



Karakterisasi Selulase Asal Bakteri Tanah Danau Kalimpa'a Sulawesi Tengah

Cellulase Characterization On Soil Bacteria From Lake Kalimpa'a Central Sulawesi

Marina^{*}, Orryani Lambui, dan I Nengah Suwastika

Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Tadulako, Palu 94111 Sulawesi Tengah

ABSTRACT

Cellulase can be produced by cellulolytic bacteria. This bacteria is a kind of bacteria which naturally decomposing cellulose into a simple monomer. Lake Kalimpa'a which is located in Lore Lindu National Park of Central Sulawesi has high litter productivity, so it depends on the existence of soil microorganism in its decomposition process. In this study, we performed isolation and characterization of cellulolytic bacteria, as well as characterization of produced cellulase enzyme. The method used in this research was qualitative descriptive, and the results of enzyme activity were presented quantitatively. Characterization of the cellulase was determined based on activity at various temperatures (30 °C; 40 °C; and 50 °) and various pH (5.0; 6.0; 7.0; and 8.0). There were 5 best isolates of potentially cellulolytic bacteria (incubated as K1, K2, K3, K4 and K5). The results showed that qualitatively, the K4 isolate can produce the highest cellulase activity based on clear zone formation in the Cellulase Activity Index (IAS) of 3.88 mm. Quantitatively the cellulase activity was determined based on the production of reducing sugar using the DNS method (*Di Nitro Salicylic Acid*). K2 isolate was able to produce the highest cellulase activity of 0,30 U/ml and the lowest cellulase activity was produced by K1 (0,001 U/ml). The optimum temperature and pH of the cellulase activity were 40 °C and pH 6 respectively which showed an enzyme activity of 0,279 U/ml.

Keywords: *Cellulolytic bacteria, Cellulose, CMC, DNS, Enzyme activity*

ABSTRAK

Selulase adalah enzim yang dapat dihasilkan oleh bakteri selulolitik, memiliki kemampuan dalam menguraikan selulosa menjadi monomer yang lebih sederhana di alam. Danau Kalimpa'a yang merupakan kawasan Taman Nasional Lore Lindu Sulawesi Tengah memiliki produktivitas seresah yang tinggi, sehingga sangat bergantung pada keberadaan mikroorganisme tanah termasuk bakteri selulolitik sebagai dekomposer. Pada penelitian ini telah dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim endogenous. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif kualitatif dan deskripsi aktivitas enzim dipaparkan secara kuantitatif. Karakterisasi selulase ditentukan dengan menguji aktivitas enzim pada variasi suhu (30°C, 40°C, dan 50°C) dan variasi pH (5.0; 6.0; 7.0; dan 8.0). Hasil isolasi bakteri diperoleh 5 isolat terbaik (K1, K2, K3, K4 dan K5) yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi selulosa. Secara kualitatif, isolat K4 dapat mendegradasi selulosa lebih cepat dibanding isolat lain berdasarkan pembentukan zona bening dengan Indeks Aktivitas Selulase (IAS) sebesar 3,88 mm. Secara kuantitatif, aktivitas selulase ditentukan berdasarkan kadar gula reduksi yang dihasilkan menggunakan metode DNS (*Di Nitro Salisilic Acid*). Isolat K2 mampu menghasilkan enzim dengan aktivitas selulase tertinggi yaitu 0,30 U/ml dan aktivitas selulase terendah dihasilkan oleh isolat K1 yaitu 0,001 U/ml. Suhu dan pH optimum selulase adalah 40°C dan pH 6, yang menghasilkan aktivitas enzim sebesar 0,279 U/ml.

Kata Kunci : *Bakteri selulolitik, Selulase, CMC, DNS, Aktivitas enzim*

LATAR BELAKANG

Selulase (E.C.3.2.1) merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan β -1,4 glikosidik dalam suatu molekul selulosa sehingga dapat menjadi bentuk yang lebih sederhana berupa monomer glukosa. Bersifat ekstraseluler karena enzim disintesis di dalam sel dan dikeluarkan ke media tumbuhnya sehingga dapat dengan mudah dipisahkan melalui sentrifugasi. Salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan selulase adalah bakteri selulolitik (Onsori *et al.*, 2005).

