

PENGARUH AMMONIUM SULFAT TERHADAP PERTUMBUHAN DAN KEMAMPUAN *TRICHODERMA REESEI* PK_{1J2} DALAM MENGHIDROLISIS BATANG POHON SINGKONG

Afriyanti¹⁾

¹⁾Fakultas Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Veteran Bangun Nusantara Sukoharjo

Jl. Letjend Sujono Humardani No. 1 – Jombor Sukoharjo; Telp.0271-593156. 57521;

Email: afriyantistp@gmail.com

Abstrak

Batang pohon singkong dapat digunakan sebagai sumber energi alternatif penghasil etanol karena mengandung selulosa. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan amonium sulfat terhadap pertumbuhan dan kemampuan *Trichoderma reesei* dalam menghasilkan gula reduksi dari batang pohon singkong. Penelitian dilakukan tanpa adanya proses *pretreatment*. Batang singkong dicacah untuk mengecilkan ukuran kemudian dihidrolisis. Proses hidrolisis dilakukan dengan perbandingan konsentrasi (NH₄)₂SO₄ sebesar 0%; 0,5%; 1% dan 1,5%. Selama proses fermentasi selulosa batang singkong dilakukan analisis uji aktivitas enzim, kadar biomassa, analisis glukosamin dan kadar gula reduksi. Konsentrasi spora pada awal fermentasi adalah 10⁶ spora/gram batang pohon singkong. Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap pertumbuhan *Trichoderma reesei* PK_{1J2} tetapi tidak berpengaruh terhadap gula reduksi yang dihasilkan sehingga proses hidrolisis selanjutnya tanpa penambahan amonium sulfat. Kadar gula reduksi tertinggi didapatkan setelah tiga hari fermentasi yaitu sebesar 10,828 g/L.

Kata kunci: amonium sulfat, hidrolisis, selulosa, *Trichoderma reesei*.

Abstract

The aims of this research were to analyze the effect of ammonium sulphate addition to the growth and reducing sugar production of *Trichoderma reesei* from cassava stems. Hydrolysis was conducted without pretreatment. Cassava stem was degraded into small pieces with and without addition of ammonium sulphate. The concentration of (NH₄)₂SO₄ were 0%; 0,5%; 1% and 1,5%. During cellulose fermentation of cassava stem, cellulase enzyme activity, dry matter loss, glucosamine content, and reducing sugar were analyzed. Initial spore concentration was 10⁶ spores/g of cassava stem. The results showed that ammonium sulphate affected to the growth but did not affect to the reducing sugar production of *Trichoderma reesei*, therefore hydrolysis continued without ammonium sulphate addition. Highest levels of reducing sugars was obtained after three days of fermentation which was 10,828 g/L.

Keywords: ammonium sulphate, cellulose, hydrolysis, *Trichoderma reesei*.

1. PENDAHULUAN

Singkong (*Mannihot esculenta* Crantz) merupakan salah satu bahan pangan sumber karbohidrat. Pemanfaatan tanamannya sebagian besar menghasilkan umbi singkong untuk kebutuhan pangan sedangkan hanya 10% dari tinggi batang dimanfaatkan untuk ditanam kembali dan 90% merupakan limbah (Sumada dkk, 2011). Kandungan utama batang pohon singkong adalah selulosa (21,43±0,17%), protein kasar (2,72±0,29) dan pati (8,41±0,32%) (Sovorawet & Kongkiattikajorn, 2012). Hasil lain ditunjukkan oleh penelitian Han *et al* (2011), batang pohon singkong memiliki kandungan hemiselulosa 24,3%; selulosa 35,2%; lignin 33,8% dan kadar abu 2,2%. Limbah

batang pohon singkong ini dapat digunakan sebagai sumber energi alternatif penghasil bioetanol karena kandungan selulosanya yang cukup tinggi melalui proses hidrolisis selulosa menjadi gula.

