

# **Optimasilisasi Waktu Fermentasi, Kadar Air dan Konsentrasi Cu<sup>2+</sup> pada Produksi Lakase *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 Secara Fermentasi Padat Batang Padi dalam Reaktor Labu**

Novia Sellyna<sup>1</sup>, Miranti<sup>1</sup>, Yuana Nurulita<sup>1</sup>, Edy Saputra<sup>2</sup>, Panca Setia Utama<sup>2</sup>, Titania T. Nugroho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru

<sup>2</sup>Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Riau, Pekanbaru

\*Penulis korespondensi: titania.nugroho@lecturer.unri.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v8.n1.26730>

**Abstrak:** *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 adalah galur *Trichoderma* yang diisolasi dari tanah perkebunan cokelat di Riau yang mampu memproduksi lakase. Lakase merupakan enzim ligninolitik yang dapat mendegradasi lignin, sekaligus mengoksidasi senyawa fenol. Penelitian ini bertujuan mengoptimasi produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara fermentasi padat (SSF) menggunakan batang padi sebagai penginduksi lakase, di dalam reaktor labu sederhana. Optimasi parameter fermentasi (waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi Cu<sup>2+</sup>) dilakukan menggunakan *Central Composite Design* (CCD) dengan *Response Surface Methodology* (RSM). Hasil ANOVA menunjukkan bahwa model quadratik dipilih, dengan persamaan regresi  $Y = 64,19 - 6,71 X_1 + 6,93 X_2 - 15,65 X_1 \cdot X_1 - 7,11 X_2 \cdot X_2 - 15,40 X_3 \cdot X_3$ . Waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi Cu<sup>2+</sup> sebagai CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O ditemukan memiliki efek signifikan (*p-value*<0,05) terhadap aktivitas lakase yang diproduksi. Kondisi optimal untuk produksi lakase dengan penginduksi batang padi, secara SSF dalam reaktor labu, adalah 7 hari fermentasi, kadar air 67% dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,046 g/L. Aktivitas lakase yang diperoleh pada kondisi optimum adalah  $65,3 \pm 0,7$  mU per gram batang padi. Meskipun hanya meningkatkan aktivitas lakase 2% dari aktivitas pada *center point*, kondisi optimum tetap membuat proses menjadi lebih ekonomis dan efisien, karena memperpendek waktu produksi dari 8 hari menjadi 7 hari, dan mengurangi konsentrasi penambahan Cu<sup>2+</sup>.

**Kata kunci:** *Trichoderma asperellum*, lakase, fermentasi padat reaktor labu, *central composite design*, batang padi

**Abstract:** *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 is a *Trichoderma* strain isolated from cocoa plantation soil in Riau that is able to produce laccase. Laccase is a ligninolytic enzyme that can degrade lignin, and oxidise phenolic compounds. The purpose of this research is the optimization of *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 laccase production under solid state fermentation (SSF) using rice straw as the substrate inducer, in a flask reactor system. Optimization of the fermentation parameters (fermentation time, water content and Cu<sup>2+</sup> concentration) were determined using the Central Composite Design (CCD) and Response Surface Methodology (RSM) analysis. The ANOVA results gave a chosen quadratic model, with a regression equation of  $Y = 64.19 - 6.71 X_1 + 6.93 X_2 - 15.65 X_1 \cdot X_1 - 7.11 X_2 \cdot X_2 - 15.40 X_3 \cdot X_3$ . The optimal conditions for laccase production in a flask SSF system of rice straw, are 7 days fermentation time, 67% water content and 0.046 g / L CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O concentration, giving a laccase activity of  $65.33 \pm 0.7$  mU per g rice straw. Although the laccase activity at optimal condition only increased 2% from the centre point activity, optimisation contributed to a more economical and efficient process, by decreasing the fermentation time and Cu<sup>2+</sup> supplement concentration.

**Keywords:** *Trichoderma asperellum*, laccase, flask reactor solid state fermentation, central composite design

## PENDAHULUAN

Industri tekstil merupakan salah satu industri penyumbang pencemaran air yang disebabkan oleh air limbah yang masih mengandung pewarna (Naresh *et al.* 2013). Pewarna azo merupakan senyawa aromatik polisiklik yang paling banyak digunakan pada industri tekstil (Bruschweiler *et al.* 2014; Lalnunhlimi & Krishnaswamy 2016). Limbah tekstil

yang mengandung pewarna azo yang dilepaskan ke perairan berbahaya bagi lingkungan dan makhluk hidup. Bahaya ini disebabkan oleh sifat toksin dan mutagenik dari amina aromatik yang dapat menyebabkan dermatitis serta menginduksi pertumbuhan tumor kanker jika dicerna oleh manusia atau mamalia (Lade *et al.* 2015; Leme *et al.* 2015; Bruschweiler *et al.* 2014). Oleh karena itu diperlukan

upaya untuk menghilangkan limbah pewarna azo serta pewarna tekstil lainnya dari limbah tekstil, sebelum dibuang ke perairan. Upaya penghilangan pewarna tekstil dari perairan dapat dilakukan dengan cara sedimentasi, filtrasi, koagulasi, oksidasi, elektrokimia, proses oksidasi lanjut (AOPs), metode biologi, adsorpsi, pertukaran ion, dan fotokatalitik (Iryani & Hartanto 2018). Metode biologi dianggap lebih ramah lingkungan karena tidak menghasilkan lumpur beracun sehingga banyak digunakan untuk biodekolorisasi limbah pewarna tekstil. Biodekolorisasi limbah pewarna tekstil dapat dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme hidup, seperti konsorsium mikroba (Sing *et al.* 2017), atau monokultur jamur hidup (Adnan *et al.* 2017) atau menggunakan enzim, seperti enzim lakase (Forootanfar 2015; Nor *et al.* 2015).