Kemampuan bakteri selulolitik dalam memproduksi selulase banyak dimanfaatkan untuk berbagai macam

keperluan industri karena biaya produksinya murah, waktu produksi singkat, menghasilkan kompleks multienzim dan cenderung stabil pada kondisi ekstrim (Ladeira *et al.*, 2015).

Selulase memiliki banyak baik dalam bidang industri maupun dalam bidang lainnya. Produksi selulase secara komersial umumnya menggunakan bakteri yang telah diisolasi. Mikroorganisme dapat diisolasi dari mana saja termasuk dari Hutan Primer di sekitar Danau Kalimpa'a. Keanekaragaman hayati yang tinggi di kawasan TNLL meningkatkan produktivitas seresah tanaman yang

dibuang di tanah. Kondisi hutan primer di sekitar Danau Kalimpa ini sangat mendukung pertumbuhan dan keanekaragaman mikroorganisme tanah terutama bakteri selulolitik. Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi bakteri selulolitik asal hutan primer yang berada di sekitar Danau Kalimpa'a dan karakterisasi selulase yang dihasilkan oleh bakteri selulolitik tersebut.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2017 sampai bulan Agustus 2017. Diawali dengan pengambilan sampel tanah yang bertempat di hutan primer sekitar Danau Kalimpa'a kawasan Taman Nasional Lore Lindu. Tahapan isolasi, identifikasi dan karakterisasi selulase asal bakteri selulolitik dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer, sentrifuse, cawan petri, jarum ose dan pipet mikro. Bahan yang digunakan adalah DNS, CMC, NaCl fisiologis, *congo red*, *phenol red* dan aquades.

Pengambilan Sampel Tanah

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada lokasi yang memiliki banyak serasah daun karena pada kondisi ini banyak mikroorganisme tanah yang hidup termasuk

bakteri selulolitik. Sampel tanah diambil sampai pada kedalaman 10 cm menggunakan bor tanah kemudian sampel tanah dimasukkan ke dalam wadah plastik yang steril dan diberi kode.

Isolasi dan Pemurnian

Sebanyak 10 g sampel dilarutkan ke dalam 90 ml larutan NaCl fisiologis, kemudian dihomogenkan dengan hot plate dan magnetic stirrer. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Suspensi kemudian diambil sebanyak 1 ml lalu dilakukan pengenceran bertingkat, suspensi dari seri pengenceran 10^{-8} hingga 10^{-12} diinokulasikan sebanyak 0,1 ml dengan menggunakan metode *spread* ke dalam masing-masing cawan petri yang telah berisi media CMC (Carboxyl methyl cellulose) lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

Karakterisasi Bakteri

a. Pengamatan Morfologi koloni

Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati secara langsung ciri-ciri koloni isolat yang meliputi bentuk, warna, tepian dan elevasi koloni.

b. Pewarnaan Gram

Sebanyak satu ose isolat bakteri yang berumur 24 jam diratakan pada kaca objek, kemudian difiksasi diatas bunsen. Selanjutnya secara berturut-turut diberikan larutan kristal violet (Gram A) selama 1 menit, larutan lugol (Gram B) 1 menit, larutan aseton-alkohol (Gram C) selama 30

menit dan larutan safranin (Gram D) selama 2 menit. Pengamatan di bawah mikroskop dilakukan dengan menggunakan perbesaran 1000x.

c. Uji Fermentasi Karbohidrat

Uji fermentasi karbohidrat meliputi glukosa, laktosa dan sukrosa. Biakan bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam diinokulasikan masing-masing sebanyak 1 ose ke dalam media uji fermentasi karbohidrat. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Uji dikatakan positif jika terjadi perubahan warna pada media uji.

Uji Kualitatif Selulase

Menurut Kader dan Omar (1988), secara kualitatif besarnya aktivitas selulase dapat dinyatakan sebagai indeks selulolitik atau indeks aktivitas selulase yang diperoleh dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{Indeks selulolitik} = \frac{A-B}{B}$$

Keterangan : A : Diameter Zona Bening (mm)

B : Diameter Koloni (mm)

Penentuan aktivitas enzim selulase secara kualitatif dilakukan dengan mengamati zona bening pada media CMC agar. Isolat bakteri yang berumur 18 jam diambil sebanyak 10 µL isolat untuk ditumbuhkan pada kertas saring dengan diameter 8 mm. yang diletakkan di atas

media CMC agar. kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, permukaan media CMC agar direndam dengan menggunakan larutan *congo red* 0,1% selama 20 menit kemudian di bilas dengan NaCl 1 M. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Produksi Crude Enzyme

Sebanyak 2 ose isolat hasil peremajaan secara aseptis diinokulasikan ke dalam 200 ml media CMC cair. Setelah itu dishaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 24 jam untuk memperbanyak fase adaptasi.