Jamur merupakan sumber utama enzim selulase dan hemiselulase. Semakin meningkatnya biaya fermentasi dalam pembuatan bioetanol, produksi enzim selulase menjadi salah satu tahapan kunci dalam proses hidrolisis bahan lignoselulosa (Kataria dan Ghosh, 2011). *Trichoderma reesei* telah lama dianggap sebagai jamur pemecah ikatan kristalin selulosa yang paling produktif dan kuat (Balat dkk, 2008). Jamur ini memiliki kemampuan memecah selulosa menjadi monomer-monomernya. *Trichoderma reesei* memiliki

kemampuan tumbuh dengan baik dalam *Solid Substrate Fermentation* (SSF), yaitu proses fermentasi yang terjadi dalam kondisi sedikit air bebas. Proses SSF umumnya menggunakan bahan-bahan alami sebagai sumber karbon dan energi seperti singkong, *barley*, dan residu-residu industri pertanian (Shetty dkk, 2006).

Beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan jamur adalah proses perlakuan pendahuluan (*pretreatment*) dan tersedianya nutrisi tambahan. Penelitian ini dilakukan tanpa adanya perlakuan pendahuluan, hanya dengan pencacahan untuk memperluas permukaan substrat sehingga mempermudah penetrasi miselia jamur. Hal tersebut juga bertujuan untuk mengurangi penggunaan bahan kimia yang tidak ramah lingkungan. Nutrien yang ditambahkan adalah amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) sebagai sumber nitrogen yang murah dan mudah didapatkan.

Amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) merupakan salah satu sumber nitrogen anorganik yang memiliki beberapa kelebihan yaitu tidak higroskopis, tahan disimpan dalam waktu lama, mudah larut dalam air serta harga dapat dijangkau masyarakat. Penambahan amonium sulfat dalam substrat fermentasi mampu menghasilkan aktivitas enzim terbaik dibandingkan dengan sumber nitrogen yang lain seperti amonium nitrat, amonium klorida, urea dan pepton (Mukhopadhyay, 1999). Untuk mengurangi biaya produksi, amonium sulfat biasa digunakan untuk menggantikan sumber nitrogen organik seperti pepton. Konsentrasi amonium sulfat 2 g/L menghasilkan aktivitas enzim selulase dari *Trichoderma reesei* pada substrat tongkol jagung tertinggi dibandingkan konsentrasi 4 g/L dan 1 g/L. Gula yang dihasilkan sebesar 7,8 g/L untuk selobiosa; 65,9 g/L untuk glukosa dan 20 g/L untuk xilosa (Xiong et al, 2013).

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan amonium sulfat terhadap pertumbuhan dan kemampuan *Trichoderma reesei* dalam menghasilkan gula reduksi dari batang pohon singkong.

1. METODE

1.1. Persiapan Bahan Dasar

Batang pohon singkong dicuci bersih, dipotong kecil-kecil kemudian dicacah kasar. Setelah itu dicacah hingga halus dan dianalisis kadar air, pH, a_w dan kadar selulosanya. Hancuran batang pohon singkong ini siap dipakai untuk starter dan proses hidrolisis.

1.2. Mikroorganisme dan Penyiapan Starter

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Trichoderma reesei* PK₁J₂ yang didapatkan dari Laboratorium Bioteknologi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada. Sebanyak 100 g hancuran batang pohon singkong yang telah disterilisasi ditambah dengan 10 ml suspensi spora *Trichoderma reesei* yang memiliki konsentrasi awal fermentasi 10⁶ spora/gram. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 30±2°C selama 7 hari. Untuk mendapatkan serbuk starter, dilakukan pengeringan spora yang dihasilkan bersama mediana pada suhu 50°C kemudian dihaluskan. Penghitungan jumlah spora starter kering dilakukan dengan melakukan *plating* pada media DRBC.

1.3. Hidrolisis Batang Pohon Singkong oleh *Trichoderma reesei* PK₁J₂

Penelitian dilakukan tanpa adanya proses *pretreatment*. Batang singkong dicacah untuk mengecilkan ukuran kemudian dihidrolisis. Sebanyak 100 gram hancuran batang pohon singkong dimasukkan ke dalam botol selai dan ditambah air 100 ml (1:1). Amonium sulfat ditambahkan ke dalam botol selai sesuai konsentrasi (0%; 0,5%; 1%; 1,5%). Botol ditutup rapat menggunakan plastik kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 30 menit. Setelah dingin, substrat dipindahkan ke dalam kotak plastik berukuran 13 cm x 10 cm x 5 cm kemudian diinokulasi dengan menambahkan starter *Trichoderma reesei* PK₁J₂ dan inkubasi pada suhu 30±2°C. Konsentrasi awal fermentasi adalah 10⁶ spora/gram. Setiap 24 jam dilakukan analisis kadar gula reduksi dan kadar biomasanya.

