

# PEMANFAATAN UREA SEBAGAI SUMBER NITROGEN PADA BIOSOLUBISASI BATUBARA OLEH *Trichoderma* sp.

Novi Mulyawati<sup>1</sup>, Megga Ratnasari Pikoli<sup>1</sup>, Irawan Sugoro<sup>2\*</sup> dan Pingkan Aditiawati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Prodi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

<sup>2</sup>Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN Pasar Jumat

<sup>3</sup>Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung

\*Corresponding author: irawansugoro@gmail.com

## Abstract

Lignite coal was found abundant in Indonesia, but usage for this type of coal was still relatively low. Economic value of coal increases when it is solubilized. Biosolubilization of coal by utilize of microbes produces compounds equivalent to petroleum. In this research, effect of urea on lignite biosolubilization by *Trichoderma* sp. was examined. Method of this research consisted of spore inoculum preparation, biosolubilization lignite coal with a variety of treatment that consists of treatment A (MSS + sucrose 1% + coal 5% + urea), and treatment B (MSS + sucrose 1% + coal 5%). Results showed that the addition of urea supported lignit coal biosolubilization by *Trichoderma* sp. based on increase in medium pH, concentration of phenolic and conjugated aromatic compounds, and activity of extracellular enzyme. In addition, result of product characterization using GCMS revealed compounds equivalent to 13,60%, 26,20% and 90,8% respectively for gasoline, kerosene and diesel components. Those confirmed that urea can be used as an alternative nitrogen source to support *Trichoderma* sp. in lignit biosolubilization producing petroleum compounds.

**Keywords:** Biosolubilization, lignite, urea, *Trichoderma* sp.

## PENDAHULUAN

Semakin beragamnya kebutuhan energi yang dibutuhkan untuk mendukung aktivitas kehidupan modern yang semakin kompleks, maka kebutuhan akan energi cenderung terus meningkat. Batubara merupakan sumber energi penting di dunia selain gas alam dan minyak bumi. Saat ini batubara menjadi sumber energi alternatif yang potensial, khususnya di wilayah Indonesia. Oleh karena itu, peran batubara sebagai sumber energi terus mengalami peningkatan dari 41 juta ton di tahun 2005 menjadi 67 juta ton di tahun 2010. Berdasarkan data struktur energi nasional, porsi batubara pada tahun 2005 sebesar 19% dan naik menjadi 23% pada tahun 2010. Tahun 2025 porsi itu ditargetkan terus meningkat hingga mencapai 33%, namun cadangan batubara Indonesia diperkirakan

habis dalam 80 tahun ke depan (ESDM, 2012).

Cadangan batubara Indonesia didominasi oleh jenis lignit sebesar 59%, subbituminus sebesar 27%, dan bituminus mencapai 14%, sedangkan antrasit kurang dari 0,5% (ESDM, 2010). Batubara lignit banyak digunakan untuk pembangkit tenaga listrik dan panas. Akan tetapi, emisi gas yang dihasilkan dari pembakaran batubara lignit secara langsung menghasilkan senyawa berbahaya bagi lingkungan seperti terbentuknya gas sulfur oksida (SO<sub>x</sub>), nitrogen oksida (NO<sub>x</sub>), karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) dan logam berat (Xu *et al.*, 2000). Oleh karena itu, dibutuhkan satu penanganan teknologi yang dapat menghasilkan produk bersih dari pengolahan batubara lignit yang tidak mencemari lingkungan.

Biosolubilisasi merupakan suatu teknologi pencairan batubara dengan memanfaatkan mikroba sehingga diperoleh sumber energi dengan produk bersih. Produk biosolubilisasi yang berupa cairan hitam menyimpan 97,5% dari nilai pemanasan lignit mentah (Shi *et al.*, 2009). Biosolubilisasi memiliki keuntungan yang lebih dibandingkan dengan proses liquifaksi termal. Beberapa keuntungan yang diperoleh dari proses biosolubilisasi yaitu prosesnya dilakukan dalam kondisi suhu dan tekanan atmosfer, mikroba dapat menggunakan hidrogen dari air dan tidak membutuhkan energi eksternal hidrogen untuk membentuk lignit tersolubilisasi (Fakoussa, 1999).

