

Optimasi produksi selulase dari fungi selulolitik *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 yang diisolasi dari serasah daun salak (*Salacca edulis*)

Optimization of cellulase production from cellulolytic fungi *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 isolated from salak leaf litter (*Salacca edulis*)

HANA FADHILA ROHMAH^{*}, RATNA SETYANINGSIH, ARTINI PANGASTUTI, SITI LUSI ARUM SARI

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir Sutami 36A Surakarta 57 126, Jawa Tengah, Indonesia. Tel./fax.: +62-812-5104-3121, ^{*}email: hanafadhilarohmah@gmail.com

Manuscript received: 26 October 2018. Revision accepted: 21 November 2018.

Abstract. Rohmah H. F, Setyaningsih R, Pangastuti A, Sari S. A. 2018. Optimasi produksi selulase dari fungi selulolitik *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 yang diisolasi dari serasah daun salak (*Salacca edulis*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 5: 150-154. Kebutuhan enzim di bidang industri meningkat pesat dari tahun ke tahun. Enzim selulase adalah salah satu enzim yang banyak diminati oleh berbagai bidang industri. Salah satu sumber penghasil selulase adalah fungi. Produksi enzim selulase oleh fungi membutuhkan kondisi lingkungan yang optimum. Dengan demikian diperlukan langkah optimasi untuk meningkatkan produksi enzim selulase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi, suhu, dan pH optimum bagi *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 untuk memproduksi selulase, serta mengetahui aktivitas spesifik enzim selulase pada kondisi yang optimum. Fungi *T. ethacetica* SLL10 ditumbuhkan dalam media agar miring Potato Dextrose Agar (PDA) dan digunakan sebagai stok biakan. Spora dipanen dari stok biakan yang berumur 5 hari dan digunakan sebagai inokulum. Inokulum yang mengandung $5,9 \times 10^6$ spora/mL diinokulasikan ke media produksi untuk mengetahui pertumbuhan fungi dan waktu inkubasi yang optimum untuk produksi enzim selulase. Inokulum juga diinokulasikan ke media produksi untuk dilakukan optimasi dengan variasi suhu dan pH saat fermentasi. Ekstrak kasar yang didapatkan dari setiap perlakuan dihitung aktivitas enzimnya sehingga diketahui waktu inkubasi, suhu, dan pH yang optimum. Aktivitas spesifik enzim dihitung setelah selulase diproduksi kembali dalam kondisi waktu inkubasi, suhu, dan pH optimum. Fungi *T. ethacetica* SLL 10 memproduksi enzim selulase secara maksimal pada suhu 40°C dan pH 5,5 selama 10 hari inkubasi. Aktivitas spesifik enzim selulase dari *T. ethacetica* SLL 10 mencapai 3,1578 U/mg dalam kondisi waktu inkubasi, suhu, dan pH yang optimum.

Kata kunci: Selulase, *Thielaviopsis ethacetica* SLL10, optimasi produksi, daun salak

Abstract. Rohmah HF, Setyaningsih R, Pangastuti A, Sari S. A. 2018. Optimization of cellulase production from cellulolytic fungi *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 isolated from salak leaf litter (*Salacca edulis*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 5: 150-154. Cellulase enzyme is one of the highest demand enzyme by various industrial fields. Cellulase enzyme produced by various types of microorganisms, including fungi. The production of cellulase enzyme by fungi requires optimum conditions. Thus, an optimization step is needed to increase cellulase enzyme production. This study aimed to determine the optimum incubation time, temperature, and pH for *Thielaviopsis ethacetica* SLL10 to produce cellulase, and to determine the specific activity of cellulase enzymes in optimum conditions. *T. ethacetica* SLL10 was grown in potato dextrose agar (PDA) medium and it's used as a culture stock. Spores were harvested from a 5-day-old culture stock and used as an inoculum. Inoculum containing $5,9 \times 10^6$ spores/mL were inoculated into production medium to determine the growth of fungi and optimum incubation time for cellulase enzyme production. Inoculum was inoculated too into the production medium for optimization in temperature and pH variation during fermentation. The crude extract obtained from each treatment was calculated for enzyme activity so that the optimum incubation time, temperature and pH were known. Enzyme-specific activity was calculated after cellulase was reproduced in conditions of optimum incubation time, temperature and pH. *T. ethacetica* SLL 10 produced cellulase enzyme maximally at 40°C and pH 5.5 for 10 days of incubation. The specific activity of cellulase enzyme from *T. ethacetica* SLL 10 reached 3,1578 U/mg under optimum conditions.

