

PRODUKSI ENZIM SELULASE DARI BAKTERI TS2b YANG DIISOLASI DARI RUMPUT LAUT DAN PEMANFAATANNYA DALAM MENGHIDROLISIS KULIT UBI KAYU DAN DAUN UBI KAYU SEBAGAI BAHAN BAKU PAKAN IKAN

Irma Melati^{*)}, Mulyasari^{*)}, Mas Tri Djoko Sunarno^{*)}, Maria Bintang^{**)}, dan Titin Kurniasih^{*)}

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar
Jl. Sempur No 1, Bogor 16154
E-mail: *irma_melati08@yahoo.com*

^{**)} Departemen Biokimia, Institut Pertanian Bogor
Jl. Gatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 19 Juni 2014; Disetujui publikasi: 15 Juli 2014)

ABSTRAK

Upaya untuk mendapatkan bahan baku pakan alternatif masih perlu dilakukan mengingat makin meningkatnya harga pakan ikan. Salah satu bahan yang berpotensi untuk dimanfaatkan adalah kulit ubi kayu (KUK) dan daun ubi kayu (DUK). Tingginya kadar serat kasar khususnya selulosa dalam bahan baku tersebut, menjadi kendala dalam upaya pemanfaatannya. Penggunaan enzim selulase dapat menjadi alternatif untuk menangani masalah tersebut. Kemampuan kompleks enzim selulase dari bakteri selulolitik dalam mendegradasi selulosa sangat beragam. Tujuan penelitian ini adalah memproduksi dan memanfaatkan enzim selulase dari bakteri yang diisolasi dari rumput laut untuk menghidrolisis KUK, DUK, dan selulosa murni (*Carboxymethyl Cellulose*). Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap yaitu: pertama adalah produksi optimum enzim selulase dari bakteri TS2b dengan waktu inkubasi 24, 48, 72, 78, dan 96 jam dan kedua adalah tahap untuk mengetahui kemampuan enzim selulase bakteri TS2b dalam menghidrolisis KUK, DUK, dan *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) (*in vitro*). Parameter yang diamati adalah aktivitas enzim selulase berdasarkan modifikasi metode Miller dan kadar gula pereduksi (glukosa) berdasarkan metode DNS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu optimum untuk produksi enzim selulase terjadi pada jam ke-78 yaitu sebesar 0,0214 U/mL dengan kadar glukosa yang dilepaskan sebesar 0,0231 mg/L. Daya hidrolisis enzim selulase tertinggi diperoleh pada substrat KUK dengan aktivitas enzim selulase dan kadar gula pereduksi yang dilepaskan berturut-turut sebesar 0,0179 U/mL dan 0,9701 mg/L; sedangkan daya hidrolisis terendah diperoleh pada substrat DUK dengan aktivitas selulase sebesar 0,0015 U/mL dan kadar gula pereduksi yang dilepaskan sebesar 0,0787 mg/L. Enzim selulase isolat TS2b mempunyai kemampuan menghidrolisis substrat KUK dengan baik, tapi kurang efektif untuk menghidrolisis CMC dan DUK.

KATA KUNCI: enzim selulase, kulit ubi kayu, daun ubi kayu, selulosa

ABSTRACT: *The production of cellulose enzym from TS2b bacteria isolated from seaweed and its use in hydrolizing the peels and leaves of cassava as fish feed ingredients. By: Irma Melati, Mulyasari, Mas Tri Djoko Sunarno, Maria Bintang, and Titin Kurniasih*

Effort to find alternative fish feed ingredients are still needed to be done due to the increase of feed's price. One of the potential fish feed ingredients to be used is the

