

## EFEKTIVITAS CAMPURAN ENZIM SELULASE DARI *Aspergillus niger* DAN *Trichoderma reesei* DALAM MENGHIDROLISIS SUBSTRAT SABUT KELAPA

Selviza Safaria<sup>1\*</sup>, Nora Idiawati<sup>1</sup>, Titin Anita Zaharah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,

Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi

\*email : selvizasafaria@yahoo.co.id

### ABSTRAK

Sabut kelapa merupakan limbah perkebunan yang mengandung selulosa dan belum dimanfaatkan secara optimal. Selulosa yang terdapat pada sabut kelapa dapat dimanfaatkan untuk memproduksi glukosa dengan proses hidrolisis. Hidrolisis dilakukan menggunakan ekstrak enzim kasar dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dengan perbandingan campuran 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 berdasarkan jumlah U/mL aktivitas enzim pada variasi pH 4, 5, dan 6 dengan waktu hidrolisis selama 2, 4, 6, dan 8 jam. Aktivitas enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* diukur dengan metode fenol-asam sulfat. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hidrolisis selulosa dari sabut kelapa menggunakan campuran enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* 1:2 pada pH 5 dengan waktu hidrolisis 6 jam menghasilkan konsentrasi glukosa paling tinggi, yaitu sebesar 22,3 mg/L.

**Kata Kunci:** sabut kelapa, selulase, glukosa, *A.niger*, *T.reesei*.

### PENDAHULUAN

Sabut kelapa merupakan salah satu limbah perkebunan yang diketahui banyak mengandung serat kasar. Serat kasar tersebut tersusun atas senyawa lignoselulosa (senyawa kompleks lignin, selulosa, dan hemiselulosa). Kandungan selulosa yang terdapat pada sabut kelapa dapat dimanfaatkan untuk memproduksi glukosa melalui proses hidrolisis.

Proses hidrolisis dapat dilakukan secara kimia maupun enzimatik. Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis kimia yakni tidak terjadi degradasi gula hasil hidrolisis, dapat berlangsung pada suhu rendah, berpotensi memberikan hasil yang tinggi, dan biaya pemeliharaan peralatan relatif rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Taherzadeh dan Karimi, 2007).

Enzim selulase diperoleh dari campuran enzim endoglukanase, eksoglukanase dan  $\beta$ -glukosidase. Selulase dapat diproduksi oleh jamur, bakteri, tumbuhan, dan ruminansia. Salah satu mikroorganisme utama yang dapat memproduksi selulase adalah jamur. Jamur berfilamen seperti *Trichoderma* dan *Aspergillus* adalah penghasil enzim selulase dan *crude enzyme* secara komersial (Ul-Haq, dkk., 2005).

*Trichoderma reesei* (*T.reesei*) menghasilkan endoglukanase dan eksoglukanase sampai 80% tetapi  $\beta$ -glukosidasenya lebih rendah sehingga produk utama hidrolisisnya bukan glukosa melainkan selobiosa (Ahmed dan Vermette, 2008; Martins,

et al., 2008) yang merupakan inhibitor kuat terhadap endoglukanase dan eksoglukanase.

*Aspergillus niger* (*A.niger*) menghasilkan  $\beta$ -glukosidase tinggi akan tetapi endo- $\beta$ -1,4-glukanase dan ekso- $\beta$ -1,4-glukanasenya rendah (Juhász, et al., 2003). Oleh karena itu perlu adanya penambahan  $\beta$ -glukosidase dari luar untuk mempercepat konversi selobiosa menjadi glukosa dengan cara mengkombinasikan enzim selulase dari *T.reesei* dan *A.niger*.

Penelitian hidrolisis selulosa secara enzimatik telah banyak dilakukan menggunakan enzim yang dihasilkan dari satu jenis jamur namun konsentrasi glukosa yang dihasilkan masih belum cukup tinggi (Anwar, dkk., 2010). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa hidrolisis enzimatik menggunakan kombinasi enzim dari dua jenis jamur lebih efisien menghidrolisis selulosa dibandingkan hidrolisis menggunakan selulase dari satu jenis jamur saja.

