



## PENGARUH KONDISI KULTUR PADA AKTIVITAS SELULASE ISOLAT *Pycnoporus* sp. DAN *Phlebiopsis* sp.

Luciasih Agustini\*, Ragil S.B. Irianto, Maman Turjaman, Sarah Asih Faulina, Resti Ariantari,  
Sira Stephandra, Herni Yuniar, Aryanto, Najmulah, Ahmad Yani  
Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan  
Jl. Gunung Batu No.5 Bogor 16118

Diterima : 29 Juli 2017, Revisi akhir : 23 Desember 2017, Disetujui terbit : 30 Desember 2017

### ***EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON CELLULASE ACTIVITIES PRODUCED BY *Pycnoporus* sp. AND *Phlebiopsis* sp.***

#### **ABSTRACT**

*The effects of media, pH and temperature on cellulase-complex enzyme produced by *Pycnoporus* sp. FORDACC-03452 and *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482 cultivated in rice bran and corn cobs media under solid state fermentation with pH 4–7 and temperature 30°C–45°C were investigated. Rice bran media showed a propensity to induce endo- $\beta$ ,1,4-glucanase and cellobiohydrolase productions, while corn cobs media induce  $\beta$ -glucosidase production. However, the mixture of rice bran and corn cobs did not result in better cellulase-complex enzyme activities. Cellulase-complex produced by *Pycnoporus* sp. showed superior activities compared to those produced by *Phlebiopsis* sp. Crude enzyme of *Pycnoporus* sp. showed optimum specific-activities of endo- $\beta$ ,1,4-glucanase at pH 6, temperature 35°C ( $0.403 \pm 0.010$  IU/mg), cellobiohydrolase at pH 6, temperature 40°C ( $0.540 \pm 0.020$  IU/mg) and  $\beta$ -glucosidase at pH 4, temperature 30 °C ( $0.022 \pm 0.001$  IU/mg). While *Phlebiopsis* sp. showed optimum specific-activities of endo- $\beta$ ,1,4-glucanase at pH 6, temperature 35°C ( $0.202 \pm 0.005$  IU/mg), cellobiohydrolase at pH 4, temperature 45°C ( $0.180 \pm 0.002$  IU/mg) and  $\beta$ -glucosidase at pH 6, temperature 45°C ( $0.007 \pm 0.001$  IU/mg). Due to low  $\beta$ -glucosidase activities, the cellulase-complex generated from this study were not able to completely hydrolyse lignocellulosic waste and yielded insufficient sugars content. Further investigation to optimize cellulase-complex production from these fungal isolates is still required.*

*Keywords: *Pycnoporus* sp., *Phlebiopsis* sp., endo- $\beta$ ,1,4-glucanase, cellobiohydrolase, and  $\beta$ -glucosidase*

#### **ABSTRAK**

Penelitian pengaruh media kultivasi, pH dan suhu inkubasi terhadap produksi enzim selulase-kompleks dari *Pycnoporus* sp. FORDACC-03452 dan *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482 yang ditumbuhkan di media dedak padi dan tongkol jagung dengan metode kultur padat pada variasi pH 4–7 dan suhu 30°C–45°C, telah dilakukan. Hasil memperlihatkan bahwa media dedak padi cenderung menginduksi produksi endo- $\beta$ ,1,4-glukanase dan selobiohidrolase, sedangkan media tongkol jagung menginduksi produksi  $\beta$ -glukosidase. Namun, campuran kedua substrat tersebut tidak menghasilkan aktivitas selulase yang lebih baik. Selulase-kompleks yang dihasilkan *Pycnoporus* sp. menunjukkan aktivitas lebih baik dibandingkan dengan yang diproduksi *Phlebiopsis* sp. Filtrat kasar *Pycnoporus* sp. menunjukkan aktivitas-spesifik endo- $\beta$ ,1,4-glukanase optimum pada pH 6, suhu 35°C ( $0,403 \pm 0,010$  IU/mg); selobiohidrolase pada pH 6, suhu 40°C ( $0,540 \pm 0,020$  IU/mg); dan  $\beta$ -glukosidase pada pH 4, suhu 30°C ( $0,022 \pm 0,001$  IU/mg). Sementara, *Phlebiopsis* sp. menunjukkan aktivitas-spesifik endo- $\beta$ ,1,4-glukanase optimum pada pH 6, suhu 35°C ( $0,202 \pm 0,005$  IU/mg); selobiohidrolase pada pH 4, suhu 45°C ( $0,180 \pm 0,002$  IU/mg); dan  $\beta$ -glukosidase pada pH 6, suhu 45°C ( $0,007 \pm 0,001$  IU/mg). Rendahnya aktivitas  $\beta$ -glukosidase menyebabkan selulase-kompleks dari penelitian ini belum dapat menghidrolisis limbah lignoselulosa dengan sempurna dan kadar glukosa yang diperoleh masih rendah. Oleh karena itu, optimasi produksi selulase-kompleks dari *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. masih perlu diteliti lebih lanjut.

Kata kunci: *Pycnoporus* sp., *Phlebiopsis* sp., endo- $\beta$ ,1,4-glukanase, selobiohidrolase,  $\beta$ -glukosidase

\* Alamat korespondensi :  
E-mail: [luci-agustini@forda-mof.org](mailto:luci-agustini@forda-mof.org)

## PENDAHULUAN

Selulase merupakan enzim ketiga terbanyak, selain protease dan amilase, yang diproduksi secara komersial di seluruh dunia karena pemanfaatannya yang luas (Gurung *et al.*, 2013). Pada industri pulp dan kertas, selulase antara lain berperan dalam proses *bleaching*, *deinking* enzimatis, mengurangi pemakaian klorin, dan meningkatkan efektifitas pengeringan. Pada industri tekstil, selulase berperan pada proses *biostoning* bahan denim (jeans), *biopolishing* serat tekstil, mengurangi pewarnaan yang berlebih, dan meningkatkan kecerahan warna kain. Pada industri makanan, enzim ini dapat membantu meningkatkan hasil ekstraksi pati dan protein, melembutkan tekstur, dan memperbaiki kualitas produk kue dan roti, serta memperkuat rasa dan aroma dari senyawa *volatile* produk-produk berbahan dasar buah-buahan dan sayur-sayuran (Kuhad *et al.*, 2011; Mohanram *et al.*, 2013). Kebutuhan selulase ini akan semakin meningkat jika suatu saat bioetanol dari limbah biomassa berkayu (*cellulosic-ethanol*), sebagai salah satu bahan bakar alternatif, diproduksi dalam skala besar (Banerjee, Scott-Craig and Walton, 2010).