peels and the leaves of cassava. High content of crude fibers especially cellulose in that ingredients become the major constrain of its utilization. The use of cellulose enzyme could be an alternative to solve the problem. The ability of complex cellulose enzymes derived from cellulotic bacteria in degrading cellulose quite varies. The objectives of this study were to produce and to investigate the ability of the cellulose enzyme from TS2b bacterium that is isolated from seaweed to hydrolyze peels and the leaves of cassava and pure cellulose (Carboxymethyl Cellulose). This experiment was conducted in two stages; the first one was to find out the optimal production of cellulose enzyme from TS2b bacteria at different incubation times of 24, 48, 72, 78, and 96 hours and the second one was to find out the ability of cellulose enzyme of TS2b bacteria in hydrolyzing peels and the leaves of cassava and Carboxymethyl Cellulose (CMC) (in vitro). The observed parameters were the cellulose enzyme activities based on modified Miller method and the content of reducing sugar (glucose) based on DNS method. The results of the study showed that the optimal time to produce cellulose enzyme happened after 78 hours incubation with amount of 0.0214 U/mL and the glucose content released was 0.0231 mg/L. The highest hydrolysis capability of cellulose enzyme was obtained at substrat cassava peels (CP) with cellulose enzyme activity and reducing sugar content were 0.0179 U/mL and 0.9701 mg/L, respectively while the lowest hydrolysis capability occurred at substrate cassava leaves (CL) with cellulose activity of 0.0015 U/mL and the released reduction sugar content was 0.0787 mg/L. The cellulose enzyme from TS2b bacteria has capability to hydrolyze CP better than CMC and CL.

KEYWORDS: cellulose enzyme, cassava peels (CP), cassava leaves (CL), cellulose

PENDAHULUAN

Upaya pencarian bahan baku alternatif untuk pakan ikan masih terus dilakukan mengingat makin tingginya harga pakan ikan yang disebabkan tingginya harga sumber bahan baku pakan khususnya sumber protein. Penggunaan sumber protein dalam pakan dapat diefisienkan jika pemanfaatan sumber karbohidrat pakan bisa dioptimalkan karena karbohidrat dapat berperan sebagai "protein sparing effect", yang berarti sebagian besar protein dapat dimanfaatkan untuk pertumbuhan sedangkan kebutuhan energi dipenuhi oleh karbohidrat (National Research Council, 1983). Karbohidrat merupakan sumber energi yang murah tetapi karena meningkatnya permintaan dan keterbatasan persediaannya maka sumber karbohidrat pakan pun menjadi mahal seperti dedak dan tepung terigu. Sehingga perlu dilakukan upaya untuk mencari alternatif sumber karbohidrat lain yang lebih murah dan mudah didapatkan contohnya kulit ubi kayu (KUK) dan daun ubi kayu (DUK).

Potensi KUK dan DUK untuk dijadikan bahan baku pakan ikan cukup tinggi mengingat kelimpahan dan kadar nutrisinya cukup tinggi. Haroen (1993) menyatakan bahwa persentase produk olahan tapioka menghasilkan tepung tapioka sebesar 20%-24%, dan limbah kulit luar, kulit dalam, dan ongkok berturut-turut

sebesar 2%, 15%, dan 5%-15%. Komposisi nutrisi daun dan kulit ubi kayu beragam, bergantung pada jenis ubi kayunya. Kandungan karbohidrat, protein dan serat kasar kulit ubi kayu adalah berturut-turut sebesar 64,6%; 8,2%; dan 12,5% (Obloh, 2006). Daun ubi kayu mengandung protein dan serat kasar berturut-turut sebesar 31%-36% dan 8%-11% (Eggum, 1970).

Pemanfaatan KUK dan DUK sebagai bahan baku pakan ikan masih terbatas, karena kandungan nutrisinya yang kurang seimbang. KUK dan DUK mempunyai energi yang cukup tinggi tetapi kandungan protein kasar relatif rendah, serta tingginya serat kasar khususnya selulosa. Upaya peningkatan kualitas KUK dan DUK perlu dilakukan dan salah satunya melalui penambahan enzim selulase.

Enzim selulase merupakan suatu kompleks multienzim yang bekerja bersama-sama menghidrolisis selulosa menjadi glukosa. Da Silva *et al.* (2005) menyatakan bahwa enzim selulase yang dikenal dengan nama sistematik β -1,4 glukon-4-glukanohidrolase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Oleh karena itu, penambahan ekstrak kasar enzim selulase yang disekresikan oleh mikroba selulolitik hasil isolasi dari rumput laut, diharapkan dapat menurunkan kadar serat kasar

bahan baku tersebut, sehingga pemanfaatannya dalam formulasi pakan dapat ditingkatkan. Tujuan penelitian ini adalah memproduksi dan meningkatkan pemanfaatan enzim selulase dari bakteri yang diisolasi dari rumput laut untuk menghidrolisis KUK, DUK, dan selulosa murni (*Carboxymethyl Cellulose*).