1.4. Kadar Biomassa Jamur (Smith, 1998; Sardjono, 2008)

Kadar bahan kering sampel ditentukan dengan mengukur kadar air menggunakan metode gravimetri. Data kehilangan bahan kering didapatkan dari pengurangan bahan kering sampel sebelum fermentasi dengan bahan kering sampel setelah fermentasi. Satuannya adalah g bahan kering/100 g bahan kering awal.

1.5. Pengukuran Biomassa Jamur dengan Glukosamin (Zamani et al, 2008)

Glukosamin dalam sampel ditentukan menggunakan metode yang dipaparkan Zamani et al (2008). Tahap I adalah penyiapan material tak larut alkali (MTLA). Sebanyak 60 mg sampel ditambah dengan 30 ml NaOH 0,5 M dan dihidrolisis semalaman pada suhu 90°C. Campuran kemudian disentrifuse selama 10 menit pada 4000 g kemudian natannya dicuci berulang

kali dengan akuades sampai pH mendekati 7. Sampel lalu dikeringkan pada suhu 50°C semalaman kemudian ditimbang dan disimpan. Tahap II adalah penentuan glukosamin. Sampel yang diperkirakan mengandung 10 mg kitin/kitosan ditimbang, ditambah dengan 0,3 ml H₂SO₄ 72% dan dipanaskan pada suhu ruang selama 90 menit sambil diaduk tiap 15 menit. Sampel kemudian ditambah 8,4 ml akuades dan dihidrolisis pada suhu 121°C selama 1 jam. Sampel diambil sebanyak 0,5 ml selagi masih panas dan dimasukkan kedalam dua botol A dan B. Botol A ditambah dengan 0,5 ml NaNO₂ sedangkan botol B ditambah 0,5 ml akuades. Kedua botol ditutup. Isi dicampur dan dibiarkan selama 6 jam pada suhu ruang. Botol dibuka di ruang asam dengan penghisap dinyalakan semalaman untuk menghilangkan uap NO₂. Sampel kemudian ditambah 0,5 ml ammonium sulfamat 12% dan dicampur selama 4 menit. Lalu 0,5 ml MBTH 0,5% (3-metil-2-benzotiazolinon-hidrazon hidroklorid) ditambahkan dan dibiarkan tanpa pencampuran selama 1 jam. Kemudian ditambahkan 0,5 ml FeCl₃ 0,5% dicampur dan dibiarkan selama 1 jam. Sampel kemudian ditera absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm. Kurva standar disiapkan menggunakan glukosamin hidroklorid murni dalam 2,48% (v/v) asam sulfat. Peneraan dilakukan segera setelah warna terbentuk.

1.6. Aktivitas Enzim Selulase (Ghose, 1987)

Pengujian aktivitas enzim selulase menggunakan metode Ghose (1987). Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 µmol glukosa dalam satu menit pada suhu 50°C.

1.7. Analisis Gula Reduksi Metode DNS (Miller, 1959)

Pengujian gula reduksi menggunakan kurva standar DNS dengan menggunakan metode Miller (1959).

2. HASIL DAN PEMBAHASAN

2.1. Karakteristik Batang Pohon Singkong

Batang pohon singkong yang digunakan dalam penelitian berumur sekitar 6 bulan saat singkong siap dipanen. Bagian yang dipakai dari batang pohon singkong ini adalah bagian tengah ke atas hingga ke ujungnya. Bagian tengah ke bawah digunakan sebagai bibit. Batang pohon singkong yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kadar air 15,28%; kadar selulosa 27,82%; pH 5,1 dan a_w 0,971. Karakter awal batang pohon singkong tersebut sudah memenuhi kriteria untuk pertumbuhan *Trichoderma reesei* sehingga

tidak diperlukan pengaturan pH dan a_w. Perlakuan pendahuluan dalam penelitian dilakukan secara fisik dengan tujuan untuk mengurangi penggunaan bahan kimia dan ramah lingkungan. Pencacahan akan menghasilkan batang pohon singkong dengan ukuran yang lebih kecil dan mengurangi kristalinitas struktur lignoselulosa. Ukuran yang lebih kecil akan meningkatkan luasan permukaan substrat yang tersedia dan menurunkan derajat polimerisasi (Palmowski dan Muller, 1999).