Keywords: Cellulase, *Thielaviopsis ethacetica* SLL10, production optimization, salak leaf

PENDAHULUAN

Berbagai industri membutuhkan enzim spesifik untuk diaplikasikan dalam pengolahan bahan baku. Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri adalah enzim selulase. Sumber enzim yang paling diminati berasal dari mikroorganisme. Salah satu enzim yang

banyak digunakan dalam bidang industri adalah enzim selulase (Nigam 2013).

Selulase memiliki aplikasi yang luas di bidang industri. Selulase berperan penting dalam industri makanan, *wine*, pembuatan bir, industri tekstil, binatu, kertas dan industri hasil pertanian (Sher et al. 2017). Selulase juga berperan penting dalam industri pakan hewan (Suprayudi et al.

2011). Selain itu, selulase juga banyak diaplikasikan dalam bidang energi misalnya untuk produksi *biofuel*, sumber energi alternatif pengganti bahan bakar fosil (Srivastava et al. 2017).

Kebutuhan selulase di bidang industri sangat tinggi, sedangkan produksi enzim selulase membutuhkan waktu yang cukup lama. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, perlu diketahui kondisi optimum produksi selulase sehingga dapat dihasilkan dalam jumlah banyak dalam waktu singkat. Optimasi produksi selulase dari mikroorganisme selulolitik diharapkan dapat memenuhi kebutuhan enzim selulase yang semakin meningkat.

Serasah tumbuhan yang berupa ranting dan dedaunan memiliki komponen selulosa yang tinggi. Komponen selulosa pada limbah serasah mencapai 45% dari berat kering bahan (Perez et al. 2002). Salah satu kelompok tumbuhan yang memiliki kandungan selulosa tinggi adalah kelompok *Palmae*. Kelapa sawit memiliki komponen selulosa sebesar 50,78% pada bagian batangnya (Lai dan Idris 2013). Anggota kelompok *Palmae* yang lain adalah tanaman salak (*Salacca edulis*). Dengan fakta tersebut, tanaman salak kemungkinan juga mengandung komponen selulosa yang tinggi sehingga fungi selulolitik dapat ditemukan pada serasah daun salak.

Fungi dari genus *Thielaviopsis* merupakan patogen yang menyerang berbagai jenis tanaman, baik tanaman pangan maupun nonpangan. Fungi ini bahkan telah menjadi ancaman yang cukup serius untuk tanaman kehutanan (Rahayu et al. 2015). Mengingat kemampuan *Thielaviopsis* dalam menyebabkan kerusakan pada berbagai tanaman, fungi ini berpotensi sebagai penghasil enzim selulase. Selulosa merupakan komponen terbesar penyusun dinding sel tumbuhan. Selulosa hanya dapat didegradasi dengan bantuan enzim selulase.

Sari et al. (2017) berhasil melakukan isolasi terhadap fungi selulolitik dari serasah daun salak. Salah satu fungi yang memiliki aktivitas selulolitik tinggi adalah *Thielaviopsis ethacetica* SLL10. Fungi ini memiliki aktivitas selulolitik yang lebih tinggi daripada *Penicillium* sp. *T. ethacetica* SLL10 diharapkan dapat menjadi produsen enzim selulase yang banyak dibutuhkan dalam berbagai bidang industri. Penelitian menggunakan fungi dari genus *Thielaviopsis* untuk produksi enzim selulase masih jarang ditemukan.

