

Produksi Selobiosa dari Hidrolisis Kulit Umbi Singkong dan Uji Aktivitas Prebiotiknya pada *Lactobacillus plantarum*

Production of Cellobiose from Cassava Peels Hydrolysis and Its Prebiotic Activity Toward *Lactobacillus plantarum*

Ilham Marvie^{1,2}, Azis Boing Sitangang^{2*}, Slamet Budijanto²

¹Program Studi Teknologi Pangan, Jurusan Teknologi Produksi dan Industri, Institut Teknologi Sumatera, Jl. Terusan Ryacudu Way Huwi, Lampung Selatan 35365, Indonesia.

²Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16002, Indonesia

*Penulis korepondensi: Azis Boing Sitangang, Email: boing.lipan@apps.ipb.ac.id

Submisi: 21 Juli 2020; Revisi: 6 Februari 2021, 31 Agustus 2021; Diterima: 3 September 2021

ABSTRAK

Kulit umbi singkong merupakan salah satu limbah dari industri pengolahan singkong. Eksplorasi dari pemanfaatan selulosa kulit umbi singkong dilakukan untuk mendapatkan peningkatan nilai tambah dan menjawab kebutuhan industri, salah satunya adalah selobiosa sebagai alternatif sumber prebiotik. Selobiosa didapatkan melalui hidrolisis selulosa dengan enzim selulase. Penelitian ini bertujuan memproduksi selobiosa dengan menggunakan kombinasi konsentrasi enzim selulase dan waktu hidrolisis yang tepat, serta menguji aktivitas prebiotik selobiosa yang dihasilkan menggunakan *Lactobacillus plantarum*. Penelitian ini menggunakan kulit umbi singkong varietas Gajah (GJ-0) dari Sukabumi, Jawa Barat. Metode yang dilakukan pada penelitian ini meliputi karakterisasi bahan baku, ekstraksi selulosa dari kulit singkong, hidrolisis selulosa menjadi selobiosa, pengukuran total gula dan gula pereduksi produk hidrolisis, kinetika reaksi hidrolisis, uji kemampuan tumbuh probiotik dan penentuan skor aktivitas prebiotik. Proses hidrolisis menggunakan enzim selulase berkonsentrasi 1,15 U/mL dan 2,88 U/mL, pH 4,8, suhu 37 °C, kecepatan agitasi 150 rpm, dan diamati selama 24 jam waktu hidrolisis. Hasil menunjukkan bahwa selama 12 jam waktu hidrolisis dapat menghasilkan selobiosa dengan derajat polimerisasi 2,05 pada selulase berkonsentrasi 1,15 U/mL dan 1,94 pada selulase berkonsentrasi 2,88 U/mL. Hidrolisis selama 12 jam dengan konsentrasi enzim 1,15 U/mL meningkatkan kandungan total gula sebesar 516,30±16,57 mg/L dan gula pereduksi sebesar 250,03±9,43 mg/L. Peningkatan penggunaan konsentrasi selulase menjadi 2,88 U/mL menghasilkan kandungan total gula menjadi 592,41±17,81 mg/L dan kandungan gula pereduksi menjadi 304,67±10,70 mg/L. Reaksi hidrolisis selulase mengikuti kinetika reaksi ordo 0 dengan nilai *k* yang tidak jauh berbeda diantara kedua konsentrasi enzim yang digunakan. Penggunaan konsentrasi enzim sebesar 1,15 U/mL selama 12 jam waktu hidrolisis adalah kombinasi terbaik. Potensi prebiotik dari selobiosa terlihat dengan adanya pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* pada MRS dimana glukosa disubstitusi dengan selobiosa. Produk hidrolisis dengan selulase berkonsentrasi 2,88 U/ml memiliki skor aktivitas prebiotik 0,74 dan lebih tinggi dibandingkan produk hidrolisis dengan konsentrasi selulase 1,15 U/mL, yakni dengan skor 0,60.

Kata kunci: Kulit umbi singkong; selobiosa; selulase; selulosa; prebiotik

ABSTRACT

Cassava peel is one of the wastes obtained from the cassava processing industry, and the exploration of its cellulose content is often carried out to increase the added value and meet industrial needs. For example, cellobiose obtained through the hydrolysis of cellulose by a cellulase enzyme is an alternative source of prebiotics. Therefore, this study aims to produce cellobiose with the right combination of cellulase enzyme concentration and hydrolysis time, as well as to assess the potential of cellobiose produced using *Lactobacillus plantarum*. The cassava tubers used belongs to the Gajah variety (GJ-0) from Sukabumi, West Java. The methods in this study include characterization of raw materials, extraction of cellulose, hydrolysis of cellulose, measurement of total and reducing sugar of the products, hydrolysis reaction kinetics, probiotic growth ability, and determination of prebiotic activity scores. The hydrolysis process was carried out using two concentrations, namely 1.15 U/mL and 2.88 U/mL at pH of 4.8, 37°C, agitation speed of 150 rpm, and 24 hours observation time. The results showed that cellobiose produced after 12 hours had degrees of polymerization of 2.05 and 1.94 at 1.15 U/mL and 2.88 U/mL cellulase, respectively. The product obtained at a concentration of 2.88 U/mL had a higher total and reduced sugar content compared to others. Furthermore, the two reactions have kinetics of order 0 with similar k values. These results indicate that an enzyme concentration of 1.15 U/mL and 12 hours hydrolysis was the best treatment combination. Cellobiose has the potential to be used as a prebiotic because it supports the growth of *Lactobacillus plantarum*. The prebiotic activity scores of cellulose hydrolysis were 0.74 and 0.60 for 1.15 U/mL and 2.88 U/mL cellulase concentrations, respectively.

Keywords: Cassava peel; cellobiose; cellulase; cellulose; prebiotic

PENDAHULUAN

Industri pengolahan singkong diprediksi akan terus meningkat dengan tingkat konsumsi nasional mencapai 12,7 juta ton pada tahun 2020 (Anonim, 2013). Kulit umbi singkong (*Manihot utilissima Sp.*) merupakan salah satu limbah dari industri pengolahan singkong dengan bobot kering mencapai 10-13% total berat umbi singkong (Aripin dkk., 2013). Usaha-usaha dalam eksplorasi potensi kulit umbi singkong terus dilakukan seperti pemanfaatan untuk pembuatan bioetanol, pakan ternak, bahan baku industri dan obat-obatan. Eksplorasi dari pemanfaatan potensi kulit umbi singkong akan terus dilakukan untuk mendapatkan nilai tambah yang lebih besar dan menjawab kebutuhan industri. Menurut Idugboe dkk. (2017) kulit umbi singkong memiliki kandungan 7,9% air, 4,4% protein kasar, 7,8% abu, dan 12,2% kandungan serat kasar. Selulosa merupakan salah satu bagian dari serat kasar yang terdapat pada korteks kulit umbi singkong.

Selulosa merupakan polimer yang tersusun oleh D-anhidroglukopiranosida pada ikatan β -1,4-glikosida. Selulosa pada kondisi alami berikatan dengan lignin dan hemiselulosa (Elechi dkk., 2016). Selulosa dilapisi oleh hemiselulosa yang membentuk matrik yang mudah terhidrolisis oleh asam, basa dan enzim sedangkan lignin yang berfungsi sebagai pengikat matrik memiliki sifat hidrofobik, tidak dapat diisolasi dan tidak dapat dihidrolisis oleh asam, akan tetapi larut dalam alkali panas. Lignin juga dapat teroksidasi dan mudah terkondensasi dengan penambahan fenol. Untuk

mendapatkan selulosa diperlukan usaha memisahkan kandungan lignin dan hemiselulosa (Allen dkk., 2016).

