

## KARAKTERISASI ENZIM KASAR SELULASE KAPANG ENDOFIT DARI LAMUN

### CHARACTERIZATION OF CRUDE CELLULASE OF SEAGRASS ENDOPHYTIC FUNGUS

Yulia Oktavia<sup>1</sup>, Aulia Andhikawati<sup>1</sup>, Tati Nurhayati<sup>1</sup>, dan Kustiariyah Tarman<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Divisi Bioteknologi Laut, Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Laut, LPPM-IPB

\*E-mail: kustya@gmail.com

#### ABSTRACT

*In this study, cellulase was produced by endophytic fungus isolated from seagrass. Substrate used for incubating the fungus was the waste of agar industry. The objectives of this study were to optimize cellulase production and to characterize the highest activity of fungal crude cellulase. In our previous study, the EN isolate (isolated from *Enhalus* sp.) showed the highest cellulolytic index. Therefore, in this research we focused on cellulase activity of the isolate. Cellulase activity was determined based on endoglucanase activity, total cellulase activity, and  $\beta$ -glucosidase activity. The highest activity was then used to determine cellulase activity in enzyme characterization. The fungus was cultured in different concentration of agar extraction algal wastes. The fungal culture was incubated for 3-21 days with 120 rpm orbital shaker. The results showed that endoglucanase activity was 0.019-0.031 U/mL, total cellulase activity was 0.007-0.013 U/mL, and  $\beta$ -glucosidase activity was 0.00012-0.00361 U/mL. The highest endoglucanase and total cellulase activity were obtained from the fungal culture after 9 days incubation,  $\beta$ -glucosidase was obtained from the fungal culture after 15 days incubation with 1.5% of algal waste as substrate. The optimum pH and temperature were determined as 4 and 60 °C, maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) and Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) for endoglucanase activity was determined as 0.044 U/mL and 0.103% respectively.*

**Keywords:** algal waste, cellulase, endophytes, enzymes, seagrass

#### ABSTRAK

Pada penelitian ini selulase dihasilkan oleh kapang endofit yang diisolasi dari lamun. Substrat yang digunakan untuk menghasilkan enzim ini yaitu limbah agar-agar. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan produksi selulase dan mengkarakterisasi selulase yang memiliki aktivitas tertinggi. Pada penelitian sebelumnya, isolat kapang EN (isolat dari *Enhalus* sp.) memiliki indeks selulolitik tertinggi. Sehingga pada penelitian ini hanya difokuskan pada aktivitas selulase isolat EN. Aktivitas selulase diukur berdasarkan pada aktivitas endoglukanase, selulase total, dan  $\beta$ -glukosidase. Kapang dikultur pada media yang mengandung berbagai konsentrasi limbah agar-agar. Kultur kapang diinkubasi 3-21 hari dengan goyangan 120 rpm. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas endoglukanase 0,19-0,031 U/mL, aktivitas selulase total 0,007-0,013 U/mL, dan aktivitas  $\beta$ -glukosidase 0,00012-0,00361 U/mL. Aktivitas endoglukanase dan selulase total tertinggi terjadi pada hari kesembilan inkubasi sedangkan  $\beta$ -glukosidase pada hari kelimabelas dengan konsentrasi limbah agar-agar 15%. pH dan suhu optimum endoglukanase yaitu 4 dan 60 °C dengan kecepatan reaksi maksimum ( $V_{maks}$ ) 0,044 U/mL dan konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) 0,103%.

**Kata kunci:** endofit, enzim, lamun, limbah agar, selulase

## I. PENDAHULUAN

Produksi rumput laut pada tahun 2009 sebesar 2.791.689 ton dan pada tahun 2010 mengalami peningkatan produksi menjadi 3.399.438 ton (KKP, 2012). Umumnya industri pengolahan rumput laut akan menghasilkan limbah rumput laut sebesar 65-75%. Jumlah limbah yang cukup besar jika tidak ditangani dengan baik akan menyebabkan pencemaran lingkungan. Limbah rumput laut mengandung selulosa yang tinggi bisa mencapai 15-25 %. Selulosa merupakan polisakarida linear glukosa yang dihubungkan dengan ikatan  $\beta$ -1, 4-glikosidik (Gupta *et al.*, 2012). Sering kali di beberapa industri pengolahan berbasis rumput laut, limbah hasil pengolahan yang tinggi kandungan selulosanya dibuang dan tidak dimanfaatkan. Padahal dengan adanya sistem selulolitik, selulosa dapat dikonversi menjadi senyawa yang lebih sederhana dan produk multiguna lainnya dengan proses biologi yang aman serta biaya produksi yang murah. Penanggulangan limbah secara biologi yaitu dengan menguraikan selulosa tersebut menggunakan enzim misalnya selulase. Selulase dapat mendegradasi selulosa menjadi oligosakarida kemudian menjadi glukosa sehingga dapat dimanfaatkan untuk berbagai industri lainnya (Subowo, 2010).