BAHAN DAN METODE

Percobaan ini dilaksanakan dalam dua tahap yaitu: pertama penentuan waktu produksi optimum enzim selulase dari bakteri TS2b dan produksi enzim selulase berdasarkan waktu optimum tersebut dan kedua pemanfaatan enzim selulase dalam menghidrolisis KUK, DUK, dan CMC secara *in vitro*.

Percobaan 1. Penentuan Waktu Optimum Produksi Enzim Selulase

Penentuan waktu optimum produksi enzim selulase diawali dengan penentuan waktu pertumbuhan eksponensial bakteri inokulum yang akan digunakan. Penentuan waktu pertumbuhan eksponensial bakteri dilakukan dengan mengkultur 2 lup isolat ke dalam 50 mL media cair CMC. Kultur diinkubasi pada suhu 28°C. Pengambilan sampel dilakukan pada jam ke-24, 48, 72, 78, dan 96 inkubasi untuk diukur nilai *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm. Pada setiap waktu pengukuran, dilakukan pula pengujian aktivitas enzim selulase pada panjang gelombang 550 nm. Setelah itu, dibuat kurva pertumbuhan untuk menentukan waktu pertumbuhan eksponensial bakteri tersebut. Waktu pertumbuhan dengan aktivitas enzim selulase tertinggi digunakan sebagai waktu optimum produksi enzim selulase.

Produksi Enzim Selulase

Produksi enzim selulase dilakukan berdasarkan prosedur dan waktu inkubasi yang telah diperoleh berdasarkan aktivitas selulase tertinggi pada kurva aktivitas selulase yang dihasilkan. Media pertumbuhan produksi diinkubasi pada suhu 28°C kemudian enzim selulase dipanen selama waktu produksi tertinggi yang telah didapatkan sebelumnya. Kultur sel pada media produksi yang mengandung enzim selulase ekstraseluler disentrifugasi pada kecepatan 9.000 x g selama sepuluh menit untuk memisahkan larutan enzim dengan pelet bakteri. Supernatan hasil sentrifugasi kemudian disimpan pada suhu 10°C sebagai ekstrak kasar.

Percobaan 2. Uji Aktivitas Enzim Selulase untuk Menghidrolisis Substrat KUK, DUK, dan CMC

Uji aktivitas enzim pada berbagai substrat didasarkan pada metode yang dilakukan Meryandini *et al.* (2009). Sebanyak 5 mL substrat ditambah dengan 5 mL enzim ekstrak kasar. Substrat tepung KUK dan DUK sebanyak masing-masing 0,05 g ditambahkan masing-masing 5 mL *buffer* dan 5 mL enzim ekstrak kasar. Reaksi antara substrat dan enzim ekstrak kasar dilakukan di dalam erlenmeyer 100 mL selama 60 menit pada suhu 50°C. Setelah itu, reaksi dihentikan dengan menginkubasinya pada suhu 100°C selama 15 menit. Lalu suspensi tersebut disentrifugasi pada kecepatan 2.500 rpm selama 25 menit. Sebanyak 2 mL supernatannya diambil dan ditambahkan 2 mL DNS lalu diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Sebagai kontrol digunakan enzim yang sebelumnya sudah diinaktivasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah larutan dingin seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Parameter yang diamati adalah aktivitas enzim selulase (Miller, 1959) dan kadar gula pereduksi (metode DNS).

