

Produksi Enzim Xilanase dari *Aspergillus niger* melalui Metode Fermentasi Terendam dalam Valorisasi Tandan Kosong Kelapa Sawit sebagai Produk Biorefineri Bernilai Tambah

Xylanase Production from Aspergillus niger via Submerged Fermentation towards Oil Palm Empty Fruit Bunches (OPEFB) Valorization as Value-added Biorefinery Products

Tania Widani Imanisa^{1,*}, Efri Mardawati^{1,3}, Nanang Masruchin^{2,3}

¹ Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran
Jl. Ir. Soekarno Km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363, Indonesia.

² Pusat Riset Biomassa dan Bioproduk, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, Badan Riset dan Inovasi Nasional
Jl. Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat 16911, Indonesia.

³ Research Collaboration Center for Biomass and Biorefinery between BRIN and Universitas Padjadjaran
Jl. Ir. Soekarno Km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363, Indonesia.

*⁾ Alamat E-mail Korespondensi: tania19002@mail.unpad.ac.id

Informasi Artikel

Diterima: 26 Mei 2023

Disetujui: 15 Juni 2023

Terbit : 30 Juni 2023

Kata Kunci:

Aktivitas Enzim Xilanase,
Aspergillus niger,
Fermentasi Terendam,
Kadar Protein, dan TKKS.

Abstrak. Peningkatan penggunaan enzim di berbagai sektor industri belum dapat dipenuhi oleh produsen nasional sehingga impor dilakukan sebagai solusi pemenuhannya. Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) sebagai biomassa berlignoselulosa yang dikategorikan sebagai limbah mengandung xilan pada kompleks struktur hemiselulosa. Kandungan xilan dapat dimanfaatkan untuk memproduksi enzim xilanase yang banyak digunakan untuk menghidrolisis xilan menjadi xilosa atau xilooligosakarida sebagai gula rendah kalori. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi produksi enzim xilanase dari TKKS yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* melalui metode fermentasi terendam. Fermentasi dilakukan selama 3-9 hari inkubasi dengan respons utama terhadap aktivitas enzim xilanase dan kadar protein enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim xilanase tertinggi dapat diraih setelah fermentasi berlangsung selama 9 hari yaitu sebesar 39,96 U/mL. Adapun kadar protein enzim tertinggi dicapai saat fermentasi berlangsung setelah 6 hari inkubasi yaitu sebesar 0,00942 mg/mL. Hal tersebut diketahui berkaitan dengan dinamika pertumbuhan sel *A. niger* sehingga terjadi fluktuasi kandungan protein terhadap peningkatan aktivitas enzim xilanase. Tingginya aktivitas enzim yang didapatkan dalam penelitian ini dapat diaplikasikan dalam hidrolisis enzimatik terhadap biomassa berlignoselulosa seperti TKKS untuk mendapatkan xilosa yang kemudian dikonversi menjadi xilitol sebagai produk biorefineri bernilai tambah yang rendah kalori.

Abstract. The increasing enzyme utilization in various industrial fields cannot be fulfilled by national producers, so imports are carried out as a solution to fulfill them. Oil palm empty fruit bunches (OPEFB) as lignocellulosic biomass, then categorized as xylan-containing waste in the hemicellulose structure, had the potential to be valorized. The xylan could be used to produce xylanase, which is widely used to hydrolyze xylan into xylose or xylooligosaccharides as low-calorie sugars. This study was aimed at evaluating the production of xylanase from OPEFB produced by *Aspergillus niger* via submerged fermentation. Fermentation was carried out for 3–9 days of incubation, with the main responses being xylanase activity and protein content in the enzyme. The results showed that the highest xylanase activity was achieved after 9 days of fermentation, at 39.96 U/mL. The highest protein content in the enzyme was achieved when the fermentation took place after 6 days of incubation, which was 0.00942 mg/mL. This is related to the dynamics of *A. niger* cell growth, resulting in fluctuations in protein content towards increased xylanase activity. The high enzyme activity obtained in this study can be applied to the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass such as OPEFB to obtain xylose, which is then converted to xylitol as a low-calorie, value-added biorefinery product.