Sanjaya dan Adrianti (2010) serta Anwar dkk (2010) meneliti hidrolisis jerami padi menggunakan campuran selulase kasar dari *T.reesei* dan *A.niger*. Hasil kedua penelitian tersebut menunjukkan bahwa campuran selulase kasar dari *T.reesei* dan *A.niger* dua kali lebih efektif menghidrolisis jerami padi menjadi glukosa dibandingkan dengan enzim selulase komersial dari *A.niger*. Berdasarkan penelitian tersebut maka dilakukan hidrolisis sabut kelapa menggunakan campuran selulase dari *T.reesei* dan *A.niger* dengan memvariasikan

perbandingan campuran enzim, pH, dan waktu hidrolisis.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu agar-agar, akuades, alkohol 70%, *aluminium foil*, amonium sulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), asam klorida (HCl), glukosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), kalsium klorida monohidrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), kentang, kertas saring whatman no.1, magnesium sulfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), natrium hidroksida (NaOH), natrium sitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), sabut kelapa, tween-80, urea  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , dan *wrapping plastic*.

Mikroorganisme yang digunakan yaitu *A.niger* dan *T.reesei* yang diperoleh dari Institut Pertanian Bogor.

### Peralatan

Peralatan yang digunakan yaitu *autoclave*, ayakan 60 mesh, *bulb*, *centrifuge*, *hotplate*, kuvet, laminar, neraca analitik, oven, peralatan gelas, spektrofotometer UV-Vis Genesys 6, dan termometer.

### Cara Kerja

#### Preparasi dan delignifikasi sampel

Sabut kelapa kering yang diperoleh dari desa Sungai Rengas Kabupaten Kubu Raya, sebelum digunakan sabut kelapa digiling dan dikeringkan pada suhu  $105^\circ\text{C}$  selama 6 jam. Selanjutnya sabut kelapa diayak.

Sebanyak 60 g sabut kelapa dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 1000 mL, ditambah dengan larutan NaOH 1% lalu diaduk selama 2 jam dengan kecepatan 150 rpm (Sukardati, dkk., 2010)

#### Pembuatan larutan nutrisi

Dilarutkan urea (3 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (10 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,5 g/L) dengan akuades (Singhania, *et al.*, 2006). Diukur pH awal dan diatur hingga pH 5 untuk *A.niger* (Harfinda, 2011) maupun *T.reesei* (Sukadarti, dkk., 2010).

#### Perbanyak jamur *A.niger* dan *T.reesei*

Kentang dikupas, dicuci dan dipotong kecil, direbus sebanyak 40 g dalam 200 mL akuades hingga lunak lalu disaring. Air rebusan ditambahkan agar dan glukosa masing-masing sebanyak 2,3 g kemudian direbus kembali sampai mendidih. Selanjutnya, larutan

disterilisasi dalam *autoclave* selama 20 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$ . Masing-masing jamur dikembangkan pada media *potato dextrose agar* (PDA) menggunakan kawat ose, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari dalam cawan petri yang telah disterilkan.

### Tahap produksi enzim

Sebanyak 5 g serbuk sabut kelapa dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 25 mL larutan nutrisi dan ditutup. Campuran (media) tersebut disterilisasi pada temperatur  $121^\circ\text{C}$  selama 20 menit kemudian didinginkan. Masing-masing bibit *A.niger* dan *T.reesei* diinokulasikan pada media. *T.reesei* diinkubasi selama 6 hari sedangkan *A.niger* diinkubasi selama 8 hari pada suhu ruang (Anwar, dkk., 2010).

### Ekstraksi enzim

Dituangkan 100 mL larutan 0,1% tween 80 ke dalam sabut kelapa yang sudah difermentasi dan diaduk pada 150 rpm selama 120 menit pada suhu ruang. Larutan kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai ekstrak enzim kasar (Szendefy, *et al.*, 2006).

### Uji aktivitas enzim metode fenol-sulfat

Sebanyak 1 mL buffer Na-sitrat 0,05 M pH 4,8 dan satu strip kertas saring whatman no 1 ukuran 1x6 cm dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan dipanaskan pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama beberapa saat. Masing-masing ekstrak enzim kasar dari *A.niger* dan *T.reesei* dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 mL, larutan dipanaskan pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 1 jam, kemudian diambil kertas saring dari tabung reaksi (Adney dan Baker, 1996). Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL larutan fenol 5% dan 2,5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat kemudian dihomogenkan. Larutan dilakukan pengenceran dengan penambahan buffer Na-sitrat. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 495 nm (Dubois, *et al.*, 1956). Aktivitas enzim selulase dihitung dengan persamaan (Kamila, 2003) :

$$\text{Aktivitas enzim selulase (U/mL)} = \frac{G \times Fp}{t}$$

Keterangan:

G = glukosa yang dihasilkan

Fp = Faktor pengenceran

t = waktu inkubasi

konsentrasi glukosa yang didapat diplot pada persamaan kurva kalibrasi.