Spesies *Trichodema sp.* mampu menghilangkan zat warna langsung oleh sel-sel jamurnya (Nugroho *et al.* 2012), atau dengan melepaskan enzim yang mendegradasi zat warna, seperti enzim lakase (Adnan *et al.* 2017; Nor *et al.* 2015). *T. asperellum* LBKURCC1 merupakan spesies dari galur *Trichoderma* yang diisolasi dari rizosfer perkebunan cokelat di Kecamatan Rumbai, Kota Pekanbaru, Provinsi Riau. *T. asperellum* LBKURCC1 telah dilaporkan dapat menghasilkan lakase dengan dua metoda fermentasi, yaitu fermentasi cair atau Submerged Fermentation (SmF) dan fermentasi padat atau Solid State Fermentation (SSF) (Nugroho *et al.* 2018).

Aktivitas enzim lakase yang diproduksi menggunakan SSF lebih baik dibandingkan dengan SmF, karena sistem SSF menyediakan lingkungan yang lebih dekat dengan habitat jamur alami, yang biasanya merupakan tanah atau media kayu yang lembab (Thomas *et al.* 2013). Selain itu, SSF juga memiliki kelebihan, yaitu represi katabolit yang lebih rendah, kelembaban yang lebih sedikit, tidak rentan terhadap kontaminasi, terdapat kontak yang lebih tinggi antara penginduksi produksi enzim dan sel jamur (Doriya *et al.* 2016). SSF juga termasuk metode ekonomis karena menggunakan limbah lignoselulosa, seperti batang padi (Risdianto *et al.* 2012), ampas tebu (Karp *et al.* 2015), jerami (Hanung *et al.* 2013), daun nanas (Chenthamarakshan *et al.* 2017) dan serbuk gergaji (Gonzales *et al.* 2013), sebagai substrat. Optimalisasi produksi lakase dengan SSF telah dilakukan terhadap ekstrak ragi, pH dan temperatur pada jamur Marasmius (Risdianto *et al.* 2012); CuSO<sub>4</sub>, asam ferulat dan ekstrak ragi pada jamur *Pleurotus ostreatus* (Karp *et al.* 2015); ukuran partikel, kelembapan awal, konsentrasi Cu<sup>2+</sup> pada jamur pelapuk putih *Marasmius sp* (Hanung *et al.* 2013); pH, suhu, galaktosa, CuSO<sub>4</sub>, dan konsentrasi inokulum pada *Marasmiellus palmivorus* LA1 pada substrat daun nanas (Chenthamarakshan *et al.* 2017); dan konsentrasi nitrogen, surfaktan Tween-20 dan karbon pada *T. asperellum* LBKURCC1 (Rahayu *et al.* 2019). Berdasarkan hal ini, pada makalah ini

dilaporkan hasil optimalisasi waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi Cu<sup>2+</sup> dalam bentuk CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O pada produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF menggunakan substrat batang padi sebagai penginduksi lakase.

## BAHAN DAN METODE

### Isolat Mikroorganisme

Penelitian ini menggunakan isolat jamur *T. asperellum* LBKURCC1 yang diisolasi dari perkebunan cokelat di Riau. Mikroorganisme ini menjadi koleksi Laboratorium Riset Enzim, Fermentasi, dan Biomolekuler FMIPA Universitas Riau.

### Bahan

Bahan hayati: batang padi sebagai penginduksi produksi enzim diperoleh dari petani lokal di kota Payakumbuh, Sumatera Barat, Indonesia. Bahan Kimia: ABTS (Sigma-Aldrich A1888) untuk penentuan aktivitas enzim, Tween 20 dan kedelai bubuk untuk media (soybean meal, Sigma-Aldrich), serta bahan kimia lainnya adalah *biological preparative media grade*). Untuk pemisahan miselia dari media enzim digunakan *filter glass fiber* (whatmann GF/C), dan untuk pemekatan dan dialisis enzim digunakan *corning spin-x UF6 10k*.

### Persiapan Media dan Inokulum *T. asperellum* LBKURCC1

#### Media Potato Dextrose Agar (PDA)

Media PDA terdiri dari 200 g kentang, 20 g dextrosa, 17 g agar, 5 mL asam sitrat 1% dan 1 L aquades. Larutan media dan asam sitrat 1% disterilisasi secara terpisah di dalam autoclaf pada tekanan 15 lb dan temperatur 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya larutan media dimasukkan ke dalam *waterbath thermostat* pada temperatur 65 °C selama 30 menit dan kemudian ditambahkan asam sitrat. Media agar cair dituang ke cawan petri atau tabung untuk pertumbuhan mikroba di agar miring, dan dibiarkan memadat pada suhu kamar, sebelum digunakan.

#### Peremajaan jamur *T. asperellum* LBKURCC1

Sebanyak 3 mL aquades steril ditambahkan ke dalam isolat *T. asperellum* LBKURCC1 agar miring. Spora jamur yang tumbuh lebat dipermukaan agar disogok dengan jarum ose sehingga bercampur dengan aquades steril. Kemudian, sebanyak 150 mL larutan spora tersebut disebar pada PDA di cawan petri.

#### Media Potato Dextrose Broth (PDB)

Media PDB terdiri dari 200 g kentang, 20 g dextrosa, 5 mL asam sitrat 1 % dan 1 L aquades. Sebanyak 200 g kentang dipotong dadu dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi 1 L aquades. Campuran dididihkan selama 20 menit dan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh

dicampurkan dengan dextrosa dan asam sitrat. Setelah tercampur rata, sebanyak 30 mL media PDB dituang ke dalam Erlenmeyer 100 mL dan disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb dan temperatur 121 °C selama 15 menit. Selanjutnya, media PDB diinkubasi semalam pada suhu ruang sebelum diinokulasi dengan jamur *T. asperellum* LBKURCC1.

#### Media Dasar untuk Produksi Lakase

Komposisi media dasar untuk SSF terdiri dari: 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,6 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% gliserol, 23,07 g/L Tepung kedelai, 1 g/L Tween-20 dan CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. Konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O merupakan salah satu faktor yang akan dioptimalisasi. Sehingga, larutan CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dibuat dengan lima variasi konsentrasi, yaitu: 0,025 g/L; 0,035 g/L; 0,05 g/L; 0,065 g/L dan 0,075 g/L.

#### Persiapan Substrat Batang Padi Proses SSF

Proses SSF dilakukan dengan menggunakan limbah batang padi sebagai substrat untuk penginduksi lakase. Batang padi dicuci lalu dikering anginkan kemudian dipotong dengan ukuran 1 sampai 2 cm.

