

FERMENTASI ONGGOK MENGGUNAKAN MUTAN *TRICHODERMA* UNTUK PRODUKSI SELULASE

Fermentation of Cassava Bagasse by Trichoderma Mutant for Cellulase Production

Ali Mursyid Wahyu Mulyono¹, Muhammad Nur Cahyanto², Zuprizal³,
Zaenal Bachruddin³

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh a_w awal medium, konsentrasi inokulum, pH awal, dan waktu fermentasi onggok menggunakan mutan *Trichoderma AAI* terhadap produksi selulase. Fermentasi onggok menggunakan metode fermentasi substrat padat. Medium diinokulasi dengan mutan *Trichoderma AAI* dan diinkubasikan selama 4 hari. Variabel yang dipelajari meliputi a_w awal medium (0,96; 0,97; 0,98; dan 0,99), konsentrasi inokulum (10^5 , 10^6 , 10^7 , dan 10^8 spora/g), dan pH awal medium (4,5, 5,0, 5,5, dan 6,0.). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi terbaik fermentasi onggok menggunakan mutan *Trichoderma AAI* untuk menghasilkan selulase adalah: a_w awal medium 0,99, konsentrasi inokulum 10^7 spora/g, pH awal medium 5, dan waktu fermentasi 3 hari. Aktivitas selulase yang dihasilkan adalah 0,168 dan 0,072 $\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$ masing-masing untuk carboxy methyl cellulase dan filter paper-ase.

Kata kunci: *Onggok, Trichoderma, mutan, fermentasi, selulase*

ABSTRACT

The objective of the research was to study the influence of initial a_w of medium, inoculum concentration, initial pH of the medium and incubation time during fermentation of cassava bagasse by mutant *Trichoderma AAI* on cellulase production. Fermentation of cassava bagasse was carried out by solid substrate fermentation method. The medium was inoculated by *Trichoderma AAI* and incubated for four days. The initial a_w of medium (0.96, 0.97, 0.98, and 0.99), inoculum concentration (10^5 , 10^6 , 10^7 , dan 10^8 spores/g), and initial pH of the medium (4.5, 5.0, 5.5, and 6.0) were studied by measuring the cellulase activity during fermentation. The production of cellulase was the best when the medium had initial a_w of 0.99, inoculum concentration of 10^7 spores/g, and initial pH of 5. The peak of the cellulase production was achieved after 3-days fermentation. The cellulase activities obtained were 0.168 and 0.072 $\mu\text{mol}/\text{minute}/\text{ml}$ for carboxy methyl cellulase dan filter paper-ase respectively.

Keywords: *Cassava bagasse, Trichoderma, mutant, fermentation, cellulase*

PENDAHULUAN

Onggok adalah limbah padat berupa ampas dari pengolahan ubi kayu menjadi tapioka, yang apabila dibiarkan dalam beberapa hari akan menimbulkan bau asam dan busuk serta bersifat mencemari lingkungan (Balitnak, 1994). Produksi ubi kayu Indonesia pada tahun 2002 mencapai 16,9 juta ton (Anonim, 2003) menempati urutan keempat terbesar

setelah Nigeria, Brazil dan Thailand. Sebagian besar produksi ubi kayu diserap industri tapioka, sehingga setiap tahun dihasilkan tidak kurang dari 1,2 juta ton onggok.

Unsur utama nutrisi onggok adalah karbohidrat (Tisnadjaja, 1996; Mulyono, 1999), sehingga dari segi kapasitas produksi dan kandungan karbohidratnya, onggok sangat potensial menjadi bahan pakan unggas (Balitnak, 1994). Tingginya serat kasar, rendahnya protein (Mulyono, 1999), dan

¹ Fakultas Pertanian, Universitas Veteran Bangun Nusantara, Sukoharjo

² Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Sosio Yustisia, Yogyakarta 55281

³ Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Agro, Yogyakarta 55281

rendahnya pencernaan merupakan kendala nutritif pemanfaatan onggok sebagai bahan pakan unggas (Mulyono dan Zuprizal, 2005). Serat kasar merupakan nutrisi khas penyusun dinding sel tanaman, yang bagian besarnya berupa selulosa. Selulosa adalah polimer D-glukosa dengan ikatan β -1,4 glikosidik (Carlile dkk., 2001) yang tidak dapat dicerna oleh unggas (Santos dkk., 2004). Penggunaan onggok pada aras 30 % sebagai pengganti jagung akan menurunkan performan ayam (Mulyono, 1999).