Konversi selulosa menjadi gula sederhana membutuhkan aktivitas mikroorganisme yang dapat mempercepat degradasi. Mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa salah satunya yaitu kapang. Kapang tersebut mampu menghasilkan enzim selulase yang merupakan enzim ekstraseluler yang terdiri atas kompleks endo- $\beta$ -1,4-glukanase (CMCase, Cx selulase endoselulase, atau carboxymethyl cellulase), kompleks ekso- $\beta$ -1,4-glukanase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase), dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase yang mampu memutus ikatan  $\beta$ -1,4 glikosidik

(Zhou *et al.*, 2008). Selama ini kapang yang digunakan dalam sakarifikasi pembentukan gula sederhana yaitu kapang yang diisolasi dari organisme darat seperti *Trichoderma harzianum* yang diisolasi dari tanah dan hasil pelapukan kayu yang berasal dari hutan hujan tropis Amazon (Delabona *et al.*, 2012), serangga seperti rayap (isopteran), kutu buku (Lepidoptera), ulat bulu dan siput (Gupta *et al.*, 2012), dan *Fusarium oxysporum* (Yuan *et al.*, 2012). Kapang yang diisolasi dari organisme laut biasanya berupa kapang endofit yaitu jenis kapang yang tumbuh di dalam tanaman inangnya tanpa menyebabkan gejala penyakit terhadap inang dan pertumbuhannya di habitat melibatkan interaksi yang berjalan terus-menerus antara metabolisme kapang dan inangnya (Schulz *et al.*, 2002).

Kapang endofit yang diisolasi dari organisme laut ini juga memiliki potensi dalam mendegradasi selulosa namun keberadaannya belum banyak dikaji lebih lanjut. Berdasarkan penelitian pendahuluan mengenai *screening* kapang laut endofit pehasil enzim selulase, diketahui bahwa kapang isolat EN yang diisolasi dari lamun *Enhalus* sp. memiliki indeks selulolitik tertinggi dibandingkan dengan kapang endofit lainnya yang diisolasi dari rumput laut, daun mangrove, dan spons. Untuk itulah dilakukan penelitian ini yang difokuskan pada aktivitas enzim selulase dari kapang isolat EN. Penelitian ini bertujuan mengoptimasi waktu inkubasi dan konsentrasi sumber karbon yang tepat dalam memproduksi enzim selulase dan mengkarakterisasi enzim selulase yang dihasilkan oleh Kapang isolat EN.

## II. METODE PENELITIAN

### 2.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi limbah agar-agar kertas yang diperoleh dari Pameungpeuk Garut, Jawa Barat; kapang isolat EN yaitu

kapang endofit yang diisolasi dari lamun *Enhalus* sp. dari perairan Pulau Karya, Kepulauan Seribu, media produksi enzim selulase (Muthuvelayudham dan Viruthagiri 2006), CMC (*Carboxymethyl cellulase*) (Teknis), *Potato Dextrose Agar* (Difco, USA), *Potato Dextrose Broth* (Difco, USA), pereaksi DNS (Sigma Aldrich, India), buffer sitrat, kertas saring Whatman no 1 (China), dan *p*-NPG (*p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glycopyranoside) Sigma Aldrich, Switzerland). Alat yang digunakan meliputi sentrifuse (Himac CR21G, Japan), spektrofotometer UV-Vis 2500 (Yamato, Japan), pipet mikro (Gibson, Germany), *waterbath* inkubator BT25 (Yamato, Japan), dan autoklaf SM52 (Yamato, Japan).

