% (Tabel 4).

## Pembahasan

Pada perlakuan suhu 50°C terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim selulase kasar memiliki nilai yang sangat kecil bila dibandingkan dengan perlakuan suhu 27°C dan 37°C, yakni sebesar  $0.09415 \pm 0.190$  U/mg. Hal ini dikarenakan suhu yang terlalu tinggi dapat mengubah konformasi enzim selulase termasuk konformasi sisi aktif enzim, sehingga menurunkan peluang penempelan enzim selulase dengan substrat bagas tebu. Selain itu, suhu yang terlalu tinggi dapat mendenaturasi bagian protein enzim yakni apoenzim (Lehninger, 1982). Rendahnya aktivitas spesifik enzim selulase kasar pada suhu 50°C juga disebabkan karena rendahnya pertumbuhan *A. niger* pada medium. Hal ini ditunjukkan dari tidak adanya miselium pada medium pertumbuhan *A. niger* di suhu 50°C. Suhu yang terlalu tinggi juga menyebabkan terjadinya denaturasi DNA dan menurunkan konsentrasi asam lemak pada membran sel *A. niger* (Annous *et al.* 1999). Konsentrasi asam lemak yang rendah menyebabkan membran sel kehilangan fluiditas, sehingga sel akan pecah ketika pembelahan sel. Adanya denaturasi DNA dan penurunan konsentrasi asam lemak pada membran sel *A. niger* akan mengganggu pertumbuhan sel *A. niger* dalam medium.

Suhu memiliki peran penting dalam aktivitas metabolik mikroba, termasuk jamur (Mrudula & Murugammal 2011). Penelitian Mrudula dan Murugammal (2011) menunjukkan aktivitas selulase *A. niger* mengalami penurunan pada perlakuan suhu inkubasi di atas 35°C dan mencapai optimum pada suhu 27°C. Penelitian Ali *et al.* (1991) menyatakan hasil maksimum dari selulase *A. niger* Z10 dan *A. terreus* dicapai pada suhu 40°C. Hasil penelitian terdahulu oleh Asquiere dan Park (1992) juga menunjukkan aktivitas enzim *A. niger* optimum pada suhu inkubasi 37°C.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan aktivitas enzim selulase *A. niger* FNCC 6018 meningkat hingga mencapai maksimum pada suhu optimum yakni 37°C. Hal ini menunjukkan suhu memiliki peran penting dalam reaksi enzimatik yang berpengaruh pada aktivitas spesifik enzim. Ketika suhu bertambah hingga mencapai suhu optimum, gerak thermal molekul akan meningkat, fraksi molekul yang memiliki energi dalam meningkat untuk memasuki keadaan transisi (Lehninger 1982). Dengan demikian, kecepatan reaksi enzimatik meningkat maka aktivitas enzim meningkat. Selain itu, peningkatan suhu inkubasi sampai suhu optimum, meningkatkan energi kinetik yang akan meningkatkan pergerakan baik molekul enzim maupun substrat, sehingga akan meningkatkan peluang bertemunya sisi aktif enzim selulase dengan substrat bagas tebu untuk menghasilkan produk (glukosa).

Pada perlakuan variasi pH, aktivitas enzim selulase *A. niger* FNCC 6018 mencapai maksimum pada pH 5 yakni sebesar  $0.18791 \pm 0.187$  U/mg dan mengalami penurunan pada pH 6 dan pH 7. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pH 5 merupakan pH optimum untuk aktivitas enzim selulase *A. niger* FNCC 6018. Menurut Lehninger (1982) sifat ionik dari gugus karboksil dan gugus amino pada molekul enzim dipengaruhi oleh pH. Kondisi pH yang tidak sesuai akan menyebabkan perubahan pada sisi aktif atau sisi katalitik enzim sehingga menurunkan peluang pertemuan antara substrat dengan sisi aktif enzim yang kemudian menyebabkan penurunan aktivitas enzim (Zakpa *et al.* 2009). Profil pH enzim menggambarkan pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik (sisi aktif) enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan (Lehninger 1982). Dengan demikian, pH 5 merupakan pH yang ideal untuk mendukung terjadinya pertemuan atau penempelan substrat bagas tebu pada sisi aktif enzim selulase *A. niger* FNCC 6018 sehingga reaksi hidrolisis substrat bagas tebu menghasilkan produk glukosa menjadi