Salah satu kendala dalam proses produksi bioetanol ini adalah tahap hidrolisis selulosa menjadi senyawa gula yang akan difermentasi menjadi etanol (Vishwakarma and Banerjee, 2016). Hal ini terutama berkaitan dengan kompleksitas substrat lignoselulosa itu sendiri. Selulosa pada biomassa berkayu ini terintegrasi dalam struktur yang kompleks dengan komponen-komponen lain, yaitu lignin, hemiselulosa, dan pektin, sehingga proses untuk mendapatkan gula dari substrat berlignoselulosa yang bersifat *recalcitrant* menjadi tantangan tersendiri dan sampai saat ini masih terus diteliti upaya optimasi prosesnya (Sun *et al.*, 2016). Selulase yang digunakan pada proses produksi *cellulosic ethanol* ini perlu disesuaikan dengan jenis bahan baku (limbah biomassa) serta proses perlakuan awal delignifikasi agar etanol yang diperoleh lebih optimal (Banerjee *et al.*, 2010). Penelitian untuk memperoleh selulase yang efektif untuk hidrolisis biomassa berlignoselulosa terus dilakukan.

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dapat diproduksi oleh berbagai jenis mikroorganisme, baik dari kelompok bakteri, maupun fungi. Darisekian banyak mikroorganisme

penghasil selulase di alam, bakteri *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, fungi *Trichoderma*, dan *Aspergillus* adalah genera yang telah banyak diteliti secara intensif oleh para peneliti di seluruh dunia (Ang *et al.*, 2013). Bahkan sejumlah strain unggulan *Trichoderma* dan *Aspergillus* telah dikembangkan sebagai penghasil selulase secara komersial (Ul-Haq *et al.*, 2005).

Jamur pelapuk putih dari kelompok Basidiomycota telah diketahui sebagai dekomposer lignoselulosa yang efisien karena dapat mensekresikan 2 tipe enzim ekstraseluler sekaligus, yaitu: (1) sistem enzim hidrolitik yang mampu mengurai selulosa dan hemiselulosa; dan (2) sistem enzim oksidatif yang mampu mendegradasi lignin. Sistem enzim hidrolitik terdiri sejumlah enzim, diantaranya endo-1,4- $\beta$ -glukanase, selobiohidrolase (ekso-1,4- $\beta$ -glukanase),  $\beta$ -glukosidase, dan xylanase; sedangkan sistem enzim oksidatif terdiri dari enzim lakase, mangan peroksidase dan lignin peroksidase (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015). Enzim-enzim penyusun selulase-kompleks memiliki peran yang sinergis dalam mengurai rantai polimer selulosa menjadi glukosa sebagai sumber karbon untuk menunjang pertumbuhan dan siklus hidup fungi tersebut (Falkoski *et al.*, 2012). Endo-1,4- $\beta$ -glukanase berperan dalam mengurai ikatan internal 1,4- $\beta$  glikosidik secara acak; selobiohidrolase berperan dalam mengurai ikatan glikosidik pada ujung kedua sampai keempat unit selulosa menjadi disakarida selobiosa; dan  $\beta$ -glukosidase berperan untuk mengurai selobiosa menjadi dua gugus glukosa (Kuhad, Gupta and Sing, 2011).

Kondisi lingkungan kultur berpengaruh terhadap pertumbuhan dan proses fisiologis koloni mikroorganisme dalam menghasilkan enzim (Sindhu, Binod and Pandey, 2016). Goyal and Soni (2011) yang meneliti optimasi produksi selulase dari isolat fungi *Pleurotus florida*, *P. Ostreatus*, dan *P. sajor-caju* pada media campuran Malt Ekstrak 0,5% dan CMC 1%, melaporkan bahwa kultur fungi yang diinkubasi pada pH 5,0 suhu 35–40°C menghasilkan aktivitas endo-1,4- $\beta$ -glukanase dan selobiohidrolase (ekso-1,4- $\beta$ -glukanase) yang paling optimal; sedangkan aktivitas  $\beta$ -glukosidase paling optimal diperoleh dari kultur fungi yang diinkubasi pada pH 4,5 suhu 30°C. Gutiérrez-Soto *et al.* (2015) melaporkan bahwa *Pycnoporus sanguineus* yang dikultivasi pada media limbah kulit buah-buahan

menghasilkan titer enzim selulase paling optimal pada pH 5-6 suhu 70°C. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi lingkungan kultur, seperti komposisi media kultivasi, pH, dan temperatur mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan.

Limbah berlignoselulosa seperti dedak padi, tongkol jagung, jerami, serbuk kayu, kulit pisang, sabut kelapa, *bagasse*, dll., telah banyak digunakan sebagai media tumbuh mikroorganisme penghasil enzim karena pada limbah tersebut masih terdapat sejumlah nutrisi, antara lain: karbohidrat, lemak, protein dan serat, yang diperlukan sebagai substrat pertumbuhan fungi (Bhavsar *et al.*, 2015; Meryandini *et al.*, 2009; Rochman, 2015). Setyaningsih, Zaenab and Hudha (2015) melaporkan bahwa penambahan 10%–40% tepung tongkol jagung pada media kultivasi telah meningkatkan 14%–54% berat basah *Pleurotus ostreatus*. Adapun penambahan 20% campuran dedak padi dan tepung tongkol jagung pada media kultivasi *Pleurotus florida* telah mempercepat waktu pemanenan (15 hari lebih awal) dan meningkatkan berat basah fungi sekitar 50% dibandingkan perlakuan lainnya (Rochman, 2015). Selain berdampak positif terhadap pertumbuhan dan perkembangan struktur fungi, pemanfaatan limbah lignoselulosa ini juga dapat menghasilkan aktivitas selulase yang sama tingginya dengan substrat selulosa murni. Sebagai contoh, isolat *Trichoderma reesei* ZU-02 yang ditumbuhkan pada media selulosa murni 25 g/L menunjukkan aktivitas selulase yang tidak berbeda nyata dengan yang ditumbuhkan pada tepung tongkol jagung 40 g/L, yaitu sekitar 5,25–5,42 IU/mL (Liming and Xueliang, 2004). Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa limbah lignoselulosa, antara lain: dedak padi dan tongkol jagung, dengan mengoptimalkan kondisi kultur tertentu, berpotensi dimanfaatkan sebagai media produksi selulase yang murah, ramah lingkungan dan menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi pula.