## 2.2. Optimasi Konsentrasi Limbah Agar-agar dan Waktu Inkubasi Kapang Penghasil Selulase

Kapang ditumbuhkan pada media PDB diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar dengan goyangan 120 rpm, kemudian dipindahkan ke labu Erlenmeyer 500 mL yang berisi 200 mL media produksi enzim dengan sumber karbon yaitu limbah agar-agar dalam beberapa konsentrasi (0,5; 1,0; 1,5; 2,0%) kemudian diinkubasi dengan goyangan 120 rpm selama 3-21 hari pada suhu kamar. Supernatan sebagai enzim kasar diperoleh dengan cara sentrifugasi pada 5000xg selama 20 menit pada suhu 4 °C (Tang *et al.*, 2012). Aktivitas selulase total diukur menurut metode Mandels *et al.* (1976), endoglukanase (Mandels *et al.*, 1976), dan  $\beta$ -glukosidase diukur menurut metode Grover *et al.* (1977). Pengukuran aktivitas enzim dimulai pada hari ketiga dengan interval pengamatan setiap tiga hari. Konsentrasi sumber karbon dan waktu inkubasi yang dapat menghasilkan aktivitas optimum dipakai untuk tahap penelitian selanjutnya.

## 2.3. Penentuan pH Optimum

Nilai pH optimum enzim selulase ditentukan dengan metode Lee *et al.* (2007). Sebanyak 0,5 mL enzim ditambahkan 0,5 mL CMC 1% (b/v) dalam sediaan 50 mM buffer sitrat (pH 3,0-6,0) dan Tris-HCl (pH 7,0-9,0). Campuran dalam pH buffer yang beragam diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit dan aktivitas selulase diuji dengan metode DNS.

## 2.4. Penentuan Suhu Optimum

Suhu optimum enzim untuk menghidrolisis CMC dalam 50 mM buffer pH optimum diukur dengan menggunakan metode Lee *et al.* (2007). Campuran enzim dan CMC 1% diinkubasi selama 30 menit dengan perbedaan suhu (30-80 °C). Larutan DNS ditambahkan untuk menghentikan reaksi.

## 2.5. Kinetika Enzim

Kinetika enzim ditentukan menggunakan CMC dengan konsentrasi yang berbeda yaitu: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0%. Sebanyak 0,5 mL enzim dan 0,5 mL substrat dalam 50 mM buffer pH optimum diinkubasi selama 30 menit pada suhu optimum. Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan diukur dengan metode DNS. Satu unit didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk melepaskan 1  $\mu$ mol glukosa per menit. Konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dan kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) ditentukan dengan plot Lineweaver-Burk.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Optimasi Sumber Karbon dan Waktu Produksi Enzim Selulase

Optimasi konsentrasi sumber karbon dan waktu inkubasi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan waktu inkubasi yang tepat untuk menghasilkan enzim selulase dengan aktivitas tertinggi. Aktivitas selulase ditentukan dengan

mengukur aktivitas enzim endoglukanase,  $\beta$ -glukosidase dan selulase total. Da silva *et al.* (2005) menyatakan bahwa sistem pemecahan selulosa menjadi glukosa terdiri dari tiga jenis enzim selulase yaitu endo- $\beta$ -1,4-glukanase, ekso- $\beta$ -1,4-glukanase, dan  $\beta$ -glukosidase. Pengaruh konsentrasi limbah agar-agar kertas dan lama waktu inkubasi terhadap aktivitas endoglukanase,  $\beta$ -glukosidase dan selulase total yang dihasilkan dari kapang isolat EN dapat dilihat pada Gambar 3, 4, dan 5. Aktivitas enzim endoglukanase mewakili adanya aktivitas pemecahan ikatan glikosidik secara acak terhadap selulosa. Enzim  $\beta$ -glukosidase menunjukkan aktivitas pemecahan yang menghasilkan glukosa sedangkan selulase total diukur untuk melihat kerja sinergis beberapa enzim penyusun selulase dalam menghasilkan glukosa (Deswal *et al.*, 2011).