#### Inokulum *Trichoderma asperellum* LBKURCC1

Sebaran koloni *T. asperellum* LBKURCC1 pada media agar di cawan petri diplug menggunakan *cork borer* (diameter 1 cm) sebanyak dua kali untuk diinokulasi secara aseptis ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 30 mL media PDB steril. Inokulum kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan dilakukan pengocokan menggunakan *rotary shaker* 150 rpm, hingga 48 jam.

#### Produksi Lakase secara SSF dengan Batang Padi

Produksi lakase secara SSF dilakukan dengan optimalisasi tiga variabel, yaitu: waktu fermentasi (hari), kadar air (%) dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (g/L) dengan menggunakan desain eksperimen *Central Composite Design* (CCD) (Tabel 1). Produksi secara SSF dalam reaktor labu sederhana dimulai dengan inokulasi 30 mL suspensi inokulum ke dalam 30 mL larutan media dasar (MD) yang telah mengandung batang padi. Setelah inokulasi, fermentor diinkubasi pada suhu ruang ( $\pm 30$  °C) dan dikocok secara manual setiap hari selama 10 menit, untuk meratakan distribusi miselia jamur yang tumbuh dalam media. Pada setiap waktu akhir fermentasi, enzim diekstraksi untuk memperoleh ekstrak kasar enzim lakase.

#### Penentuan Kadar Air

Pengukuran kadar air dengan menggunakan metode gravimetri ialah dengan menentukan berat sampel yang hilang setelah ditempatkan pada oven selama waktu tertentu. Pada metode gravimetri

diasumsikan bahwa hanya air yang menguap dalam proses pengeringan (Ruiz 2001). Persamaan yang digunakan untuk menentukan kadar air suatu bahan sesuai dengan yang digunakan oleh Amelia *et al.* (2015), sebagai:

$$KA = \frac{mb - mk}{mb} \times 100\%$$

Keterangan:

KA = kadar air (%)

mb = massa basah bahan (gram)

mk = massa kering bahan (gram)

#### Ekstraksi Lakase

Larutan *buffer* asetat 0,05 M pH 5,5 ditambahkan ke dalam reaktor SSF pada akhir waktu fermentasi dengan perbandingan 20 mL *buffer* tiap 2 g batang padi. Setelah itu, reaktor SSF dikocok menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm selama 10 menit pada suhu kamar untuk mengekstraksi enzim. Suspensi kemudian didinginkan dalam lemari es selama 1 jam. Suspensi disentrifugasi 8000 rpm selama 10 menit dalam sentrifus dingin, kemudian filtrat disaring vakum dengan kertas saring GF/C. Larutan enzim dicuci tiga kali dengan *buffer* asetat menggunakan membran ultrafiltrasi *corning spin-X UF6 10k* dengan sentrifus pada temperatur 5-10 °C. Larutan enzim akhir yang telah dicuci disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20 °C, jika tidak langsung digunakan.

#### Uji Aktivitas Enzim Lakase

Aktivitas lakase ditentukan menggunakan substrat ABTS mengikuti metode yang dijelaskan oleh Kiiskinen *et al.* (2004). Aktivitas lakase dinyatakan sebagai unit (U). Satu unit aktivitas lakase (U) didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk mengoksidasi 1 μmol ABTS tiap menit (Hanung *et al.*, 2013).

#### Desain Eksperimen dan Optimalisasi Parameter Fermentasi untuk Produksi Lakase

Optimalisasi waktu fermentasi (hari), kadar air (%) dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (g/L) pada produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF dilakukan menggunakan desain eksperimen *Central Composite Design* (CCD). Lima level dari tiga variabel CCD dalam penelitian ini, membutuhkan 20 titik percobaan, yang mencakup delapan titik faktorial, enam titik aksial, dan enam titik pusat untuk memberikan informasi mengenai interior wilayah percobaan, dan memungkinkan untuk evaluasi kelengkungan. Jarak titik aksial dari

titik pusat ditunjukkan dengan nilai  $\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}}$ .

Dimana  $k$  adalah jumlah variabel, maka untuk tiga variabel ( $k=3$ ),  $\alpha = 1,682$ . Titik faktorial terdiri dari 2 level desain, yaitu: *upper level* yang disimbolkan

**Tabel 1.** Kisaran dan tingkat variabel independen yang diuji dalam matriks CCD

Variabel	Kode Taraf				
	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Waktu Fermentasi (Hari) ( $X_1$ )	5	6	8	10	11
Kadar air (%) ( $X_2$ )	63	64	66	68	69
Konsentrasi $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) ( $X_3$ )	0,025	0,035	0,05	0,065	0,075

**Tabel 2.** Desain eksperimen CCD untuk tiga variable

Run	Kode Level Variabel			Nilai level Variabel			Aktivitas Lakase mU/g batang padi	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$ (Hari)	$X_2$ (%)	$X_3$ (g/L)	Eksperimen	Prediksi
1	-1	-1	-1	6	64	0,035	32,05	25,83
2	1	-1	-1	10	64	0,035	19,88	12,40
3	-1	1	-1	6	68	0,035	46,43	39,68
4	1	1	-1	10	68	0,035	34,68	26,25
5	-1	-1	1	6	64	0,065	19,61	25,83
6	1	-1	1	10	64	0,065	16,91	12,40
7	-1	1	1	6	68	0,065	42,67	39,68
8	1	1	1	10	68	0,065	24,82	26,25
9	-1,682	0	0	5	66	0,05	35,74	39,06
10	1,682	0	0	11	66	0,05	9,46	18,92
11	0	-1,682	0	8	63	0,05	33,01	37,81
12	0	1,682	0	8	69	0,05	50,62	58,59
13	0	0	-1,682	8	66	0,025	19,08	21,41
14	0	0	1,682	8	66	0,075	13,40	21,41
15	0	0	0	8	66	0,05	77,93	64,19
16	0	0	0	8	66	0,05	52,50	64,19
17	0	0	0	8	66	0,05	57,67	64,19
18	0	0	0	8	66	0,05	58,45	64,19
19	0	0	0	8	66	0,05	75,41	64,19
20	0	0	0	8	66	0,05	70,38	64,19

dengan +1, dan *lower level* yang disimbolkan dengan -1. Selanjutnya, titik axial disimbolkan dengan  $\alpha$ , terdiri dari 2 level, yaitu  $-\alpha$  (-1,682) dan  $+\alpha$  (+1,682) dan titik pusat disimbolkan dengan 0 (Tabel 1). Rancangan CCD diringkas pada Tabel 2. Data yang diperoleh, kemudian dianalisis menggunakan program Minitab versi 17.1.