Waktu inkubasi, suhu, dan pH memiliki pengaruh yang signifikan dalam produksi selulase (Maan et al. 2016). Suhu mempengaruhi sekresi enzim ekstraseluler dengan cara mengubah bentuk fisik membran sel. pH mempengaruhi pertumbuhan *strain* mikroba yang berdampak pada pembentukan produk metabolit (Kaseke et al. 2016). Dengan demikian, optimasi produksi selulase penting dilakukan untuk mencapai hasil yang maksimal. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui waktu inkubasi, suhu, dan pH yang optimum untuk produksi selulase dari fungi selulolitik *T. ethacetica* SLL10 yang diisolasi dari serasah daun salak (*Salacca edulis*). Penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui aktivitas spesifik enzim selulase dari fungi selulolitik *T. ethacetica* SLL10 pada waktu inkubasi, suhu, dan pH yang optimum.

BAHAN DAN METODE

Pemeliharaan biakan

Fungi *T. ethacetica* SLL10 ditumbuhkan di dalam media agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*) pada suhu inkubasi 28°C sebagai stok biakan dan disimpan pada suhu 4°C.

Pembuatan inokulum

Spora dipanen dari stok biakan yang berumur 5 hari untuk dibuat inokulum (Pandey et al. 2016). Inokulum yang digunakan memiliki konsentrasi spora $5,9 \times 10^6$ /mL.

Pengamatan pertumbuhan dan optimasi waktu inkubasi

Sebanyak 1 mL inokulum dimasukkan dalam 50 mL media produksi. Media produksi yang digunakan adalah *Mandels mineral salts solution* (urea 0,3 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,4 g/L; KH_2PO_4 2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/L; pepton 0,75 g/L; dan selulosa 30 g/L). Inokulum diinkubasi dalam inkubator *shaker* dengan agitasi 200 rpm pada suhu 30°C selama 14 hari. *Sampling* dilakukan setiap 48 jam dan sampel yang diambil pada hari ke 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14 merupakan sampel yang terpisah. Biomassa yang terbentuk selama proses inkubasi diukur berat keringnya dan selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim dari ekstrak kasar yang terbentuk.

Optimasi produksi selulase

Optimasi suhu dilakukan pada variasi suhu inkubasi 25, 30, 35, 40, dan 45°C dengan agitasi 200 rpm selama waktu inkubasi optimum. Sampel disaring untuk diambil filtratnya yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim. Optimasi pH dilakukan pada variasi pH media 4,5; 5; 5,5; 6,0; dan 6,5. Inkubasi dilakukan pada suhu inkubasi optimum dengan agitasi 200 rpm selama waktu inkubasi optimum. Sampel disaring untuk diambil filtratnya yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim (Devi dan Kumar 2012).

Uji aktivitas enzim selulase

Penentuan aktivitas enzim selulase dilakukan dengan metode DNS. Sebanyak 1 mL CMC 1% yang dicampur dengan 0,8 mL buffer sodium sitrat (50 mM; pH 5), ditambah dengan 0,2 mL ekstrak kasar dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sampel diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan reagen 3,5-dinitrosalicic acid (DNS) ke dalam tabung reaksi. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Pandey et al. 2016). Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan sebagai berikut (Kombang 2004).

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Dimana:

AE = Aktivitas enzim (Unit/mL)

C = Konsentrasi glukosa (ppm)

- BM = Berat molekul glukosa (180 gram/mol)
 t = Waktu inkubasi (menit)
 H = Volume total enzim substrat (mL)
 E = Volume enzim (mL)

Uji Kadar protein dengan Metode Bradford

Enzim selulase yang diproduksi pada waktu inkubasi, suhu, dan pH optimum diuji kadar protein terlarutnya menggunakan metode Bradford. Sebanyak 40 µl sampel enzim selulase ditambahkan dalam 2 mL larutan Bradford. Larutan tersebut kemudian divorteks dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan kemudian diukur pada $\lambda = 595$ nm (Hasanah dan Saskiawan 2015).