Fermentasi selulolitik merupakan cara mengatasi kendala bahan kaya selulosa. Mikrobial melepaskan enzim selulase untuk mendegradasi dan mentransformasi makromolekul selulosa menjadi molekul sederhana yang mudah diabsorpsi sel (Gianfreda and Rao, 2004). Degradasi dinding sel akibat hidrolisis enzimatis menyebabkan terbebaskannya isi sel (Li dkk., 2004), sehingga dapat dicerna oleh enzim endogen unggas (Hetland dkk., 2004).

Mutan *Trichoderma* AA1 merupakan mikrobial penghasil selulase dan resisten terhadap represi katabolik (Mulyono dkk., 2007) yang sangat potensial digunakan dalam fermentasi pada substrat kaya selulosa seperti onggok. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh a_w awal medium, konsentrasi inokulum, pH awal, dan waktu inkubasi pada fermentasi onggok menggunakan mutan *Trichoderma* AA1 terhadap produksi selulasenya.

METODE PENELITIAN

Mikrobial

Mikrobial yang digunakan adalah Mutan *Trichoderma* AA1 yang telah diuji mampu memproduksi selulase lebih tinggi dibandingkan dengan galur aslinya (Mulyono dkk., 2007).

Medium Fermentasi

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium padat berupa campuran onggok kering giling 10 g, aquades 25 ml, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,0375 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,015 g, KH_2PO_4 0,0075 g, gliserol 0,05 g dimasukkan dalam labu erlenmeyer 250 ml. Labu disterilisasi dengan *autoclave* pada tekanan 15 psi selama 15 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu kamar.

Fermentasi Onggok

Medium diinokulasi dengan spora mutan *Trichoderma* AA1 dan diinkubasikan selama 4 hari. Percobaan dilakukan dalam 4 tahap untuk mempelajari 4 variabel kondisi fermentasi. Variabel kondisi fermentasi meliputi a_w awal medium (0,96, 0,97, 0,98, dan 0,99), konsentrasi inokulum (10^5 , 10^6 , 10^7 ,

dan 10^8 spora/g), dan pH awal medium (4,5, 5,0, 5,5, dan 6,0). Pada waktu mempelajari pengaruh a_w awal, pengaturan konsentrasi inokulum dan pH awal medium masing-masing 10^7 spora/g dan 4,5.

Penentuan a_w awal dilakukan dengan membuat variasi kadar air (20 sampai dengan 75%) dalam medium. Pengukuran a_w menggunakan *water activity meter*, dan dilakukan pada setiap variasi kadar air, sehingga diketahui kadar air medium untuk mendapatkan a_w medium sesuai variasi perlakuan. Konsentrasi inokulum ditentukan dengan menghitung jumlah spora per milliliter suspensi spora menggunakan hemisitometer. Hasil perhitungan digunakan untuk menentukan volume suspensi spora yang dibutuhkan untuk 10 g medium. Pengaturan pH awal medium dilakukan dengan menambahkan larutan NaOH 0,01N tetes demi tetes ke dalam medium. Pengukuran pH dilakukan setiap penambahan satu tetes NaOH, sehingga ditemukan jumlah tetes NaOH untuk mendapatkan pH medium sesuai variasi perlakuan.

Preparasi Ekstrak Onggok

Ekstraksi onggok terfermentasi mengacu Fujian dkk. (2002). Semua kultur hasil fermentasi dalam labu erlenmeyer ditambah aquades 80 ml kemudian didiamkan selama 4 jam pada suhu ruang. Materi dalam erlenmeyer disaring menggunakan kertas saring. Materi cairan disentrifugasi kecepatan 5.000 rpm pada 4 °C selama 15 menit. Supernatan diambil untuk pengujian aktivitas enzim selulase dan protein terlarut.