HASIL DAN BAHASAN

Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim Selulase

Pada uji pendahuluan diketahui bahwa isolat TS2b yang ditumbuhkan pada media agar yang mengandung CMC 1% membentuk zona bening (Gambar 1). Zona bening yang dihasilkan menunjukkan adanya enzim selu-



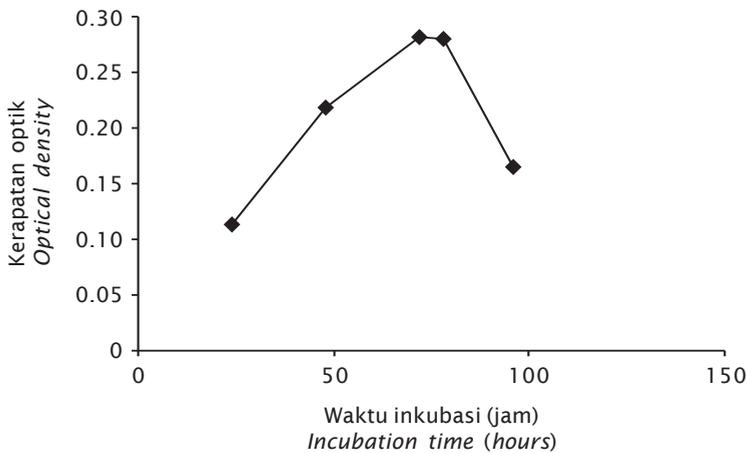
Gambar 1. Zona bening isolat TS2b
Figure 1. Clear zone of TS2b isolate

lase ekstraseluler yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Indeks selulolitik isolat TS2b sebesar empat pada inkubasi hari ketiga pada suhu kamar.

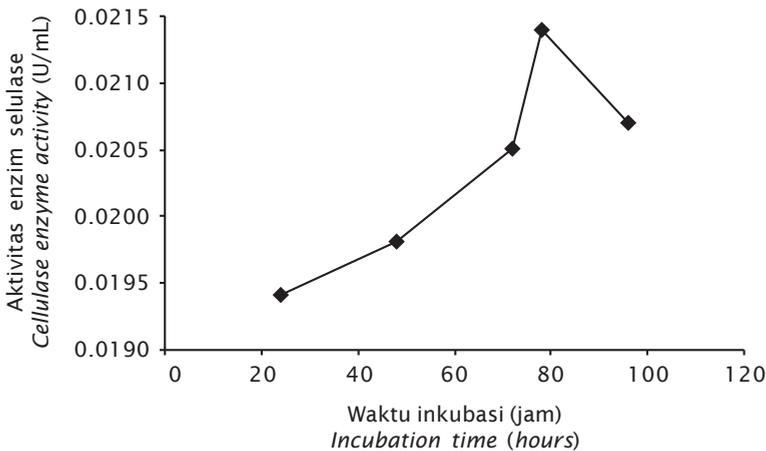
Pada percobaan penentuan waktu optimum produksi enzim selulase, isolat TS2b ditumbuhkan pada media CMC 1% pada suhu inkubasi 28°C. Pertumbuhan bakteri dilihat dari nilai kerapatan optik yang dihasilkan pada setiap jam pengukuran selama 96 jam pada panjang gelombang 600 nm. Selain dilihat kerapatan optiknya, optimasi produksi enzim selulase dilihat dengan mengukur aktivitas selulase yang dihasilkan selama waktu inku-

basi. Kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim selulase isolat TS2b disajikan pada Gambar 2 dan 3. Puncak aktivitas dan waktu optimum untuk produksi enzim selulase terjadi pada jam ke-78 yaitu sebesar 0,0214 U/mL dengan kadar glukosa yang dilepaskan sebesar 0,0231 mg/L (Tabel 1).

Isolat TS2b mengalami fase eksponensial pada jam ke-24 sampai dengan jam ke-72. Pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang cepat. Madigan *et al.* (2009) menyatakan bahwa fase logaritmik merupakan fase pertumbuhan bakteri yang berlangsung sangat cepat karena terjadi penggandaan sel bakteri



Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat TS2b
Figure 2. Growth curve of TS2b isolate



Gambar 3. Kurva aktivitas enzim selulase isolat TS2b
Figure 3. Cellulase enzyme activity of TS2b isolate

Tabel 1. Konsentrasi gula pereduksi pada berbagai waktu inkubasi
 Table 1. Concentration of reducing sugars on various incubation periods

Periode inkubasi (jam) Incubation period (hours)	Konsentrasi gula pereduksi Concentration of reducing sugars (mg/mL)
24	0.02096
48	0.02139
72	0.02214
78	0.02311
96	0.02236

secara cepat. Pada jam ke-72-78 isolat TS2b mengalami fase stasioner, pada fase ini laju pertumbuhan sama dengan laju kematiannya sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap. Fase *stationer* dilanjutkan dengan fase kematian yaitu jam ke-78 sampai dengan jam ke-96. Pada fase ini bakteri tidak dapat mengalami pertumbuhan kembali.

Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim yang berbeda-beda bergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan (Maranatha, 2008). Dalam penelitian ini, isolat TS2b ditumbuhkan pada media cair CMC 1% sebagai komponen *inducernya* dan ditambahkan glukosa 0,1% dan ekstrak khamir 0,2% sebagai media pemacu tumbuh sel pada fase *lag*. Setelah glukosa pada media habis maka bakteri akan mulai memanfaatkan selulosa sebagai sumber energinya dengan mengeluarkan enzim selulase.

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler. Suhartono (1992) menjelaskan bahwa sintesis enzim ekstraseluler dalam jumlah terbesar secara normal terjadi pada saat sebelum sporulasi, yaitu pada akhir fase eksponensial dan awal fase *stationer*. Keadaan tersebut diduga karena pada masa transisi fase eksponensial diikuti dengan penurunan jumlah sumber karbon dalam medium, sehingga sintesis enzim selulase mulai meningkat. Pada Gambar 2 dan 3 terlihat aktivitas selulase isolat TS2b meningkat seiring dengan pertumbuhan selnya. Puncak aktivitas selulase diperoleh pada saat sel mencapai fase *stationer* dan mendekati fase kematian. Pada fase *stationer*, kecepatan pembelahan sel sama dengan kecepatan kematian sel dan lisis sehingga pada fase ini selain enzim selulase, enzim protease juga dihasilkan (Martina *et al.*, 2002). Pada fase kematian, kematian sel semakin cepat dan sel banyak yang mengalami

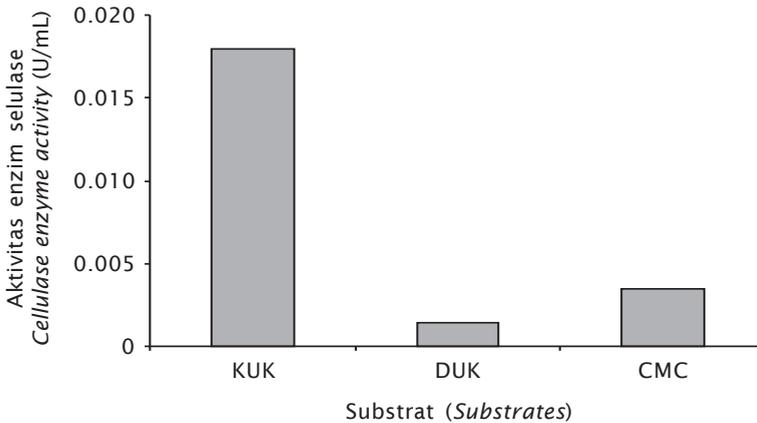
lisis sehingga produksi enzim protease intraseluler lebih banyak yang dihasilkan menyebabkan menurunnya produksi enzim selulase. Terjadinya peningkatan aktivitas enzim selulase menunjukkan bahwa isolat TS2b telah melakukan degradasi terhadap fraksi selulosa yang terdapat pada substrat untuk menghasilkan glukosa yang akan dipergunakan untuk metabolisme sel.

Uji Aktivitas Enzim Selulase dalam Menghidrolisis Substrat KUK, DUK, dan CMC

Isolat TS2b mampu menghidrolisis substrat KUK, DUK, dan CMC. Aktivitas enzim selulase tertinggi diperoleh pada substrat KUK yaitu sebesar 0,0179 U/mL; sedangkan aktivitas terendah diperoleh pada substrat DUK yaitu sebesar 0,0015 U/mL (Gambar 4).