Hasil solubilisasi yang rendah dan dibutuhkannya waktu konversi yang lama menjadi hambatan dalam mengembangkan biosolubilisasi batubara. Selain itu, jenis batubara yang berbeda untuk setiap lokasi menjadi salah satu faktor lama atau tidaknya proses biosolubilisasi berlangsung. Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan memanfaatkan kapang indigenus di pertambangan batubara karena secara alami telah teradaptasi dengan substrat batubara (Sugoro *et al.*, 2011). Jenis kapang yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Trichoderma* sp. yang merupakan koleksi laboratorium Mikrobiologi BATAN.

Berdasarkan penelitian Sugoro *et al.*, (2011) telah diketahui bahwa kapang *Trichoderma* sp. memiliki kemampuan tertinggi dalam mengsolubilisasi batubara. Selain itu, menurut Erida (2010) kapang *Trichoderma* sp. mampu mensekresikan enzim lakase dan mangan peroksidase selama proses biosolubilisasi. Hal tersebut didukung pula dari hasil isolasi dan seleksi pada penelitian Yuslida (2011) yang menunjukkan bahwa telah diperoleh isolat kapang *Trichoderma* sp. yang berpotensi sebagai agen biosolubilisasi batubara lignit. Namun, produk yang dihasilkan masih dalam jumlah yang sangat kecil.

Proses biosolubilisasi batubara lignit dengan menggunakan kapang bergantung pada kandungan nitrogen yang terdapat dalam medium. Oleh karena itu, dalam penelitian ini

digunakan sumber nitrogen anorganik berupa urea sebagai sumber nitrogen untuk menunjang proses biosolubilisasi tersebut. Jenis sumber nitrogen urea digunakan karena mudah didapatkan dengan kondisi harga yang relatif lebih terjangkau, Selain itu, penambahan sumber nitrogen urea juga dimaksudkan untuk membantu proses biosolubilisasi batubara sehingga dapat menghasilkan produk biosolubilisasi yang lebih bersih dan lebih tinggi.

## MATERIAL DAN METODE

Alat utama yang digunakan adalah, Spektrofotometer UV-Vis, mikroskop berkamera Novel, Laminar Air Flow Cabinet (LAFC), pH meter dan Gas Chromatograph Mass Spectrometer (GCMS) untuk analisa senyawa hidrokarbon hasil biosolubilisasi. Bahan yang digunakan adalah batubara jenis lignit dengan ukuran 100 mesh, isolat kapang *Trichoderma* sp. koleksi Laboratorium Mikrobiologi BATAN, medium MSS (*Minimal Salt Solution* : 0,52 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,005 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,003 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O dan 0,003 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O lalu ditambah akuades hingga volumenya mencapai 1000 ml dan pH 5,5), medium SDMA (*Sabouraud Dextrose Agar* : MSS (1 : 1) + serbuk batubara 0,1%), medium MSS+ (MSS + sukrosa 0,1 % + batubara 5%), urea, benzena, heksana, dietil eter dan aseton proanalisis.

Isolat kapang *Trichoderma* sp. koleksi Laboratorium Mikrobiologi BATAN ditumbuhkan pada medium yang terdiri dari SDMA, MSS dan batubara 1% dalam tabung reaksi untuk memperbanyak spora. diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari sampai menghasilkan spora. Selanjutnya spora kapang dilepaskan dengan menggunakan NaCl 0,85% dan diinokulasikan ke dalam medium MSS+ dengan jenis perlakuan A (MSS++Urea) dan B (MSS+). Kemudian medium kultur diinkubasi dengan menggunakan *shaking incubator* dengan agitasi 120 rpm dan disimpan pada suhu kamar selama 21 hari. Proses pencuplikan dilakukan pada hari ke-0, 3, 6, 9, 13, 15, 17, dan 21 untuk dilakukan pengukuran

parameter pH, kolonisasi, kadar senyawa fenolik dan aromatik terkonjugasi, kadar protein ekstraseluler, aktivitas enzim ekstraseluler serta analisis produk hasil biosolubilisasi dengan menggunakan GCMS.