Selobiosa merupakan hasil hidrolisis dari selulosa dengan menggunakan enzim selulase. Mekanisme hidrolisis enzim selulase terdiri atas proses pembentukan selobiosa oleh enzim endoglukanase, pembentukan selobiosa oleh enzim eksoglukanase dan pembentukan β -glukosa oleh enzim β -glukosidase. Ketiga enzim tersebut bekerja secara bersama-sama (Liang dkk., 2013). Oleh karena itu produksi selobiosa membutuhkan ketepatan waktu hidrolisis yang sesuai dengan substrat dan enzim yang digunakan. Selobiosa dapat dimanfaatkan sebagai prebiotik bagi pertumbuhan probiotik *Lactobacillus sp.* dalam saluran pencernaan manusia (Basholli-salihu dkk., 2013). Penelitian sebelumnya telah menguji kemampuan selobiosa sebagai stimulus untuk pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Van Zanten dkk., 2012). Hasil pengujian secara *in-vivo* juga sudah dilakukan untuk menguji potensi prebiotik selobiosa dan tidak memberikan efek samping yang berbahaya bagi manusia (Van Zanten dkk., 2014). Pengujian kemampuan selobiosa untuk menumbuhkan jenis bakteri asam laktat lain seperti *Lactobacillus plantarum* juga perlu dilakukan untuk menambah informasi kemampuan selobiosa sebagai prebiotik.

Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi selobiosa, yakni dengan memilih kombinasi konsentrasi enzim selulase dan waktu hidrolisis yang tepat sehingga mendapatkan selobiosa sebagai produk antara hidrolisis; Selanjutnya uji aktivitas prebiotik selobiosa juga diamati atas pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*. Penelitian

ini diharapkan dapat memperluas pemanfaatan selulosa dari kulit umbi singkong sebagai sumber prebiotik yang memiliki nilai tambah di industri pangan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit umbi dari tanaman singkong (*Manihot utilissima Sp.*) varietas gajah (GJ-0) dari Kebun percobaan Departemen Agronomi dan Hortikultura Institut Pertanian Bogor, Cigombong, Kabupaten Sukabumi, Jawa Barat. Enzim yang digunakan adalah enzim selulase kompleks (Wathringthon, Murni). Bakteri yang digunakan adalah *Lactobacillus plantarum* dan *Escherichia coli* yang didapatkan dari SEAFast IPB. Bahan kimia yang digunakan terdiri dari H₂SO₄ (Merck), NaOH (Merck), 3,5-Dinitrosalicylic acid (Merck), reagen Fenol (Merck), Nylon-66 membran ukuran pori 0,15 µ dengan diameter 25mm (Himedia), *de Man Rogosa Sharpe* (Merck) dan Media M9 (Merck).

Alat

Peralatan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah *Digital Mechanical Overhead Stirrer RW 20* (IKA, Cologne Jerman), *Impeller four-blade paddle diameter 30,6 mm*, *Waterbath THH 2*, *spectrophotometer UV-Vis genesys 150* (Thermoscientific, USA), dan Inkubator.

Persiapan bahan Kulit Umbi Singkong

Proses persiapan bahan baku terdiri atas sortasi, pencucian dan pengelupasan kulit umbi. Ukuran sampel diperkecil, dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50 °C selama 24 jam dan dihancurkan dengan menggunakan *disc mill* hingga membentuk tepung dengan ukuran 40 mesh. Sampel dikeringkan pada *cabinet drier* selama 24 jam hingga kadar air < 10% (Tasaso, 2015). Karakterisasi awal tepung kulit umbi singkong dilakukan dengan menggunakan analisa kandungan serat yang terdiri atas *acid detergent fiber* (ADF), *neutral detergent fiber* (NDF), selulosa, lignin dan kadar hemiselulosa (van Soest, 1963). Seluruh pengujian dilakukan sebanyak dua ulangan secara duplo.

Ekstraksi Selulosa dari Kulit Umbi Singkong

Ekstraksi selulosa dilakukan dengan cara memanaskan 50 g tepung kulit umbi singkong dalam 1 L air dan 100 g NaOH menggunakan autoklaf pada suhu 130 °C, tekanan 190 kPa selama 60 menit. Pemisahan hasil ekstraksi antara residu padat dan larutan pekat

berwarna hitam menggunakan kain saring dan dicuci dengan air destilasi hingga residu padat mencapai pH 7,0. Residu tersebut dikeringkan pada suhu 70 °C selama 24 jam. Proses pemucatan (*bleaching*) dengan menambahkan H₂O₂ 30% pada suhu 70 °C selama 3 jam. Tepung kulit umbi singkong dipisahkan kembali untuk mendapatkan residunya dan dibilas menggunakan air destilasi. Residu hasil pemucatan tersebut dikeringkan kembali dengan suhu 70 °C (Tasaso, 2015). Hasil ekstraksi selulosa juga dilakukan pengukuran kandungan *acid detergent fiber* (ADF), *neutral detergent fiber* (NDF), selulosa, lignin dan kadar hemiselulosa (van Soest, 1963). Seluruh pengujian dilakukan sebanyak dua ulangan secara duplo.

Hidrolisis Selulosa dari Kulit Umbi Singkong

Tepung kulit umbi singkong dihidrolisis menggunakan enzim selulase dengan konsentrasi 1,15 U/mL dan 2,88 U/mL. Konsentrasi enzim tersebut didapatkan dari hasil penelitian pendahuluan menggunakan konsentrasi 18,91 U/mL dan 22,06 U/mL dengan hasil 1 jam pertama hidrolisis sudah mencapai derajat polimerisasi 1. Hidrolisis menggunakan substrat 200 mg tepung kulit umbi singkong pada 200 mL larutan buffer sitrat pH 4.8 yang ditambahkan 0,1 mL *sodium azida* 10%. Aktivitas enzim selulase yang digunakan yaitu 1,15 U/mL (Worthington, 2020). Hidrolisis dilakukan dengan menggunakan inkubator *shaker* pada suhu 37 °C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 24 jam (Selig dkk., 2008). Hidrolisis diamati pada waktu hidrolisis 0, 0,5, 1, 3, 6, 12, 18, dan 24 jam. Hidrolisat difiltrasi menggunakan nylon-66 membran dengan ukuran pori-pori 0,45 µm dan berdiameter 25 mm untuk memisahkan produk hidrolisis dengan substrat dan enzim. Hidrolisat yang diambil dipanaskan pada suhu 85 °C selama 5 menit. Pengujian dilakukan sebanyak dua ulangan.

Parameter Pengujian Hidrolisis Selulosa dari Kulit Umbi Singkong

Hasil hidrolisis dari kulit umbi singkong diukur kandungan total gulanya dengan metode fenol sulfat (Dubois dkk., 1956) dan pengukuran gula pereduksi dengan metode DNS (Miller, 1959). Hasil perbandingan antara total gula dan gula pereduksi digunakan untuk menghitung derajat polimerisasi. Pengujian sampel dua ulangan dilakukan secara duplo.