Sejumlah isolat jamur pelapuk putih seperti *Phanerochaete* spp., *Pleurotus* spp., *Trametes* spp., dan *Pycnoporus* spp., telah diteliti dan dievaluasi kemampuannya dalam menghasilkan selulase (Goyal and Soni, 2011; Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015; Khalil *et al.*, 2011; Levin, Herrmann and Papinutti, 2008; Quiroz-Castañeda *et al.*, 2011). *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp., koleksi INTROF-CC (*Indonesian Tropical Forest Culture Collection*) Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan–Kementerian Lingkungan

Hidup dan Kehutanan, merupakan isolat jamur pelapuk putih yang belum dikarakterisasi aktivitas selulasenya. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kondisi kultur (media tumbuh, pH dan suhu inkubasi) terhadap aktivitas selulase-kompleks (endo- $\beta$ -1,4-glukanase, selobiohidrolase, dan  $\beta$ -glukosidase) yang dihasilkan isolat *Pycnoporus* sp. FORDACC-03452 dan *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Preparasi Isolat Fungi**

Isolat *Pycnoporus* sp. FORDACC-03452 dan *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482 yang digunakan pada penelitian ini merupakan fungi koleksi INTROF-CC. Isolat yang telah disimpan di dalam freezer -80°C ini, kemudian diaklimatisasi (proses *thawing*) dan disubkultur ke dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) lalu diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang ( $\pm$  27°C), sampai koloni miselia memenuhi permukaan PDA dalam cawan petri.

### **Produksi Enzim pada Variasi Media**

Produksi enzim dilakukan dengan metode kultur padat (*solid state fermentation*). Produksi dan ekstraksi enzim mengacu pada Fahrurrozi *et al.* (2010) dengan beberapa modifikasi. Dua jenis limbah lignoselulosa, yaitu: dedak padi dan serbuk tongkol jagung digunakan sebagai media tumbuh isolat *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. Masing-masing 20 g substrat limbah lignoselulosa tersebut disuspensikan ke dalam 20 mL air dalam labu Erlenmeyer, lalu disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (1 atm, 121°C) selama 30 menit. Setelah dingin, 20 potongan koloni miselia *Pycnoporus* sp. atau *Phlebiopsis* sp. ukuran  $\pm$  0,25 cm<sup>2</sup> diletakkan secara menyebar ke dalam substrat lignoselulosa tersebut, lalu diinkubasi selama 7 hari (sampai seluruh permukaan substrat terkolonisasi miselia), di dalam *shaker incubator* Innova®40 *non refrigerated* - New Brunswick Scientific, yang temperaturnya diatur pada 30°C (mendekati suhu ruangan). Inkubasi dalam kondisi temperatur yang stabil ini serupa dengan perlakuan pada eksperimen berikutnya yang menggunakan media campuran dedak padi dan tongkol jagung, sehingga data dapat dibandingkan.

## Produksi Enzim pada Variasi Kondisi Kultur

Dua puluh gram media campuran dedak padi : tongkol jagung (1:1) disuspensikan ke dalam 20 mL larutan *buffer* asetat dengan variasi pH: 4, 5, 6 dan 7 pada labu Erlenmeyer yang terpisah, lalu disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* (1 atm, 121°C) selama 30 menit. Setelah dingin, diinokulasi dengan 20 potongan koloni miselia *Pycnoporus* sp. atau *Phlebiopsis* sp. ukuran ± 0,25 cm<sup>2</sup>, lalu diinkubasi selama 7 hari pada variasi suhu, kisaran 30°–45° C dengan interval 5°C.

## Ekstraksi Filtrat Enzim Kasar

Ekstraksi enzim dilakukan dengan menambahkan 100 mL *buffer* asetat dingin 50 mM pH 6 (untuk uji variasi media); atau nilai pH yang sesuai dengan pH kondisi kultur (untuk uji variasi kondisi kultur). Proses ekstraksi enzim dilakukan dengan meletakkan labu fermentasi tersebut di dalam lemari pendingin (suhu 4°C) semalam, kemudian digoyang dengan menggunakan *shaker* kecepatan 100 rpm pada suhu kamar selama 30 menit (Rana and Rana, 2011), lalu disaring dengan menggunakan kasa berpori kecil. Filtrat hasil penyaring pertama ini disentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan difilter dengan menggunakan *syringe filter* dengan ukuran pori 0,2 µm. Filtrat kasar enzim ini lalu disimpan pada -20°C untuk pengujian lebih lanjut.

## Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas endo-β-1,4-glukanase dan selobiohidrolase mengacu pada Rana dan Rana (2011). Aktivitas endo-β-1,4-glukanase diukur dengan mencampurkan 0,1 mL filtrat kasar enzim dengan 0,1 mL larutan 0,5% CMC dalam *buffer* sitrat pH 5, lalu ditambahkan 0,8 mL *buffer* fosfat pH 7, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 28°C. Jumlah gula tereduksi diukur dengan metode DNS (Miller, 1959) dengan larutan glukosa sebagai standarnya. Delapan ulangan untuk setiap perlakuan diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan *microplate reader* Synergy H1®-Biotek Inc., pada λ 540 nm.

Aktivitas selobiohidrolase (ekso-β-1,4-glukanase) ditentukan dengan mencampurkan 0,5 mL filtrat enzim kasar dengan 0,4 ml 0,5%

suspensi selulosa kristalin (avisel) dan 0,85 mL *buffer* sodium sitrat pH 5, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 28°C. Jumlah gula tereduksi diukur dengan metode DNS (Miller, 1959). Delapan ulangan untuk setiap perlakuan diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan *microplate reader* Synergy H1®Biotek Inc., pada λ 540nm. Total protein terlarut dalam filtrat enzim diukur berdasarkan metode Lowry (Waterborg, 2002). Satu unit (U) aktivitas enzim ditentukan berdasarkan jumlah enzim yang terlibat dalam proses hidrolisis untuk menghasilkan 1 µmol glukosa per menit, sedangkan aktivitas spesifik ditentukan dari nilai unit aktivitas per µg protein, seperti Persamaan (1) berikut ini.

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{Unit aktivitas} \left( \frac{\text{IU}}{\text{mL}} \right)}{\text{Kadar Protein} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} \dots\dots(1)$$

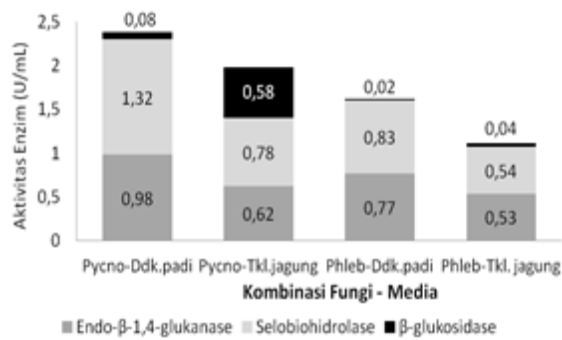
Aktivitas β-glukosidase ditentukan berdasarkan jumlah p-nitrophenol yang terlepas dari p-nitrophenol-D-glucopyranoside. β-glukosidase Activity Assay Kit® dari Sigma-Aldrich digunakan untuk mengukur aktivitas β-glukosidase dalam enzim filtrat kasar ini. Prosedur analisa dan penghitungan aktivitas β-glukosidase mengikuti instruksi dalam manual kit analisa ini.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