### Tahap hidrolisis sabut kelapa

Enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* dicampur berdasarkan variasi 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 berdasarkan U/mL aktivitas enzim dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi 5 g sabut kelapa dan ditambahkan akuades hingga volumenya 150 mL, kemudian diaduk dengan kecepatan 160 rpm, diukur pH awal. Diatur pH dengan penambahan 0,1 M HCl atau 0,1 M NaOH hingga diperoleh pH 4, 5 dan 6 kemudian dipanaskan pada suhu 40°C. Setelah itu dianalisa kadar glukosa pada waktu tertentu 0, 2, 4, 6, dan 8 jam (Anwar, dkk., 2011).

### Uji kandungan gula pereduksi metode Samogyi-Nelson (AOAC,1990).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Delignifikasi

Sabut kelapa yang akan digunakan untuk hidrolisis dilakukan proses delignifikasi dengan NaOH untuk menghilangkan kandungan lignin yang ada di dalam sabut kelapa, dimana ikatan silang dari struktur aromatik lignin dapat memperlambat penetrasi oleh enzim sehingga mempengaruhi proses hidrolisis.

Larutan NaOH dapat menyerang dan merusak struktur lignin pada bagian kristalin dan amorf serta memisahkan sebagian hemiselulosa (Gunam dan Antara, 1999). Ion OH<sup>-</sup> dari NaOH akan memutuskan ikatan-ikatan dari struktur dasar lignin sedangkan ion Na<sup>+</sup> akan berikatan dengan lignin membentuk natrium fenolat. Garam fenolat ini bersifat mudah larut. Lignin yang terlarut ditandai dengan warna hitam pada larutan yang disebut lindi hitam (*black liquor*).

### Produksi enzim selulase

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang diproduksi di luar sel mikroorganisme selulolitik. Interaksi antara substrat selulosa (S) dan enzim selulase (E) akan membentuk kompleks enzim substrat (ES) dan menghasilkan glukosa (P) sebagai produk akhir sesuai dengan reaksi berikut:



Produksi enzim selulase merupakan tahap dimana enzim dihasilkan dari proses fermentasi sabut kelapa akibat dari metabolisme *A.niger* dan *T.reesei*. Proses fermentasi meliputi pemberian larutan nutrisi dan sterilisasi media fermentasi.

Pertumbuhan jamur pada media fermentasi dipengaruhi oleh nutrisi yang ada didalam substrat maupun yang diberikan ke substrat. Larutan nutrisi yang digunakan urea, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>•H<sub>2</sub>O (Singhania, *et al.*, 2006). Sumber nutrisi yang diperlukan oleh jamur terdiri dari unsur C, N dan mineral dengan perbandingan tertentu. Sumber karbon diperoleh dari substrat yang digunakan yaitu sabut kelapa. Karbon berfungsi sebagai unsur utama dalam pembentukan sel.

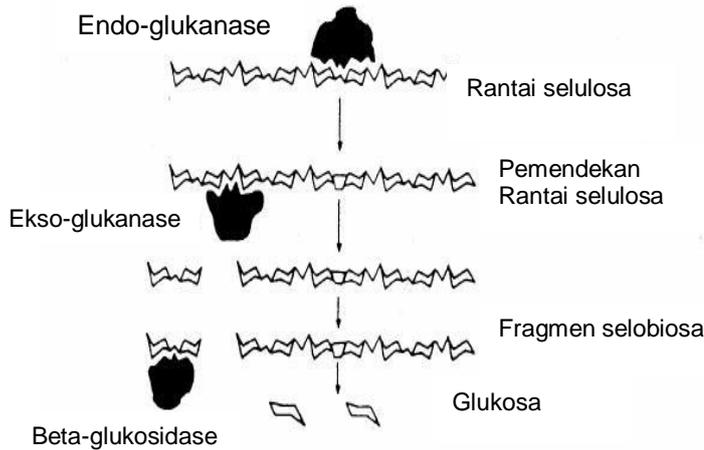
Urea CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, dan amonium sulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> merupakan sumber nitrogen nitrogen yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhan dan sekresi enzim. Sedangkan Magnesium, dan kalsium diperlukan sebagai pengendapan senyawa-senyawa kimia yang dapat mengganggu pertumbuhan jamur *A.niger* dan *T.reesei* (Taufik, 1992). Magnesium berfungsi sebagai kofaktor dalam mengatur jumlah enzim yang terlibat dalam reaksi (Gandjar, 2006).