Kinetika Hidrolisis Selulosa

Kinetika reaksi hidrolisis selulase merupakan analisis yang dihitung berdasarkan pertambahan konsentrasi gula pereduksi selama waktu hidrolisis (jam) dengan Persamaan 1.

$$\frac{d[GP]}{dt} = k[GP]^n \quad (1)$$

dimana GP: Konsentrasi gula pereduksi (mg/L), t: waktu hidrolisis (jam), n: orde reaksi (-) dan k: konstanta laju reaksi.

Reaksi kinetika dapat menunjukkan pola linier, logaritmik dan parabola. Untuk mengetahui pola pada kinetika reaksi, persamaan (1) perlu diintegrasikan pada ordo (n) dengan ordo 0 yang menunjukkan pola linier, orde 1 yang menunjukkan pola logaritmik dan orde 2 yang menunjukkan pola parabola terhadap waktu reaksi. Perubahan persamaan tersebut diperlukan untuk merubah pola konsentrasi gula pereduksi menjadi bentuk linier. Setelah diintegrasikan persamaan kinetika menjadi seperti Persamaan 2, 3, dan 4.

$$GP - GP_0 = kt \quad (2)$$

$$\ln GP - \ln GP_0 = kt \quad (3)$$

$$\left[\frac{1}{GP} \right] - \frac{1}{GP_0} = kt \quad (4)$$

dimana GP_0 : kandungan gula pereduksi jam ke-0 (mg/L). GP: Konsentrasi gula pereduksi, t: waktu hidrolisis (jam), dan k: konstanta laju reaksi.

Persamaan (2) menunjukkan reaksi ordo ke 0, persamaan (3) menunjukkan reaksi ordo ke 1 dan persamaan (4) menunjukkan reaksi ordo ke 2. Nilai k merupakan kemiringan (*slope*) yang didapatkan dari fungsi garis linier sedangkan nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan kesesuaian terhadap jenis kinetika reaksi yang terjadi pada waktu hidrolisis.

Pengujian Pertumbuhan Probiotik pada Selobiosa Kulit Umbi Singkong

Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik adalah *L. plantarum*. Sebelum digunakan *L. plantarum* disegarkan pada MRS Broth selama 24 jam pada suhu 30 °C. Pertumbuhannya dilakukan pada media MRS Basis dengan tambahan selobiosa sebagai pengganti glukosa untuk sumber karbohidrat. Komposisi untuk membuat MRS Basis adalah pepton 10 g/L, ekstrak daging 8 g/L, ekstrak khamir 4 g/L, natrium asetat 5 g/L, magnesium sulfat 0,2 g/L, mangan sulfat 0,05 g/l, dipotassium sulfat 0,05 g/l, polisorbate 80 1 g/L dan dibuat dengan pH 6,2 ± 0,2 pada suhu 25 °C (De Man dkk., 1960). Inokulasi 0,1 mL *L. plantarum* pada MRS yang ditambahkan selobiosa sebanyak 0,1 mL. *L. plantarum* juga ditumbuhkan pada MRS yang ditambahkan 0,1 mL glukosa dengan konsentrasi 250

mg/mL untuk membandingkan dengan pertumbuhan pada MRS dengan selobiosa. Selobiosa yang ditambahkan pada MRS harus difiltrasi terlebih dahulu pada membran dengan ukuran pori-pori 0,25 µm steril untuk menghindari kontaminasi bakteri.

Pertumbuhan *L. plantarum* dapat diamati dengan menumbuhkannya pada MRS agar. Pengukuran dilakukan pada *L. plantarum* yang telah diinkubasi selama 0, 24, dan 48 jam pada suhu 30 °C (Herawati dkk., 2019). Sebanyak 1 mL *L. plantarum* diinokulasikan pada MRS agar dan diinkubasikan selama 48 jam. Pertumbuhan *L. plantarum* ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna putih. Pengujian korelasi antara derajat polimerisasi, total gula, gula pereduksi dan waktu hidrolisis menggunakan analisis korelasi pearson pada aplikasi pengolahan data Minitab.

Skor Aktivitas Prebiotik

Skor aktivitas prebiotik merupakan perbandingan antara kemampuan prebiotik untuk menumbuhkan probiotik dan pertumbuhan *E. coli* terhadap pertumbuhan pada glukosa selama 24 jam inkubasi. *L. plantarum* ditumbuhkan pada media MRS yang ditambahkan oleh prebiotik dan *E. coli* ditumbuhkan pada media M9 yang ditambahkan oleh prebiotik (Moongngarm dkk., 2011). Skor aktivitas prebiotik dapat diketahui menggunakan Persamaan 5.

Skor Aktivitas Prebiotik =

$$\frac{\log \frac{cfu}{ml} \text{ probiotik \& prebiotik 24 jam} - \log \frac{cfu}{ml} \text{ probiotik \& prebiotik 0 jam}}{\log \frac{cfu}{ml} \text{ probiotik \& glukosa 24 jam} - \log \frac{cfu}{ml} \text{ probiotik \& glukosa 0 jam}} \times \frac{\log \frac{cfu}{ml} \text{ e coli \& prebiotik 24 jam} - \log \frac{cfu}{ml} \text{ e coli \& prebiotik 0 jam}}{\log \frac{cfu}{ml} \text{ e coli \& glukosa 24 jam} - \log \frac{cfu}{ml} \text{ e coli \& glukosa 0 jam}} \quad (5)$$

Pada pengujian ini, komposisi penambahan selobiosa dan glukosa pada media M9 mengikuti konsentrasi pada MRS. Sebelum digunakan *E. coli* dapat disegarkan kondisinya dengan menumbuhkan pada media *Triptic Soy Broth* (TSB)/*Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dan M9 masing-masing selama 24 jam berturut turut. *E. coli* yang tumbuh pada media M9 diinokusikan pada *Triptic Soy Agar* (TSA) untuk dihitung jumlah koloni yang tumbuh selama 24 jam inkubasi pada suhu 35 °C. Jumlah koloni yang tumbuh pada media TSA dan MRS Agar dikonversi menjadi log cfu/mL lalu dimasukan pada persamaan (5)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Kulit Umbi Singkong

Hasil karakterisasi kulit umbi singkong varietas gajah (GJ-0) memiliki rendemen sebesar 15,39%

dari total umbi singkong. Nilai tersebut lebih tinggi dari penelitian sebelumnya yaitu 12% dari total berat umbi singkong (Aripin dkk., 2013). Struktur kulit umbi singkong terdiri dari dua lapisan yaitu *periderm* dan *cortex* (Mohd-asharuddin dkk., 2017). Lapisan *cortex* yang dijadikan bahan baku pada penelitian ini memiliki tekstur licin, memiliki sifat lentur, berwarna putih, coklat hingga merah muda. Proses persiapan bahan baku dilakukan untuk membersihkan kulit singkong dari kotoran tanah dan mengurangi kandungan asam sianida yang terdapat pada kulit singkong.

Tabel 1. Kandungan Serat tidak larut air kulit umbi singkong sebelum dan setelah ekstraksi selulosa

| Kandungan serat | Sebelum ekstraksi | Setelah ekstraksi |
|------------------|-------------------|-------------------|
| Selulosa (%) | 7,15±0,90 | 52,51±1,09 |
| Hemiselulosa (%) | 11,82±0,15 | 9,26±0,39 |
| Lignin (%) | 4,61±0,74 | 5,05±0,15 |
| ADF (%) | 11,87±0,16 | 57,57±0,93 |
| NDF (%) | 23,58±0,00 | 66,83±1,32 |

Keterangan: Basis kering dengan kadar air 8,98%, pengujian dilakukan sebanyak 2 ulangan.