Pengukuran kadar senyawa fenolik dan aromatik terkonjugasi dilakukan dengan menyaring medium kultur sehingga didapatkan supernatan yang selanjutnya diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 250 nm untuk senyawa fenolik dan 450 nm untuk senyawa aromatik terkonjugasi. Pengukuran kadar protein dan aktivitas enzim ekstraseluler digunakan supernatan dengan waktu pencuplikan yang memiliki nilai kadar senyawa fenolik dan aromatik tinggi. Selanjutnya untuk pengukuran kadar protein dan aktivitas enzim ekstraseluler, supernatan yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL untuk direaksikan dengan reagen Lowry dan FDA. Kemudian diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 750 nm dan 490 nm (Breeuwer, 1996).

Analisis produk hasil biosolubilisasi batubara oleh kapang *Trichoderma* sp. dilakukan dengan menggunakan GCMS. Pelarut yang digunakan adalah campuran benzena:heksana:dietil eter dengan perbandingan 3:1:1. Supernatan hasil biosolubilisasi ditambahkan pelarut dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya campuran dikocok dan didiamkan beberapa saat sampai terbentuk fase atas dan bawah. Fase atas dipakai untuk mengidentifikasi jenis senyawa dan menentukan kadar hasil solubilisasi batubara dengan menggunakan GCMS. Adapun tujuan dilakukannya analisis ini diantaranya untuk memisahkan senyawa kimia produk biosolubilisasi dan menentukan struktur kimianya (Silva *et al.*, 2007).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### pH Medium dan Kolonisasi Miselium Kapang *Trichoderma* sp.

Berdasarkan data pH, biosolubilisasi yang telah dilakukan dari kedua medium perlakuan menghasilkan nilai pH yang relatif

asam. Nilai pH awal yang terukur pada waktu inkubasi hari ke-0 yaitu 4,40 dan 4,46. Selanjutnya nilai pH mengalami peningkatan dari kedua perlakuan ini hingga hari ke-3 menjadi 5,56 dan 4,48. Kemudian pada waktu inkubasi hari ke-6 hingga akhir waktu inkubasi, nilai pH dari kedua medium perlakuan cenderung stasioner (Gambar 1.). Hal tersebut didukung pula dengan hasil pengamatan mikroskopis yang menunjukkan terjadinya kolonisasi miselium kapang ditandai dengan adanya potensi untuk mengikat batubara (Gambar 2). Kolonisasi miselium kapang yang terjadi selama masa inkubasi 21 hari menunjukkan hasil yang berbeda dari kedua medium perlakuan. Hasil terbaik terlihat pada medium perlakuan B (kontrol) pada hari ke-9 dengan nilai pH 4,41.

Nilai pH tertinggi terdapat pada perlakuan A (urea) dengan hasil laju peningkatan pH medium sebesar 0,387/hari. Perubahan nilai pH pada medium perlakuan A (Gambar 1) terjadi karena adanya pertumbuhan dan aktivitas metabolisme dari kapang *Trichoderma* sp. yang dapat mendegradasi senyawa kompleks batubara menjadi senyawa yang lebih sederhana. Hal tersebut didukung dengan adanya hasil kolonisasi miselium kapang *Trichoderma* sp. (Gambar 2) yang mampu tumbuh dan mengkolonisasi dengan batubara. Terjadinya peningkatan nilai pH pada perlakuan A terjadi karena adanya komposisi senyawa urea yang memiliki 2 gugus amina dan berikatan dengan gugus fungsi karbonil yang memiliki sifat alkali (Gibb, 2009). Penurunan pH yang terjadi pada kedua medium dapat disebabkan terbentuknya asam-asam organik dan juga telah terjadinya proses desulfurisasi. Dimana sulfur dalam batubara terlarut ke dalam medium cair dalam bentuk ion sulfat sehingga terbentuk asam sulfat (Hammel, 1996).