maksimum. Hasil penelitian Al-Ka'aby (2012) juga menunjukkan aktivitas selulase *A. niger* pada substrat tebu (*saw dust*) maksimum pada pH 5 yakni sebesar 0.083 U/mL. Devi dan Kumar (2012) menghasilkan penelitian aktivitas selulase *A. niger* pada substrat limbah industri kertas maksimum juga pada pH 5 yakni sebesar 3,9 U/mL. Demikian pula dengan hasil penelitian Kiranmayi (2011) juga menunjukkan aktivitas selulase *A. niger* pada substrat limbah alam maksimum pada pH 5 yakni sebesar 0.098 U/mL.

Pada hasil penelitian ini, terlihat bahwa aktivitas spesifik enzim tidak berbeda nyata pada pH 6 dan pH 7, yakni sebesar  $0.141 \pm 0.073$  U/mg pada pH 6 dan  $0.143 \pm 0.076$  U/mg pada pH 7. Walaupun tidak berbeda nyata, namun pada pH 7 menunjukkan aktivitas spesifik enzim yang sedikit lebih tinggi. Oleh sebab itu, pada produksi enzim kedua untuk proses SSF produksi etanol digunakan variasi perlakuan pH 5 dan pH 7.

Pada perlakuan variasi waktu inkubasi, hasil penelitian menunjukkan waktu inkubasi 9 hari menghasilkan aktivitas spesifik enzim *A. niger* FNCC 6018 yang maksimal yakni  $0.229 \pm 0.180$  U/mg. Hasil tersebut juga berbeda nyata dengan hasil aktivitas enzim pada waktu inkubasi 5 hari, sebesar  $0.108 \pm 0.048$  U/mg dan waktu inkubasi 7 hari sebesar  $0.134 \pm 0.066$  U/mg. Hal ini menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 9 hari kontak antara sisi aktif enzim selulase dengan substrat bagas tebu mencapai optimum, sehingga proses hidrolisis substrat bagas tebu oleh enzim selulase untuk menghasilkan produk juga optimum. Peningkatan aktivitas spesifik enzim selulase terjadi dari hari ke-5, ke-7, hingga hari ke-9 waktu inkubasi. Peningkatan aktivitas spesifik enzim tersebut menunjukkan semakin lama waktu inkubasi hingga mencapai waktu inkubasi optimum menyebabkan semakin lama enzim selulase menghidrolisis substrat bagas tebu untuk menghasilkan produk glukosa. Semakin banyak produk glukosa yang dihasilkan menunjukkan semakin meningkatnya aktivitas spesifik enzim selulase.

Produk dari hidrolisis substrat oleh enzim selulase kasar *A. niger* adalah gula reduksi atau glukosa. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa kadar glukosa hasil proses hidrolisis yang tertinggi terdapat pada proses SSF dengan penggunaan enzim perlakuan pH 5, suhu 27°C, waktu inkubasi 9 hari yakni sebesar 0,619 mg/ml. Berdasarkan uji Duncan hasil tersebut berbeda tidak nyata dengan kadar glukosa dari pemanfaatan enzim perlakuan pH 5, suhu 37°C, waktu inkubasi 9 hari yakni sebesar 0,590 mg/ml. Hasil kadar glukosa tersebut sebanding dengan paling tingginya aktivitas spesifik enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 pada perlakuan pH 5, suhu 27°C, waktu inkubasi 9 hari dan perlakuan pH 5, suhu 37°C, waktu inkubasi 9 hari dibandingkan aktivitas spesifik enzim perlakuan lain. Aktivitas spesifik enzim pada perlakuan perlakuan pH 5, suhu 37°C, waktu inkubasi 9 hari merupakan yang paling tinggi, namun kadar glukosa paling tinggi terdapat pada penggunaan enzim perlakuan perlakuan pH 5, suhu 27°C, waktu inkubasi 9 hari. Hal ini dapat terjadi dikarenakan enzim selulase kasar yang digunakan dalam proses SSF belum berupa enzim murni sehingga aktivitas spesifik enzim tersebut dalam menghidrolisis substrat menjadi glukosa belum stabil, masih bisa meningkat maupun menurun. Hal tersebut dapat mempengaruhi jumlah glukosa hasil hidrolisis