ADF merupakan kandungan serat yang terdiri dari lignin, selulosa dan hemiselulosa, sedangkan NDF merupakan kandungan serat yang terdiri dari selulosa dan lignin. Selisih dari NDF dan ADF menunjukkan jumlah kandungan hemiselulosa (Oluwanike dan Adeneye, 2014). Berdasarkan pengujian kandungan serat tidak larut air (Tabel 1) diketahui bahwa kulit umbi singkong varietas gajah (GJ-0) memiliki kandungan 7,15% selulosa, 11,82% hemiselulosa dan 4,61% lignin. Barati dkk (2019) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa kulit umbi singkong bagian *cortex* mengandung 10,14% Selulosa, 30,40% Hemiselulosa dan 5,01% lignin. Sedangkan bagian *periderm* mengandung 12,49% selulosa, 6,54% hemiselulosa dan 48,91% lignin. Hal tersebut menunjukkan bahwa potensi selulosa pada bagian *cortex* dan *periderm* tidak berbeda signifikan, namun kandungan lignin yang besar pada bagian *periderm*. Hasil tersebut diperkuat dengan penelitian Aripin dkk. (2013) yang menyebutkan bahwa bagian *cortex* kulit umbi singkong memiliki kandungan ligin yang mencapai 7,5%.

Ekstraksi Selulosa dari Kulit Umbi Singkong

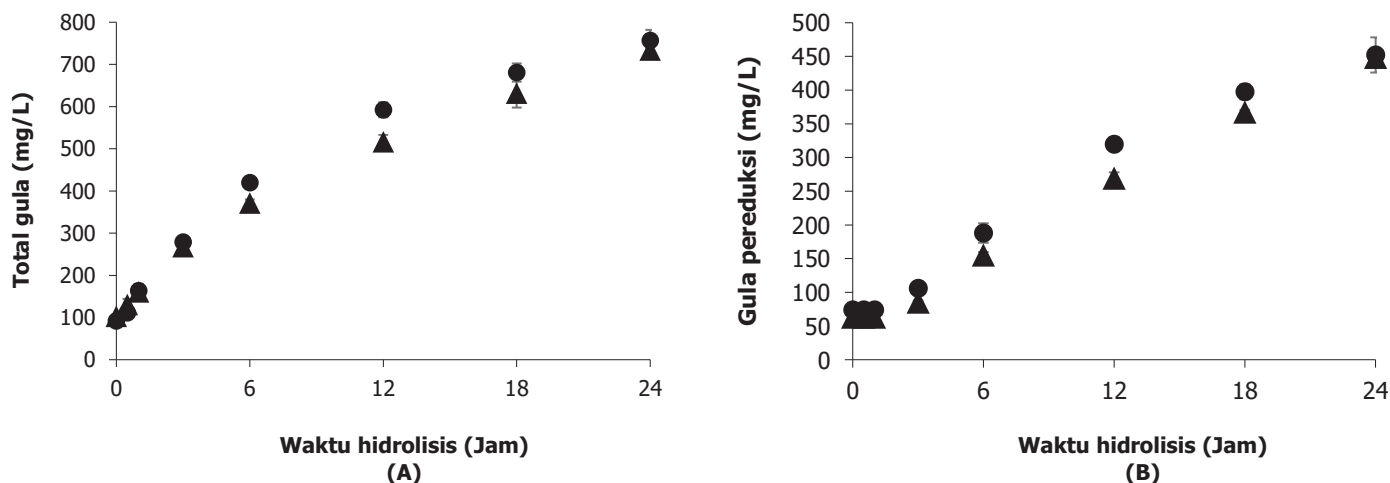
Proses ekstraksi membuat terjadinya peningkatan selulosa terhadap presentase lignin dan hemiselulosa dalam total kandungan lignoselulosa (Tabel 1).

Peningkatan persentase selulosa menunjukkan telah terjadi proses pelarutan lignin dan hemiselulosa selama ekstraksi dengan NaOH dalam suhu tinggi. Reaksi antara NaOH dengan lignin pada kondisi panas membuat terbentuknya larutan yang berwarna hitam pekat dan bersifat lengket sehingga dapat dipisahkan dari pelarut. Proses pemucatan yang dilakukan setelah ekstraksi melalui penambahan H₂O₂ bertujuan untuk menghilangkan sisa lignin dengan mengoksidasi molekul-molekul kromofor pada lignin sehingga menjadi bersifat polar dan larut dalam air. Penurunan kandungan hemiselulosa mengalami hidrolisis selama proses ekstraksi sehingga membentuk monosakarida (Chen, 2014). Selain itu hasil ekstraksi selulosa juga menunjukkan terjadinya peningkatan kandungan lignin pada kulit umbi singkong, akan tetapi peningkatan tersebut tidak signifikan dari 4,61±0,74 menjadi 5,05±0,15 (Tabel 1). Proses ekstraksi juga dapat menggunakan NaOH 4% dan NaOCl 4% dengan hasil kandungan selulosa 40,5%, lignin 11,7% dan hemiselulosa 21,4% (Widiarto dkk., 2019). Hasil ekstraksi menggunakan NaOH 11% dan H₂O₂ 30% memiliki hasil yang lebih baik untuk meningkatkan persentase selulosa.

Hidrolisis Selulosa dari kulit umbi singkong

Hidrolisis selulosa selama 24 jam memberikan peningkatan kandungan total gula pada kedua konsentrasi enzim selulase yang digunakan pada proses hidrolisis. Pada konsentrasi enzim selulase 1,15 U/mL kandungan total gula sebesar 102,67±3,32 mg/L pada jam ke-0 dan meningkat hingga 733,45±5,15 mg/L selama 24 jam. Sedangkan pada konsentrasi enzim selulase 2,88 U/mL, kandungan total gula pada kondisi awal sebesar 91,80±4,10 mg/L dan meningkat hingga 757,07±24,75 mg/L selama 24 jam (Gambar 1A). Peningkatan total gula pada hidrolisis selulosa menunjukkan terjadinya pemisahan polikarida pada bagian *amorf* selulosa terhadap bagian kristalin pada selulosa sehingga menjadi molekul yang lebih sederhana. Penggunaan selulase dalam konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 10% dari substrat akan meningkatkan kandungan total gula menjadi 1250 mg/L selama 24 jam hidrolisis (Bayitse dkk., 2015).