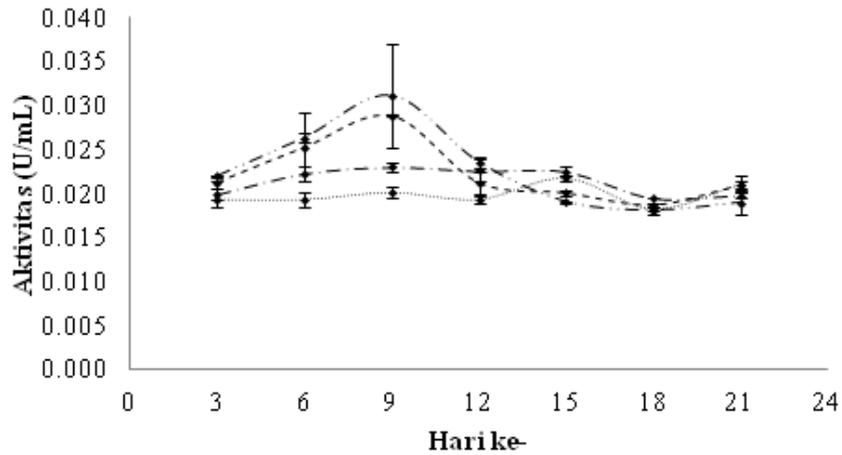
Aktivitas endoglukanase diuji menggunakan substrat CMC dan selulase total menggunakan substrat kertas saring Whatman No 1. Gambar 1 dan 2 memperlihatkan aktivitas optimum endoglukanase dan selulase total yaitu 0,031 U/mL dan 0,013 U/mL terjadi pada penambahan limbah agar-agar 1,5% dengan lama waktu inkubasi 9 hari. Gambar 3 memperlihatkan aktivitas  $\beta$ -glukosidase yang diuji dengan menggunakan substrat *p*-NPG. Aktivitas  $\beta$ -glukosidase optimum yaitu 0,036 U/mL terdapat pada pemberian limbah agar-agar 1,5% dengan lama waktu inkubasi 15 hari. Pemberian konsentrasi di atas 1,5% menyebabkan penurunan aktivitas selulase. Hal ini diduga selulase yang dihasilkan isolat EN tidak mampu lagi merombak limbah agar-agar dikarenakan sisi aktif enzim telah terisi semua oleh substrat sehingga meskipun konsentrasi limbah dinaikkan, tidak akan meningkatkan aktivitas enzim selulase. Pemberian konsentrasi di bawah 1,5% menyebabkan terbatasnya sumber karbon sehingga pertumbuhan tidak optimal dan aktivitas

enzim rendah. Aktivitas  $\beta$ -glukosidase optimum terjadi pada inkubasi 15 hari. Berbeda dengan aktivitas enzim lainnya,  $\beta$ -glukosidase akan bekerja optimum setelah enzim-enzim penyusun selulase lainnya bekerja dan menghasilkan komponen selulosa yang sederhana seperti selobiosa. Lee *et al.* (2008) menyatakan bahwa  $\beta$ -glukosidase hanya akan bekerja memecah selobiosa untuk menghasilkan glukosa. Oleh sebab itulah pada inkubasi sebelum 15 hari aktivitas  $\beta$ -glukosidase rendah.

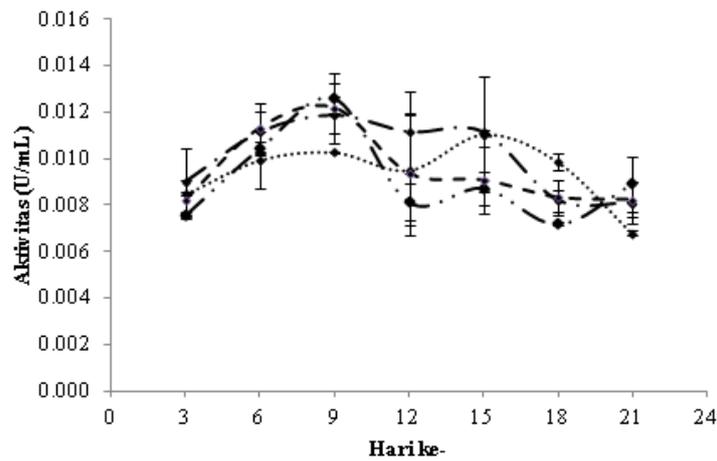
Kapang mempunyai masa pertumbuhan yang bervariasi, dalam aktivitas metabolismenya kapang memiliki beberapa fase dalam pertumbuhannya. Aktivitas metabolisme akan menurun setelah kapang melewati fase puncak pertumbuhannya. Fase-fase pertumbuhan tersebut sangat berpengaruh terhadap enzim yang dihasilkan oleh kapang untuk membantu dalam mencerna makanannya. Pemanenan enzim dapat dilakukan pada fase eksponensial pada pola kurva pertumbuhannya (Gandjar *et al.*, 2006). Tingginya aktivitas enzim pada hari kesembilan diduga pada hari tersebut merupakan fase eksponensial dari isolat kapang EN. Menurunnya aktivitas enzim pada hari keduabelas karena pada hari tersebut kapang memasuki fase deselerasi dan stasioner, sehingga enzim tidak diproduksi lagi pada fase ini. Aktivitas  $\beta$ -glukosidase meningkat pada hari kelimabelas dikarenakan pada hari tersebut substrat enzim tersebut banyak tersedia yang dihasilkan dari pemecahan selulase kompleks oleh enzim penyusun selulase lainnya yang aktif bekerja pada hari kesembilan.