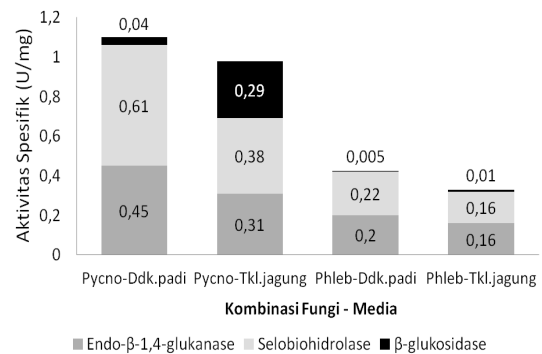
### Produksi Enzim pada Variasi Media

Mikroorganisme dapat menghasilkan kompleks enzim yang berbeda-beda, tergantung pada faktor genetik mikroorganisme tersebut serta sumber karbon yang digunakan sebagai nutrisi pertumbuhannya (Adrio and Demain, 2014; Gurung *et al.*, 2013). *Phlebiopsis* sp. dan *Pycnoporus* sp. merupakan jamur pelapuk kayu, secara alamiah tumbuh pada material berlignoselulosa, memiliki gen-gen yang mengatur sintesa dan sekresi enzim selulosa. Hal ini terlihat dari terdeteksinya aktivitas sistem enzim selulase (endo-β-1,4-glukanase, selobiohidrolase dan β-glukosidase) pada filtrat kasar kedua isolat fungi ini (Gambar1).

Profil aktivitas enzim (Gambar 1) dan aktivitas spesifik (Gambar 2) isolat *Pycnoporus* sp. FORDACC-03452 dan *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482 memiliki pola data yang relatif serupa meskipun telah memperhitungkan kadar



Gambar 1. Aktivitas Enzim Selulase *Pycnopus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. pada Dua Substrat Lignoselulosa yang Berbeda



Gambar 2. Aktivitas Spesifik Selulase Komplek *Pycnopus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. pada Dua Substrat Lignoselulosa yang Berbeda

Tabel 1. Kadar Protein Filtrat Enzim Kasar Fungi *Pycnopus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. pada Dua Substrat Lignoselulosa yang Berbeda

Isolat fungi	Perlakuan		Kadar protein* (mg/mL)
	Media kultivasi		
<i>Pycnopus</i> sp.	Dedak Padi		2,18 ± 0,033
	Tongkol jagung		3,85 ± 0,078
<i>Phlebiopsis</i> sp.	Dedak Padi		2,03 ± 0,080
	Tongkol jagung		3,42 ± 0,213

\*Data merupakan rerata dari 8 ulangan ± standar error.

total protein (Tabel 1). Dengan membandingkan aktivitas enzim (Gambar 1) dan aktivitas spesifik (Gambar 2) yang dihasilkan oleh kedua isolat pada media kultivasi yang sama, terlihat bahwa isolat *Pycnopus* sp. FORDACC-03452 mensekresikan enzim selulase kompleks lebih tinggi aktivitasnya dibandingkan dengan *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482. *Pycnopus* sp. yang ditumbuhkan pada media dedak padi menunjukkan aktivitas endo-β-1,4-glukanase tertinggi sebesar 0,98 IU/mL (0,45 IU/mg protein) dan selobiohidrolase sebesar 1,32 IU/mL (0,61 IU/mg protein). Aktivitas β-glukosidase tertinggi pun diperoleh dari filtrat kasar *Pycnopus* sp. yang ditumbuhkan pada media serbuk bonggol jagung, yaitu: 0,58 IU/mL (0,29 IU/mg protein). Aktivitas sistem enzim selulase filtrat kasar *Phlebiopsis* sp. menunjukkan angka yang lebih rendah, bahkan sangat rendah untuk aktivitas enzim β-glukosidase (Gambar 1 dan Gambar 2).

Media kultivasi mempengaruhi proses sintesis protein dan aktivitas selulase-kompleks yang disekresikan oleh isolat-isolat fungi tersebut. Isolat fungi yang ditumbuhkan pada media tongkol jagung menunjukkan kadar protein (Tabel 1), dan aktivitas β-glukosidase (Gambar 1 dan Gambar 2) lebih tinggi daripada media dedak padi. Sebaliknya, endo-β-1,4-glukanase dan selobiohidrolase, kedua enzim tersebut lebih tinggi aktivitasnya jika isolat fungi tersebut dikultivasi pada media dedak padi. Fenomena ini merupakan adaptasi fisiologis isolat fungi dalam merespons perbedaan komponen kimia pada masing-masing media kultivasi yang menjadi nutrisi bagi pertumbuhan dan perkembangan fungi tersebut (Bertrand *et al.*, 2015; Selbmann *et al.*, 2013). Dedak padi yang mengandung kadar selulosa yang lebih tinggi, yaitu sekitar 51,6% (Artika, 2010), sedangkan tongkol jagung 35,6% (Naufala dan Pandebesie, 2015) menginduksi isolat fungi untuk lebih aktif menghasilkan endo-β-1,4-glukanase dan selobiohidrolase sehingga dapat menguraikan polimer selulosa dari media tersebut menjadi rantai polimer yang lebih pendek. Fenomena bahwa βglukosidase lebih banyak dihasilkan oleh fungi yang ditumbuhkan pada media tongkol jagung berhubungan dengan kandungan karbohidrat media tongkol jagung yang lebih tinggi, yaitu sekitar 56–61%, sedangkan media dedak padi sekitar 46–52% (Artika, 2010). Polimer gula pada karbohidrat relatif lebih sederhana daripada selulosa menyebabkan proses hidrolisis oleh endo-β-1,4-glukanase dan selobiohidrolase pun menjadi relatif lebih mudah, sehingga pada media tongkol jagung dihasilkan

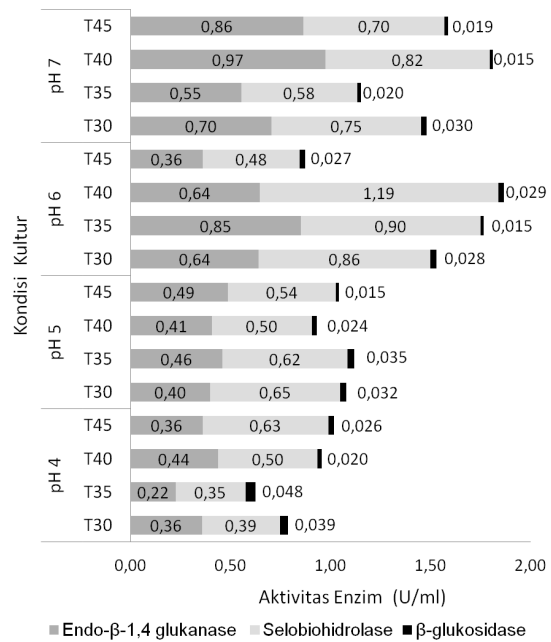
selobiosa lebih banyak daripada media dedak padi. Hal ini direspons oleh isolat fungi dengan lebih aktif mengekskresikan  $\beta$ glukosidase yang berperan dalam memecah selobiosa (disakarida) menjadi glukosa.