Kandungan gula pereduksi mengalami peningkatan pada kedua hidrolisis selulosa selama 24 jam. Pada konsentrasi enzim selulosa 1,15 U/mL pembentukan gula pereduksi dari 26,46±1,98 mg/L pada kondisi awal dan mencapai 444,31±6,16 mg/L selama 24 jam hidrolisis. Sedangkan dengan konsentrasi enzim selulase 2,88 U/mL kandungan gula pereduksi yang terbentuk dari 38,55±1,20 mg/L menjadi 448,19±28,28 mg/mL selama 24 jam hidrolisis (Gambar 1B). Proses hidrolisis kulit umbi singkong menggunakan kapang



Gambar 1. Grafik pengukuran kandungan total gula (A) dan gula pereduksi (B) hasil hidrolisis selulosa dari umbi kulit umbi singkong varietas GJ 0 dengan konsentrasi enzim selulase 1,15 U/mL (▲) dan 2,88 U/mL (●)

T. viride menghasilkan Kandungan gula pereduksi kurang dari 200 mg/L selama 24 jam hidrolisis (Jayus dkk., 2019). Kandungan gula pereduksi pada satu jam pertama yang cenderung konstan menunjukkan hanya terjadi pemotongan substrat (selulosa) oleh enzim endoglukanase dan selobiohidrolase menjadi oligosakarida dan disakarida. Enzim β -D-glukosidase belum bekerja dikarenakan belum terbentuknya oligosakarida. Oleh sebab itu peningkatan kandungan gula pereduksi yang signifikan mulai terjadi setelah jam ke-3 yang menunjukkan telah terjadi proses hidrolisis oleh enzim β -D-glukosidase.

Kinetika Reaksi Hidrolisis Selulosa

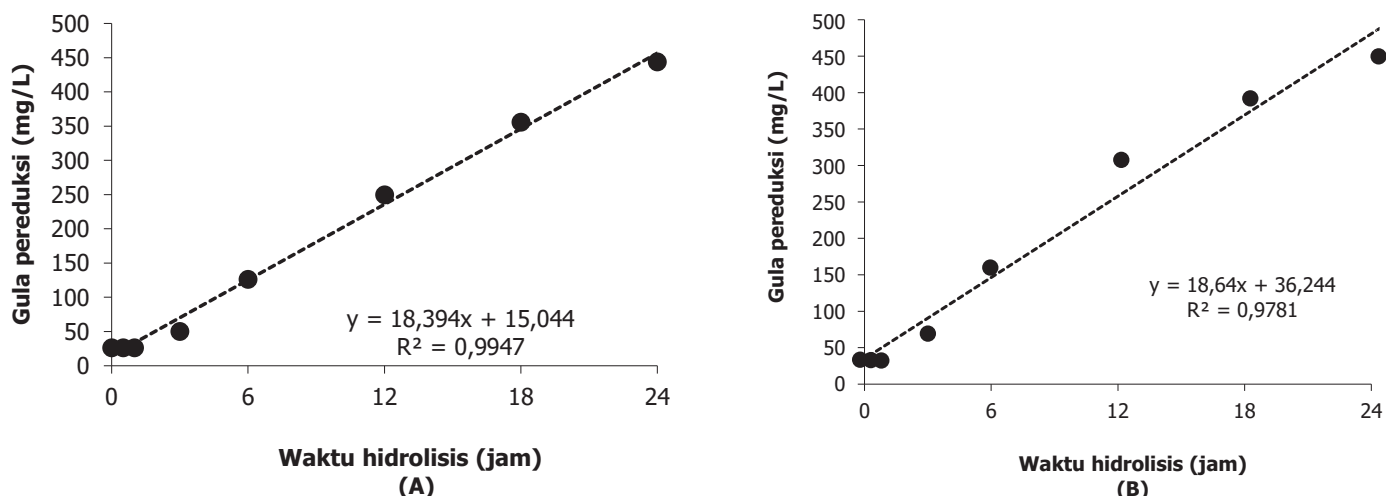
Peningkatan kandungan gula pereduksi terhadap waktu hidrolisis dapat menunjukkan kinetika reaksi enzimatik yang terjadi pada substrat. Berdasarkan kurva kinetika reaksi pada ordo 0, ordo 1 dan ordo 2 memperlihatkan bahwa reaksi hidrolisis enzim selulase dengan konsentrasi 1,15 U/mL dan 2,88 U/mL merupakan reaksi pada ordo 0 (Gambar 2). Reaksi tersebut merupakan reaksi yang linier antara pertambahan gula pereduksi dengan waktu hidrolisis dengan nilai R^2 0,9947 pada konsentrasi selulase 1,15 U/mL dan 0,0978 pada konsentrasi selulase 2,88 U/mL. Sedangkan jika pola pembentukan gula pereduksi dikonversi ke reaksi ordo 1 dan 2 maka nilai R^2 lebih rendah dari kurva ordo 0. Hal tersebut membuktikan bahwa reaksi tidak membentuk kurva logaritmik maupun parabola. Hasil yang berbeda dapat ditunjukkan pada proses hidrolisis tandan kosong kelapa sawit dengan menggunakan *A. niger*, enzim selulase yang dihasilkan dapat menghidrolisis selulosa menjadi gula pereduksi dengan membentuk pola orde 1 (Kayati dkk., 2016).

Pada kedua reaksi hidrolisis yang menggunakan selulase dengan konsentrasi 1,15 U/mL memiliki nilai k sebesar 18,39 sedangkan pada konsentrasi enzim 2,88 U/mL memiliki nilai k yang tidak berbeda nyata yaitu 18,64. Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi 1,15 U/mL sudah cukup untuk menghidrolisis selulosa pada kulit umbi singkong menjadi selobiosa dalam waktu 12 jam. Faktor lain dalam peningkatan kinetika reaksi adalah ukuran partikel substrat yang semakin kecil membuat nilai k semakin kecil (Kayati dkk., 2016). Oleh sebab itu persiapan substrat harus dilakukan secara homogen agar tidak terjadi bias dalam melakukan pemodelan kinetika reaksi hidrolisis.

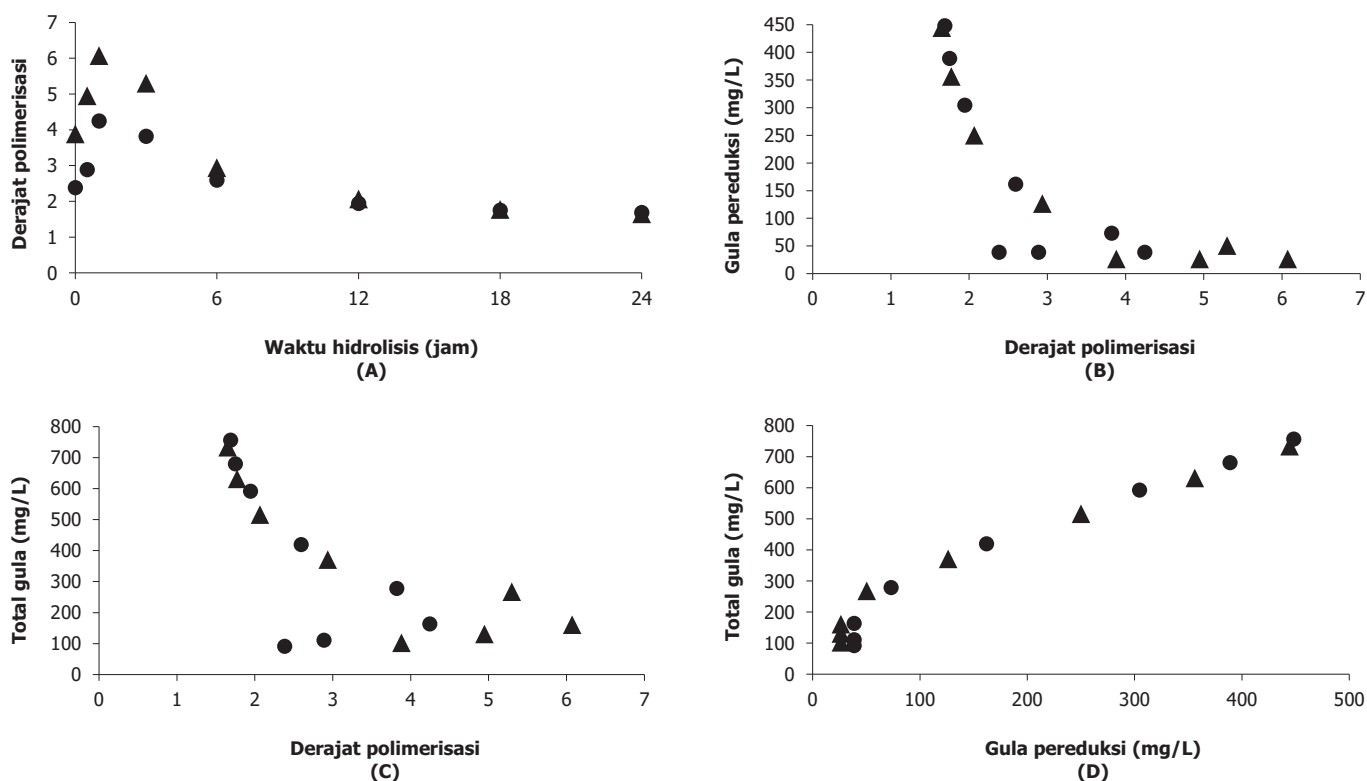
Karakterisasi Selobiosa Hasil Hidrolisis kulit umbi singkong