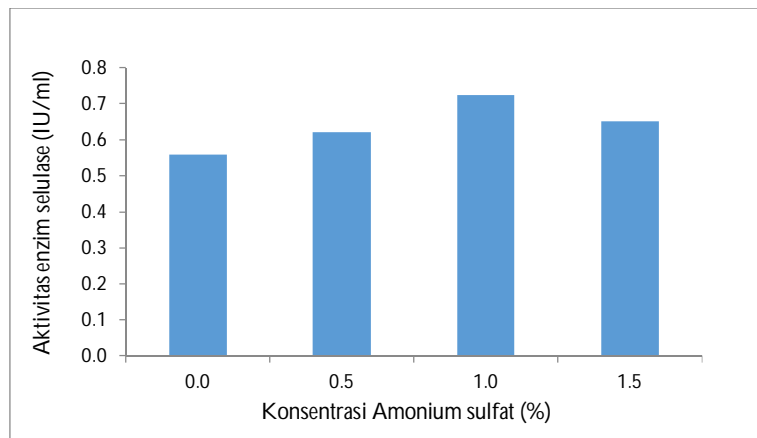
2.2. Persiapan Starter *Trichoderma reesei* PKJ₂

Pembuatan starter bertujuan untuk aklimatisasi atau adaptasi terhadap media yang baru karena sebelumnya baik *Trichoderma reesei* ditumbuhkan pada media PDA yang mempunyai komposisi zat gizi yang lengkap untuk pertumbuhan optimal kedua mikrobia tersebut. Pada awal pencampuran, konsentrasi spora *Trichoderma reesei* pada saat awal fermentasi adalah 10⁶ spora/g hancuran batang pohon singkong. Pada saat akhir fermentasi yaitu hari ketujuh, dilakukan penghitungan jumlah spora dengan metode *plating* pada media DRBC. Jumlah spora *Trichoderma reesei* mengalami kenaikan menjadi 10⁸ spora/g hancuran batang pohon singkong. Starter ini yang digunakan untuk proses hidrolisis batang pohon singkong.

2.3. Aktivitas Enzim Selulase pada Berbagai Konsentrasi Amonium Sulfat

Gambar 1 menunjukkan aktivitas enzim selulase pada berbagai konsentrasi amonium sulfat. Proses hidrolisis batang pohon singkong pada penelitian pendahuluan menghasilkan gula reduksi dengan konsentrasi yang rendah. Hal ini diduga kandungan nitrogen pada batang pohon singkong kurang mencukupi untuk pertumbuhan jamur. Oleh karena itu dilakukan penambahan sumber nitrogen dalam beberapa variasi untuk mengetahui konsentrasi penambahan sumber nitrogen yang tepat untuk pertumbuhan jamur.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi amonium sulfat 1% menghasilkan aktivitas enzim selulase tertinggi yaitu 0,724 IU/ml. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Widayanti et al (2013) yang meneliti pengaruh amonium sulfat terhadap produksi bioetanol rumput laut. Kadar nitrogen 1% menghasilkan aktivitas tertinggi. Perbedaan substrat akan mempengaruhi kerja *Trichoderma reesei* sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim selulase yang dihasilkan.



Gambar 1. Aktivitas enzim selulase
pada berbagai konsentrasi amonium sulfat

2.4. Hubungan antara pertumbuhan biomassa, aktivitas enzim selulase dan kadar gula reduksi yang dihasilkan pada proses hidrolisis batang pohon singkong dengan penambahan amonium sulfat 1%