Analisis Selulase

Enzim selulase yang diukur meliputi aktivitas *carboxy methyl cellulase* (CMCase) dan *filter paper-ase* (FPase). Substrat kertas saring Whatman No.1 berukuran 1 x 6 cm (untuk pengukuran FPase) dan *carboxy methyl cellulose* (CMC) 1 % (untuk pengukuran CMCase) masing-masing direaksikan dengan supernatan kultur onggok pada larutan buffer sitrat 50mM pH 4,8 selama 60 menit. Gula reduksi yang dibebaskan diukur dengan metode *dinitro calycilic acid* (DNS) (Miller, 1959). Larutan uji 1 ml ditambah reagen DNS 3 ml dan diinkubasikan pada air mendidih selama 5 menit, kemudian didinginkan menggunakan air es. Warna yang terbentuk ditera menggunakan spektrofotometer pada 540 nm. Kadar gula reduksi ditentukan dengan memplotkan absorbansi supernatan pada persamaan regresi kurva standar larutan glukosa. Satuan aktivitas selulase adalah μmol gula reduksi dibebaskan (ekuivalen glukosa) per menit.

Analisis Protein Terlarut

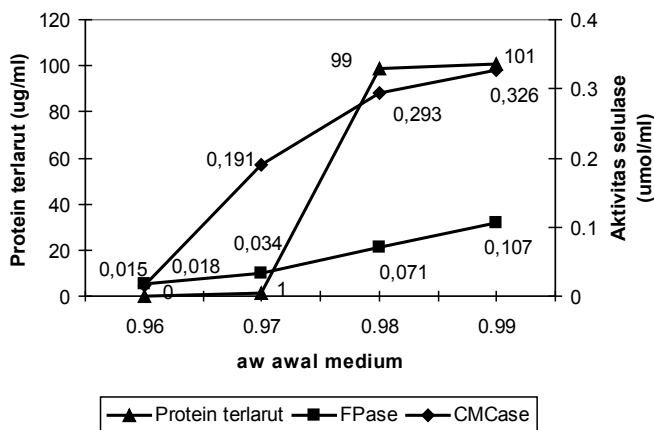
Protein terlarut diukur dengan metode Bradford (1976) dengan satuan μg protein terlarut/ml kultur. Supernatan kultur onggok 0,1 ml direaksikan dengan 1 ml Reagen Bradford.

Warna biru yang dihasilkan ditera dengan spektrofotometer pada 595 nm. Kadar protein ditentukan dengan mem-plot-kan absorbansi supernatan pada persamaan regresi kurva standar *bovine serum albumin* (BSA).

HASIL DAN PEMBAHASAN

a_w Awal Medium Terhadap Selulase

Aktivitas air (a_w) merupakan air yang terdapat pada matrik padatan lapisan tipis yang terserap pada permukaan partikel atau terikat pada kapiler padatan (Raimbault, 1998). Kondisi ini sangat menentukan tingkat pertumbuhan mikrobia. a_w rendah mendorong terjadinya sporulasi yang lebih awal, sehingga pertumbuhan miselium akan terhenti (Krishna, 2005), yang selanjutnya akan berpengaruh pada produksi selulase. Pengaruh a_w awal medium terhadap produksi selulase pada kondisi konsentrasi inokulum 10⁷ spora/g, pH awal 4,5; dan waktu inkubasi 4 hari terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas enzim selulase pada berbagai variasi a_w awal medium

Pada a_w 0,96 menunjukkan bahwa kultur tidak tumbuh dengan baik karena kurangnya kelembaban pada substrat. Hal ini bisa dilihat dari aktivitas selulase dan protein terlarut yang memberikan nilai mendekati 0. Mulai dari a_w 0,97 sampai dengan 0,99 terlihat terjadi peningkatan yang tajam pada aktivitas selulase dan protein terlarut. Khusus pada protein terlarut terlihat peningkatan yang kurang berarti dari a_w 0,98 menuju 0,99, meskipun aktivitas selulasenya masih meningkat tajam. a_w awal terbaik untuk menghasilkan selulase pada penelitian ini adalah 0,99 dengan kandungan air 71,2 %.