### Validasi Model

Program minitab versi 17.1 digunakan untuk analisis regresi data eksperimen, membentuk grafik 3D permukaan respon, kontur plot 2D dan persamaan polinomial orde dua. ANOVA digunakan untuk mengestimasikan signifikansi parameter fermentasi dan pengujian *lack-of-fit* bertujuan untuk mengetahui kesesuaian model. Selanjutnya, dilakukan validasi model untuk mengkonfirmasi keakuratan model. Percobaan validasi dilakukan dengan menggunakan tiga variabel yang telah dioptimalkan oleh program

minitab. Variabel yang dioptimalkan secara teoritis diuji untuk menentukan aktivitas lakase aktual dalam percobaan. Kemudian aktivitas enzim eksperimen dibandingkan dengan aktivitas enzim yang diprediksi.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi lakase secara SSF dimulai pada umur inokulum *T. asperellum* LBKURCC1 dalam media PDB yang sudah berada pada fase eksponensial. Fase ini dipilih karena terdapat pertumbuhan yang cepat dalam ukuran dan jumlah sel, dan sel-sel yang paling banyak adalah sel dengan tahap metabolisme yang produktif. Sel miselia jamur pada fase eksponensial akan dengan cepat memetabolisme media fermentasi. Kualitas inokulum dalam fase pertumbuhan mikroorganisme adalah faktor penting untuk memberikan hasil produksi fermentasi yang optimal (Krishna & Nokes 2001).

**Tabel 3.** ANOVA untuk produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF pada substrat batang padi dalam desain CCD dengan faktor waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F- value	p-value	Interpretasi statistik <sup>a)</sup>
Model	9	7436,02	826,22	8,56	0,001	Signifikan
Linear	3	1272,26	424,09	4,39	0,032	Signifikan
X <sub>1</sub> (Waktu fermentasi)	1	563,20	563,20	5,84	0,036	Signifikan
X <sub>2</sub> (Kadar air)	1	599,60	599,60	6,21	0,032	Signifikan
X <sub>3</sub> (Konsentrasi CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	1	109,45	109,45	1,13	0,312	Tidak signifikan
Square	3	6134,84	2044,95	21,19	0,000	Signifikan
X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>	1	2520,17	2520,17	26,11	0,000	Signifikan
X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>	1	520,00	520,00	5,39	0,043	Signifikan
X <sub>3</sub> *X <sub>3</sub>	1	3368,37	3360,37	34,90	0,000	Signifikan
2-Way Interaction	3	28,92	9,64	0,10	0,958	Tidak signifikan
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	1	27,11	27,11	0,28	0,608	Tidak signifikan
X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>	1	1,41	1,41	0,01	0,906	Tidak signifikan
X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>	1	0,40	0,40	0,00	0,950	Tidak signifikan
Error	10	965,04	96,50			
Lack-of-fit	5	408,33	81,67	0,73	0,629	Model sesuai
Pure Error	5	556,72	111,34			
Total	19	8401,06				

Catatan: <sup>a)</sup>interaksi signifikan merupakan interpretasi untuk *p-value* < 0,05. Interaksi tidak signifikan adalah interpretasi untuk *p-value* ≥ 0,05

**Tabel 4.** Ringkasan model untuk produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF dengan substrat batang padi dalam desain CCD dengan faktor waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

S	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> (adj)	R <sup>2</sup> (pred)
8,87783	86,87 %	82,17 %	70,78 %

Penentuan kondisi optimum produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF pada batang padi dalam reaktor labu dilakukan secara statistik menggunakan metode Central Composite Design (CCD) untuk mendapatkan aktivitas lakase optimal. Waktu fermentasi (X<sub>1</sub>), kadar air (X<sub>2</sub>), dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (X<sub>3</sub>) dipilih sebagai variabel untuk mengoptimalkan produksi lakase. Data hasil perlakuan dikomputasi dalam program Minitab versi 17.1 (Tabel 2). Model kuadratik yang disarankan program digunakan untuk mencari kondisi optimum untuk menghasilkan aktivitas lakase optimum.

Kesesuaian model diuji dengan ANOVA dan lack-of-fit. Tabel 3 menunjukkan hasil uji. ANOVA untuk model kuadratik yang dipilih menunjukkan bahwa model yang digunakan memiliki signifikansi (*p-value* = 0,001) terhadap aktivitas lakase. Variabel waktu fermentasi (X<sub>1</sub>) dan kadar air (X<sub>2</sub>) memiliki *p-value* < 0,05 pada efek linier dan square sehingga variabel X<sub>1</sub> dan X<sub>2</sub> memiliki pengaruh signifikan terhadap aktivitas lakase. Sedangkan variabel konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (X<sub>3</sub>) memiliki *p-value* > 0,05 pada efek linier, akan tetapi memiliki *p-value* < 0,05 pada efek square, sehingga variabel X<sub>3</sub> juga memiliki pengaruh signifikan terhadap aktivitas

lakase. Persamaan regresi model kuadratik yang diperoleh adalah:

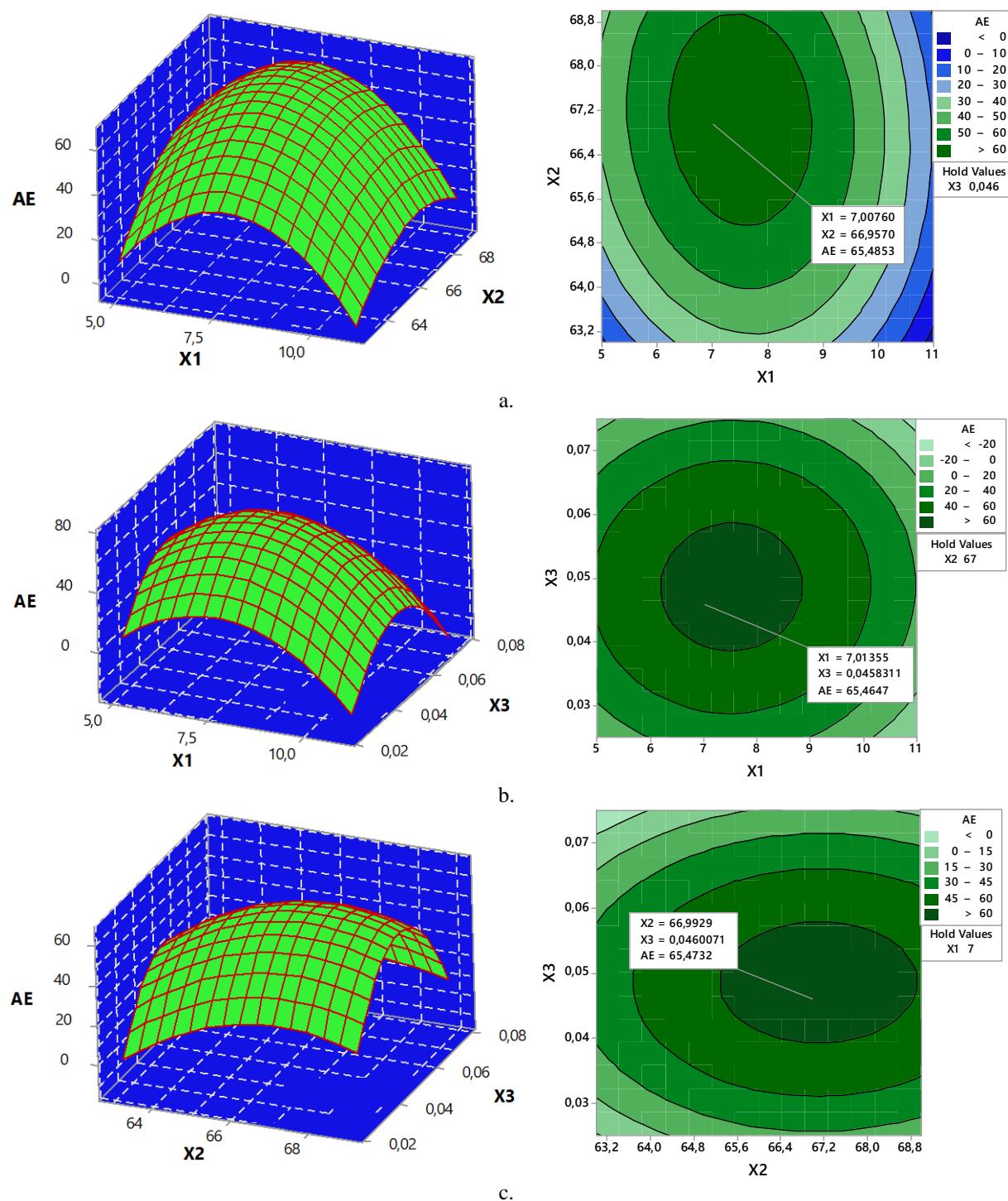
$$Y = 64,19 - 6,71 X_1 + 6,93 X_2 - 15,65 X_1 \cdot X_1 - 7,11 X_2 \cdot X_2 - 15,40 X_3 \cdot X_3$$

Koefisien linier X<sub>2</sub> bernilai positif sehingga berkontribusi meningkatkan Y. Sedangkan, koefisien kuadrat X<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>\*X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>\*X<sub>2</sub> dan X<sub>3</sub>\*X<sub>3</sub> bernilai negatif sehingga berkontribusi menurunkan Y. Selanjutnya, uji kesesuaian model ditinjau dari hipotesis pengujian lack-of-fit.

$$\begin{aligned} H_0 &= \text{tidak ada lack of-fit (model sesuai)} \\ H_1 &= \text{ada lack of-fit (model tidak sesuai)} \end{aligned}$$

Hipotesis H<sub>0</sub> diterima apabila *p-value* > 0,05. Berdasarkan Tabel 3, lack of-fit memiliki nilai *p-value* = 0,629, artinya artinya model kuadratik yang dipilih memiliki kesesuaian untuk menggambarkan hubungan variabel bebas dan respon.

Nilai koefisien regresi kuadrat (R<sup>2</sup>) sebesar 0,8687 yang menunjukkan 86,87% perlakuan dapat dijelaskan oleh model (Tabel 4). Selisih nilai antara koefisien regresi kuadrat (R<sup>2</sup>) dan koefisien regresi kuadrat terkoreksi (R<sup>2</sup> Adj) tidak lebih dari 0,2, mengindikasikan bahwa model dapat menentukan



**Gambar 1.** Grafik tiga dimensi respon permukaan dan kontur plot aktivitas lakase. a) Interaksi X<sub>1</sub> dan X<sub>2</sub>; b) Interaksi X<sub>1</sub> dan X<sub>3</sub>; c) Interaksi X<sub>2</sub> dan X<sub>3</sub>. X<sub>1</sub>= waktu fermentasi (hari), X<sub>2</sub>= kadar air (%) dan X<sub>3</sub>=Konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (g/L)

kondisi optimum variabel yang berpengaruh pada aktivitas lakase yang dihasilkan (Yeni 2015).