Enzim selulase diekstraksi menggunakan 100 mL larutan tween-80 0,1% yang berperan sebagai surfaktan non ionik yang dapat menurunkan tegangan antara air dan spora karena spora dari *A.niger* dan *T.reesei* tidak larut dalam air. Larutan tween-80 juga dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel sehingga proses keluarnya enzim dari dinding sel menjadi lebih mudah. Selain itu penggunaan tween-80 tidak mempengaruhi pH dari ekstrak enzim karena sifatnya yang non ionik.

Satu unit aktivitas enzim setara dengan satu mikromol glukosa yang dihasilkan pada proses hidrolisis tiap menit. Aktivitas enzim yang dihasilkan dari *T.reesei* sebesar 0,038 U/mL dan *A.niger* sebesar 0,036 U/mL.

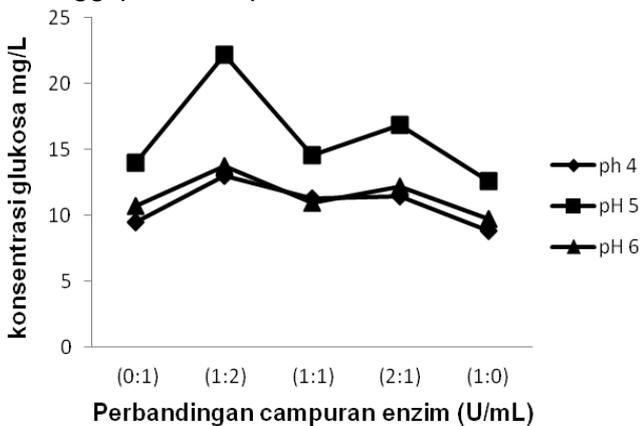
### Pengaruh perbandingan campuran enzim selulase terhadap konsentrasi glukosa

Enzim selulolitik yang bekerja secara sinergis menghasilkan glukosa melalui proses hidrolisis. Enzim selulolitik merupakan enzim yang terdiri dari endo-β-1,4-glukanase dan ekso-1,4-glukanase dan β-glukosidase memotong ikatan rantai dalam selulosa menghasilkan molekul-molekul selulosa yang lebih pendek. Ekso-1,4-glukanase memotong ujung rantai selulosa menghasilkan molekul selobiosa, sedangkan β-glukosidase memotong molekul selobiosa menjadi dua molekul glukosa.



Gambar 1. Mekanisme hidrolisis selulosa (Shofiyanto, 2008).

Kurva pada Gambar 2 menunjukkan Perbandingan campuran enzim 1:2 yang menghasilkan konsentrasi glukosa tertinggi sebesar 22,3 mg/L dibandingkan dengan campuran enzim lainnya. Penelitian yang dilakukan Sanjaya dan Adrianti (2010) serta Anwar (2010) tentang hidrolisis jerami padi menggunakan campuran enzim dari *A.niger* dan *T.reesei* menghasilkan konsentrasi glukosa tertinggi pada campuran enzim 1:2.

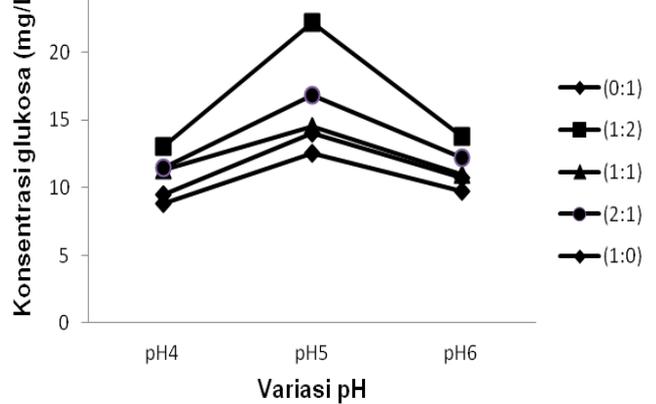


Gambar 2. Kurva pengaruh perbandingan campuran enzim terhadap kadar glukosa menggunakan campuran enzim dari *T.reesei* dan *A.niger* 0:1, 1:2, 1:1, 2:1,1:0 pada pH 4, 5 dan 6.