### 3.2. Penentuan pH Optimum Enzim Selulase

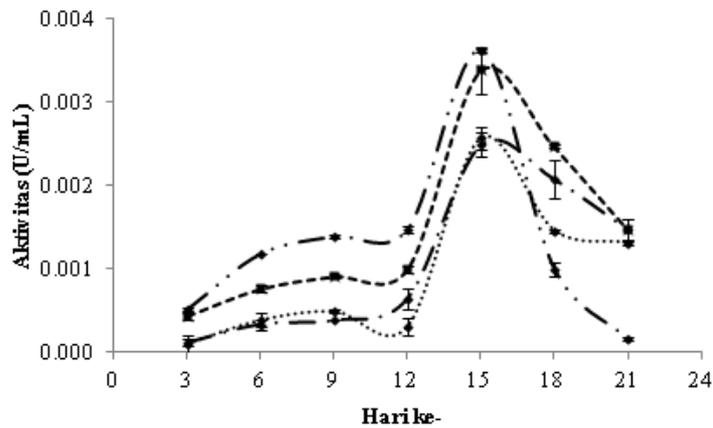
Berdasarkan hasil pengujian aktivitas enzim selulase total menggunakan substrat kertas saring Whatman No 1, endoglukanase menggunakan substrat



Gambar 1. Aktivitas endoglukanase pada beberapa konsentrasi limbah agar-agar kertas terhadap lama waktu inkubasi; .....◆.....0,5%; -◆-1,0%; -◆-1,5%; -◆-2,0%.



Gambar 2. Aktivitas selulase total pada beberapa konsentrasi limbah agar-agar kertas terhadap lama waktu inkubasi; .....◆.....0,5%; -◆-1,0%; -◆-1,5%; -◆-2,0%.



Gambar 3. Aktivitas beta-glukosidase pada beberapa konsentrasi limbah agar-agar kertas terhadap lama waktu produksi; .....◆.....0,5%; -◆-1,0%; -◆-1,5%; -◆-2,0%.

CMC, dan  $\beta$ -glukosidase menggunakan *p*-NPG terlihat bahwa aktivitas tertinggi yaitu endoglukanase sehingga untuk karakterisasi enzim selulase ini menggunakan CMC sebagai substrat. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH, maka dari itu diperlukan buffer dengan pH tertentu supaya enzim dapat bekerja optimum. Enzim merupakan molekul amfoter yang mengandung sejumlah besar kelompok asam dan basa terutama terdapat pada permukaan. Muatan-muatan pada kelompok tersebut akan berubah berdasarkan konstanta disosiasi asam terhadap pH lingkungannya. Perubahan yang terjadi pada muatan-muatan oleh pH dapat berpengaruh terhadap aktivitas, stabilitas struktural dan daya kelarutan enzim (Chaplin dan Bukle, 1990). Penentuan pH optimum dilakukan dengan penambahan buffer pada rentang pH 3-9. Hasil pengukuran aktivitas selulase pada beberapa pH disajikan pada Gambar 4.

Berdasarkan Gambar 4 dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan aktivitas pada pH 4 dan pH tersebut merupakan pH optimum aktivitas ekstrak kasar selulase dengan aktivitas 0,042 U/mL. Aktivitas ekstrak kasar selulase mengalami penurunan pada pH 5 dan menurun drastis hingga pH 9. Menurut Harshvardhan *et al.* (2013), enzim selulase aktif pada kisaran pH 3-9. Selain itu, hasil penelitian Thongekkaew *et al.* (2008) menunjukkan pH optimum endoglukanase yang dihasilkan oleh *Pichia pastoris* yaitu 3,5. Yuan *et al.* (2012), menyatakan endoglukanase yang dihasilkan oleh *Fusarium oxysporum* sangat reaktif pada pH 4,5-5,5. Menurut Rastogi *et al.* (2010) enzim yang mampu bertahan pada kondisi asam digolongkan ke dalam enzim asidofil.