Respon permukaan dan kontur plot dibuat untuk memperjelas respon dari perlakuan. Visualisasi RSM untuk respon aktivitas lakase disajikan pada Gambar 1 yang memperlihatkan kisaran optimal untuk masing-masing variabel. Dari hasil yang ditunjukkan

pada Gambar 1, dapat disimpulkan bahwa waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dapat meningkatkan produksi lakase. Gambar 1a menunjukkan pengaruh waktu fermentasi (X<sub>1</sub>) dan kadar air (X<sub>2</sub>) pada konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (X<sub>3</sub>) tetap 0,046 g/L. Produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF optimum diamati pada

**Tabel 5.** Validasi eksperimental aktivitas lakase

Faktor	Kondisi optimum	Aktivitas enzim prediksi (mU/g)	Aktivitas enzim eksperimen (mU/g)
Waktu Fermentasi (X <sub>1</sub> )	7 hari		
Kadar air (X <sub>2</sub> )	67 %	65,47	65,33±0,7*
Konsentrasi CuSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (X <sub>3</sub> )	0,046 g/L		

Catatan: \*2 kali pengulangan (duplo) pada produksi secara SSF dan 3 kali pengulangan (triplo) pada aktivitas lakase

kisaran waktu fermentasi 7 hingga 8 hari dan kadar air 65,2 hingga 68,8%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Nurliati dkk. (2018) pada produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1, Aftab *et al.* (2018) pada *Aspergillus flavus* Maf 0139, Irfan *et al.* (2018) pada *Alternaria alternate*, dan Gosh (2017) pada *Aspergillus flavus* PUF5 yang menyatakan bahwa waktu optimum untuk fermentasi lakase yaitu selama 7 hari. Selain faktor waktu fermentasi, kadar air dalam proses SSF memainkan peran penting pada produksi lakase dan pemanfaatan substrat (Aftab *et al.* 2018). Dalam proses SSF, kadar air bervariasi antara 30 - 85%. Kadar air optimum tersebut berbeda-beda untuk tiap jenis mikroorganisme (Raimbault 1998). Pada penelitian ini, diperoleh kadar air optimum untuk produksi lakase dari *T. asperellum* LBKURCC1 sebesar 67%. Hal ini sesuai dengan kisaran kadar air yang dikemukakan oleh Krishna (2005), yaitu untuk jamur berfilamen, kadar air harus berada pada rentang 20 - 70%.

Kadar air merupakan parameter fermentasi penting dalam produksi enzim, karena korelasi antara kadar air dengan difusivitas O<sub>2</sub> dalam medium fermentasi. Keberadaan air dalam substrat mempengaruhi pengembangan (*swelling*) dan kemudahan absorpsi nutrien dalam substrat yang dapat digunakan mikroorganisme untuk pertumbuhan dan aktivitas metabolisme. Kadar air yang terlalu rendah mengurangi solubilitas nutrien dalam substrat dan mempengaruhi pertumbuhan awal jamur. Kadar air yang terlalu tinggi menurunkan porositas medium fermentasi. Hal tersebut dapat menghambat transfer O<sub>2</sub> secara difusi. Penyebaran O<sub>2</sub> menjadi tidak merata sehingga ada bagian jamur yang tidak mendapat pasokan O<sub>2</sub> yang cukup. Kekurangan O<sub>2</sub> dapat menyebabkan penurunan kinerja jamur dalam produksi enzim dan pertumbuhan (Rashid dan Yusoff 2011).

Gambar 1b menunjukkan pengaruh waktu fermentasi (X<sub>1</sub>) dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (X<sub>3</sub>) pada kadar air (X<sub>2</sub>) tetap 67%. Produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF optimum diamati pada kisaran waktu fermentasi 7 hingga 8 hari dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,04 hingga 0,058 g/L. Enzim lakase dapat diinduksi oleh logam Cu, namun penambahan logam Cu yang berlebihan dapat menimbulkan dampak negatif pada mikroorganisme. Levin *et al.* (2002) menjelaskan bahwa penambahan Cu sebesar 1 mM dapat meningkatkan produksi

enzim lakase *Trametes trogii*, namun penambahan Cu dengan konsentrasi 1,5 mM dapat menurunkan laju pertumbuhan maksimum dari mikroorganisme tersebut. Hal ini, disebabkan karena penambahan Cu yang berlebihan dapat mempengaruhi sistem protein lain yang dihasilkan. Menurut Niladevi *et al.* (2007), kadar Cu yang lebih tinggi pada media merupakan racun bagi mikroorganisme. Telah banyak penelitian yang dilakukan terkait penentuan konsentrasi Cu optimum, sehingga konsentrasi Cu optimum bervariasi untuk tiap mikroorganisme. Pada penelitian ini, diperoleh konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O optimum yaitu 0,046 g/L.

Gambar 1c. menunjukkan pengaruh kadar air (X<sub>2</sub>) dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (X<sub>3</sub>) pada waktu fermentasi (X<sub>1</sub>) tetap 7 hari. Produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF optimum diamati pada kisaran kadar air 65,4 hingga 68,8% dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,04 hingga 0,055 g/L. Lakase merupakan enzim yang memerlukan Cu<sup>2+</sup> sebagai ion yang berperan pada pusat reaksinya (Fillat *et al.* 2017). Oleh karena itu, umumnya konsentrasi Cu<sup>2+</sup> akan sangat mempengaruhi aktivitas atau produksi lakase.

Penentuan titik optimum dilakukan untuk mendapatkan kondisi proses dengan variabel yang menghasilkan respon optimal dengan pendekatan nilai desirability. Nilai desirability mendekati 1, menunjukkan kesesuaian proses produksi optimal terhadap respon atau makin rendah tingkat kesalahan (Yeni 2015). Hasil optimum respon aktivitas lakase diperoleh pada waktu fermentasi 7 hari, kadar air 67% dan konsentrasi CuSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,046 g/L dengan hasil prediksi aktivitas lakase 65,47 mU/g. Eksperimen verifikasi dilakukan pada kondisi optimum, dengan dua kali pengulangan produksi SSF dan tiga kali pengulangan pengukuran aktivitas enzim, menghasilkan aktivitas lakase 65,33±0,7 mU/g (Tabel 5). Perbedaan antara aktivitas lakase prediksi dan eksperimental kurang dari 0,03%. Menurut Sahoo *et al.* (2011) perbedaan antara nilai prediksi dan eksperimental kurang dari 3% menunjukkan bahwa model yang dihasilkan memiliki kecocokan baik dan kemampuan prediksi tinggi.