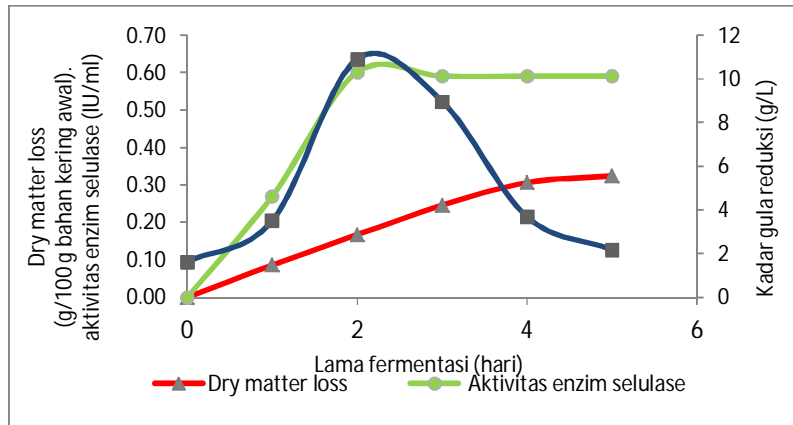
Laju pertumbuhan jamur dapat dilihat dari laju kehilangan berat kering bahan. Kenaikan laju pertumbuhan tertinggi terjadi setelah dua hari fermentasi. Hasil tersebut linier dengan aktivitas enzim dan kadar gula reduksi yang dihasilkan yang mengalami kenaikan secara signifikan setelah fermentasi dua hari. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.

Kenaikan aktivitas enzim tertinggi terjadi setelah dua hari fermentasi yaitu dari 0,2697 IU/ml meningkat menjadi 0,6005 IU/ml. Kehilangan berat kering bahan juga mengalami kenaikan di hari tersebut, yaitu dari 0,0861 g/ 100 g bahan kering awal menjadi 0,1667 g/ 100 g bahan kering awal. Kadar gula reduksi tertinggi terjadi setelah dua hari fermentasi sebesar 10,90 g/L. Jika laju kehilangan bahan kering dikaitkan dengan aktivitas metabolisme, yang didasarkan pada aktivitas degradasi bahan kering, hal

ini menunjukkan bahwa aktivitas metabolisme *Trichoderma reesei* PK_{1J2} tertinggi terjadi pada dua hari fermentasi.

Sardjono (2008) menunjukkan dalam fermentasi substrat padat dengan *Aspergillus oryzae* terdapat korelasi positif antara akumulasi produksi CO₂ (mmol/g bahan kering) dan kehilangan bahan kering (g/g bahan kering).

Kadar gula reduksi yang dihasilkan dengan perlakuan pendahuluan secara fisik relatif lebih kecil dibandingkan dengan substrat yang telah dilakukan perlakuan pendahuluan secara kimia. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Han et al (2011) juga menunjukkan hasil kadar gula reduksi yang lebih tinggi. Perlakuan pendahuluan dilakukan dengan penambahan asam dan dilanjutkan hidrolisis secara enzimatis menghasilkan gula reduksi 15,51 g/L sedangkan batang pohon singkong yang dilakukan perlakuan pendahuluan secara fisik hanya menghasilkan 9,49 g/L.



Gambar 2. Hubungan antara pertumbuhan biomassa, aktivitas enzim selulase dan kadar gula reduksi yang dihasilkan pada proses hidrolisis batang pohon singkong dengan penambahan amonium sulfat 1%

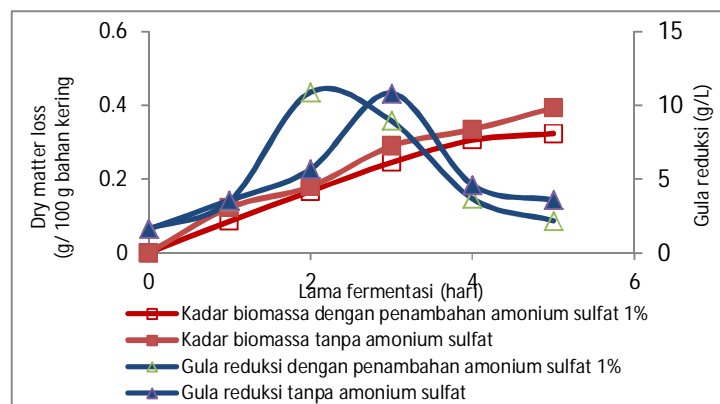
2.5. Pengaruh amonium sulfat 1% terhadap kadar biomassa *Trichoderma reesei* PK_{1J2} dan gula reduksi selama fermentasi batang pohon singkong

Penambahan amonium sulfat 1% menunjukkan aktivitas enzim selulase yang tertinggi dibandingkan dengan yang lainnya. Tahap selanjutnya adalah membandingkan proses hidrolisis batang pohon singkong dengan penambahan amonium sulfat 1% dengan batang pohon singkong tanpa penambahan amonium sulfat.