Berdasarkan data ini diduga kombinasi media dedak padi dan tongkol jagung dapat menginduksi isolat fungi *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. untuk mensekresikan kompleks enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase, selobiohidrolase, dan  $\beta$ -glukosidase dengan proporsi aktivitas yang tinggi dan seimbang. Hal tersebut diperlukan untuk proses hidrolisis biomassa berselulosa secara sempurna. Campuran dedak padi dan tongkol jagung ini selanjutnya menjadi media pada perlakuan variasi suhu dan pH kultivasi.

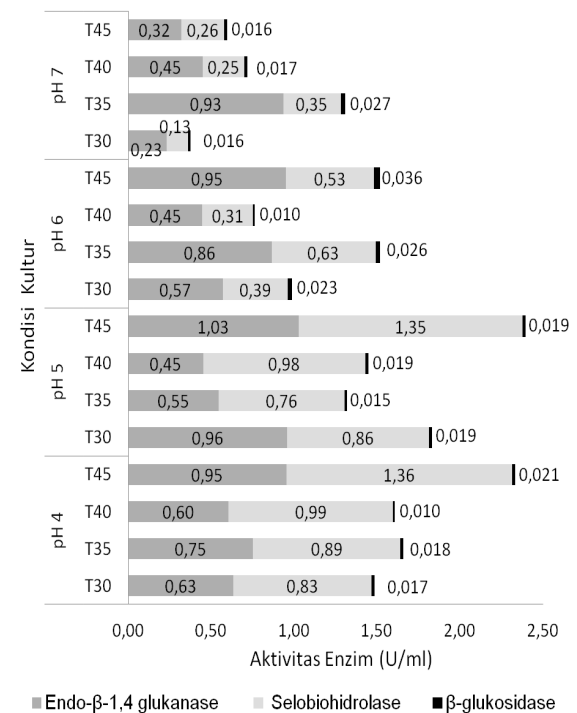
### Produksi Enzim pada Variasi pH dan Suhu Inkubasi

Kondisi lingkungan kultur, seperti pH media dan suhu inkubasi memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap aktivitas selulase-kompleks yang disekresikan oleh isolat fungi *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. Filtrat enzim kasar *Pycnoporus* sp. menunjukkan aktivitas endo- $\beta$ -1,4-glukanase optimum pada pH 7, dan suhu inkubasi 40°C, dengan aktivitas  $0,97 \pm 0,029$  IU/mL; selobiohidrolase pada pH 6, suhu 40°C, sebesar  $1,19 \pm 0,044$  IU/mL;  $\beta$ -glukosidase pada pH 4, suhu 35°C, sebesar  $0,048 \pm 0,002$  IU/mL (Gambar 3). Sementara itu, filtrat enzim kasar *Phlebiopsis* sp. menunjukkan aktivitas enzim endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan selobiohidrolase yang sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan filtrat *Pycnoporus* sp., yaitu  $1,03 \pm 0,011$  IU/mL (untuk endo- $\beta$ -1,4-glukanase, pada pH 5 suhu inkubasi 45°C) dan  $1,36 \pm 0,019$  IU/mL (untuk selobiohidrolase, pada pH 4 and pH 5, suhu inkubasi 45°C);  $\beta$ -glukosidase paling optimum pada pH 6 suhu 45°C, sebesar  $0,036 \pm 0,004$  IU/mL (Gambar 4).

Filtrat enzim kasar isolat fungi *Phlebiopsis* sp. menunjukkan kadar total protein yang lebih tinggi (yaitu: berkisar antara 2,87–14,04 mg/mL filtrat) daripada *Pycnoporus* sp. yang menunjukkan kadar protein antara 1,80–8,52 mg/mL filtrat (Tabel 2). Jumlah kadar total protein yang lebih tinggi ini menyebabkan aktivitas spesifik selulase-kompleks pada filtrat enzim kasar *Phlebiopsis* sp. menjadi lebih rendah daripada *Pycnoporus* sp. (Gambar 5 dan Gambar 6). Pada uji optimasi



Gambar 3. Aktivitas Enzim Selulase *Pycnoporus* sp. pada Kondisi Kultur yang Bervariasi



Gambar 4. Aktivitas Enzim Selulase *Phlebiopsis* sp. pada Kondisi Kultur yang Bervariasi

produksi dengan variabel pH, media kultivasi, dan suhu inkubasi ini, aktivitas enzim berbanding terbalik aktivitas spesifiknya.

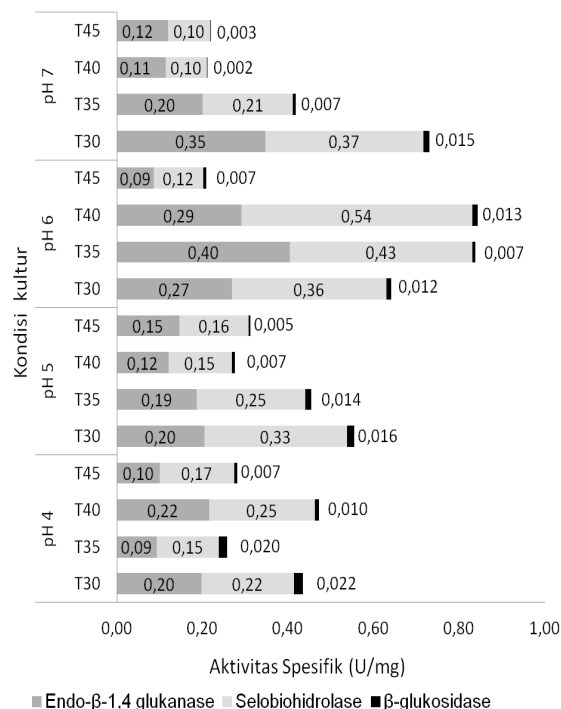
Aktivitas spesifik enzim mengindikasikan tingkat kemurnian enzim. Semakin besar nilai aktivitas spesifik suatu enzim menunjukkan semakin murni kadar enzim tersebut pada suatu larutan/campuran, begitu pula sebaliknya (Bisswanger, 2014). Filtrat enzim kasar *Pycnopus* sp. menunjukkan aktivitas spesifik endo- $\beta$ -1,4-glukanase sebesar  $0,403 \pm 0,010$  IU/mg protein (pada pH 6, suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ); selobiohidrolase  $0,540 \pm 0,020$  IU/mg protein (pada pH 6, suhu  $40^{\circ}\text{C}$ ); dan  $\beta$ -glukosidase  $0,022 \pm 0,001$  IU/mg protein (pada pH 4, suhu  $30^{\circ}\text{C}$ ) (Gambar 5), sedangkan aktivitas spesifik filtrat enzim kasar *Phlebiopsis* sp. adalah sebagai berikut: endo- $\beta$ -1,4-glukanase sebesar  $0,202 \pm 0,005$  IU/mg protein (pH 6, suhu  $35^{\circ}\text{C}$ ); selobiohidrolase  $0,180 \pm 0,002$  IU/mg protein (pH 4, suhu  $45^{\circ}\text{C}$ ); dan  $\beta$ -glukosidase  $0,007 \pm 0,001$  IU/mg protein (pH 6, suhu  $45^{\circ}\text{C}$ ) (Gambar 6). Data ini menunjukkan bahwa filtrat enzim kasar dari kultur *Pycnopus* sp. memiliki kemurnian lebih baik daripada *Phlebiopsis* sp.