Aktivitas lakase yang dihasilkan pada titik optimum hanya meningkat 2% dari aktivitas lakase pada titik pusat (*centre point*), dengan aktivitas lakase pada titik pusat adalah 65,4±10,6 mU/g. Kondisi fermentasi pada titik pusat adalah waktu fermentasi 8 hari, kadar air 66% dan konsentrasi

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05 g/L, sehingga optimalisasi fermentasi ke titik optimum tetap menguntungkan secara ekonomi. Optimalisasi fermentasi ke titik optimum mempersingkat waktu fermentasi satu hari dan mengurangi konsentrasi  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  yang harus ditambahkan sebesar 0,004 g/L. Meski nilai ini terlihat kecil pada skala laboratorium, pada skala produksi yang ditingkatkan untuk industri, memiliki dampak ekonomi yang patut diperhitungkan.

Aktivitas lakase pada kondisi optimum dari penelitian ini masih lebih kecil secara signifikan, yaitu sepersepuluh dari aktivitas lakase yang dilaporkan oleh Rahayu *et al.* (2019), menggunakan metode SSF yang sama dan galur fungi filamen yang sama. Pada Rahayu *et al.* (2019) optimasi parameter menunjukkan bahwa penggunaan Tween-20 dari 0,5 hingga 1,5 g/L tidak mempengaruhi produksi lakase, sedangkan konsentrasi nitrogen, dalam bentuk tepung kedelai, dan konsentrasi karbon, dalam bentuk gliserol sangat mempengaruhi produksi lakase. Dalam penelitian ini telah digunakan parameter kadar Tween-20 1 g/L, konsentrasi nitrogen dan konsentrasi karbon optimum yang diperoleh Rahayu *et al.* (2019), tetapi dengan hasil akhir aktivitas lakase yang lebih kecil. Salah satu kemungkinan perbedaan ini disebabkan antara lain sumber batang padi yang berbeda, dengan konsentrasi lignin yang berbeda. Penelitian ini menggunakan batang padi yang berasal dari Sumatra Barat, sedangkan Rahayu *et al.* (2019) menggunakan batang padi yang berasal dari sentra pertanian padi di Karawang, Jawa Barat. Sumber batang padi berbeda, berpotensi memiliki kadar lignin berbeda, yang berpengaruh pada induksi produksi lakase, dan juga berpengaruh pada penentuan aktivitas lakase ekstrak kasar enzim. Penelitian pendahuluan kami, menunjukkan bahwa kadar produk degradasi lignin dalam sampel ekstrak kasar lakase dapat mengganggu penentuan aktivitas lakase (Dahliaty *et al.* 2020). Pada penelitian ini, gangguan produk degradasi lignin pada penentuan aktivitas enzim telah dihilangkan dengan terlebih dahulu mencuci dialisis ekstrak kasar menggunakan membran ultrafiltrasi 10 kD, sebanyak tiga kali untuk semua sampel. Sampel yang telah dicuci dialisis kemudian dikembalikan ke volume semula sebelum pencucian. Semua sampel yang diperbandingkan aktivitas enzim lakasenya pada penelitian ini mendapat perlakuan yang sama. Oleh karena perbandingan semua parameter yang diuji penelitian ini menggunakan sampel batang padi yang sama, dengan perlakuan yang sama, maka kesimpulan kondisi optimum untuk parameter waktu fermentasi, kadar air dan konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  yang dilakukan pada penelitian ini dapat diterima.

## KESIMPULAN

Kondisi optimum waktu fermentasi 7 hari, kadar air 67% dan konsentrasi  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,046 g/L pada produksi lakase *T. asperellum* LBKURCC1 secara SSF pada substrat limbah batang padi dalam reaktor

labu menghasilkan aktivitas lakase sebesar  $65,33 \pm 0,7$  mU/g batang padi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pemberdayaan dan Pengembangan Penelitian (DRPM), Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, berdasarkan kontrak No. 324/UN.19.5.1.3/PP/2018, skema Penelitian Tim Pascasarjana (PTP).

## DAFTAR PUSTAKA

- Arif, Y Adnan, L. A., Sathishkumar, P., Yusoff, A. R. M., Hadibarata, T. & Ameen, F. (2017). Rapid bioremediation of alizarin red s and quinizarine green ss dyes using *Trichoderma lixii* F21 mediated by biosorption and enzymatic processes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **40**(1): 85-97.
- Aftab, M., Tahir, A., Asim, T. & Maryam, I. (2018). Optimization of cultural conditions for enhanced production of laccase by *Aspergillus flavus* Maf 0139. *Biologia (Pakistan)*. **64**(2): 247-255.
- Amelia, R., Ginting, M. & Sugianto. (2015). Penentuan kadar air ubi kayu menggunakan plat kapasitor sejarar. *JOM FMIPA*. **2**(1): 324-330.
- Brüschweiler, B. J., Küng, S., Bürgi, D., Muralt, L. & Nyfeler, E. (2014). Identification of non-regulated aromatic amines of toxicological concern which can be cleaved from azo dyes used in clothing textiles. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **69**(2): 263-272.
- Chenthamarakshan, A., Parambayil, N., Miziriya, N., Soumya, P. S., Lakshmi, K., Ramgopal, A., Dileep, A. & Nambisan, P. (2017). Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. *BMC Biotechnology*. **17**(12): 1-10.
- Dahliaty, A., Miranti, Buana, T.A., Tamher, M.M., Nurulita, Y., Yanti. & Nugroho, T.T. (2020). Gangguan produk degradasi limbah lignoselulosa pada penentuan aktivitas lakase. *Jurnal Natur Indonesia*. submitted.
- Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., & Kumar, D.S. (2016). Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of l-asparaginase. *Advances in Food and Nutrition Research*. **78**: 115–135.
- Fillat, U., Ibarra, D., Eugenio, M. E., Moreno, A.D., Tomas-Pejo, E. & Martin-Sampedro, R. (2017). Laccase as a potential tool for the efficient conversion of lignocellulosic biomass: A review. *Fermentation*. **3**:17.
- Forootanfar, H. & Faramarzi, M.A. (2015). Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology Progress*. **31**(6): 1443-1463.