### 3.3. Penentuan Suhu Optimum Enzim Selulase

Suhu merupakan faktor yang mempengaruhi laju katalisis reaksi

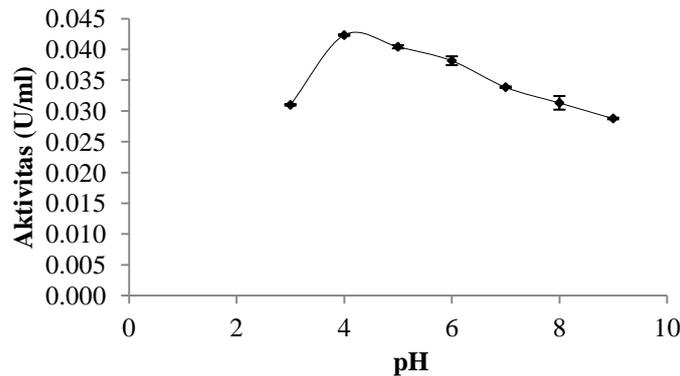
enzimatis. Kenaikan suhu hingga batas tertentu dapat meningkatkan aktivitas enzimatik sampai pada kondisi suhu optimum, namun kenaikan suhu yang berlebih dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Panas yang ditimbulkan akibat kenaikan suhu dapat mempercepat reaksi dan meningkatkan kecepatan molekul karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bereaksi. Kenaikan suhu melebihi suhu optimum menyebabkan protein enzim dan substrat mengalami perubahan konformasi yang bersifat detrimental. Perubahan konformasi substat mengakibatkan gugus reaktif mengalami hambatan dan tidak dapat lagi memasuki sisi aktif enzim (Suhartono, 1989). Penentuan suhu optimum dilakukan pada suhu 30-80 °C. Hasil pengukuran aktivitas selulase pada beberapa suhu disajikan pada Gambar 5.

Gambar 5 memperlihatkan aktivitas selulase meningkat seiring dengan peningkatan suhu hingga suhu optimum terjadi pada suhu 60 °C dengan aktivitas 0,042 U/mL dan terjadi penurunan aktivitas dimulai pada suhu 70 °C. Selulase cenderung memiliki aktivitas optimum pada suhu 30-60 °C. Hasil penelitian Yuan *et al.* (2012) menunjukkan suhu optimum selulase yang dihasilkan dari kapang jenis *Fusarium oxysporum* yaitu 60 °C dan hasil yang sama diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Adekele *et al.* (2012) yang menyatakan aktivitas optimum enzim selulase yang diproduksi oleh *Bacillus coagulans* Co4 terjadi pada suhu 60 °C.

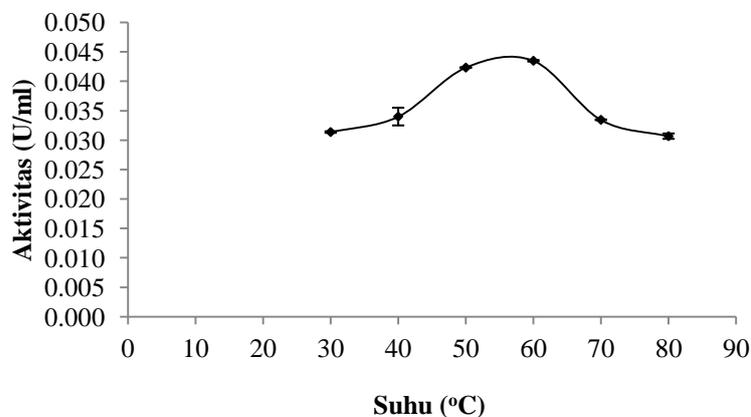
### 3.4 Penentuan Kinetika Enzim

Mekanisme kerja enzim juga ditentukan oleh jumlah atau konsentrasi substrat yang tersedia. Pada suatu reaksi enzimatik bila konsentrasi substrat diperbesar sedangkan kondisi lainnya

tetap maka kecepatan reaksi ( $v$ ) akan meningkat sampai suatu batas kecepatan



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas selulase.