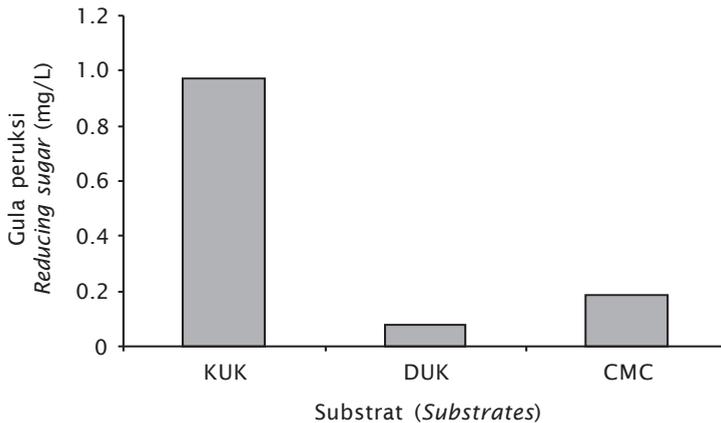
Enzim selulase mempunyai kemampuan menghidrolisis komponen dinding sel substrat KUK, CMC, dan DUK yang dibuktikan dengan adanya aktivitas enzim selulase dan dilepaskannya glukosa. Kadar glukosa yang dilepaskan berbanding dengan aktivitas enzim selulase yang dihasilkan (Gambar 4 dan 5). Seperti halnya aktivitas enzim selulase yang dihasilkan, kadar glukosa tertinggi juga diperoleh pada substrat KUK yaitu sebesar 0,9701 mg/L sedangkan terendah pada substrat DUK yaitu sebesar 0,0787 mg/L.

KUK dan DUK merupakan substrat selulosa yang tidak murni. Selain mengandung selulosa, substrat ini mengandung komponen serat lain seperti hemiselulosa dan lignin (Tabel 2). Aktivitas selulase TS2b lebih tinggi pada substrat KUK dibanding pada DUK dan CMC, diduga disebabkan oleh adanya enzim hemiselulolitik yang mampu mendegradasi hemiselulosa menjadi glukosa pada enzim



Gambar 4. Aktivitas enzim selulase isolat TS2b pada berbagai substrat

Figure 4. Activity of cellulase enzyme of TS2b isolate on various substrates



Gambar 5. Kadar gula pereduksi pada berbagai substrat

Figure 5. Concentration of reducing sugars on various substrates

kasar yang diproduksi oleh TS2b. Beberapa bakteri selain menghasilkan selulase dapat juga menghasilkan hemiselulosa, seperti yang dilaporkan oleh Han *et al.* (2003) bahwa bakteri *Clostridium cellulovorant* saat ditumbuhkan pada substrat selulosa ternyata dapat menghasilkan enzim hemiselulolitik (*xylA*). Hal yang serupa diduga terjadi pada bakteri TS2b yang juga menghasilkan enzim hemiselulolitik.

Dari beberapa substrat yang diuji, aktivitas enzim selulase tertinggi diperoleh pada substrat KUK diduga disebabkan karena lebih rendahnya kadar lignin yang terkandung dalam KUK dibanding DUK. Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa kandungan lignin KUK dan DUK

berturut-turut sebesar 8,54% dan 19,23% dan diduga kandungan lignin ini memengaruhi kerja enzim selulase.

Selulosa terbungkus dan terikat pada matrik amorf lignin dan hemiselulosa. Lignin membungkus dan mengikat selulosa secara fisik sehingga menghalangi enzim selulase bekerja secara maksimal pada substrat. Adanya lignin tersebut dapat menyebabkan rendahnya biodegradasi selulosa dan hemiselulosa (Soliman *et al.*, 2013). Hasil serupa diperoleh pada penelitian Maranatha (2008) yang memperlihatkan bahwa aktivitas enzim selulase isolat C5-1 lebih tinggi pada substrat kulit pisang dibanding CMC. Begitu pula akti-

Tabel 2. Kandungan selulosa, hemiselulosa, dan lignin pada KUK dan DUK

Table 2. Cellulose, hemicelluloses, and lignin on CP and CL

Substrat Substrates	Selulosa Cellulose (%)	Hemiselulosa Hemicellulose (%)	Lignin Lignin (%)	Sumber Source
KUK	9.05	10.46	8.54	Kurniasih <i>et al.</i> (2013)
DUK	22.85	0.042	19.23	Kurniasih <i>et al.</i> (2013)

vitanya lebih tinggi pada kulit pisang daripada tongkol jagung. Hal ini diduga disebabkan oleh kadar lignin pada kulit pisang lebih sedikit dibanding pada tongkol jagung.