Selobiosa merupakan disakarida dari D-anhidroglukopiranosida pada ikatan β -1,4-glikosida (β glukosa) yang memiliki nilai derajat polimerisasi (DP) 2. DP merupakan jumlah unit monomer penyusun dalam satu molekul, semakin kecil nilai dari DP menunjukkan senyawa telah membentuk molekul gula yang lebih sederhana. Nilai DP didapatkan dari perbandingan antara jumlah total gula dengan jumlah gula pereduksi. Hasil hidrolisis selulosa dari kulit umbi singkong pada konsentrasi enzim 1,15 U/mL menunjukkan bahwa selobiosa telah terbentuk pada jam ke 12 dari 24 jam waktu hidrolisis. Nilai DP sudah mencapai 2,06 yang menunjukkan bahwa kandungan disakarida sudah dominan. Pada hidrolisis dengan konsentrasi enzim 2,88 U/mL selobiosa telah terbentuk lebih awal kurang dari 12 jam waktu hidrolisis dengan nilai derajat polimerisasi 1,94 (Gambar 3A).

Hasil hidrolisis memperlihatkan perubahan warna buffer sitrat pH 4,8 dari bening hingga menjadi sedikit



Gambar 2. Kinetika reaksi pembentukan gula pereduksi pada konsentrasi enzim selulase 1,15 U/mL (A) dan konsentrasi 2,88 U/mL (B)



Gambar 3. Grafik perubahan derajat polimerisasi selama hidrolisis selulosa (A), perubahan gula pereduksi terhadap derajat polimerisasi (B), perubahan total gula terhadap derajat polimerisasi (C), dan perubahan total gula terhadap gula (D) pada hidrolisis selulosa dengan konsentrasi Selulase 1,15 U/mL (▲) dan 2,88 U/mL (●)

keruh. Proses hidrolisis menyebabkan degradasi selulosa pada larutan substrat oleh enzim selulase (Jayus dkk., 2019). Pada waktu hidrolisis dari jam ke-0 hingga jam ke-6 nilai DP masih berada pada angka 6,07-2,59 yang menunjukkan bahwa kinerja enzim Endoglukonase

masih lebih dominan dalam membentuk oligosakarida yaitu Sello-oligosakarida. Oligosakarida memiliki DP antara 3 sampai 10. Pada waktu hidrolisis ke 18 dan 24 jam nilai DP telah mencapai 1,77 dan 1,65 yang menunjukkan bahwa monomer sudah lebih dominan

terbentuk oleh enzim β -D-glukosidase. Selobiosa yang merupakan produk dari hidrolisis Sello-oligosakarida oleh enzim selobiohidrolase (ekso-D-glukosidase) juga dapat berperan sebagai penghambat (*inhibitor*) dari enzim β -D-glukosidase. Oleh karena itu kemampuan enzim selulase dalam menghidrolisis selulosa ditentukan oleh konsentrasi enzim yang tepat terhadap konsentrasi substrat. Selain itu kondisi pH, temperatur dan kecepatan agitasi yang optimal akan mempengaruhi aktivitas enzim selulase.

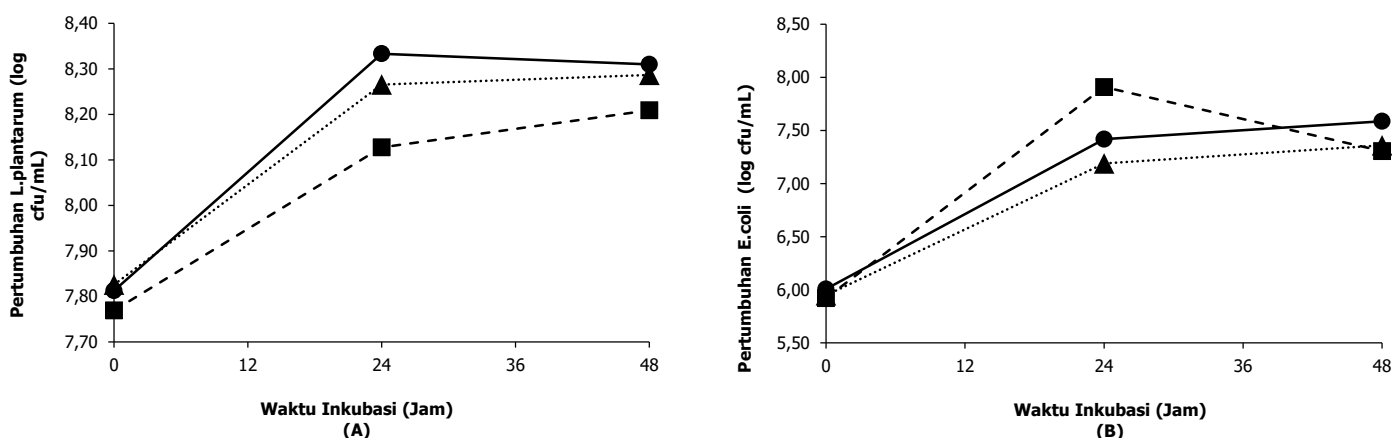
Peningkatan gula pereduksi dan total gula terhadap penurunan nilai DP juga dapat ditampilkan dalam grafik (Gambar 3B dan 3C). Semakin kecil dari nilai DP maka konsentrasi gula pereduksi dan total gula semakin meningkat, sedangkan semakin besar nilai DP maka konsentrasi gula pereduksi dan total gula akan semakin besar. Oleh sebab itu peningkatan total gula dan gula pereduksi dapat membentuk tren yang linier jika ditampilkan pada grafik (Gambar 3D). Korelasi antara gula pereduksi, total gula, derajat polimerisasi dan waktu hidrolisis dianalisis korelasi *pearson* menggunakan aplikasi minitab. Pada hidrolisis dengan konsentrasi enzim 1,15 U/mL dan 2,88 U/mL memiliki korelasi yang positif antara waktu hidrolisis, total gula dan gula pereduksi dengan nilai *r* hitung 0,964-0,997. Sedangkan korelasi negatif terjadi antara derajat polimerisasi terhadap waktu hidrolisis, total gula dan gula pereduksi dengan nilai *r* hitung 0,703-0,876. Menurut Sugiyono (2013) Klasifikasi nilai koefisien korelasi *pearson* miliki tingkat hubungan sangat kuat (0,800-1,000), hubungan kuat (0,600-0,799), hubungan cukup kuat (0,400-0,599), hubungan rendah (0,200-0,399) dan hubungan sangat rendah (0,000-0,199). Pada hidrolisis dengan konsentrasi selulase

1,15 U/mL dan 2,88 U/mL memiliki nilai *P*-value 0,000 pada korelasi antara waktu hidrolisis, total gula, gula pereduksi dan derajat polimerisasi. Nilai tersebut lebih kecil dari nilai α 0,05 maka menunjukkan korelasi yang signifikan antar variabel.