### Kadar Senyawa Fenolik dan Aromatik Terkonjugasi

Hasil pengukuran nilai absorbansi senyawa fenolik dan aromatik terkonjugasi terlihat pada Gambar 2 dimana dalam grafiknya menunjukkan terbentuknya pola perubahan yang berbeda antara kedua medium perlakuan. Peningkatan nilai

absorbansi perlakuan A (urea) untuk senyawa fenolik terjadi dari awal waktu inkubasi hingga hari ke-9, selanjutnya terjadi penurunan hingga akhir waktu inkubasi. Perlakuan B (kontrol) memiliki peningkatan nilai absorbansi pada hari ke-0 hingga hari ke-6, selanjutnya terjadi penurunan hingga akhir waktu inkubasi seperti pada perlakuan A. Pola perubahan yang terjadi pada pengukuran kadar senyawa aromatik terkonjugasi untuk perlakuan A mengalami peningkatan dari hari ke-0 hingga hari ke-3, sedangkan untuk perlakuan B terjadi pada hari ke-0 hingga hari ke-9. Selanjutnya penurunan nilai absorbansi terjadi pada hari ke-6 hingga hari ke-21 untuk perlakuan A dan perlakuan B terjadi pada hari ke-13 hingga akhir waktu inkubasi.

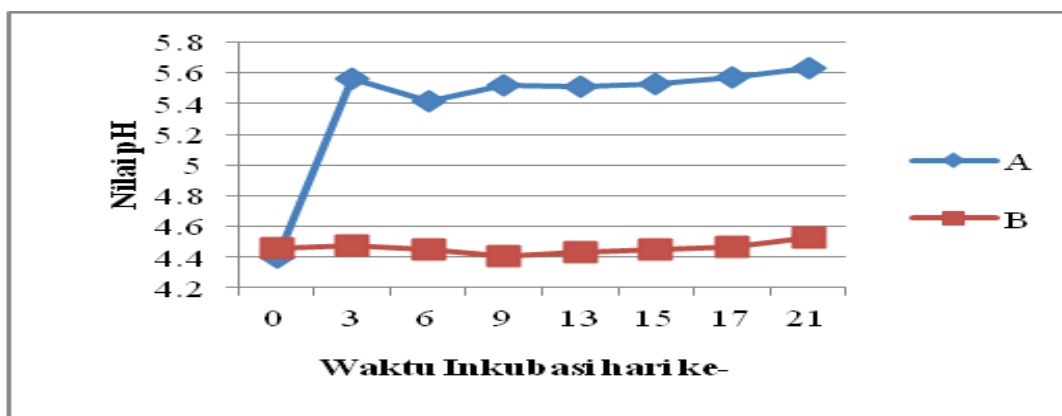
Terjadinya penurunan pH didukung pula dengan hasil pengukuran absorbansi senyawa fenolik dan aromatik terkonjugasi. Nilai absorbansi senyawa fenolik dan aromatik tertinggi terdapat pada perlakuan A (urea) berdasarkan nilai laju sebesar 0,133/hari dan 0,237/hari. Adanya aktivitas biosolubilisasi lignit oleh kapang *Trichoderma* sp. mengakibatkan terlarutnya batubara yang bercampur dengan medium dan menyebabkan terlepasnya senyawa yang mengandung gugus fenolik maupun aromatik. Batubara yang terlarut mengakibatkan perubahan warna pada medium. Pengukuran kadar senyawa fenolik memiliki nilai absorbansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan pengukuran senyawa aromatik terkonjugasi (Gambar 2). Perbedaan nilai