Keywords:

Xylanase Activity,
Aspergillus niger,
Submerged Fermentation,
Total Protein Content, and
OPEFB.

PENDAHULUAN

Berbagai produk berbasis teknologi secara luas dibantu oleh enzim sebagai biokatalisator dalam proses produksinya untuk pemenuhan kebutuhan manusia. Hal tersebut ditunjukkan dengan penggunaan enzim yang semakin meningkat dari tahun ke tahun hingga mencapai 10-15% [1]. Namun, kebutuhan enzim di Indonesia masih belum terpenuhi dengan baik sehingga kebutuhan tersebut dipenuhi dengan cara impor. Alasan tersebut kemudian mendorong para peneliti untuk lebih meningkatkan kemajuan dalam bidang teknologi, salah satunya dengan memanfaatkan peran mikroorganisme dalam bidang industri [2]. Menurut Sutrisno [3], penggunaan enzim secara komersial mencakup dalam beberapa sektor industri mulai dari pengolahan makanan, pakan ternak, kertas, kulit, deterjen, kesehatan, farmasi, dan industri jasa analitik terutama untuk diagnostik.

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa atau xilan menjadi xilosa dan xilooligosakarida sebagai monomer penyusunnya [4]. Xilan menjadi substrat bagi enzim xilanase diketahui banyak dijumpai pada tanaman-tanaman tahunan dan khususnya limbah pertanian seperti tandan kosong kelapa sawit (TKKS), tongkol jagung, bagas tebu, jerami padi, dedak gandum, dan biji kapas. TKKS merupakan hasil samping dari perkebunan kelapa sawit dengan kandungan lignoselulosa yang terdiri dari selulosa (43,0-43,7%), hemiselulosa (22,9-23,7%), dan lignin (21,3-22,1%) [5]. Tingginya kandungan hemiselulosa pada TKKS berpotensi untuk digunakan sebagai substrat dan menghasilkan enzim xilanase sebagai produk metabolisme mikroorganisme dengan memanfaatkan xilan.

Xilanase dapat dihasilkan oleh mikroorganisme melalui proses fermentasi oleh bakteri atau kapang [6]. Kapang diketahui memiliki tingkat hidrolisis lebih tinggi daripada khamir dan bakteri [4]. Dekomposisi komponen lignoselulosa dapat dilakukan oleh kapang dengan memproduksi beragam jenis kelompok enzim hidrolitik dan oksidatif. Pada penelitian ini digunakan *Aspergillus niger* karena spesies ini termasuk ke dalam kelompok kapang berfilamen penghasil xilanase. Kapang tersebut sangat efisien dalam memproduksi xilanase serta penanganannya mudah dan murah [7]. Beberapa faktor pengaruh dalam pertumbuhan

kapang yaitu konsentrasi substrat, sumber nutrisi, aerasi, pH, temperatur, inkubasi, kadar air, dan waktu fermentasi [8].

Fermentasi merupakan transformasi kimia substrat organik karena adanya aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme [4]. Mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses fermentasi berkembang biak secara alami karena lingkungan hidupnya sesuai dengan pertumbuhannya [9]. Pada penelitian ini, metode yang digunakan untuk produksi enzim xilanase yaitu metode fermentasi terendam atau umum dikenal dengan *submerged fermentation*. *Submerged fermentation* merupakan salah satu metode fermentasi dengan menggunakan substrat cair. Penambahan maupun penggantian nutrisi dalam media *submerged fermentation* berjalan kontinyu. Teknik fermentasi ini paling cocok untuk mikroorganisme seperti kapang yang membutuhkan kadar air yang tinggi [10].

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi enzim xilanase yang dihasilkan oleh *A. niger* dengan substrat TKKS. Evaluasi dilakukan terhadap aktivitas dan kadar protein enzim sebagai karakteristik utama dari suatu enzim.