**Pengaruh pH terhadap konsentrasi glukosa**

Enzim merupakan suatu protein yang memiliki aktivitas biokimia sebagai katalis suatu reaksi. Kerja enzim sebagai protein dipengaruhi oleh tingkat kondisi pH nya. Aktivitas optimal suatu enzim bergantung pada kondisi pH nya, kondisi pH yang optimum akan membantu enzim dalam mengkatalis suatu reaksi dengan baik. Masing-masing enzim memiliki pH optimum yang

berbeda. Enzim tidak dapat bekerja pada pH yang terlalu rendah (asam) atau pH yang terlalu tinggi (basa). Pada pH yang terlalu asam atau basa enzim akan terdenaturasi sehingga sisi aktif enzim akan terganggu.



Gambar 3. Kurva pengaruh pH terhadap konsentrasi glukosa dengan campuran enzim dari *A.niger* dan *T.reesei* 0:1, 1:2, 1:1, 2:1,1:0

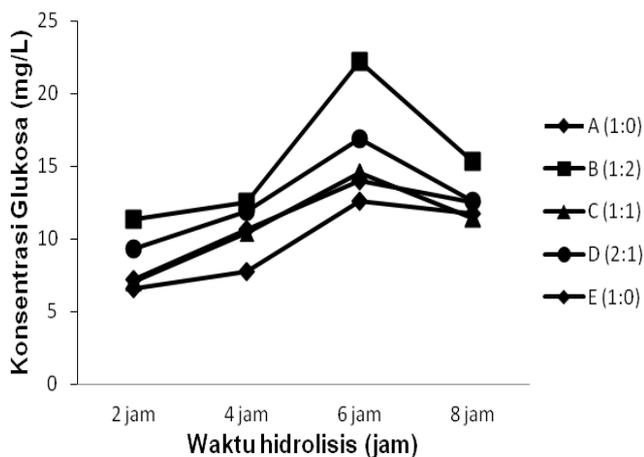
Kurva pada Gambar 3 menunjukkan bahwa enzim selulase bekerja optimum menghasilkan konsentrasi glukosa tertinggi pada pH 5.

Menurut Monica (2007) aktivitas enzim ditentukan oleh gugus aktif pada rantai samping enzim. Proses hidrolisis selulosa oleh selulase terjadi pada sisi aktif asam amino glutamat. Fraksi gugus (-COOH) dari asam amino glutamat akan bermuatan negatif membentuk (-COO). Apabila jumlah gugus karboksil dari enzim meningkat maka protonasi oksigen glikosidik yang mengawali pembentukan kompleks glikosil enzim akan semakin mudah terjadi karena jumlah dari gugus karboksil dari enzim yang meningkat. Hal ini mempengaruhi aktivitas enzim menjadi meningkat.

Aktivitas selulase dihambat oleh muatan fraksi gugus sulfhidril (-SH) dari asam amino sistein. Hal ini mengakibatkan penurunan aktivitas enzim. Peningkatan pH akan menyebabkan kelebihan ion -OH dalam larutan sehingga fraksi gugus aktif sulfhidril (-SH) kehilangan muatan positif membentuk gugus -S-. Hal ini mengakibatkan protonasi yang melibatkan gugus fungsi sulfhidril (-SH) terhambat sehingga interaksi substrat dan enzim tidak dapat berlangsung dengan sesuai dan pembentukan kompleks E-S menjadi terhambat. Kondisi ini mengakibatkan konsentrasi glukosa menurun (Monica, 2007).

### Pengaruh waktu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa

Kurva pada Gambar 4 menunjukkan hidrolisis selulosa dari sabut kelapa menggunakan campuran selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* 0:1, 1:2, 1:1, 2:1,1:0 pada pH 5 menghasilkan konsentrasi glukosa paling tinggi pada waktu hidrolisis 6 jam. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Sanjaya dan Adrianti (2010) hidrolisis jerami padi menggunakan campuran enzim *A.niger* dan *T.reesei* menghasilkan konsentrasi glukosa tertinggi berada pada waktu hidrolisis 7 jam.



Gambar 4. Kurva pengaruh waktu hidrolisis terhadap konsentrasi glukosa dengan campuran enzim selulase dari *A.niger* dan *T.reesei* 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0

Peningkatan konsentrasi glukosa yang dihasilkan pada waktu hidrolisis 6 jam menunjukkan bahwa terjadi interaksi antara enzim selulase dengan substrat yang tinggi. Interaksi antara enzim selulase dengan substrat selulosa akan membentuk kompleks enzim-substrat yang menghasilkan glukosa sebagai produk. Enzim memiliki interaksi dengan substrat yang semakin lama menyebabkan reaksi berjalan lebih maksimal sehingga konsentrasi glukosa yang dihasilkan menjadi lebih tinggi.