Kondisi optimum aktivitas selulase yang dihasilkan oleh setiap mikroorganisme berbeda-beda. Oktavia *et al.* (2014) yang mengisolasi fungi endofit dari lamun (*seagrass*) melaporkan bahwa kondisi optimum untuk aktivitas selulase isolat yang diperolehnya adalah pH 4 dan suhu  $50^{\circ}\text{--}60^{\circ}\text{C}$ , dengan aktivitas total selulase sebesar  $0,007\text{--}0,013$  IU/mL; endo- $\beta$ -1,4-glukanase  $0,019\text{--}0,031$  IU/mL; dan  $\beta$ -glukosidase  $0,00012\text{--}0,00361$  IU/mL. Quiroz-Castañeda *et al.* (2009) melaporkan aktivitas optimum selulase *Bjerkandera adusta* (2,4 IU/mg) dan *Pycnopus sanguineus* (1,4 IU/mg) yang dikultivasi pada media jerami gandum diperoleh pada kondisi kultur pH 5 dan suhu  $28^{\circ}\text{C}$ . Chuwech *et al.* (2015) yang mengekstrak enzim selulase dari fungi *Pycnopus coccineus* dan menumbuhkannya pada media tongkol jagung melaporkan bahwa aktivitas spesifik paling optimum endo- $\beta$ -1,4-glukanase sebesar 14,81 IU/gds; selobiose ( $\beta$ -glukosidase) sebesar 1,118 IU/gds; dan total selulase sebesar 10,303 IU/gds diperoleh pada kondisi pH 6 dan suhu inkubasi  $30^{\circ}\text{C}$ . Adapun filtrat enzim kasar *Pycnopus* sp. FORDACC-03452 menunjukkan aktivitas endo- $\beta$ -1,4-glukanase paling optimum sebesar  $0,403$  IU/mg (setara dengan  $0,85$  IU/mL atau

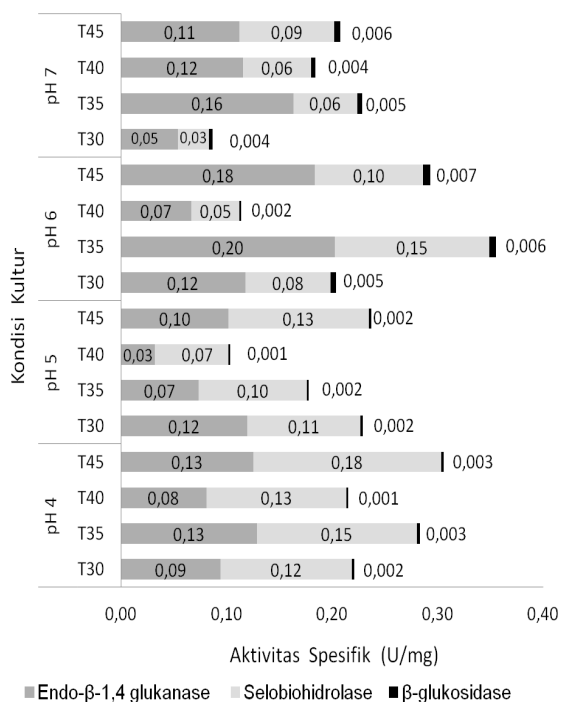
Tabel 2. Kadar Protein Filtrat Enzim Kasar Fungi *Pycnopus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. pada Kondisi Kultur yang Bervariasi

Kondisi Kultur		Kadar Protein* (mg/mL)	
pH	Suhu	<i>Pycnopus</i> sp.	<i>Phlebiopsis</i> sp.
4	$30^{\circ}\text{C}$	$1,80 \pm 0,024$	$6,71 \pm 0,856$
	$35^{\circ}\text{C}$	$2,41 \pm 0,263$	$5,85 \pm 0,404$
	$40^{\circ}\text{C}$	$2,02 \pm 0,086$	$7,48 \pm 0,456$
	$45^{\circ}\text{C}$	$3,61 \pm 0,118$	$7,63 \pm 0,195$
5	$30^{\circ}\text{C}$	$1,95 \pm 0,124$	$8,01 \pm 0,587$
	$35^{\circ}\text{C}$	$2,46 \pm 0,176$	$7,41 \pm 0,180$
	$40^{\circ}\text{C}$	$3,37 \pm 0,108$	$14,04 \pm 0,803$
	$45^{\circ}\text{C}$	$3,33 \pm 0,241$	$10,11 \pm 0,238$
6	$30^{\circ}\text{C}$	$2,38 \pm 0,115$	$4,85 \pm 0,383$
	$35^{\circ}\text{C}$	$2,11 \pm 0,059$	$4,27 \pm 0,146$
	$40^{\circ}\text{C}$	$2,21 \pm 0,054$	$6,71 \pm 0,806$
	$45^{\circ}\text{C}$	$4,17 \pm 0,382$	$5,18 \pm 0,390$
7	$30^{\circ}\text{C}$	$2,03 \pm 0,155$	$4,32 \pm 0,207$
	$35^{\circ}\text{C}$	$2,75 \pm 0,292$	$5,72 \pm 0,418$
	$40^{\circ}\text{C}$	$8,52 \pm 0,418$	$3,90 \pm 0,233$
	$45^{\circ}\text{C}$	$7,18 \pm 0,365$	$2,87 \pm 0,258$

\*Data merupakan rerata dari 8 ulangan  $\pm$  standar error



Gambar 5. Aktivitas Spesifik Enzim Selulasekomplek *Pycnopus* sp. pada Kondisi Kultur yang Bervariasi



Gambar 6. Aktivitas Spesifik Enzim Selulase *Phlebiopsis* sp. pada Kondisi Kultur yang Bervariasi

5,1 IU/gds); selobiohidrolase 0,540 IU/mg (setara dengan 1,19 IU/mL atau 7,14 IU/gds); dan β-glukosidase sebesar 0,022 IU/mg (setara dengan 0,04 IU/mL atau 0,24 IU/gds). Dengan demikian aktivitas selulase yang diperoleh pada penelitian ini relatif lebih baik daripada yang dilaporkan oleh Oktavia *et al.* (2014), namun masih lebih rendah dari yang dilaporkan oleh Quiroz-Castañeda *et al.* (2009) dan Chuwech *et al.* (2015). Upaya untuk optimasi produksi enzim masih perlu dilanjutkan.