- Ghosh, P. & Ghosh, U. (2017). Statistical optimization of laccase production by *Aspergillus flavus* PUF5 through submerged fermentation using agro-waste as cheap substrate. *Acta Biologica Szegediensis*. **61(1)**: 25-33.
- Gonzales, J.C., Medina, S.C., Rodriguez, A., Osma, J.F., Almeciga-Diaz, C.J. & Sanchez, O.F. (2013). Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. *PLOS One*. **8(9)**: e73721.
- Hagerman, A.E. (2010). *The Tannin Handbook. Hydrolyzable tannin structural chemistry*, Miami University, Oxford, Ohio, USA. <https://www.users.miamioh.edu/hagermae/Hydrolyzable%20Tannin%20Structural%20Chemistry.pdf>
- Hanung, C. D., Osmond, R. & Risdianto, H. (2013). Optimisasi produksi enzim lakase pada fermentasi kultur padat menggunakan jamur pelapuk putih *Marasmius sp.*: pengaruh ukuran partikel, kelembapan, dan konsentrasi Cu. *Jurnal Selulosa*. **3(2)**: 65 – 72.
- Irfan, M., Mahmood, S., Irshad, M. & Anwar, Z. (2018). Optimized production, purification and molecular characterization of fungal laccase through *Alternaria alternate*. *Turkish Journal of Biochemistry*. **43(6)**: 1-10.
- Iryani, A. & Hartanto, D. (2018). Textile dyes removal by ZSM-5 from Bangka kaolin. *Journal of Physics: Conference Series*. **1095**: 102011.
- Karp, S.G., Faraco, V., Amore, A., Letti, L.A.J., Soccol, V.T., & Soccol, C.R. (2015). Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. *BioMed Research International*. **2015(8)**: 1-8.
- Krishna, C. & Nokes, S.E. (2001). Predicting vegetative inoculum performance to maximize phytase production in solid-state fermentation using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **26(3)**: 161-170.
- Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems—An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. **25(1-2)**: 1-30.
- Lade, H., Govindwar, S. & Paul, D. (2015). Mineralization and detoxification of the carcinogenic azo dye congo red and real textile effluent by a polyurethane foam immobilized microbial consortium in an upflow column. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. **12(6)**: 6894-6918.
- Lalnunhlimi, S. & Krishnaswamy, V. (2016). Decolorization of azo dyes (direct blue 151 and direct red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*. **47(1)**: 39-46.
- Leme, D.M., Primo, F.L., Gobo, G.G., da Costa, C.R.V., Tedesco, A.C. & de Oliveira, D.P. (2015). Genotoxicity assessment of reactive and disperse textile dyes using human dermal equivalent (3D cell culture system). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. **78(7)**: 466-480.
- Levin, L., Forchiassin, F. & Ramos, A.M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycological Society of America Journal*. **94(3)**: 377-383.
- Naresh, B., Preethi, C., Sneha, S., Bhagyashree, R. & Parizad, P. (2013). Microbial decolorization of disperse textile dye brown 21 by *Enterobacter gergoviae* isolated from textile effluent. *International Research Journal of Environmental Sciences*. **2(5)**: 31-36.
- Niladevi, K.N., Sukumaran, R.K. & Prema, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **34(10)**: 665-674.
- Nor, N.M., Hadibarata, T., Zubir, M.M.F.A., Lazim, Z.M., Adnan, L.A. & Fulazzaky, M. A. (2015). Mechanism of triphenylmethane cresol red degradation by *Trichoderma harzianum* M06. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **38(11)**: 2167-2175.
- Nugroho, F.L., Rohaeni, A., Wahjuni, S. & Sobirachman, D. (2012). Removal of colour index reactive blue 5 (CIRB5) anthraquinone dye by live *Trichoderma asperellum* TNC52 isolated from the soil of a cacao plantation in Riau. 5<sup>th</sup> Regional Conference on Global Environment: "Toward a Sustainable ASEAN": 21-22 November 2012, Bandung, Indonesia: proceedings (Bandung: Centre for Environmental Studies, Institut Teknologi Bandung), pp 147–160.
- Nugroho, T. T., Akbar, I., Astina, D., Helianty, S., & Saputra, E. (2018). Colour removal of an azo-textile dye and production of laccase by submerged cultures of *Trichoderma asperellum* LBKURCC1. *Journal of Physics: Conference Series*. **1116**: 042027.
- Nurliati, I., Helianty, S. & Dahliaty, A. (2018). Produksi enzim lakase oleh jamur *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 dengan variasi penambahan CuSO<sub>4</sub> menggunakan bioreaktor Tray secara Solid State Fermentation (SSF). *JOM FTEKNIK*. **5(2)**: 1-6.
- Rahayu, A.G., Utama, P.S., Nurulita, Y., Miranti, M. & Nugroho, T.T. (2019). Surfactant, nitrogen and carbon media optimization for *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 laccase production by flask solid state fermentation of rice straw. *Journal of Physics: Conference Series*. **1351**: 01230.

- Raimbault, M. (1988). General and microbiological aspects of solid state fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. **1**(3): 1-20.
- Rashid, J.I.A. & Yusoff, W.M.W. (2011). Optimization of temperature, moisture content and inoculum size in solid state fermentation to enhance mannase production by *Aspergillus terreus* SUK-1. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **14**(9): 533-539.
- Risdianto, H., Sofianti, E., Suhardi, S.H. & Setiadi, T. (2012). Optimisation of laccase production using white rot fungi and agriculture wastes in solid state fermentation. *Journal of Engineering Science*. **44**(2): 93-105.
- Sahoo, B.K., Mishra, A.K. & Pal, T.K. (2011). Optimization and validation of modulated release formulation of ranitidine HCl by response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. **3**(1): 13-18.
- Sing, N.N., Husaini, A., Zulkharnain, A. & Roslan, H.A. (2017). Decolourisation capabilities of ligninolytic enzymes produced by *Marasmius cladophyllus* UMAS MS8 on remazol brilliant blue R and other azo dyes. *Biomed Reseach International*. **2017**(4): 1-8.
- Terron, M.C., Lopez-Fernandez, M., Carbajo, J.M., Junca, H., Tellez, A., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Gonzalez, T. & Gonzalez, A.E. (2004). Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. *Biochimie*. **86**: 519-522.
- Thomas, L., Larroche, C. & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. **81**: 141-161.
- Yeni, G. (2015). Rekayasa proses nanoenkapsulasi konsentrat katekin dari gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) sebagai antioksidan. Disertasi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.