Penghitungan aktivitas spesifik enzim selulase

Aktivitas spesifik enzim selulase dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Anggarawati 2012).

$$AS = \frac{AE}{K}$$

Dimana:

AS = Aktivitas spesifik enzim (Unit/mg)

AE = Aktivitas enzim (Unit/mL)

K = Kadar protein terlarut (mg/mL)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Inkubasi optimum untuk produksi enzim selulase

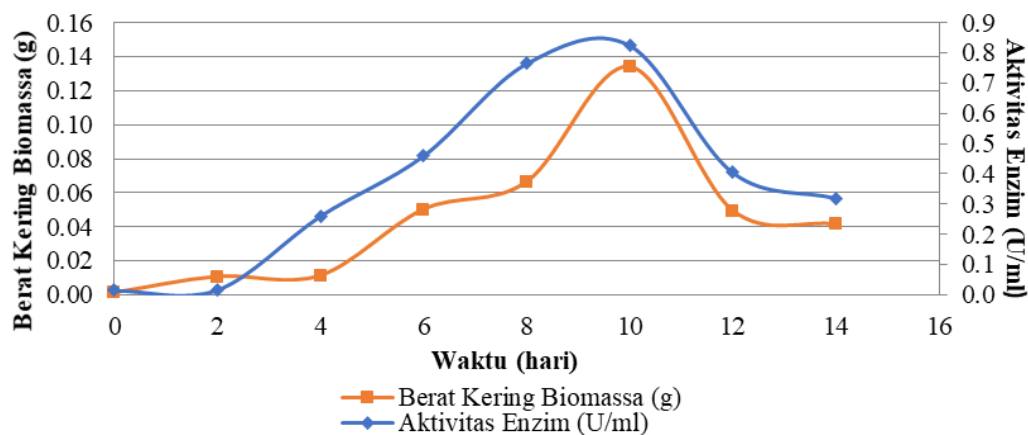
Selama masa inkubasi, fungi mengalami beberapa fase pertumbuhan. Hari ke-0 hingga hari ke-4 fungi mengalami fase adaptasi. Setelah hari ke-4 hingga hari ke-10, fungi mengalami fase eksponensial. Setelah hari ke-10 inkubasi, berat kering biomassa fungi mengalami penurunan yang signifikan (Gambar 1).

Enzim selulase disekresikan fungi selama masa pertumbuhan. Selulase digunakan oleh fungi untuk menembus *barrier* dari inang sehingga fungi dapat masuk ke jaringan inang (Gandjar dan Sjamsuridzal 2006). Produksi enzim selulase oleh *T. ethacetica* SLL10 diketahui berdasarkan aktivitas enzim yang dihasilkan. Aktivitas enzim mengalami peningkatan dari hari ke-2 hingga hari ke-10 inkubasi, kemudian mengalami penurunan hingga hari ke-14. Aktivitas enzim tertinggi menunjukkan hasil 0,8250 U/mL yang didapatkan selama 10 hari inkubasi. Aktivitas puncak tersebut terjadi pada saat fungi mengalami fase eksponensial.

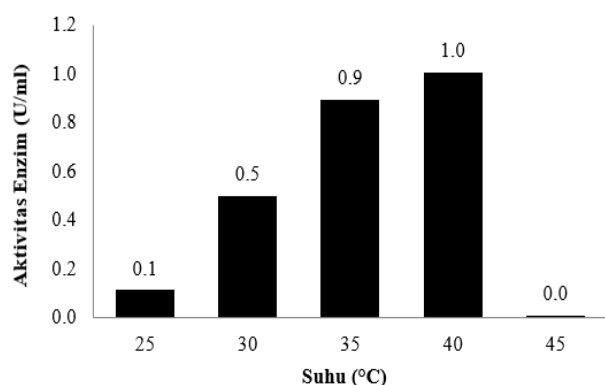
Waktu inkubasi berkaitan erat dengan produksi enzim dan metabolisme lainnya hingga batas tertentu. Inkubasi dalam waktu yang terlalu lama menyebabkan penipisan nutrisi sehingga menekan kondisi fisiologis fungi yang berdampak pada menurunnya produksi enzim (Gautam et al. 2011). *Strain* yang berbeda memiliki waktu inkubasi yang berbeda untuk produksi enzim secara maksimal. Aktivitas enzim selulase dari *Chalara* (Syn. *Thielaviopsis paradoxa* CH32 meningkat dari hari ke-9 hingga hari ke-15 kultivasi dan menurun setelah hari ke-21 (Lucas et al. 2001). Produksi selulase pada fungi *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467) mengalami peningkatan pada tahap awal fermentasi, yaitu pada hari ke-1 sampai ke-3 dan selanjutnya mengalami penurunan (Gologuri et al. 2015).