METODE

Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah TKKS yang diperoleh dari PT. Condong Garut (Garut, Jawa Barat) dan isolat murni *Aspergillus niger* dari Badan Riset dan Inovasi Nasional. Adapun bahan lain yang digunakan terdiri dari akuades, pereaksi asam DNS, BCA (*Bicinchoninic Acid*), Working reagen A dan B, buffer sitrat 0,05 M dengan pH 4, *Potato Dextrose Broth*, *Potato Dextrose Agar*, dan xilan 1%,

Persiapan Bahan

Proses persiapan bahan baku dalam penelitian ini mengacu pada Harahap *et al.* [11]. TKKS dilakukan proses pembersihan, pengeringan dengan bantuan sinar matahari kemudian proses pengeringan menggunakan *oven blower* dengan suhu 60 °C selama 24 jam. Setelah mengering, TKKS tersebut dilakukan pengecilan ukuran menggunakan *disc mill* tipe dan pengayakan menggunakan ayakan *tyler* dengan ukuran 60-80 mesh. Kandungan lignoselulosa pada TKKS

kemudian dianalisis menggunakan metode [12]. TKKS yang digunakan pada penelitian ini mengandung selulosa (36,0%), hemiselulosa (23,4%), dan lignin (19,1%).

Peremajaan Isolat *Aspergillus niger*

Peremajaan isolat *A. niger* mengikuti penelitian dari Purkan *et al.* [13] dengan modifikasi. Medium yang digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakkan isolat *A. niger* adalah media padat PDA. Sebanyak 3,9 g PDA dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan didinginkan pada suhu ruang. Isolat *A. niger* diremajakan dengan cara memindahkan satu ose koloni dari isolat murni ke dalam media padat yang telah disiapkan kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 5-7 hari hingga terlihat spora.

Proses Produksi Enzim Xilanase

Sebanyak 2,4 g PDB dengan 100 mL akuades lalu dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* yang kemudian dicampurkan dengan 2,5 g TKKS (konsentrasi sebesar 2,5% biomassa) dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, didinginkan hingga mencapai suhu ruang [14]. Tween 80 (1%) digunakan untuk menghambat terjadinya inhibisi produk ke dalam sel kapang menggunakan *syringe filter*. Pengukuran sel kapang dilakukan terlebih dahulu menggunakan hemasitometer dan mengikuti prosedur dari Avin [15] hingga didapat spora untuk dijadikan kultur kerja. Sebanyak $6,8 \times 10^7$ sel/mL diinokulasikan secara aseptik erlenmeyer dan diinkubasi pada suhu 30 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 9 hari menggunakan *incubator shaker*. Pengambilan sampel dilakukan setiap 3 hari sekali dan sampel disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk setelah disentrifugasi adalah *crude enzyme* xilanase yang selanjutnya diuji aktivitas dan kadar protein.

Aktivitas Enzim Xilanase

Aktivitas enzim xilanase mengacu pada Jampala *et al.* [16]. Sebanyak 0,5 mL *crude enzyme* ditambahkan dengan 1 mL buffer sitrat 0,05 M pH 4,8 ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, sebanyak

0,5 mL xilan 1% ditambahkan sebagai substrat untuk pengujian xilanase. Sampel diinkubasi menggunakan *waterbath* pada suhu 50 °C selama 30 menit. Lalu, ditambahkan 2 mL reagen DNS ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 90 °C selama 10 menit dan didinginkan. Perubahan warna terlihat dan absorbansi diukur dalam spektrofotometer pada 540 nm. Hasil pengukuran absorbansi kemudian disubstitusikan pada persamaan standar xilosa $y = 40,118x + 0,444$ ($R^2 = 0,995$) dengan prosedur pembuatan kurva standar xilosa (0-10 g/L) yang mengikuti Adney & Baker [17].

Pengujian Kadar Protein

Kadar protein ditentukan menggunakan metode *Bicinchoninic Acid* (BCA) protein *assay kit* mengacu pada prosedur dari ThermoScientific [18]. Pengujian kadar protein dilakukan dengan cara menambahkan BCA Working Reagen sebanyak 200 μ L pada setiap kolom sampel microplate yang akan diuji. BCA Working Reagen dibuat dengan cara mencampurkan BCA Reagen B dengan BCA Reagen A pada rasio perbandingan 1:50, lalu working reagen ditambahkan dengan 25 μ L sampel enzim kemudian dihomogenisasi menggunakan shaker selama 30 detik, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Lalu diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang sebesar 562 nm. Hasil pengukuran kurva standar dari BSA (0-200 g/L) diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0008x + 0,0064$ ($R^2 = 0,946$) yang akan digunakan untuk menentukan konsentrasi protein pada sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Xilanase