absorbansi menunjukkan adanya perbedaan tingkat biosolubilisasi batubara lignit oleh kapang melalui aktifitas enzim ekstraseluler menjadi suatu produk yang dapat melarut atau mencair. Terjadinya biosolubilisasi batubara dapat dilihat dari adanya perubahan gugus fungsi batubara. Menurut Scott & Lewis (1990), perubahan ini disebabkan biosolubilisasi yang dilakukan oleh kapang terhadap batubara yang merupakan proses oksidatif. Struktur lignit didegradasi menjadi senyawa fenolik dan alifatik lignin hasil degradasi cincin aromatik.

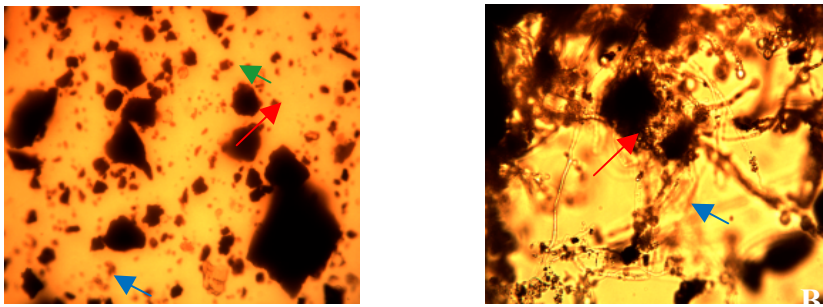
#### Kadar Protein Ekstraseluler

Grafik pada gambar menunjukkan adanya pola perubahan yang berbeda antara perlakuan A (urea) dan perlakuan B (kontrol). Nilai kadar protein ekstraseluler tertinggi di peroleh pada perlakuan B dengan nilai 0,291 mg/mL pada waktu inkubasi hari ke-6. Perlakuan A mengalami perubahan yang cenderung tidak berfluktuatif karena antara peningkatan dan penurunan nilai absorbansi bersifat stabil.

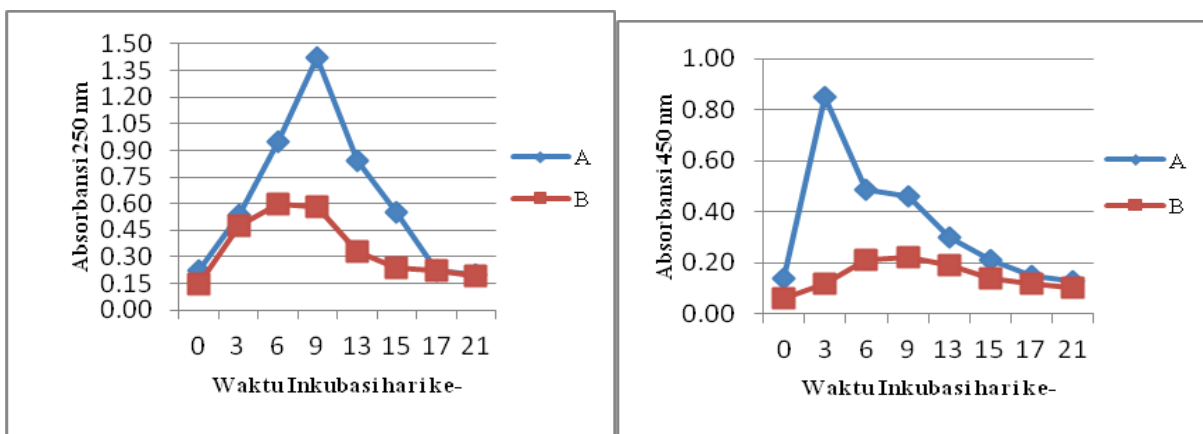
Berbeda halnya dengan pengukuran kadar aktivitas enzim ekstraseluler, nilai aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada perlakuan A dengan nilai 1,156  $\mu\text{g/mL}$  pada waktu inkubasi hari ke-15. Pola perubahan yang terjadi pada Gambar 4 menunjukkan adanya pola yang hampir sama antara medium perlakuan A dan B yaitu sama-sama mengalami peningkatan pada hari ke-0 hingga hari ke-9, akan tetapi nilai terus mengalami