Suhu inkubasi optimum untuk produksi enzim selulase

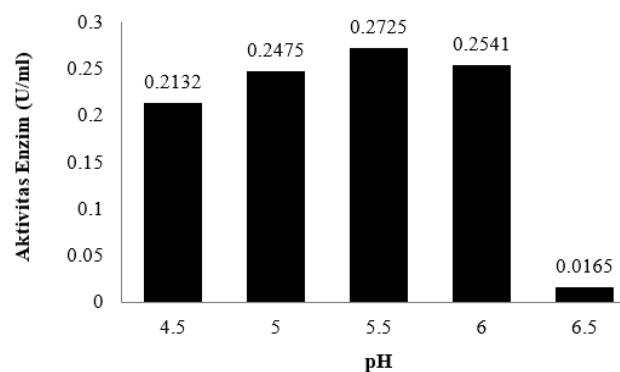
Produksi enzim dari fungi *T. ethacetica* SLL10 berbanding lurus dengan suhu inkubasi hingga mencapai suhu optimum. Pada suhu 25°C, aktivitas enzim yang dihasilkan adalah 0,1120 U/mL. Aktivitas enzim mengalami peningkatan hingga suhu 40°C dan menurun secara signifikan pada suhu 45°C. Pada suhu 40°C, aktivitas enzim dari *T. ethacetica* SLL10 mencapai 1,0186 U/mL, sedangkan pada suhu 45°C, aktivitas enzim yang dihasilkan hanya 0,0058 U/mL (Gambar 2).



Gambar 1. Pertumbuhan dan produksi enzim selulase dari *T. ethacetica* SLL10 selama 14 hari



Gambar 2. Produksi enzim selulase dari *T. ethacetica* SLL10 pada suhu 25-45°C



Gambar 5. Produksi Enzim Selulase dari *T. ethacetica* SLL10 pada pH 4,5-6,5

Pada suhu tinggi, mikroorganisme tumbuh lebih cepat tetapi produksi enzim tidak maksimal karena mikroorganisme lebih cepat mengalami penuaan. Sebaliknya, pada suhu rendah, pertumbuhan mikroorganisme lebih lambat sehingga siklus untuk memproduksi enzim lebih lambat. Dengan demikian, mikroorganisme mesofil lebih sesuai jika ditumbuhkan pada suhu sedang agar proses produksi enzim lebih efektif (Srivastava et al. 2017).

Suhu optimum untuk produksi selulase berbeda-beda tergantung pada variasi *strain* mikroorganisme. *Penicillium* sp. menghasilkan enzim sebesar 9,83 U/mL pada suhu 30°C (Prasanna et al. 2016). Sethi dan Gupta (2014) menjelaskan bahwa fungi selulolitik *A. Niger* memproduksi enzim secara optimum pada suhu 40°C dengan aktivitas enzim mencapai (0,63 U/mL). Studi terhadap suhu yang optimum untuk produksi selulase dari fungi selulolitik juga dilaporkan oleh Gupta et al. (2015). Produksi selulase oleh *strain* fungi CG-5 dan CG-10 mencapai maksimum pada suhu 32°C dan mengalami penurunan setelah peningkatan produksi Gupta et al. (2015).

pH inkubasi optimum untuk produksi enzim selulase

Produksi enzim oleh *T. ethacetica* SLL10 meningkat dari pH 4,5 hingga pH 5,5, kemudian menurun pada pH 6 dan 6,5. Aktivitas enzim mengalami kenaikan hingga batas tertentu dan selanjutnya mengalami penurunan setelah melewati pH optimum. Produksi enzim terbaik terjadi pada pH 5,5 yang diketahui berdasarkan aktivitas enzim yang dihasilkan. Pada pH 5,5, aktivitas enzim mencapai puncak yaitu 0,2725 U/mL. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pH 5,5 adalah pH optimum bagi *T. ethacetica* SLL10 untuk memproduksi enzim selulase (Gambar 3).