Aktivitas enzim xilanase diukur berdasarkan konsentrasi xilosa yang terbentuk dari xilan murni sebagai substrat. Semakin tinggi kadar xilosa yang terukur menunjukkan peningkatan aktivitas enzim xilanase. Hasil kuantifikasi aktivitas enzim xilanase terhadap waktu inkubasi disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1, aktivitas xilanase tertinggi dihasilkan pada waktu inkubasi selama 9 hari dengan nilai 39,96 U/mL. Pada hari ke-0 hingga hari ke-2, aktivitas xilanase relatif rendah karena jumlah xilanase yang terdapat pada larutan enzim yang diuji masih sedikit, sehingga jumlah substrat yang

dapat dihidrolisis per satuan waktu inkubasi juga rendah dan jumlah gula pereduksi yang terdeteksi pun sedikit [19]. Seiring bertambahnya waktu inkubasi, terjadi peningkatan aktivitas enzim xilanase pada rentang hari ke-3 hingga hari ke-9 disebabkan karena waktu inkubasi yang lebih lama memberikan kesempatan kepada *A. niger* pada medium fermentasi untuk berkembang biak. Isolat *A. niger* mendapatkan makanan yang berlimpah terutama sumber karbon yang berasal dari xilan pada kondisi yang tepat [20].

Tabel 1. Aktivitas Enzim Xilanase

Waktu Inkubasi (hari)	Aktivitas Xilanase (U/mL)
3	29,46±6,99
6	38,19±0,27
9	39,96±0,04

Selain itu, enzim bekerja secara spesifik terhadap jenis substrat. Hal ini saling berkaitan karena struktur substrat terluar adalah komponen lignin yang berfungsi untuk memperkokoh, sedangkan komponen hemiselulosa berada pada lapisan yang berikatan dengan lignin. Maka diperlukan perombakan komponen lignin terlebih dahulu sebelum perombakan hemiselulosa sehingga dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk merombak hemiselulosa. Hasil penelitian membuktikan hal tersebut dengan didapaknya aktivitas enzim yang meningkat hingga hari ke-9 [21].

Penambahan xilan 1% sebagai substrat dalam medium akan menstimulasi sintesis xilanase. Xilan sebagai polimer berukuran besar dan tidak dapat dilakukan penetrasi ke dinding sel tanaman oleh isolat *A. niger*. Xilanase digunakan oleh *A. niger* untuk merombak xilan menjadi gula yang lebih sederhana sehingga dapat digunakan untuk pertumbuhan [4].

Aktivitas enzim yang dihasilkan dari penelitian ini dinilai lebih baik daripada penelitian sebelumnya. Penelitian dari Kanimozhi & Nagalakshmi [22] menghasilkan aktivitas xilanase dari *A. niger* sebesar 1,4 U/mL. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi substrat, waktu inkubasi, suhu, pH, inhibitor, dan aktivator.

Kadar Protein

Prinsip pengukuran kadar protein menggunakan metode BCA yaitu berdasarkan pengukuran pada konsentrasi total protein dalam sampel menggunakan *microplate* dengan menggabungkan reagen uji protein (working reagent A dan B) dengan sampel. Konsentrasi total protein ditandai dengan adanya perubahan warna dari hijau menjadi ungu dengan membandingkan albumin standar dan dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 562 nm.