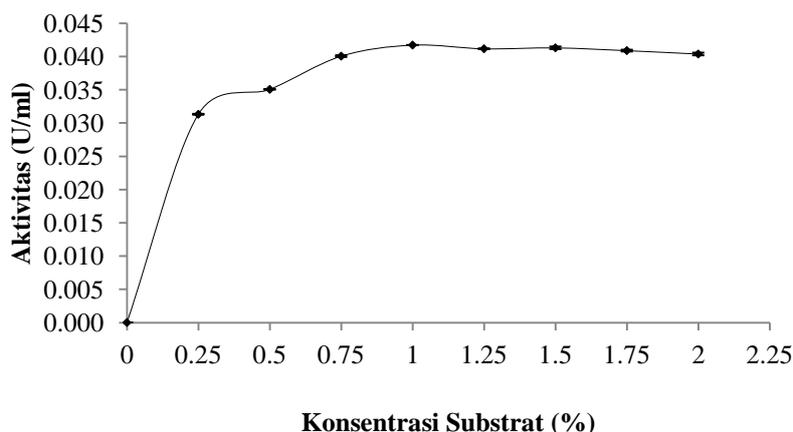
Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas selulase.

maksimum ( $V_{maks}$ ).  $K_m$  (konstanta Michaelis) dan  $V_{maks}$  (kecepatan maksimum reaksi) merupakan dua parameter kinetika enzim.  $V_{maks}$  dapat diartikan sebagai kecepatan reaksi pada saat enzim telah jenuh oleh substrat. Pengaruh perubahan konsentrasi substrat CMC terhadap kecepatan reaksi enzimatik (Gambar 6) terlihat bahwa aktivitas selulase optimum pada konsentrasi substrat 1% dengan aktivitas 0,042 U/mL.

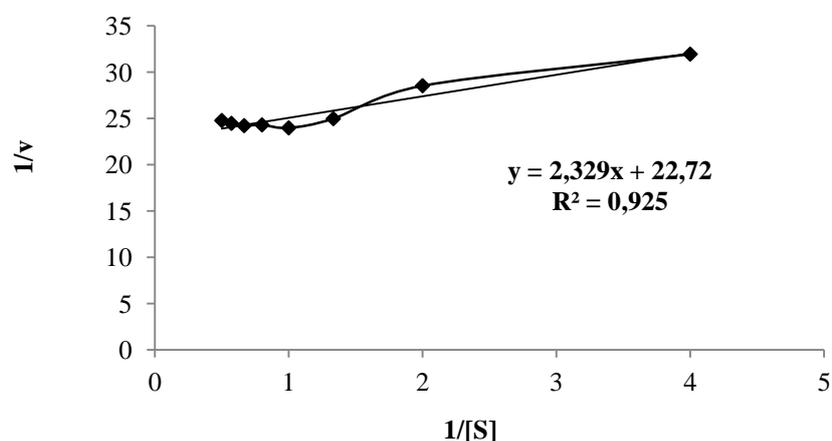
Penentuan nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  ditentukan dengan menggunakan persamaan Michaelis-Menten. Penentuan  $K_m$  dan  $V_{maks}$  dengan kurva garis lurus ini dikenal sebagai metode Lineweaver-Burk seperti terlihat pada Gambar 7.

Nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  enzim selulase hasil perhitungan menggunakan persamaan ini masing-masing sebesar 0,103% dan

0,044 U/mL. Kanti (2003) menyatakan bahwa pada konsentrasi substrat yang rendah sampai tercapai nilai  $K_m$ , kecepatan reaksi meningkat secara tajam. Hal ini disebabkan substrat telah berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat (ES), tetapi masih belum jenuh dengan substrat. Setelah nilai  $K_m$  tercapai dan sebelum tercapainya nilai batas kerja enzim, peningkatan kecepatan reaksi enzim berjalan secara perlahan sampai tercapai kecepatan maksimum. Setelah titik ini peningkatan konsentrasi substrat relatif tidak dapat meningkatkan kecepatan reaksi. Hal ini disebabkan sisi katalitik enzim telah jenuh terisi oleh substrat sehingga meskipun konsentrasi substrat dinaikkan, aktivitas tidak akan terjadi kenaikan.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim selulase.



Gambar 7. Kurva Lineaweaver-Burk pada penentuan  $K_m$  dan  $V_{maks}$ .