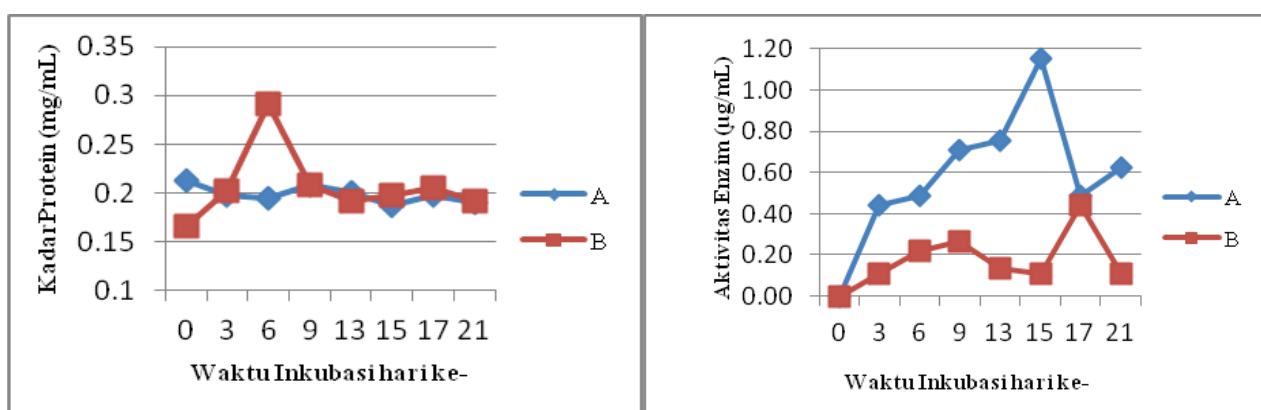
**Gambar 1.** pH medium perlakuan A (medium MSS+ + urea) dan B (Kontrol) yang diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi 120 rpm



**Gambar 2.** Kolonisasi miselium kapang *Trichoderma* sp. pada harike-9 dalam medium perlakuan A (medium MSS+ + urea) dan B (Kontrol) yang diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi 120 rpm. (spora: tanda panah hijau ; miselia; tanda panah biru; batubara: tanda panah merah ; perbesaran 400 x)



**Gambar 3.** Pengukuran kadar senyawa fenolik dan aromatik terkonjugasi pada medium perlakuan A (medium MSS+ + urea) dan B (Kontrol) yang diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi 120 rpm



**Gambar 4.** Pengukuran kadar protein ekstraseluler dengan Lowry dan aktivitas enzim ekstraseluler dengan FDA terhidrolisis pada medium perlakuan A (medium MSS+ + urea) dan B (kontrol) yang diinkubasi pada suhu kamar dan agitasi 120 rpm

peningkatan pada medium A hingga hari ke-15 setelah itu terjadi penurunan hingga akhir