Tabel 2. Kadar Protein

Waktu Inkubasi (hari)	Kadar Protein (mg/mL)
3	9,23±0,01 × 10 ⁻³
6	9,42±0,10 × 10 ⁻³
9	9,36±0,04 × 10 ⁻³

Berdasarkan Tabel 2, kadar protein tertinggi didapatkan setelah dilakukan inkubasi selama 6 hari yaitu sebesar 0,00942 mg/mL dan kadar protein terendah setelah inkubasi selama 3 hari yaitu sebesar 0,00923 mg/mL. Lama inkubasi tidak berpengaruh terhadap kadar protein yang dihasilkan oleh kapang *A. niger* dikarenakan variasi sangat besar terjadi di antara ulangan. Kadar protein yang fluktuatif sejalan dengan hasil penelitian Seprianto [23] yang mendapatkan kadar protein pada hari ke-3 masih rendah karena fase adaptasi pertumbuhan sel kapang. Fase adaptasi ditandai dengan kenaikan komponen makromolekul seperti protein. Sel mempersiapkan semua perangkat untuk berkembangbiakan selanjutnya termasuk mensintesis berbagai jenis enzim hidrolase ekstraseluler. Penurunan kadar protein pada rentang hari ke-6 hingga hari ke-9 tidak dapat dijelaskan dengan penurunan jumlah sel karena kadar protein hanya mencerminkan besarnya protein ekstraseluler yang dilepas oleh kapang. Pernyataan ini didukung oleh sifat ekspresi xilanase yang harus diinduksi terlebih dahulu dalam medium terbatas yang hanya mengandung sumber karbon selulosa dan perlu adanya investigasi lebih lanjut pada penelitian selanjutnya.

KESIMPULAN

Produksi enzim xilanase oleh *A. niger* dengan metode *submerged fermentation* mampu menghasilkan aktivitas enzim xilanase yang cukup tinggi. Terdapat pengaruh lama inkubasi terhadap produktivitas enzim xilanase oleh *A. niger* dengan TKKS yang diukur dari aktivitas enzim yang dihasilkan. Aktivitas enzim xilanase tertinggi sebesar $39,96 \pm 0,04$ U/mL terjadi setelah inkubasi dilakukan selama 9 hari. Peningkatan kadar protein diketahui berkaitan dengan fase pertumbuhan sel *A. niger*. Adapun kadar protein tertinggi yaitu sebesar $0,00942 \pm 0,00010$ mg/mL yang didapatkan dari inkubasi setelah 6 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Teknologi Proses dan Bioproses Agroindustri Fakultas Teknologi Industri Pertanian dan Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran atas fasilitas laboratorium dan pengujian yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] I. Mufarrikha, A. Roosdiana, and S. Prasetywan, "Optimasi kondisi produksi pektinase dari *Aspergillus niger*," *Kim. Student*, vol. 2, no. 1, pp. 393–399, 2014, [Online]. Available: <https://media.neliti.com/media/publications/248527-optimasi-kondisi-produksi-pektinase-dari-8aa14abb.pdf>.
- [2] D. Istia'nah, U. Utami, and A. Barizi, "Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat," *J. Ris. Biol. dan Apl.*, vol. 2, no. 1, p. 11, 2020, doi: 10.26740/jrba.v2n1.p11-17.
- [3] A. Sutrisno, *Teknologi Enzim*. Malang: UB Press, 2017.
- [4] E. Utarti and Siswanto, "Limbah Berlignoselulosa Sebagai Media Produksi Xilanase Kapang Asal Jerami Padi Sawah Pantai," *J. Ilmu Dasar*, vol. 19, no. 2, pp. 117–124, 2018, [Online]. Available: <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JID>.
- [5] E. Mardawati, A. Werner, T. Bley, K. Mtap, And T. Setiadi, "The Enzymatic Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunches to Xylose," *J. Japan Inst. Energy*, vol. 93, no. 10, pp. 973–978, 2014, doi: 10.3775/jie.93.973.
- [6] N. Arini, R. Meisy, E. Putri, S. N. Fadila, and S. K. Namidya, "Tinjauan Literatur : Imobilisasi Sel Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Xylanase," *Pros. SEMNAS BIO 2021*, pp. 1217–1225, 2021.
- [7] S. B. Ariyani, Asmawit, and P. P. Utomo, "Optimasi Waktu Inkubasi Produksi Enzim Selulase Oleh *Aspergillus niger* Menggunakan Fermentasi Substrat Padat," *Biopropal Ind.*, vol. 5, no. 2, pp. 61–67, 2014.
- [8] H. Wisda, W. B. Sediawan, and Sarto, "Pengaruh Aerasi Pada Fermentasi Padat Tandan Kosong Kelapa Sawit Oleh *Aspergillus niger* Terhadap Produksi Gula Sederhana," *J. Tek. Kim. USU*, vol. 5, no. 3, pp. 12–16, 2016, doi: 10.32734/jtk.v5i3.1539.
- [9] F. Wulandari, N. Nazaruddin, and M. Amaro, "Pengaruh Jenis Bakteri Asam Laktat dan Lama Fermentasi terhadap Mutu Fisik, Kimia, Organoleptik, dan Mikrobiologi Tepung Mocaf," *Pros. SAINTEK*, vol. 3, no. November 2020, pp. 169–181, 2021.
- [10] D. O. Indriani, L. Noer, I. Syamsudin, F. H. Sriherfyna, and A. K. Wardani, "Invertase dari *Aspergillus niger* dengan Metode Solid State Fermentation dan Aplikasi di Industri: Kajian Pustaka," *J. Pangan dan Agroindustri*, vol. 3, no. 4, pp. 1405–1411, 2015.
- [11] B. M. Harahap, A. I. Dewantoro, M. R. Maulid, E. Mardawati, and V. P. Yarlina, "Autoclave-assisted weak acid pretreatment of oil palm empty fruits bunches for fermentable sugar production," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 443, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1755-1315/443/1/012080.
- [12] P. J. Van Soest, J. B. Robertson, and B. A. Lewis, "Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition," *J. Dairy Sci.*, vol. 74, no. 10, pp. 3583–3597, 1991, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- [13] P. Purkan, A. Baktir, and A. R. Sayyidah, "Produksi Enzim Kitinase Dari *Aspergillus niger* Menggunakan Limbah Cangkang Rajungan Sebagai Induser," *J. Kim. Ris.*, vol. 1, no. 1, p. 34, 2016, doi:

- 10.20473/jkr.v1i1.2440.
- [14] A. Andriani *et al.*, “Sequential production of ligninolytic, xylanolytic, and cellulolytic enzymes by *Trametes hirsuta* AA-017 under different biomass of Indonesian sorghum accessions-induced cultures,” *Bioresour. Technol. Reports*, vol. 12, no. July, p. 100562, 2020, doi: 10.1016/j.biteb.2020.100562.
- [15] F. A. Avin, “Easy way to count spores and prepare spore suspension by Hemocytometer Strain Improvement of Edible Mushrooms View project,” 2019. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/337772212>.
- [16] P. Jampala, S. Tadikamalla, M. Preethi, S. Ramanujam, and K. B. Uppuluri, “Concurrent production of cellulase and xylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method,” *3 Biotech*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1007/s13205-017-0607-y.
- [17] B. Adney and J. Baker, “Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP),” 2008.
- [18] Thermoscientific, “BCA Protein Assay Kit,” 2020.
- [19] S. Saputra, A. Hanoum, Mulyadi, and A. Dinoto, “Aktivitas Xilanase Dari *Bacillus altitudinis* Yang Diproduksi Dengan Variasi Waktu Inkubasi Dan Kondisi Pengujian Ph Netral Dan Alkalin,” *J. Ilmu-Ilmu Hayati*, vol. 2, pp. 159–166, 2022.
- [20] I. Kurniawati, I. N. Wirajana, and I. G. Mahardika, “Peningkatan Aktivitas Selulase Pada Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Bali Dengan Pengayaan Subtrat Selulosa Janur Kelapa (*Cocos nucifera*),” *J. Kim.*, vol. 7, no. 1, pp. 75–81, 2013.
- [21] I. Darliana, “Biodegradasi Limbah Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) Menggunakan Konsorsium Akteri Penghasil Enzim Selulase,” *Wanamukti J. Penelit. Kehutan.*, vol. 23, no. 1, p. 1, 2021, doi: 10.35138/wanamukti.v23i1.174.
- [22] Kanimozhi and Nagalakshmi, “Xylanase Production from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using agricultural waste as substrate,” *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 437–446, 2014.
- [23] Seprianto, “Isolasi dan Penapisan Bakteri Selulolitik dari Berbagai Jenis Sebagai Penghasil Enzim Selulase,” *IJOB*, vol. 1, no. 2, pp. 64–70, 2017.