Aktivitas spesifik enzim selulase kasar pada penelitian ini secara keseluruhan sebanding dengan hasil kadar etanol meskipun kadar maksimum tidak pada perlakuan penggunaan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 dengan aktivitas paling tinggi. Hal ini dapat disebabkan karena enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 digunakan langsung dalam proses SSF tanpa pemurnian sehingga aktivitas spesifik enzim selulase tersebut belum stabil, bisa meningkat dan bisa menurun. Aktivitas spesifik enzim merupakan ukuran kemurnian suatu enzim, nilainya meningkat selama pemurnian enzim lalu menjadi maksimum dan tetap (konstan) jika enzim sudah berada pada keadaan murni (Lehninger 1982).

Kadar etanol hasil SSF dengan enzim selulase kasar *A. niger* 6018 dan *S. cerevisiae* FNCC 3012 paling tinggi pada perlakuan penggunaan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 dengan perlakuan pH 5 suhu 27°C waktu inkubasi 7 hari yakni sebesar 1,217%. Aktivitas enzim spesifik pada enzim yang digunakan untuk produksi etanol dengan kadar paling tinggi tersebut memang bukan aktivitas spesifik maksimal namun dapat menghasilkan kadar etanol paling tinggi. Hal ini dapat disebabkan karena enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 belum murni sehingga aktivitas spesifik enzim belum stabil atau konstan saat digunakan dalam proses SSF.

Kandungan kadar etanol menggunakan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 dengan perlakuan pH 5 suhu 27°C waktu inkubasi 7 hari paling tinggi daripada kadar etanol dengan perlakuan lain. Hal tersebut dapat menunjukkan bahwa aktivitas enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 relatif lebih stabil saat digunakan dalam proses SSF sedangkan aktivitas enzim spesifik selulase kasar dengan perlakuan lainnya belum stabil saat digunakan dalam proses SSF. Semakin tinggi aktivitas enzim spesifik selulase kasar menyebabkan semakin banyak selulase pada substrat bagas tebu dihidrolisis menjadi glukosa. Semakin banyak glukosa yang dihasilkan oleh aktivitas enzim, semakin banyak pula glukosa yang diubah menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* FNCC 3012, sehingga kadar etanol yang dihasilkan semakin tinggi (Moat *et al.* 2002).

Kadar etanol tertinggi (1,217%) dari substrat bagas tebu yang dihasilkan dengan pemanfaatan enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 pada penelitian ini lebih tinggi dari kadar etanol yang dihasilkan dari penelitian dengan pemanfaatan enzim selulase kasar *Trichoderma reesei* (0,590%) oleh Yudaputri (2014). Kadar etanol tertinggi pada penelitian ini juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda jauh dengan kadar etanol dari substrat bagas tebu yang telah didelignifikasi secara kimiawi yang dihasilkan melalui proses SSF dengan pemanfaatan enzim selulase murni *T. reesei* yakni sebesar 1,354 % (Wahono *et al.* 2014). Kadar etanol pada penelitian ini bila diuji statistika dengan uji Duncan, menghasilkan nilai yang berbeda tidak signifikan. Kadar etanol yang berbeda tidak signifikan tersebut dapat disebabkan karena aktivitas spesifik enzim selulase kasar *A. niger* FNCC 6018 belum stabil saat digunakan dalam medium SSF.

### Pustaka

- Ahmed FM, Rhaman SR, Gomes DJ. 2012 – Saccharification of sugarcane bagasse by enzymatic treatment for bioethanol production. *Malaysian Journal of Microbiology* 8(2), 97–103.
- Ali S, Sayed A, Sarker RI, Alam R. 1991 – Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. *World Journal Microbiology Technology* 7(1), 62–66.
- Al-Ka'aby T. 2012 – Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *Journal of Babylon University/ Pure and Applied Sciences* 20, 1300–1310.
- Amores I, Ballesteros I, Manzanares P, Saez F, Michelena G, Ballesteros M. 2013 – Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. *Electronic Journal of Energy and Environment* 1, 25–36.
- Annous BA, Kozempel MF, Kurantz M J. 1999 – Changes in membrane fatty acid composition of *Pediococcus* sp. strain NRRL B-2354 in response to growth conditions and its effect on thermal resistance. *Environmental Microbiology* 65(7), 2857–2862.
- Asquieri ER, Park YK. 1992 – Production of extracellular cellulases from the thermostable *Aspergillus* sp. *Review Microbiology* 23, 183–188.