Gambar 3 menunjukkan bahwa pertumbuhan jamur *Trichoderma reesei* PK_{1J2} pada substrat yang ditambah amonium sulfat 1% tidak mengalami perbedaan yang signifikan dengan pertumbuhan jamur *Trichoderma reesei* PK_{1J2} pada substrat tanpa penambahan amonium sulfat 1%. Penambahan amonium sulfat 1% hanya berpengaruh terhadap kecepatan laju metabolisme. Tanpa penambahan amonium sulfat 1%, kenaikan laju pertumbuhan tertinggi terjadi setelah tiga hari fermentasi yaitu dari 0,1797 g/100 bahan kering awal menjadi 0,2896 g/100 g bahan

kering awal, sedangkan dengan penambahan amonium sulfat 1% laju pertumbuhan tertinggi didapatkan setelah dua hari fermentasi yaitu dari 0,0861 g/100 g bahan kering awal menjadi 0,1667 g/100 g bahan kering awal. Kadar gula tertinggi dari batang pohon singkong dengan penambahan amonium sulfat 1% terjadi setelah dua hari fermentasi yaitu 10,90 g/L sedangkan dengan tanpa penambahan amonium sulfat didapatkan kadar gula reduksi tertinggi 10,828 g/L setelah tiga hari fermentasi.

Setelah dua hari fermentasi, diduga *Trichoderma reesei* PK_{1J2} mengalami fase stasioner sehingga laju kehilangan berat keringnya juga mengalami penurunan. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Smith (1998) yang melaporkan bahwa pertumbuhan *Trichoderma reesei* QM9414 pada kulit gandum mengalami laju pertumbuhan tertinggi setelah dua hari fermentasi yaitu dari 0,01 g/g bahan kering awal menjadi 0,101 g/g bahan kering awal. Setelah itu terjadi penurunan laju kehilangan berat kering bahan.

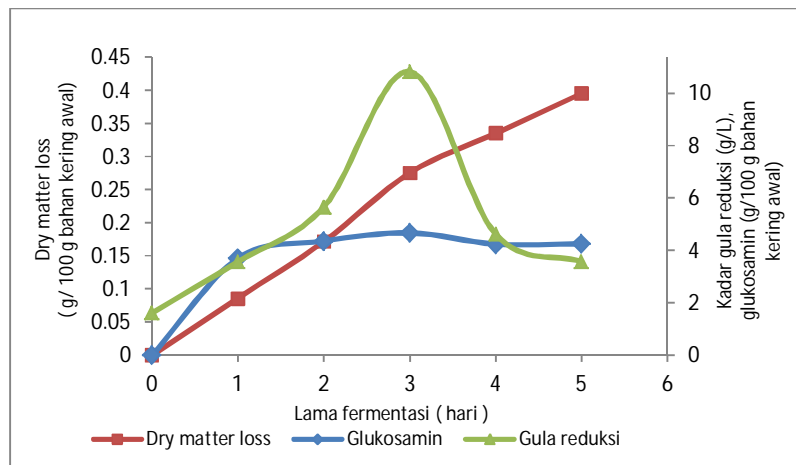


Gambar 3. Pengaruh amonium sulfat 1% terhadap kadar biomassa *Trichoderma reesei* PK_{1J2} dan gula reduksi selama fermentasi batang pohon singkong.

2.6. Hubungan antara laju kehilangan berat kering, kadar glukosamin dan kadar gula reduksi hasil hidrolisis batang pohon singkong tanpa penambahan amonium sulfat

Gambar 4 menunjukkan hubungan antara perubahan kehilangan bahan kering, glukosamin dan kadar gula reduksi yang dihasilkan selama fermentasi batang pohon singkong tanpa penambahan amonium sulfat. Kehilangan bahan kering tertinggi mencapai 0,2896 g/100 g bahan kering awal pada hari ketiga fermentasi. Laju kenaikan kehilangan bahan kering linier dengan kenaikan kadar gula reduksi yang dihasilkan. Kadar gula reduksi tertinggi diperoleh pada hari ketiga fermentasi yaitu sebesar 10,828 g/L.