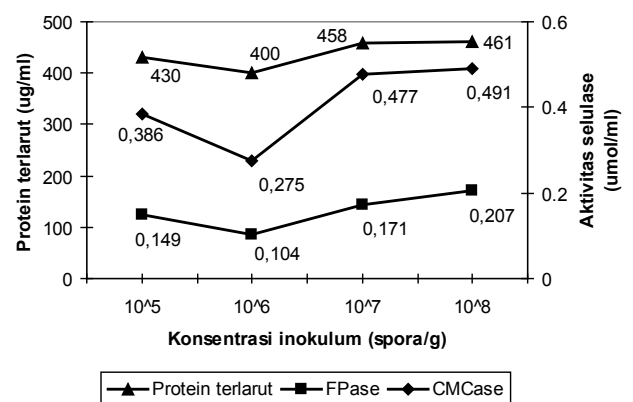
Peningkatan aktivitas selulase akibat peningkatan a_w onggok terkait dengan kebutuhan mikrobia terhadap air untuk aktivitas metabolismenya (Khrisna, 2005). Keberadaan air dalam onggok membuat enzim selulase miselium lebih mudah menjangkau substrat, sehingga dapat meningkatkan

ketersediaan glukosa sebagai sumber energi bagi mikrobia. Hal ini mendorong pertumbuhan dan selanjutnya miselium mensekresikan enzim selulase lebih banyak. Nilai a_w onggok yang tinggi juga merupakan suasana yang cocok untuk reaksi enzim selulase dalam mendegradasi selulosa onggok. Nilai a_w optimal untuk pertumbuhan *T. viridae* adalah 0,99, dan penurunan a_w menjadi 0,98 mendorong sporogenesis (Gervats dkk., 1988). Troller dan Stinson (1978) menyatakan bahwa penurunan a_w dari 0,996 menuju 0,97 dan berlanjut hingga 0,94 menyebabkan penurunan drastis terhadap protein seluler dan enzim ekstraseluler, dan pada a_w 0,91 sudah tidak ditemukan adanya aktivitas enzim ekstraseluler.

Banyak peneliti menggunakan parameter kadar air substrat untuk menggambarkan a_w. Namun hal ini kurang tepat apabila substrat adalah bahan yang kurang higroskopis. Arzumanov dkk. (2005) melaporkan kadar air optimum untuk terjadinya sporulasi adalah 57-58 % pada kultur *Metarhizium anisopliae* IMI 331189. Kadar air optimum untuk fermentasi substrat padat pada *Trichoderma harzianum* adalah 70 % (Sheikh dkk., 2003) dan 65,7 % (Nampoothiri dkk., 2004), *Trichoderma longibrachiatum* pada kadar air 55 % (Ridder dkk., 2005), dan *Chaetomium cellulolyticum* pada kadar air 80 % (Abdullah dkk., 2004).

Konsentrasi Inokulum Terhadap Selulase

Konsentrasi inokulum merupakan jumlah spora awal pada saat inokulasi. Jumlah ini sangat menentukan kecepatan pertumbuhan miselium dan produksi selulasenya. Pengaruh konsentrasi inokulum terhadap produksi selulase pada kondisi a_w awal 0,99; pH awal 4,5; dan waktu inkubasi 4 hari ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas enzim selulase pada berbagai variasi konsentrasi inokulum

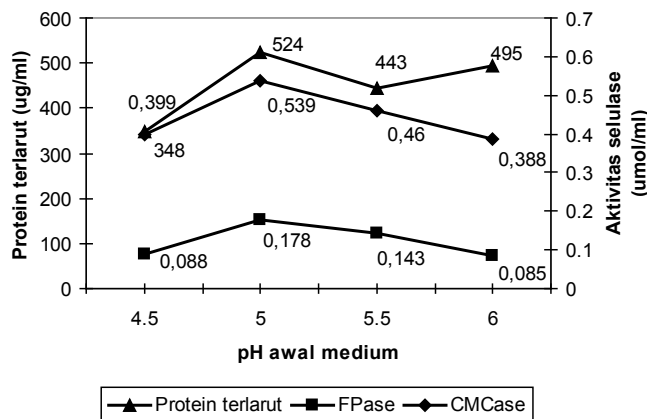
Aktivitas selulase (FPase dan CMCase) dan protein terlarut mempunyai kecenderungan meningkat selaras dengan meningkatnya konsentrasi inokulum dari 10⁶ menuju 10⁸ spora/g. Peningkatan selulase dan protein terlarut cukup tajam