Perubahan pH mempengaruhi produksi enzim pada fungi. Fungi memiliki sistem regulasi pH yang berguna untuk mengontrol segala aktivitas, termasuk sekresi dan sintesis enzim. Lingkungan asam akan menginduksi sistem regulasi yang bertugas khusus untuk mengontrol aktivitas pada lingkungan asam, termasuk produksi enzim. Sebaliknya, ketika lingkungan basa, hanya sistem regulasi yang bertugas khusus untuk mengontrol aktivitas di lingkungan basa yang akan terinduksi (Polizeli dan Rai 2014). Dengan demikian, akan terjadi perbedaan hasil

produksi enzim yang dihasilkan pada lingkungan asam dan basa.

Setiap mikroorganisme memiliki pH minimum, optimum, dan maksimum yang berbeda-beda untuk pertumbuhannya (Anggarani dan Rusijono 2015). Penelitian dari Devi dan Kumar (2012) membuktikan bahwa fungi selulolitik *A. Niger* memproduksi enzim secara optimum pada pH 5 dengan aktivitas enzim mencapai 3,9 U/mL). Kondisi yang sama juga terjadi pada fungi *Penicillium chrisogenum* yang menghasilkan selulase dengan aktivitas lebih dari 0,5 U/mL (Kaur dan Joshi 2015). Akan tetapi, Li et al. (2013) melaporkan bahwa pH optimum untuk produksi endoglukanase pada *Trichoderma reesei* adalah 4,5.

Aktivitas spesifik enzim selulase

Aktivitas spesifik enzim selulase dari *T. ethacetica* SLL10 sebesar 3,1578 U/mg. Pada kondisi waktu, suhu, dan pH inkubasi optimum, *T. ethacetica* SLL10 memiliki aktivitas enzim dan kadar protein berturut-turut sebesar 0,3521 U/mL dan 0,1115 mg/mL. Semakin tinggi nilai aktivitas spesifik enzim, semakin murni enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme lebih banyak memproduksi enzim dibandingkan dengan produksi protein lain selama masa pertumbuhannya. Sebaliknya, semakin rendah nilai aktivitas spesifik enzim, semakin banyak protein lain yang turut diproduksi oleh mikroorganisme selama masa pertumbuhannya.

Enzim selulase termasuk protein ekstraseluler. Protein ekstraseluler cenderung bersifat adaptif sehingga sintesisnya hanya akan terjadi jika terdapat induser. Induser yang digunakan dalam penelitian ini adalah substrat. Substrat yang digunakan hanya satu jenis sehingga fungi terpicu untuk menghasilkan satu jenis protein ekstraseluler. Protein intraseluler cenderung bersifat konstitutif. Sintesis protein intraseluler terjadi setiap saat dan tidak bergantung pada ada tidaknya substrat. Protein ini berperan penting dalam proses metabolisme sel.

Aktivitas spesifik selulase dari fungi *T. ethacetica* SLL10 yang mencapai 3,1578 U/mg tersebut menandakan bahwa pertumbuhan fungi sudah didukung oleh faktor lingkungan yang optimum. Kondisi optimum tersebut dapat