- Cunha FM, Esperanca MN, Zangirolami TC, Badino A C, Farinas CS. 2014 – Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. *Bioresource Technology* 112, 270–274.
- Devi MC, Kumar MS. 2012 – Production, optimization, partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *Journal Microbiology Biotechnology* 2(1), 120–128.
- Gunam IBW, Buda K, Guna IMYS. 2010 – Pengaruh perlakuan delignifikasi dengan larutan NaOH dan konsentrasi substrat bagas padi terhadap produksi enzim selulase dari *Aspergillus niger* NRRL A-II, 264. *Jurnal Biologi* 14(1), 55–61.
- Gutierrez-Correa M, Portal L, Moreno P, Tengerdy RP. 1999 – Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse. *Biosource Technology* 68, 173–178.
- Hurst PL, Nielsen J, Sullivan PA, Shepherd MG. 1977 – Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry Journal* 165(1), 33–41.
- Irfan M, Nadeem M, Syed QA, Baig S. 2010 – Submerged cultivation of *Aspergillus niger* on pretreated sugarcane bagasse. *World Journal of Agricultural Science* 6(4), 466–472.
- Kiranmayi MU, Poda S, Charyulu PBBN, Vijayalakshmi M, Khrisna PV. 2011 – Studies an influence of natural biowaste on cellulase production by *Aspergillus niger*. *Journal Environmental Biology* 32, 695–699.
- Lehninger AL. 1982 – *Principles of Biochemistry*. Worth Publisher, Inc. New York, pp. 237–249.
- Lowry OH, Roser AF, Randall R. 1951 – Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry* 242, 265–275.
- Miller GL. 1976 – Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytic Chemistry* 31, 426–428.
- Moat A G, Foster JW, Spector MP. 2002 – *Microbial Physiology* 4th ed. John Wiley and Sons Inc. New York, pp. 351–353, 419–420.
- Mrudula S, Murugammal R. 2011 – Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 1119–1127.
- Oyeleke SB, Oyewole OA, Egwim EC, Dauda BEN, Ibeh EN. 2012 – Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences* 5(1), 78–83.
- Ray AK, Singhal A, Naik UC, Thakur IS. 2011 – Biodegradation and delignification of sugarcane bagasse of pulp and paper mill effluent by *Cryptococcus albidus* for production of bioethanol. *Society for Applied Biotechnology* 1(3), 387–399.
- Samsuri M, Gozan M, Hermansyah H, Prasetya B, Nasikin M, Watanabe T. 2006 – Ethanol production from bagasse with combination of cellulase-cellubiase in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using white rot fungi pre-treatment. *Journal of Chemical and Natural Resources Engineering* 3, 20–32.
- Singhania RR, Pate AM, Sukumaran RK, Larrochee C, Pandey A. 2013 – Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Biosource Technology* 127, 500–507.
- Siwarasak P, Pajantagate P, Prasertlertrat K. 2012 – Use of *Trichoderma reesei* RT-P1 crude enzyme powder for ethanol fermentation of sweet sorghum fresh stalks. *Biosource Technology* 107, 200–204.
- Souza WR, Gouvea PF, Savoldi M, Malavazi I, Bernardes LAS, Goldman MHS, Vries RP, Oliveira AV C, Goldman GH. 2011 – Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* 4, 40.
- Stone R. 1951 – Sugarcane process wastes. *Sewage and Industrial Waste* 23(8), 1025–1028.

- Suharni TT, Nastiti SJ, Soetarto AES. 2004 – Mikrobiologi Umum. Atmajaya Press. Yogyakarta, p. 54.
- Wahono SK, Darsih C, Rosyida VT, Maryana R, Pratiwi D. 2014 – Optimization of cellulose enzyme in the simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse on the second-generation bioethanol production technology. *Energy Procedia* 47, 268–272.
- Yudaputri P. 2014 – Penggunaan enzim kasar selulase *Trichoderma reesei* FNCC 6013 untuk produksi bioetanol dari ampas tebu oleh *Saccharomyces cerevisiae* FNCC 3012. Skripsi, p. 36.
- Zakpa HD, Mak-Mensah EE, Johnson FS. 2009 – Production of bioethanol from corncobs using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation. *African Journal of Biotechnology* 8(13), 3018–3022.