#### IV. KESIMPULAN

Waktu inkubasi dan konsentrasi limbah agar-agar terbaik untuk memproduksi enzim selulase dengan aktivitas tertinggi yaitu 9 hari inkubasi dan konsentrasi limbah 1,5% dengan aktivitas selulase tertinggi terdapat pada penggunaan substrat CMC (endoglukanase) yaitu 0,031 U/mL. Nilai pH dan suhu optimum kerja enzim selulase yaitu pH 7 dan 60 °C. Konsentrasi substrat CMC yang digunakan untuk memperoleh aktivitas optimum adalah 1%. Hasil perhitungan kinetika reaksi menunjukkan

nilai  $V_{maks}$  selulase adalah 0,044 U/mL dengan  $K_m$  0,103%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia melalui Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi atas nama Ketua Peneliti Dr. Kustiariyah Tarman, S.Pi., M.Si. dengan judul Pengembangan Teknologi Produksi Bioetanol melalui Pemanfaatan Limbah Industri Rumput Laut dengan Kapang

Endofit Indigenous Laut Indonesia (No. 58/IT3.41.2/L1/SPK/2013).

## DAFTAR PUSTAKA

- Adeleke, E.O., B.O. Omafuvbe, I.O. Adewale, and M.K. Bakare. 2012. Purification and characterisation of a cellulase obtained from cocoa (*Theobroma cacao*) pod-degrading *Bacillus coagulans* Co4. *Turk J. Biochem*, 37(3):222–230.
- Chaplin, M.F. and C. Bukle. 1990. Enzyme technology. Cambridge University Press. Cambridge. 264p.
- Da Silva, R., E.S. Lago, C.W. Merheb, M.M. Machione, Y.K. Park, and E. Gomes. 2005. Production xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus auranticus* miehe. *Braz J. Microbiomol*, 36:235-241.
- Delabona, P.S., C.S. Farinas, M.R. da Silva, S.F. Azzon, and J.G. da Cruz Pradella. 2012. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *J. Bioresource Technology*, 107:517–521.
- Deswal, D., Y.P. Khasa, and R.C. Kuhad. 2011. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Biore-source Technology*, 102:6065-6.
- Grover, A.K., D.D. Macmurchi, and R.J. Cushley. 1977. Studies on almond emulsin  $\beta$ -D-glukosidase I. Isolation and characterization of biofunctional isozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 482:98-108.
- Gupta, P., K. Samant, and A. Sahu. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International J. of Microbiology*, 2012: 1-5.
- Harshvardhan, K., A. Mishr, and B. Jha. 2013. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 93:51-56.
- Kanti, A. 2005. Actinomycetes selulolitik dari tanah hutan Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. *Biodiversitas*, 6(2):85-89.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan [KKP]. 2012. Sistem informasi dan statistik. <http://www.kkp.go.id>. [27 Maret 2012].
- Lee, Y.J., B.K. Kim, B.H. Lee, K.I. Jo, N.K. Lee, C.H. Chung, Y.C. Lee, and J.W. Lee. 2007. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Biore-source Technology*, 99:378-386.
- Mandels, M., R. Andreotti, and C. Roche. 1976. Measurment of saccharifying cellulase. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, 6:21-33.
- Muthuvelayudham, R. and T. Viruthagiri. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugar-cane bagasse and rice straw. *African J. of Biotechnology*, 5(20):1873-1881.
- Rastogi, G., A. Bhalla, A. Adhikari, K.M. Bischoff, R.S. Hughes, L.P. Christopher, and R.K. Sani. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Biore-source Technology*, 101:8798–8806.
- Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A.K. Römmert, and K. Krohn. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active second-

- dary metabolites. *Mycol. Res.*, 106 (9):996-1004.
- Subowo, Y.B. 2010. Uji aktivitas selulase dan ligninase dari beberapa jamur dan potensinya sebagai pendukung pertumbuhan tanaman terong (*Solanum melongena*). *Berita Biologi*, 10(1):1-6.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan bioteknologi. Bogor. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 322hlm.
- Tang, B., H. Pan, W. Tang, Q. Zhang, L. Ding, and F. Zhang. 2012. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02. *Biomass and Bioenergy*, 36:366-372.
- Thongekkaew, J., H. Ikeda, K. Masaki, and H. Iefuji. 2008. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 60: 140–146.
- Yuan, L., W. Wang, Y. Pei, and F. Lu. 2012. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium oxysporum*. *Procedia Environmental Science*, 12: 1213-1219.
- Zhou, J., Y.H. Wang, J. Chu, J.P. Zhuang, S.L. Zhang, and P. Yin. 2008. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technology*, 99:6826–6833.

*Diterima* : 3 Maret 2014  
*Direview* : 18 April 2014  
*Disetujui* : 28 April 2014