Hal yang sama terjadi pada hasil pengukuran glukosamin. Pengukuran kadar glukosamin yang terdapat pada kitin sebagai senyawa penyusun dinding sel jamur merupakan salah satu metode yang biasa digunakan untuk mengukur laju pertumbuhan jamur. Hasil penelitian menunjukkan kadar glukosamin tertinggi sebesar 4,67 g/ 100 g bahan kering awal pada hari ketiga fermentasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa jamur sedang dalam fase eksponensial dan mengalami fase stasioner setelah tiga hari fermentasi yang ditunjukkan dengan kadar glukosamin yang relatif sama hingga akhir fermentasi. Ketiga hasil tersebut menunjukkan bahwa aktivitas metabolisme jamur tertinggi terjadi pada hari ketiga fermentasi.



Gambar 4. Hubungan antara laju kehilangan berat kering, kadar glukosamin dan kadar gula reduksi hasil hidrolisis batang pohon singkong tanpa penambahan amonium sulfat

3. SIMPULAN

Penambahan sumber nitrogen mempengaruhi pertumbuhan tetapi tidak mempengaruhi kemampuan *Trichoderma reesei* PK_{1J2} dalam menghasilkan gula reduksi. Kadar gula reduksi tertinggi didapatkan setelah tiga hari fermentasi yaitu sebesar 10,828 g/L. Kadar gula yang dihasilkan rendah karena tanpa adanya proses perlakuan pendahuluan.

4. DAFTAR PUSTAKA

- Balat, M., Balat, H., and Oz, C. 2008. Progress in Bioethanol Processing. *Progress in Energy and Combustion Science* (34): 551-573.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of Cellulase Activity. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Vol 59. No 2. Pp 257-268

- Guowei, S., dkk. 2011. Effect of Some Factors on Production of Cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia Environmental Sciences* 8 (2011): 357-36.
- Han, M., dkk. 2011. Bioethanol Production from Optimized Pretreatment of Cassava Stem. *Korean Journal Chem. Eng.* 28(1) : 119-125
- Kataria, R., and Ghosh, S. 2011. Saccharification of Kans Grass Using Enzyme Mixture from *Trichoderma reesei* for Bioethanol Production. *Bioresource Technology* (102): 9970-9975.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* Vol 31. No 3: 426-428.

- Mukhopadhyay, S., and Nandi, B. 1999. Optimization of Cellulase Production by *Trichoderma reesei* ATCC 26921 Using a Simplified Medium on Water Hyacinth Biomass. *Journal of Scientific and Industrial Research* Vol 58: 107-111.
- Palmowski, L and Muller. 1999. Influence of The Size Reduction of Organic Waste on Their Anaerobic Digestion. In: *International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste*. Pp 137-144.
- Sardjono (2008). The Growth Kinetics of *Aspergillus oryzae* KKB4 on Solid State Culture System and The Activity of Crude Extracellular Enzyme on Reducing Aflatoxin B. *Agritech* 28(4): 145-149.
- Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., and Levin, R. 2006. *Food Biotechnology second Edition*. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York.
- Smith, I.P. 1998. *Solid State Fermentation: Modelling Fungal Growth and Activity*. Agro Food Industry Hi-tech, Holland.
- Sovorawet, B., and Kongkiattikajorn, J. 2012. Bioproduction of Ethanol in Separate Hydrolysis and Fermentation and Simultaneous Saccharification and Fermentation from Cassava Stalk. *Journal of Food Science and Engineering* 2 (2012): 80-87.
- Sumada, K., Tamara, P.E., and Alqani, F. 2011. Kajian Proses Isolasi α - Selulosa dari Limbah Batang Tanaman *Manihot esculenta crantz* yang Efisien. *Jurnal Teknik Kimia* Vol.5, No.2: 434-438.
- Widayanti, N.P., Rita, W.S., dan Ciawi, Y. 2013. Pengaruh Konsentrasi Ammonium Sulfat ((NH₄)₂SO₄) sebagai Sumber Nitrogen terhadap Produksi Bioetanol Berbahan Baku *Glacilaria sp.* *Jurnal Kimia* 7 (1), Januari 2013 : 1-10.
- Xiong, L., dkk. 2013. Efficient Cellulase Production from Low-Cost Substrates by *Trichoderma reesei* and Its Application on the Enzymatic Hydrolysis of Corncob. *Academic Journals* Vol 7(43): pp 5018-5024.
- Zamani, A., A. Jeihanipour, L. Edebo, C. Niklasson dan M. J. Taherzadeh (2008). Determination of Glucosamine and N-Acetyl Glucosamine in Fungal Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8314-8318.