terjadi pada konsentrasi inokulum 10^6 menuju 10^7 , setelah itu peningkatannya landai. Semakin tinggi konsentrasi inokulum berarti jumlah awal sel juga semakin tinggi, sehingga akan menghasilkan miselium yang lebih banyak dan produksi selulase juga akan meningkat. Kenaikan selulase kurang berarti ketika konsentrasi inokulum ditingkatkan dari 10^7 menjadi 10^8 . Konsentrasi inokulum 10^7 spora/g merupakan hasil terbaik untuk dapat menghasilkan aktivitas selulase yang tinggi. Hasil ini selaras dengan Nampoothiri dkk. (2004) bahwa konsentrasi inokulum 4×10^7 spora *T. harzianum* menghasilkan khitinase maksimum. Santiago dkk. (2006) menginokulasikan mutan *Aspergillus niger* UAM-GS1 sebanyak 2×10^7 spora/g substrat kopra dengan metode fermentasi substrat padat.

Konsentrasi inokulum merupakan jumlah awal sel yang akan ditumbuhkan pada onggok, sehingga jumlah lebih tinggi akan menghasilkan miselium yang lebih banyak dan produksi selulase juga akan meningkat. Ketika jumlah sel awal ditingkatkan lagi, pada satuan waktu inkubasi yang sama, ada kemungkinan jumlah miselium yang tumbuh telah menutupi seluruh permukaan onggok. Kondisi ini kemungkinan menurunkan ketersediaan oksigen, sehingga menghambat pertumbuhan miselium. Hal inilah yang mungkin menjadi penyebab tipisnya perubahan aktivitas selulase dan protein terlarut akibat perubahan konsentrasi inokulum dari 10^7 menjadi 10^8 .

pH Awal Medium Terhadap Selulase

Mikrobia membutuhkan kondisi keasaman medium yang spesifik untuk keberlangsungan hidup dan pertumbuhannya. Pengaruh pH awal medium terhadap produksi selulase pada kondisi a_w awal 0,99; konsentrasi inokulum 10^7 spora/g, dan waktu inkubasi 4 hari sebagaimana pada Gambar 3.



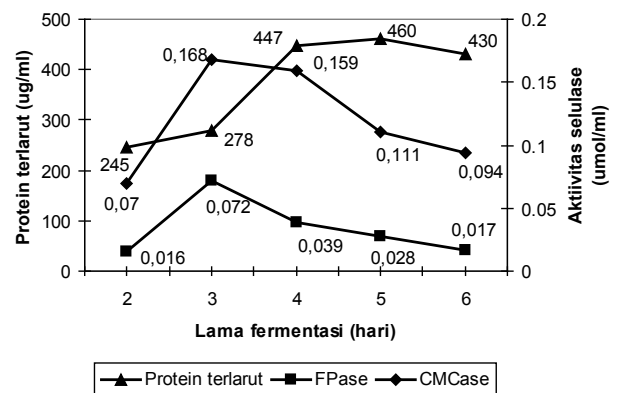
Gambar 3. Aktivitas enzim selulase pada berbagai pH awal medium

Aktivitas selulase terlihat meningkat selaras dengan meningkatnya pH awal medium dari 4,5 menuju 5,0.