Dihasilkannya aktivitas selulase dan gula pereduksi menunjukkan bahwa selulosa dalam substrat telah terhidrolisis dan dirubah menjadi glukosa. Dengan berkurangnya kadar selulosa diharapkan dapat meningkatkan pencernaan bahan tersebut sehingga pemanfaatannya dalam formulasi pakan ikan dapat dioptimalkan. Ikan mempunyai keterbatasan dalam mencerna serat kasar karena jumlah enzim pencernaan yang diproduksi oleh ikan hanya bersumber dari saluran pencernaan dan dari mikroflora yang terdapat dalam usus yang jumlahnya terbatas (Andriani *et al.*, 2012). Menurut Leeson & Zubair (2000), selulosa dapat memengaruhi *viscositas* cairan usus yang berakibat terhadap penurunan kecepatan difusi substrat dan enzim pencernaan, sehingga menurunkan efisiensi penyerapan nutrisi secara keseluruhan pada dinding usus, yang pada gilirannya akan berdampak langsung terhadap efisiensi pakan dan performa ternak. Ikan pun mempunyai keterbatasan dalam mencerna serat kasar khususnya selulosa.

Pemanfaatan KUK dan DUK sebagai bahan baku pakan belum banyak diinformasikan. Chhay *et al.* (2010) melaporkan bahwa pemanfaatan DUK sebagai pakan ikan baik dalam bentuk segar ataupun kering tidak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pertambahan bobot dan panjang ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Hal serupa yang ditemukan oleh Keong & Wee (1989) memperlihatkan bahwa tidak ada perbedaan antara pemanfaatan DUK secara segar ataupun kering terhadap pertumbuhan ikan nila tilapia tetapi semakin tinggi tingkat DUK dalam pakan maka pertumbuhan dan efisiensi pakan cenderung menurun. Bichi & Ahmad (2010) menunjukkan bahwa tingkat inklusi DUK terhadap *Maize meal* sebesar 66,7% memberikan respons pertumbuhan terbaik pada ikan

lele *Clarias gariepinus*. Penelitian Nnaji *et al.* (2010) memperlihatkan bahwa ikan nila (*O. niloticus*) yang diberi pakan dengan DUK memberikan pertumbuhan, rasio efisiensi protein, dan konversi pakan yang lebih baik dibanding pakan yang mengandung daun *Gliricidia sepium* dan *Stylosanthes humilis*. Azwar & Melati (2012) menunjukkan bahwa laju pertumbuhan spesifik ikan nila yang diberi pakan dengan menggunakan kulit ubi kayu terfermentasi hingga 16% tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (tanpa tepung kulit ubi kayu).

KESIMPULAN

Waktu optimum produksi enzim selulase terjadi pada jam ke-78 yaitu sebesar 0,0214 U/mL dengan kadar glukosa yang dilepaskan sebesar 0,0231 mg/L. Enzim selulase yang dihasilkan TS2b mampu menghidrolisis substrat KUK, DUK, dan CMC dengan tingkat hidrolisis tertinggi diperoleh pada substrat KUK dengan aktivitas enzim selulase dan kadar glukosa yang dilepaskan berturut-turut sebesar 0,0179 U/mL dan 0,9701 mg/L; dan terendah diperoleh pada substrat DUK dengan aktivitas selulase sebesar 0,0015 U/mL dan kadar glukosa yang dilepaskan sebesar 0,0787 mg/L. Enzim selulase isolat TS2b mampu menghidrolisis substrat KUK dengan baik, tetapi kurang efektif menghidrolisis CMC dan DUK.