### SIMPULAN

Kondisi optimum hidrolisis selulosa dari sabut kelapa berada pada pH 5, waktu hidrolisis selama 6 jam, dengan campuran enzim *A.niger* dan *T.reesei* 1:2. Kadar glukosa tertinggi yang dihasilkan dari hidrolisis enzimatik sabut kelapa tersebut di atas sebesar 22,3 mg/L.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adney, B. And Baker J., 1996, Measurement of Cellulose Activities, National Renewable Energy Laboratory, report.nf NREL/TP-501-42628.
- Anwar, N.; A. Widjaja; dan S. Winardi, 2010, Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase Kasar dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*, Institut Teknologi Sepuluh November, *Makara, Sains*, 14(2): 113-116.
- Ahamed, A. P. Vermette (2008), "Culture-based Strategies to Enhance Cellulase Enzyme Production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in Bioreactor Culture Conditions", *Biochemical Engineering Journal* 40, 399-407.
- Official of the Association of Chemistry inc (AOAC)., 1990 Arlington. Virginia USA.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", 28(3):350-356
- Gandjar, I., 2006, "Mikrobiologi Dasar dan Terapan", Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Gunam, I.B.W., dan Antara, N.S., 1999, Study on Sodium Hydroxide Treatment Of Corn Stalk to Increase Its Cellulose Saccharification Enzymatically by Using Culture Filtrate of *Trichoderma reesei*. *Gitayana, Agric. Technol. J*, 5 (1): 34-38
- Harfinda, E.M., 2011, Pengaruh Kadar Air, pH, dan Waktu Fermentasi Terhadap Produksi Enzim Selulase oleh *Aspergillus niger* Pada Ampas Sagu, Universitas Tanjungpura, Pontianak, (Skripsi).
- Juhasz, T., K. Kozma, Z. Szengyel, K. Reczey 2003, Production of  $\beta$ -Glucosidase in Mixed Culture of *Aspergillus niger* BKMf 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30, *Food Technol. Biotechnol.* 41 (1) 49-53.
- Kamila, L. 2003, "Penciriaan Selulolitik Isolat Khamir *Rhodotorula sp.* Dari Tanah Taman Nasional Gunung Halimu", Jurusan Kimia, IPB, (Skripsi)
- Martins, L.F., D. Kolling, M. Camassola, A.J.P. Dillon, L.P. Ramos (2008), "Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates", *Bioresource Technology*, 99, 1417-1424

- Monica, A.D.N., 2007, "Studi Aktivitas Spesifik Selulosa dari *Lactobacillus collinodes* yang Dimurnikan dengan Pengendapan Bertingkat Amonium Sulfat", Jurusan Kimia, Universitas Brawijaya, Malang, (Skripsi).
- Narasimha, G., Sridevi, A., Viswanath, B., Subosh, C.M, and Rajasekhar, R.B., 2006, "Nutrient Effect on Production of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus niger*", *Afr. J. Biotechnol.*, 5(5):472-476.
- Sanjaya, W. dan S. Adrianti, 2010, Optimasi Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menjadi Glukosa Untuk Bahan Baku Biofuel Menggunakan Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*, Institut Teknologi Sepuluh November, (Skripsi).
- Sukardati, S., Kholisoh, D.S., Prasetyo, H., Santoso P.W., dan Mursini.T 2010, "Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa Menggunakan Jamur *Trichoderma reesei*", Teknik Kimia, UPN Yogyakarta, (Tesis).
- Szendefy, J.; Szakacs, G. And Christopher, L., 2006, "potential of solid-state Fermentation Enzymes of *Aspergillus* in Biobleaching of Paper Pulp", *Enzymes and Microbial Technology*, 39, 1354-1360.
- Taherzadeh, M.J. dan Karimi, K., Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review, 2007, *Bioresources* 2(3), pp. 472-499.
- Taufik, E., 1992, "Fermentasi Media Padat Kulit Buah Coklat oleh *Aspergillus niger* untuk Produksi Pertinase", Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bandung. *Thermomyces Lanuginosus* Xylanases, Helsinki University of Technology, Department of Chemical Technology, (Disertasi).
- Ul-Haq, I.; M. M. Javed; T. S. Khan; and Z. Siddiq, 2005, Cotton Saccharifying Activity of Cellulases Produced by Co-culture of *Aspergillus Niger* and *Trichoderma Viride*, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(3): 241-245.