waktu inkubasi. Perlakuan B mengalami penurunan dari hari ke-

13 hingga ke-15, setelah itu terjadi sedikit peningkatan pada hari ke-17 dan terjadi penurunan kembali di akhir waktu inkubasi. Perubahan kadar protein ekstraseluler dari kedua medium perlakuan memiliki nilai yang berbeda (Gambar 3). Kadar protein tertinggi terdapat pada perlakuan B (kontrol) berdasarkan nilai laju peningkatan di hari ke-6 sebesar 0,257 mg/mL. Penurunan kadar protein ekstraseluler terjadi akibat adanya penggunaan protein sebagai sumber nutrisi bagi kapang *Trichoderma* sp. Protein ekstraseluler yang terdapat dalam medium perlakuan didegradasi oleh kapang sebagai sumber nitrogen yang digunakan untuk pertumbuhannya. Terjadinya penurunan pH medium juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan dari metabolisme kapang. Nilai absorbansi tertinggi terjadi pada perlakuan A yang ditambahkan sumber nitrogen urea berdasarkan laju peningkatan aktivitas enzim ekstraseluler 1,079 µg/hari. Meningkatnya nilai absorbansi aktivitas enzim ekstraseluler dapat pula disebabkan oleh meningkatnya jumlah enzim pendegradasi lignin yang dihasilkan oleh kapang *Trichoderma* sp. Berdasarkan grafik yang diperoleh pada Gambar 4 terlihat adanya pola perubahan yang fluktuatif dari kedua medium perlakuan. Hal ini terjadi karena komposisi senyawa batubara yang bersifat kompleks dan heterogen sehingga mengakibatkan enzim yang diproduksi menjadi berbeda-beda (Laborda *et al.*, 1999).

#### **Analisis Produk Hasil Biosolubilisasi**

Sampel yang digunakan pada analisis dengan GCMS adalah supernatan yang memiliki nilai hasil absorbansi senyawa fenolik terbesar yaitu masing-masing terletak pada hari ke-9 dari waktu inkubasi. Hasil identifikasi dengan GCMS menunjukkan pada perlakuan A (urea) terdeteksi 18 senyawa hidrokarbon sedangkan pada kontrol terdeteksi 16 senyawa.

Pada kontrol terdapat senyawa dengan rantai karbon panjang yang tidak terdapat pada perlakuan A yaitu 1,2-Benzenadi carboxylic acid, butil desil ester (C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>), n-Tetrakosana (C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>), dan 9-Oktilhepta dekana (C<sub>25</sub>H<sub>52</sub>). Senyawa terdeteksi dengan

luas area tertinggi dengan nilai 13,61% pada perlakuan A yaitu senyawa 1-Dokosana (C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>), sedangkan pada perlakuan B yaitu 1,2-Benzenadicarboxylic acid, butil desil ester (C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>) persentase luas area 15,43%. Berdasarkan nilai persentase area yang didapatkan dan mengacu pada pengelompokan jenis bahan bakar dari *American Testing Society* (2009), dari kedua medium perlakuan menghasilkan senyawa – senyawa yang mirip dengan fraksi bensin (C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>), fraksi kerosin (C<sub>12</sub>-C<sub>15</sub>) dan fraksi solar (C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>). Hasil tertinggi diperoleh pada perlakuan A dengan nilai 13,60% fraksi bensin, 26,20% fraksi kerosin, dan 90,8% fraksi solar.

Peningkatan kadar senyawa fenolik yang terjadi pada Gambar 2 didukung pula dari hasil analisis GCMS supernatan medium yang menunjukkan adanya senyawa-senyawa baru yang berasal dari batubara. Adanya penurunan komposisi dan konsentrasi senyawa mengindikasikan terjadinya biosolubilisasi. Proses biosolubilisasi ini menyebabkan pemutusan rantai karbon oleh kapang menjadi rantai yang lebih sederhana dan sebagian digunakan untuk proses metabolisme kapang dimana selama masa inkubasi kapang menggunakan sumber karbon pada senyawa batubara tersebut untuk proses metabolismenya. Terbentuknya senyawa aromatik, alifatik serta fenolik yang dihasilkan pada biosolubilisasi ini merupakan indikasi adanya aktivitas metabolisme kapang *Trichoderma* sp. yang terdapat dalam medium perlakuan. Hasil analisis dengan GCMS menunjukkan bahwa medium perlakuan A memiliki senyawa yang lebih banyak dari pada perlakuan B, dan memiliki jumlah persentase area tertinggi pada jenis senyawa yang setara dengan fraksi bensin, kerosin dan solar yaitu 13,6%, 26,2%, dan 90,2%. Berdasarkan hasil tersebut, urea dapat dijadikan sumber nitrogen alternatif untuk menunjang proses biosolubilisasi batubara lignit oleh kapang *Trichoderma* sp.