diterapkan untuk proses pertumbuhan fungi *T. ethacetica* SLL10 pada penelitian selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada program studi Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah menyediakan sarana dan prasarana selama berlangsungnya proses penelitian hingga selesainya naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggaran MA, Rusijono. 2015. Optimasi Pengawetan Produk Jamur Tiram Segar sebagai Upaya Penguatan Industri Olahan Jamur. *Jurnal Sains dan Matematika* 3 (2): 50-55.
- Anggarawati D. 2012. Aktivitas Enzim Selulase Isolat SGS 2609 BBP4B-KP Menggunakan Substrat Limbah Pengolahan Rumpun Laut yang Dipretreatment dengan Asam. [Skripsi]. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Devi MC, Kumar MS. 2012. Production, Optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *J Microbiol Biotechnol Res* 2 (1): 120-128.
- Gandjar I, Sjamsuridzal W. 2006. Mikologi: Dasar dan Terapan. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Gautam SP, Bundela PS, Pandey AK, Khan J, Awasthi MK, Sarsaiya S. 2011. Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnol Res Intl* 2011: 1-8.
- Goluguri BR, Thulluria C, Addepally U, Shetty PR. 2015. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC1467): Purification and kinetic characterization. *Intl J Biological Macromolecules* 82 (2016): 823-829.
- Gupta C, Jain P, Kumar, Dixit AK, Jain RK. 2015. Production of cellulase enzyme from isolated fungus and its application as efficient refining aid for production of security paper. *International J Applied Microbiol Biotechnol Res* 3: 11-19.
- Hasanah N, Saskiawan I. 2015. Aktivitas selulase isolat jamur dari limbah media tanam jamur merang. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Agustus 2015.
- Kaseke ZM, Okaiyeto K, Nwodo UU, Mabinya LV, Okoh AI. 2016. Optimization of cellulase and xylanase production by *Micrococcus* species under submerged fermentation. *Sustainability* 8 (1168): 1-15.
- Kaur HP, Joshi D. 2015. Optimization of Cellulase Produced by Fungus Isolated from Water. *World J Pharm Pharmaceut Sci* 4 (2): 521-534.
- Lai LW, Idris A. 2013. Disruption of oil palm trunks and fronds by microwave-alkali pretreatment. *Bioresource* 8 (2): 2792-2804.
- Li Y, Liu C, Bai F, Zhao X. 2016. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. *Bioresour Technol* 2016: 503-510.
- Lucas, Robles RA, Garcí'a MT, Cienfuegos GA, Ivez AG. 2001. Production, purification, and properties of an endoglucanase produced by the Hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *J Agric Food Chem* 49: 79-85.
- Maan P, Bharti AK, Gautam S, Dutt D. 2016. Screening of Important factors for xylanase and cellulase production from the fungus *C. cinerea* RM-1 NFCCI-3086 through Plackett-Burman experimental design. *BioResources* 11 (4): 1869-1974.
- Nigam SP. 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules* 3: 597-611.
- Perez J, Munoz-Dorado J, Rubia T, Martinez J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: an Overview. *Intl Microbiol* 5: 53-63.
- Polizeli MLTM, Rai M. 2014. *Fungal Enzymes*. CRC Press, Boca Raton.
- Prasanna HN, Ramanjaneyulu G, Reddy BR. 2016. Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. *Biotech* 6: 162.
- Rahayu S, Nurjanto HH, Pratama RG. 2015. Karakter Jamur *Ceratocystis* sp. Penyebab Penyakit Busuk Batang pada *Acacia decurrens* dan Status Penyakitnya di Taman Nasional Gunung Merapi, Yogyakarta. *Jurnal Ilmu kehutanan* 2 (5): 94-104.
- Pandey AK, Edgard G, Negi S. 2016. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP-factorial design technique and application in Sorghum Stover based bioethanol production. *Renew Energ* 98: 51-56.
- Sari SLA, Setyaningsih R, Wibowo NFA. 2017. Isolation and screening of cellulolytic fungi from *Salacca zalacca* leaf Litter. *Biodiversitas* 18 (3): 1282-1288.
- Sethi BK, Das AS, Satpathy A, Behera BC. 2016. Ethanol production by a cellulolytic fungus *Aspergillus terreus* NCF 4269.10 using agro-waste as a substrate. *Biofuel* 8 (2): 207-2013.
- Sher H, Faheem M, Ghani A, Mehmood R, Rehman H, Bukhori SAI. Optimization of cellulase enzyme production from *Aspergillus oryzae* for industrial application. *World J Biotechnol* 2 (2): 155-158.
- Suprayudi, M.A., W. Dimahesa, D. Jusadi, M. Setiawati, J. Ekasari. 2011. Suplementasi crude enzim cairan rumen domba pada pakan berbasis sumber protein nabati dalam memacu pertumbuhan ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ikhtologi Indonesia* 11 (2): 177-183.
- Srivastava N, Srivastava M, Manikanta A, Singh P, Ramteke PW, Mishra PK, Malhotra BD. 2017. Production and optimization of physicochemical parameters of cellulase using untreated orange waste by newly isolated *Emericella varicolor* NS. *Appl Biochem Biotechnol* 183 (2): 601-612.