Campuran media dedak padi dan tongkol jagung tidak menghasilkan aktivitas spesifik selulase yang lebih baik dari media tunggalnya. Pada media dedak padi, *Pycnoporus* sp. menunjukkan aktivitas endo-β-1,4-glukanase dan selobiohidrolase sebesar 0,98 IU/mL dan 1,32 IU/mL (Gambar 1); sedangkan pada media campuran dedak padi dan tongkol jagung, dengan pH dan suhu yang sama, hanya sebesar 0,70 IU/mL dan 0,75 IU/mL (Gambar 3). Aktivitas β-glukosidase *Pycnoporus* sp. pada media tongkol jagung sebesar 0,58 IU/mL (Gambar 1), sedangkan pada media campurannya hanya 0,03 IU/mL (Gambar 3). Aktivitas filtrat enzim kasar *Phlebiopsis* sp. menunjukkan pola respons serupa terhadap media

kultivasi ini. Dengan demikian asumsi bahwa mencampurkan kedua limbah lignoselulosa dapat menginduksi sintesa selulase-kompleks dengan aktivitas tinggi dan proporsi yang seimbang belum dapat dibuktikan.

Aktivitas dan aktivitas spesifik β-glukosidase yang diperoleh dalam penelitian ini masih sangat rendah, padahal dalam proses hidrolisis selulosa peranan β-glukosidase sangat penting karena menjadi penentu efisiensi proses hidrolisis tersebut. Hidrolisis diukur berdasarkan jumlah gula tereduksi (glukosa) yang dihasilkan. Pada proses penguraian selulosa, glukosa dihasilkan melalui beberapa tahap, yaitu endo-β-1,4-glukanase memutus rantai polimer menjadi fragmen lebih pendek; dan selobiohidrolase memotong fragmen selulosa tersebut menjadi selobiosa, kemudian β-glukosidase akan menyempurnakan proses hidrolisis tersebut dengan mengubah selobiosa menjadi glukosa (Singhania *et al.*, 2013). Dengan demikian, jika filtrat enzim kasar yang dihasilkan pada penelitian ini digunakan untuk proses hidrolisis limbah lignoselulosa, kadar glukosa pada hidrolisat yang dihasilkannya pun masih rendah.

## KESIMPULAN

Produksi selulase-kompleks oleh isolat fungi *Pycnoporus* sp. FORDACC-03452 dan *Phlebiopsis* sp. FORDACC-02482 dipengaruhi oleh media kultivasi, pH dan suhu inkubasi. Kedua isolat tersebut menghasilkan aktivitas endo-β-1,4-glukanase dan selobiohidrolase lebih baik pada media dedak padi, sedangkan aktivitas β-glukosidase justru lebih tinggi pada media tongkol jagung. Campuran kedua substrat tersebut belum menghasilkan aktivitas selulase-kompleks yang optimal. Filtrat kasar *Pycnoporus* sp. menunjukkan aktivitas dan aktivitas spesifik enzim selulase-kompleks yang lebih baik dibandingkan filtrat *Phlebiopsis* sp. Setiap komponen enzim selulase-kompleks dari kedua isolat fungi tersebut memiliki preferensi pH dan suhu inkubasi yang berbeda-beda untuk menghasilkan aktivitas enzim optimal. Namun selulase-kompleks yang dihasilkan dari penelitian ini belum dapat mengkatalisis proses hidrolisis limbah berlignoselulosa dengan sempurna karena aktivitas dan kadar β-glukosidase masih sangat rendah. Upaya optimalisasi produksi enzim selulase-kompleks



dari fungi *Pycnoporus* sp. dan *Phlebiopsis* sp. ini masih perlu diteliti lebih lanjut.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan yang telah mendanai kegiatan penelitian ini melalui anggaran DIPA T.A 2015–2016, Dr. Garsetiasih sebagai koordinator RPPI Konservasi Keanekaragaman Hayati, serta memberi arahan pada proses penyusunan proposal dan laporan, Prof. Dr. Made Suidiana (Puslit Biologi LIPI) sudah berkenan memberikan koreksi substansial pada laporan yang menjadi acuan penulisan naskah ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adrio, J. L. and Demain, A. L. (2014) 'Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes', *Biomolecules*, 4, pp. 117–139. doi: 10.3390/biom4010117.
- Ang, S. K. *et al.* (2013) 'Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 48(9), pp. 1293–1302. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.019.
- Anish, R., Rahman, M. S. and Rao, M. (2007) 'Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims', *Biotechnology and Bioengineering*, 96(1), pp. 48–56. doi: 10.1002/bit.21175.
- Artika, A. (2010) *Kajian hidrolisis tongkol jagung oleh kapang selulolitik menggunakan kultivasi media padat untuk produksi pakan*. Institut Pertanian Bogor.
- Banerjee, G., Scott-Craig, J. S. and Walton, J. D. (2010) 'Improving enzymes for biomass conversion: A basic research perspective', *Bioenergy Research*, 3(1), pp. 82–92. doi: 10.1007/s12155-009-9067-5.
- Banerjee, S. *et al.* (2010) 'Commercializing lignocellulosic bioethanol: Technology bottlenecks and possible remedies', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(1), pp. 77–93. doi: 10.1002/bbb.188.
- Bertrand, B. *et al.* (2015) 'Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122(October), pp. 339–347. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.10.009.
- Bhavsar, N. H. *et al.* (2015) 'Optimization and Characterization of Fungal Cellulase for Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Agro-waste', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), pp. 30–46.
- Bisswanger, H. (2014) 'Enzyme assays', *Perspectives in Science*. Elsevier, 1(1–6), pp. 41–55. doi: 10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- Chokhawala, H. A. *et al.* (2015) 'Mutagenesis of *Trichoderma reesei* endoglucanase I: impact of expression host on activity and stability at elevated temperatures', *BMC Biotechnol*, 15, p. 11. doi: 10.1186/s12896-015-0118-z.
- Chuwach, M. *et al.* (2015) 'Utilization of pretreated corn-cobs for optimized bioproduction of cellulase by *Pycnoporus coccineus*', in *Proceeding of The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products*, pp. 236–242.
- Fahrurrozi, F. *et al.* (2010) 'Rapid Assessment of Diverse Trichoderma Isolates of Indonesian Origin for Cellulase Production', *Annales Bogorienses*, 14(1), pp. 39–44.
- Falkoski, D. L. *et al.* (2012) 'Characterization of cellulolytic extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and its application in biomass saccharification', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(6), pp. 1586–1603. doi: 10.1007/s12010-012-9565-3.
- Fang, H. and Xia, L. (2015) 'Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues', *Fuel*. Elsevier Ltd, 143(March), pp. 211–216. doi: 10.1016/j.fuel.2014.11.056.
- Goyal, M. and Soni, G. (2011) 'Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*', *Journal of Microbiology*, 5(10), pp. 1131–1136. doi: 10.5897/AJMR10.192.
- Gurung, N. *et al.* (2013) 'A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond', *BioMed Research International*, 2013. doi: 10.1155/2013/329121.
- Gutiérrez-Soto, G. *et al.* (2015) 'Selection and characterization of a native *Pycnoporus sanguineus* strain as a lignocellulolytic extract producer from submerged cultures of various agroindustrial wastes', *BioResources*, 10(2), pp. 3564–3576. doi: 10.15376/biores.10.2.3564-3576.