#### **KESIMPULAN**

Urea dapat dijadikan sumber nitrogen alternatif untuk menunjang proses

biosolubilisasi batubara lignit oleh kapang *Trichoderma* sp. berdasarkan berdasarkan hasil laju peningkatan pH medium sebesar 0,387/hari, laju absorbansi senyawa fenolik 0,133/hari dan aromatik terkonjugasi 0,237/hari, laju peningkatan aktivitas enzim ekstraseluler 1,079 µg/hari, serta hasil karakterisasi produk GCMS yang menghasilkan produk setara dengan komponen bensin, kerosin dan solar sebesar 13,60%, 26,20% dan 90,8% area.

#### DAFTAR PUSTAKA

- \_\_\_\_\_. (2012). *Hand Book of Energy & Economic Statistics of Indonesia 2012*. American Testing Society (ATS). 2009. *Coal*. <http://www.ats.org>.
- Breeuwer P. (1996). Assesment of Viability of Microorganism Employing Fluorescein Techniques. Germany: Wageningen.
- Erida, Y. (2010). Karakterisasi Enzim Ekstraseluler dan Produk Biosolubilisasi Batubara Hasil Iradiasi Gamma Oleh Kapang *Pennicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Erida, Y. (2010). Karakterisasi Enzim Ekstraseluler dan Produk Biosolubilisasi Batubara Hasil Iradiasi Gamma Oleh Kapang *Pennicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- ESDM, (2010). *Memfaatkan batubara agar lebih ramah lingkungan*. [online] <http://www.esdm.go.id>. (7 April 2012)
- Fakoussa, R. & Hofrichter, M., (1999). Biotechnology and Microbiology of Coal Degradation. *Appl. Microbiol. Biotech.* 52, 25-40.
- Gibb, B. C. (2009). Teetering towards chaos and complexity". *Nature Chemistry*, 1: 17- 18.
- Hammel, K. E. (1996). Extracellular Free Radicalbiochemistry of Ligninolytic Fungi. *New J Chem.* 20, 195-198.
- Laborda, F., Monistrol, I. F., Luna, M., Fernandez, M. (1999). Process of liquefaction or solubilization of spanish coal by microorganism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 49-56.
- Scott, C. D & Lewis, S.N. (1990). Solubilization of Coal by Microbial Action. In: Wise, L.D. (editor). *Bioprocessing and Biotreatment of Coal*. Marcel Dekker Inc. New York
- Shi, K. Y., Tao, X. X., Yin, S.D. & Du, Z.P. (2009). Bio-solubilization of Fushun lignite. The 6th Proceeding Conference on Mining Science dan Technology in *Procedia Earth Planet. Sci.* I. 627-633.
- Silva, M.E., Vengadajellum, C. J., Janjua, H.A., Harrison, S. T. L., Burton, S.G. & Cowan, D.A. (2007). Degradation of low rank coal by *Trichoderma atroviride* ES11. *J. Indus. Microbiol. Biotech.* 34, 625-631.
- Sugoro, I., Sasongko, D., Indriani D., & P Aditiawati, P. (2011). *Isolasi dan Seleksi Fungi dari Pertambangan Batubara sebagai Agen Biosolubilisasi Batubara* dalam Laporan Penelitian Hibah Unggulan Strategis Nasional Tahap I. ITB. Bandung
- Xu, X.H., Chen, C. H., & Qi, H.Y. (2000). Development of Coal Combustion Pollution Control for SO<sub>2</sub> and NO<sub>x</sub> in China. *Fuel Proces. Tech.* 62(2/3), 153-160.
- Yuslida, R. (2011). Biosolubilisasi batubara Lignit Hasil Interaksi Kapang *Trichoderma* sp. dengan mikroba indigenous. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.