Aktivitas selulase menurun kembali setelah pH dinaikkan lagi menjadi 5,5 dan berlanjut hingga 6,0. Kisaran pH awal 4,5 – 5,5 mempunyai pengaruh yang sama terhadap aktivitas selulase dan protein terlarut, kecuali pada pH 6,0. pH awal 5,0 merupakan pH terbaik yang dibutuhkan kultur mutan *Trichoderma* AA1 pada substrat onggok dengan metode fermentasi substrat padat. Aktivitas FPase dan CMCCase yang dihasilkan pada pH ini masing-masing 0,178 dan 0,539 umol/ml kultur. Hasil ini selaras dengan Wang dkk. (2006) yang melaporkan bahwa untuk menghasilkan FPase dan CMCCase yang optimum dari *T. reesei* pada substrat padat jerami jagung dibutuhkan pH 5,0. Sementara pada fermentasi kultur terendam, *T. reesei* membutuhkan pH 4,8 untuk menghasilkan selulase maksimum (Hu dkk., 2005). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa aktivitas endoglukanase tertinggi dicapai pada pH 5,0 dalam suhu ruang dari kultur *Melanocarpus albomyces* (Miettinen-Oinonen dkk., 2004).

Waktu Fermentasi Terhadap Selulase

Perubahan produksi selulase dari waktu ke waktu menggambarkan pola produksi selulase sekaligus pertumbuhan mikrobia. Pola produksi selulase fermentasi onggok menggunakan mutan *Trichoderma* AA1 terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Aktivitas enzim selulase pada berbagai variasi lama fermentasi

Aktivitas selulase meningkat tajam sampai dengan hari ke-3, kemudian sedikit demi sedikit menurun pada hari ke-4 sampai dengan hari ke-6. Kecenderungan protein terlarut meningkat tajam sampai dengan hari ke-4, kemudian relatif konstan sampai dengan hari ke-6. Aktivitas selulase dan protein terlarut berada di puncak pada lama fermentasi antara 3 dan 4 hari. Hal ini sesuai dengan Wang dkk. (2006) yang melaporkan adanya peningkatan selulase sampai dengan 72 jam yang kemudian menurun kembali pada kultur *T. reesei* yang ditumbuhkan pada substrat jerami jagung dengan metode fermentasi substrat padat.

Pola protein terlarut mulai hari ke-4 menunjukkan peningkatan, sedangkan aktivitas selulase sudah menurun.

Hal ini terjadi mungkin disebabkan kondisi pH kultur yang sudah terlalu rendah yaitu 2,1. Meskipun sel masih mampu mensekresikan selulase namun nilai pH tersebut sudah menghambat aktivitas enzim.

Kinetika aktivitas selulase dan protein terlarut menunjukkan bahwa mutan *Trichoderma* AA1 mensekresi enzim selulase yang mendegradasi selulosa onggok. Kandungan selulosa onggok 29 % dan setelah mengalami fermentasi menurun menjadi 18 % (data tidak dipublikasikan). Kleman-Leyer dkk. (1996) menyatakan bahwa penambahan waktu fermentasi *T. reesei* pada substrat kain katun akan meningkatkan sekresi endoglukanase yang akan menurunkan kandungan selulosa katun. Enzim kompleks selulase dari *T. reesei* mengkonversi selulosa menjadi oligomer-oligomer terlarut dan akhirnya menjadi glukosa.