Pengujian Pertumbuhan Probiotik pada Selobiosa Kulit Umbi Singkong

Hasil hidrolisis selulosa kulit umbi singkong selama 12 jam digunakan sebagai substrat dalam menumbuhkan *L. plantarum*. Pada hidrolisis dengan kedua konsentrasi enzim menunjukkan selobiosa telah terbentuk secara dominan dengan DP mendekati nilai 2,00. Hasil inkubasi *L. plantarum* selama 24 jam menunjukkan pertumbuhan jumlah koloni sebesar satu log pada MRS agar. *L. plantarum* yang ditumbuhkan pada MRS yang ditambahkan produk hasil hidrolisis dengan konsentrasi 2,88 U/mL memiliki pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan pada MRS yang ditambahkan produk hidrolisis dengan konsentrasi enzim 1,15 U/mL maupun pada glukosa (Gambar 4A).

Hasil inkubasi tersebut menunjukkan produk hidrolisis dengan konsentrasi selulase 2,88 U/mL memiliki kemampuan yang lebih baik dalam memberikan sumber karbohidrat untuk pertumbuhan *L. plantarum* pada MRS. Sedangkan kemampuannya dalam menumbuhkan *E. coli* pada M9 lebih baik dari pada pertumbuhan *L. plantarum* pada MRS. Kondisi tersebut yang diharapkan terjadi pada selobiosa sebagai prebiotik dalam memberikan kemampuan untuk menumbuhkan *L. plantarum* sebagai probiotik dan bukan menjadi sumber karbohidrat bagi *E. coli* dalam saluran pencernaan manusia. Selobiosa yang diduga dominan terdapat pada produk hasil



Gambar 4. Pertumbuhan *L. Plantarum* pada MRS (A) dan pertumbuhan *E. Coli* pada media M9 (B) terhadap penambahan produk hasil hidrolisis dengan penggunaan selulase berkonsentrasi 1,15 U/mL (▲), konsentrasi 2,88 U/mL (●) maupun penambahan glukosa (■)

Tabel 2. Skor aktivitas prebiotik pada produk hasil hidrolisis yang digunakan sebagai substrat untuk menumbuhkan *L. plantarum* dan *E. coli*

| Sampel | <i>L. plantarum</i> (log cfu/mL) | | | <i>E.coli</i> (log cfu/mL) | | | Skor aktivitas prebiotik |
|----------------|----------------------------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|--------------------------|
| | 0 Jam | 24 Jam | 48 Jam | 0 Jam | 24 Jam | 48 Jam | |
| GJ 0 1,15 U/mL | 7,826 | 8,266 | 8,287 | 5,948 | 7,190 | 7,360 | 0,60 |
| GJ 0 2,88 U/mL | 7,813 | 8,333 | 8,831 | 6,007 | 7,419 | 7,586 | 0,74 |

hidrolisis enzim selulase memiliki kemampuan untuk menumbuhkan *L. plantarum* yang lebih baik dengan nilai densitas optik (OD) 600 lebih dari 5 dibandingkan pada strain *Lactobacillus* lainnya dan strain *Bifidobacteria* sebagai probiotik, *L. plantarum* memiliki pertumbuhan yang rendah pada media yang ditambahkan glukosa selama 24 jam (Karnaouri dkk., 2019).

Pada *L. plantarum* dan *E. coli* yang telah diinkubasi 48 jam memiliki penurunan kurva pertumbuhan yang menunjukkan bahwa kedua mikroba telah berada pada fase stasioner menuju kematian karena masih berada dalam jumlah log koloni yang sama dengan pertumbuhan pada 24 jam. Pertumbuhan *L. plantarum* pada media yang ditambahkan selobiosa juga menunjukkan fase stasioner pada waktu inkubasi ke 48 jam hingga 72 jam, Jumlah selobiosa yang dikonsumsi akan berkorelasi terhadap peningkatan jumlah asam laktat, asam asetat dan asam propionate yang terbentuk. Tren penurunan pertumbuhan *L. plantarum* terjadi pada media yang ditambahkan selobiosa yang tidak murni yang diduga masih memiliki kandungan selo-oligosakarida dan sudah memiliki kandungan glukosa (Karnaouri dkk., 2019).

Skor Aktivitas Prebiotik

Kemampuan kedua produk hidrolisis perlu untuk dilakukan pengukuran potensi sebagai prebiotik menggunakan analisis skor aktivitas prebiotik. Hasil hidrolisis selulosa menggunakan selulase dengan konsentrasi 2,88 U/mL memiliki skor aktivitas prebiotik yang tertinggi dibandingkan penggunaan substrat lainnya (Tabel 2). Skor aktivitas prebiotik dari hasil hidrolisis selulase tersebut mendekati dari skor pada inulin dari hidrolisis buah merah yang ditumbuhkan pada *L. casei* sebesar 0,88 (Murtiningrum dkk., 2019). Skor aktivitas prebiotik dari kedua hasil hidrolisis selulase tersebut juga lebih tinggi aktivitas prebiotik inulin dan gallactooligosakarida (GOS) yang ditumbuhkan pada *L. plantarum* (Huebner dkk., 2007), namun lebih rendah dari pertumbuhan pada fruktooligosakarida (FOS) pada *L. acidophilus* (Moongngarm dkk., 2011).

KESIMPULAN

Kulit umbi singkong varietas gajah (GJ-0) memiliki kandungan selulosa sebesar $7,15 \pm 0,90\%$ (Basis Kering) dan proses ekstraksi dapat meningkatkan persentase selulosa terhadap kandungan lignin dan hemiselulosa. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa selama 12 jam waktu hidrolisis dapat menghasilkan selobiosa dengan derajat polimerisasi 2,05 pada selulase berkonsentrasi 1,15 U/mL dan 1,94 pada selulase berkonsentrasi 2,88 U/mL. Produk hidrolisis selama 12 jam menggunakan konsentrasi enzim 1,15 U/mL menghasilkan kandungan total gula sebesar $516,30 \pm 16,57$ mg/L dan gula pereduksi sebesar $250,03 \pm 9,43$ mg/L, sedangkan peningkatan penggunaan konsentrasi selulase menjadi 2,88 U/mL menghasilkan kandungan total gula menjadi $592,41 \pm 17,81$ mg/L dan kandungan gula pereduksi menjadi $304,67 \pm 10,70$ mg/L. Kedua reaksi hidrolisis membentuk kinetika reaksi ordo 0 dengan nilai k yang tidak berbeda nyata. sehingga produksi selobiosa dengan penggunaan konsentrasi enzim selulase 1,15 U/mL dan waktu hidrolisis selama 12 jam adalah kombinasi terbaik. Hasil inkubasi produk hasil hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase berkonsentrasi 2,88 U/mL memiliki kemampuan menumbuhkan *L. plantarum* yang terbaik. Kondisi tersebut sesuai dengan peran selobiosa sebagai prebiotik untuk *L. plantarum* dalam saluran pencernaan manusia. Selobiosa yang lebih dominan terbentuk pada hasil hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase berkonsentrasi 2,88 U/mL memiliki skor aktivitas prebiotik 0,74 dibandingkan hasil hidrolisis selulosa dengan enzim selulase berkonsentrasi 1,15 U/mL dengan skor aktivitas prebiotik 0,60.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini melalui skema penelitian thesis magister. Terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Lilis Nuraida, M.Sc. yang telah mengizinkan penggunaan kultur *L. plantarum* yang dimiliki dan terima kasih kepada Dr. Ir. Nurul Khumaida, M.Si. yang telah