DAFTAR ACUAN

- Andriani, Y., Satrawibawa, S., Safitri, R., & Abun. 2012. Isolasi dan identifikasi mikroba selulolitik sebagai biodegradator serat kasar dalam bahan pakan dari limbah pertanian. *IJAS*, 2(3): 100-105.
- Azwar, Z.I. & Melati, I. 2012. Penggunaan tepung kulit ubi kayu fermentasi dalam formulasi pakan ikan nila. *J. Ris. Akuakultur*, 7(3): 429-436.
- Bichi, A.H. & Ahmad, M.K. 2010. Growth performance and nutrient utilization of african

- catfish (*Clarias gariepinus*) fed varying dietary levels of processed cassava leaves. *Bayero J. of Pure and Applied. Science*, 3(1): 118-122.
- Chhay, T., Borin, K., Sopharith, N., Preston, T.R., & Aye, T.M. 2010. Effect of sun-dried and fresh cassava leaves on growth of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish fed basal diets of rice brand or rice brand mixed with cassava root meal. *Livestock Research for Rural Development*, 22(43). <http://www.lrrd.org/lrrd22/3/chha22043>. Diunduh tanggal 18 Maret 2014.
- Da Silva, R., Lago, E.S., Merheb, C.W., Machione, M.M., Park, Y.K., & Gomes, E. 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus auranticus miehe*. *Braz J. of Microbiol.*, 36: 235-241.
- Eggum, B.O. 1970. The protein quality of cassava leaves. *J. Nutrition*, 25: 761-768.
- Han, S.O., Yukawa, H., Inui, M., & Doi, R.H. 2003. Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *Clostridium cellulovorans*. *J. of Bacteriol.*, 185(20): 6,067-6,075.
- Haroen, U. 1993. *Pemanfaatan onggok dalam ransum dan pengaruhnya terhadap performans ayam broiler*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Program Pasca Sarjana. Program Studi Ilmu Ternak. Bogor, 64 hlm.
- Keong, W. & Wee, K.L. 1989. The nutritive value of cassava leaf meal in pelleted feed for Nile tilapia. *Aquaculture*, 83(1): 45-58.
- Kurniasih, T., Melati, I., Heptarina, D., Suryaningrum, L.H., & Samsudin, R. 2013. Peningkatan efisiensi dan kualitas bahan baku pakan untuk budidaya air tawar melalui penggunaan mikroba. Laporan Teknis. Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Tawar. Bogor, 27 hml.
- Leeson, S. & Zubair, A.K. 2000. Digestion in Poultry II: Carbohydrates, Vitamins and Mineral. Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph Ontario. Canada. 90 pp. <http://www.freewebs.com/abdallahdarwiche555/poultryfeeding.htm>. Diunduh tanggal 1 Maret 2014.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., & Parker, J. 2009. Brock Biology of Microorganisms. Prentice-Hall International (UK) Limited. London, 991 pp.
- Maranatha, B. 2008. *Aktivitas enzim selulase isolat asal Indonesia pada berbagai substrat limbah pertanian*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor, 11 hlm.
- Martina, A., Yuli, N., & Sutisna, M. 2002. Optimalisasi beberapa faktor fisik terhadap laju degradasi selulosa kayu albasia *Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen dan Karboksimetil selulosa (CMC) secara enzimatik oleh jamur. *J. Natur*, 4: 156-163.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania, N., & Satria, H. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *J. Makara Sains*, 13(1): 33-38.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- National Research Council (NRC). 1983. Nutrient requirement of warmwater fishes and shellfish. Revised Edition. National Academy Press, Washington D.C., 258 pp.
- Nnaji, J.C., Okoye, F.C., & Vo, O. 2010. Screening of leaf meals as feed supplements in the culture of *Oreochromis niloticus*. *African J. of Food Agriculture Nutrition and Development*, 10(2): 2,112-2,123.
- Oboh, G. 2006. Nutrient enrichment of cassava peels using a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* spp. solid media fermentation technique. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1): 46-49.
- Soliman, S.A., El-Zahwary, Y.A., & El-Mougith, A.A. 2013. Fungal biodegradation of agro-industrial waste. <http://dx.doi.org/10.5772/56464>. Diunduh tanggal 17 Maret 2014.
- Suhartono, M.T. 1992. Protease. Depdikbud, DIKTI, PAU Institut Pertanian Bogor. Bogor, 154 hlm.