KESIMPULAN

Produksi selulase selama fermentasi onggok menggunakan mutan *Trichoderma* AA1 dipengaruhi a_w awal medium, konsentrasi inokulum, dan pH awal medium. Kondisi terbaik fermentasi onggok menggunakan mutan *Trichoderma* AA1 untuk menghasilkan selulase dalam penelitian ini adalah a_w awal medium 0,99; konsentrasi inokulum 10^7 spora/g, pH awal medium 5,0 dan waktu fermentasi 3 hari. Aktivitas selulase yang dihasilkan adalah 0,168 dan 0,072 $\mu\text{mol}/\text{menit}/\text{ml}$ masing-masing untuk CMC-ase dan FP-ase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DPPM), Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Penelitian Hibah Bersaing XIV/2 Tahun 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A.L., Tengerdy, R.P. dan Murphy, V.G. (2004). Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering* **27**: 20-27.
- Anonim (2003). *Produksi Tanaman Padi dan Palawija di Indonesia*. Biro Pusat Statistik. Jakarta.
- Arzumanov, T., Jenkins, N. dan Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry* **40**: 1037-1042.
- Balitnak (1994). Pemanfaatan Limbah Pertanian dan Limbah Pengolahan Tapioka/Sagu Sebagai Pakan Ternak. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* **4**: 7.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C. dan Gooday, G.W. (2001). *The Fungi*. 2nd ed. Academy Press, London.
- Fujian, X.C., Zhang, H. dan Zuohu, L. (2002). Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 45-48.
- Gervats, P., Molin, P., Grajek, W. dan Bensoussan, M. (1988). Influence of water activity of solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering* **31**: 457-463.
- Gianfreda, L. dan Rao, M.A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A Review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**: 339-354.
- Hetland, H., Choct, M. dan Svihus, B. (2004). Role of insoluble non-starch polysaccharides in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal* **60**: 415-422.
- Hu, C.J., Dai, S.M. dan Li, Q.Y. (2005). Optimization of cellulase production using *Trichoderma reesei*. Dari: <http://www.ceps.com.tw/ec>.
- Li, W.F., Sun, J.Y. dan Xu, Z.R. (2004). Effects of NSP degrading enzyme on *in vitro* digestion of barley. *Asian-Australian Journal of Animal Science* **17**: 122-126.
- Kleman-Leyer, K.M., Siika-Aho, M., Teeri, T.T. dan Kirk, T.K. (1996). The cellulases endoglucanase I dan cellobiohydrolases II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2883-2887.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems – An overview. *Critical Reviews in Biotechnology* **25**: 1-30.
- Miettinen-Oinonen, A., Londesborough, J., Joutsjoki, V., Lantto, R. dan Vehmaanpera, J. (2004). Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for teryxile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology* **34**: 332-341.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**: 426-428.

- Mulyono, A.M.W. (1999). Nilai onggok-fermentasi dalam ransum ayam broiler. *Tesis*. Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Mulyono, A.M.W., Cahyanto, M.N., Sardjono, Zuprizal, dan Bachruddin, Z. (2007). Mutasi *Trichoderma sp.* untuk meningkatkan sekresi selulase. *Media Kedokteran Hewan* **22**: 68-73.
- Mulyono, A.M.W. dan Zuprizal (2005). Fermentasi substrat padat pada onggok dengan *Aspergillus oryzae*: evaluasi kandungan protein dan asam amino, pencernaan dan ketersediaan energi pada ayam broiler. *Buletin Peternakan* **29**: 71-78.
- Nampoothiri, K.M., Baiju, T.V., Sdanhya, C., Sabu, A., Szakacs, G. dan Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry* **39**: 1583-1590.
- Rachman, A. (1989). *Pengantar Teknologi Fermentasi*. PAU-IPB, Bogor.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Catolica de Valparaiso, Chile.
- Ridder, E.R., Nokes, S.E. dan Knutson, B.L. (2005). Optimization of solid-state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in forced aeration system. Abstract. Dari: www.asabe.org.
- Santiago, S.N., Gonzales, B.C., Fernandes, F.J., Jurado, A.T. dan Ochoa, S.H. (2006). Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gs1 mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol9-issue1-fulltext-2.
- Santos, Jr.A.A., Ferket, P.R., Grimes, J.L. dan Edens, F.W. (2004). Diatery pentosanase supplementation of diets containing different qualities of wheat on growth performance and metabolizable energy of turkey poult. *International Journal of Poultry Science* **3**: 33-45.
- Sheikh, M.A., Shah, A.H., Nabi, N.G. dan Asgher, M. (2003). Production of pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation of citrus peel. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* **40**: 193-201.
- Tisnadjaja, J. (1996). Pemanfaatan bahan berpati sebagai bahan baku dalam industri asam sitrat. *Warta Biotek* **10**: 3-5.
- Troller, J.A. dan Stinson, J.V. (1978). Influence of water activity on the production of extracellular enzymes by *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **35**: 521-526.
- Wang, J.Sh., Wang, J. dan Gulfranz, M. (2006). Efficient cellulase production from corn straw by *Trichoderma reesei* LW1 through solid state fermentation. Dari <http://www.siu.edu>.