mengijinkan penggunaan umbi tanaman singkong varietas gajah (GJ-0) yang dimiliki untuk penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan (*conflict of interest*) dari penulis dan berbagai pihak pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, S. A., Godson, A. R. E. E., Ayodeji, S. M., & Deborah, S. E. (2016). Lignocelluloses: An economical and ecological resource for bio-ethanol production – a review. *International Journal of Natural Resource Ecology and Management*, 1(3), 128–144. <https://doi.org/10.11648/j.ijnrem.20160103.18>
- Anonim. (2013). *Pengeluaran dan Konsumsi Penduduk Indonesia. Survey Sosial Ekonomi Nasional*. Badan Pusat Statistik. Jakarta.
- Aripin, M., Kassim, A., Daud, Z., & Hatta, M. (2013). Cassava peels for alternative fibre in pulp and paper industry: chemical properties and morphology characterization. *International Journal of Integrated Engineering*, 5(1), 30–33.
- Barati, Z., Latif, S., & Müller, J. (2019). Enzymatic hydrolysis of cassava peels as potential pre-treatment for peeling of cassava tubers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20:101247, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101247>
- Basholli-salihu, M., Mueller, M., Unger, F. M., & Viernstein, H. (2013). The Use of cellobiose and fructooligosaccharide on growth and stability of *Bifidobacterium infantis* in fermented milk. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 1301–1306.
- Bayitse, R., Hou, X., Bjerre, A. B., & Saalia, F. K. (2015). Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars. *AMB Express*, 5(60), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0146-z>
- Chen, H. (2014). *International Journal of Natural Resource Ecology and Management*. Beijing: Chemical Industry Press. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- De Man, J., Ragosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1, 130–135.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elechi, O. O., Tagbo, N. J., Mary, O. C., & Emmanuel, A. O. (2016). Acid hydrolysis of cassava peel. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 5(01), 184–187.
- Herawati, E. R. N., Miftakhussolikah, M., Nurhayati, R., Sari, K. W., & Pranoto, Y. (2019). Oligosaccharides profile and prebiotic potential of gembolo tuber (*Dioscorea bulbifera*). In *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/251/1/012048>. 30 April 2020.
- Huebner, J., Wehling, R. L., & Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006>
- Idugboe., Nwokoro, O. D., & Imasuen, S. (2017). Chemical composition of cassava peels collected from four locations (Koko, Warri, Okada, and Benin City), BREWERS SPENT YEAST AND THREE GRADES of “Caspeyeast”. *International Journal of Science and Research*, 6(4), 2015–2018. <https://doi.org/10.21275/ART20172389>
- Jayus, J., Nafi, A., & Shabrina, H. A. (2019). Degradasi komponen selulosa, hemiselulosa, dan pati tepung kulit ubi kayu menjadi gula reduksi oleh *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, dan *Acremonium sp.* IMI 383068. *Jurnal Agroteknologi*, 13(01), 34–41.
- Karnaouri, A., Matsakas, L., Krikigianni, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2019). Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1628-z>
- Kayati, F. N., Syamsiah, S., & Sediawan, W. B. (2016). Studi kinetika hidrolisis tandan kosong kelapa sawit (TKKS) dengan proses fermentasi padat menggunakan Jamur *Aspergillus niger*. *Reaktor*, 16(1), 1–8.
- Liang, X., Yoshida, T., & Uryu, T. (2013). Direct saccharification and ethanol fermentation of cello-oligosaccharides with recombinant yeast. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.056>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohd-asharuddin, S., Othman, N., Shaylinda, N., & Zin, M. (2017). A chemical and morphological study of cassava peel : a potential waste as coagulant aid. In *MATEC Web of Conferences*, 06012, 1–8. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201710306012>
- Moongngarm, A., Trachoo, N., & Sirigungwan, N. (2011). Low molecular weight carbohydrates, prebiotic content, and prebiotic activity of selected food plants in Thailand. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(4), 269–274.
- Murtiningrum, Suryadarma, P., Suryani, A., & Mangunwidjaja, D. (2019). Identification of inulin profile from red fruit (*Pandanus conoideus* L) pedicel extract using LC-MS and its in vitro prebiotic activity test. *International Journal*

- of *Advance Research*, 7(11), 344–351. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/10014>
- Oluwanike, A., & Adeneye, M. A. (2014). Evaluation of chemical composition and nutritive potential of oil palm slurry fermented with cassava peel as feed for livestock. *African Journal of Agricultural Research*, 9(26), 2062–2067. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7565>
- Selig, M., Weiss, N., & Ji, Y. (2008). *Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Laboratory Analytical Procedure*. Colorado (US): Midwest Research Institute.
- Sugiyono. (2013). *Metode Penelitian Pendidikan Pendekatan Kuantitatif, Kualitatif dan R7D*. Bandung (ID): Alfabeta.
- Tasaso, P. (2015). Optimization of reaction condition for synthesis of carboxymethyl cellulose from oil palm fronds. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 6(2), 3–6. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2015.V6.460>
- van Soest, P. J. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of AOAC*, 46, 829–835.
- van Zanten, G. C., Knudsen, A., Roytio, H., Forssten, S., Lawther, M., Blennow, A., Lahtinen, S. J., Jakobsen, M., Svensson, B., & Jespersen, L. (2012). The effect of selected synbiotics on microbial composition and short-chain fatty acid production in a model system of the human colon. *PLoS ONE*, 7(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047212>. 8 Juni 2020.
- Van Zanten, G., Krych, L., Roytio, H., Forssten, S., Lahtinen, S. J., Abu, W., Sørensen, S., Svensson, B., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2014). Synbiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and cellobiose does not affect human gut bacterial diversity but increases abundance of lactobacilli, bifidobacteria and branched-chain fatty acids: a randomized, double-blinded cross-over trial. *FEMS Microbiology Ecology* 90(1), 225-236. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12397>
- Widiarto, S., Pramono, E., Rochliadi, A., & Arcana, I. M. (2019). Cellulose nanofibers preparation from cassava peels via mechanical disruption. *Fibers*, 7(44), 1–11. <https://doi.org/10.3390/fib7050044>
- Worthington. (2020). *Enzyme Manual Cellulase*. Retrieved from <http://www.worthington-biochem.com/CEL/default.html>. 6 Juli 2020.