- Kavitha, S. and Sivamani, S. (2016) 'Statistical Optimization of Cellulase Production from Cassava Stem by Cellulomonas Fimi MTCC24 using Box-Behnken Design', 4(November), pp. 375–385.
- Kuhad, R. C. *et al.* (2011) 'Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier Ltd, 15(9), pp. 4950–4962. doi: 10.1016/j.rser.2011.07.058.
- Kuhad, R. C., Gupta, R. and Sing, A. (2011) 'Microbial cellulases and their industrial applications.', *Enzyme research*, 2011, p. 280696. doi: 10.4061/2011/280696.
- Kumar, A. K. and Parikh, B. S. (2015) 'Cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus terreus* D34 and enzymatic saccharification of mild-alkali and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass residues', *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1). doi: 10.1186/s40643-015-0038-8.
- Liming, X. and Xueliang, S. (2004) 'High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue', *Bioresource Technology*, 91(3), pp. 259–262. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00195-0.
- Meryandini, A. *et al.* (2009) 'Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya', *Makara Sains*, 13(1), pp. 33–38. doi: 10.7454/mss.v13i1.369.
- Miller, G. L. (1959) 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.
- Mingardon, F. *et al.* (2011) 'The issue of secretion in heterologous expression of *Clostridium cellulolyticum* cellulase-encoding genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824', *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), pp. 2831–2838. doi: 10.1128/AEM.03012-10.
- Mohanram, S. *et al.* (2013) 'Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries', *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), p. 15. doi: 10.1186/2043-7129-1-15.
- Mutreja, R. *et al.* (2011) 'Bioconversion of agricultural waste to ethanol by SSF using recombinant cellulase from *Clostridium thermocellum*.' *Enzyme research*, 2011, pp. 1–6. doi: 10.4061/2011/340279.
- Mutschlechner, M., Illmer, P. and Wagner, A. O. (2015) 'Biological pre-treatment: Enhancing biogas production using the highly cellulolytic fungus *Trichoderma viride*', *Waste Management*. Elsevier Ltd, 43(May), pp. 98–107. doi: 10.1016/j.wasman.2015.05.011.
- Naufala, W. and Pandebesie, E. S. (2015) 'Hidrolisis Eceng Gondok dan Sekam Padi untuk Menghasilkan Gula Reduksi sebagai Tahap Awal Produksi Bioetanol', *Jurnal Teknis ITS*, 4(2), pp. 2–6.
- Ncube, T. *et al.* (2012) 'Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation', *Industrial Crops and Products*, 37(1), pp. 118–123. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.11.024.
- Oktavia, Y. *et al.* (2014) 'Karakterisasi Enzim Kasar Selulase Kapang Endofit dari Lamun', *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 6(1), pp. 219–228. doi: 10.3724/SP.J.1041.2014.01463.
- Olson, D. G. *et al.* (2012) 'Recent progress in consolidated bioprocessing', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 23(3), pp. 396–405. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.026.
- Pribowo, A., Arantes, V. and Saddler, J. N. (2012) 'The adsorption and enzyme activity profiles of specific *Trichoderma reesei* cellulase/xylanase components when hydrolyzing steam pretreated corn stover', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 50(3), pp. 195–203. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.12.004.
- Quiroz-Castañeda, R. E. *et al.* (2009) 'Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium', *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4). doi: 10.2225/vol12-issue4-fulltext-3.
- Rana, I. S. and Rana, A. S. (2011) 'Lignocellulolytic enzyme profile of *Agaricus* and *Pleurotus* species cultured on used tea leaves substrate', *Advanced Biotech.*, 11(6), pp. 10–14.
- Rochman, A. (2015) 'Perbedaan Proporsi Dedak Dalam Media Tanam Terhadap Pertumbuhan Jamur Tiram Putih (*Pleurotus florida*)', *Jurnal Agribisnis Fakultas Pertanian Unita*, 11(13), pp. 56–67.
- Selbmann, L. *et al.* (2013) 'Biodiversity, evolution and adaptation of fungi in extreme environments', *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(1), pp. 237–246. doi: 10.1080/11263504.2012.753134.
- Setyaningsih, A., Zaenab, S. and Hudha, A. (2015) 'Pengaruh Penambahan Tepung Tongkol Jagung pada Media Tanam terhadap Berat Basah Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) sebagai Bahan Ajar Biologi', in *Seminar Nasional Pendidikan Biologi: Peran Biologi dan Pendidikan Biologi dalam Menyiapkan Generasi Unggul dan Berdaya Saing Global*. Malang, 21 Maret 2015: FKIP Universitas Muhammadiyah Malang, pp. 403–409.

- Sindhu, R., Binod, P. and Pandey, A. (2016) 'Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 199, pp. 76–82. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.030.
- Singhania, R. R. *et al.* (2013) 'Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production', *Bioresource Technology*, 127, pp. 500–507. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.012.
- Sun, S. *et al.* (2016) 'The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 199(January), pp. 49–58. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.061.
- Ul-Haq, I. *et al.* (2005) 'Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*', *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3), pp. 241–245.
- Vishwakarma, R. and Banerjee, R. (2016) 'Enhancement of sugar content of *Cyperus* sp. through cellulolytic enzymes for bioethanol generation', *Lignocellulose*, 5(2), pp. 94–105.
- Waterborg, J. H. (2002) 'The Lowry Method for Protein Quantitation', in Walker, J. M. (ed.) *The Protein Protocols Handbook*. XXIV, pp. 2–4.
- Xu, J. *et al.* (2015) 'Enzymatic in situ saccharification of rice straw in aqueous-ionic liquid media using encapsulated *Trichoderma aureoviride* cellulase', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(1), pp. 57–63. doi: 10.1002/jctb.4458.
- Yuan, S.-F. *et al.* (2015) 'Biochemical characterization and structural analysis of a bi-functional cellulase/xylanase from *Clostridium thermocellum*.', *The Journal of biological chemistry*, 290(9), pp. 5739–5748. doi: 10.1074/jbc.M114.604454.
- Zhang, J. *et al.* (2010) 'Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced  $\beta$ -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101(24), pp. 9815–9818. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.078.