Inokulum kemudian diambil sebanyak 25 ml lalu diinokulasikan ke dalam 250 ml media CMC cair 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam yang merupakan fase stasioner. Setelah itu, ekstrak kasar selulase diperoleh dengan mensentrifugasi kultur bakteri dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Proses sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan sel-sel mikroorganisme yang mengendap dan supernatan yang merupakan cairan berisi ekstrak kasar enzim.

Uji Aktivitas Selulase Secara Kuantitatif

Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan reagen *3,5-Di Nitro Salisilic Acid* (DNS) . Sebanyak 1,8 ml

substrat (1% selulosa CMC) ditambah dengan 0,2 ml enzim ekstrak kasar kemudian di vortex dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 30 °C, kemudian aktivitas enzim dihentikan dengan cara direndam pada air mendidih selama 15 menit. Setelah itu, mengambil sebanyak 1 ml dari larutan tersebut dan ditambah dengan 1 ml DNS kemudian direndam kembali dalam air mendidih selama 15 menit. Absorbansi diukur pada λ 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer Ultra Violet Visible (UV-Vis) (Wood and Saddler, 1988).

Perlakuan kontrol dan blanko dilakukan secara bersamaan dengan metode dan tahapan yang sama pada pengujian sampel, dimana kontrol merupakan enzim yang telah diinaktivasi terlebih dahulu direaksikan dengan substrat sedangkan blanko tidak menggunakan enzim tetapi menggunakan buffer fosfat pH 7 yang direaksikan dengan substrat.

$$\text{Aktivitas selulase (U/ml)} = \frac{\text{Konsentrasi glukosa sampel}}{V \times t \times BM}$$

Konsentrasi glukosa sampel : ((As - Ab) - (Ak - Ab))

Keterangan : As = Absorbansi sampel

Ab = Absorbansi blanko

Ak = Absorbansi kontrol

V = Volume enzim (0,2 ml)

T = Waktu inkubasi

BM = Bobot Molekul
Glukosa(180)

Karakterisasi Selulase

a. Penentuan Suhu Optimum

Menurut Sari (2010), enzim dan substrat direaksikan pada suhu 30 °C, 40 °C dan 50 °C dalam buffer fosfat 0,05 M pH 7,0 untuk menentukan suhu optimum selulase. Kemudian diinkubasi selama 30 menit. Aktivitas enzim selulase diukur dengan menggunakan metode DNS.

b. Penentuan pH Optimum

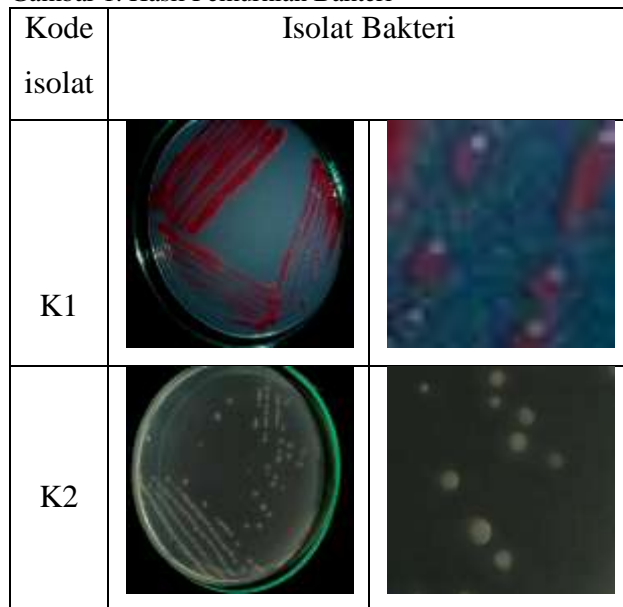
Menurut Sari (2010), ekstrak kasar selulase direaksikan dengan substrat CMC 1% pada suhu optimum sesuai dengan pH perlakuan lalu diinkubasi selama 30 menit. Variasi pH dilakukan dengan penambahan buffer sitrat 0,05 M pH 5, buffer sitrat fosfat 0,05 M pH 6 dan 7 serta buffer TRIS-HCL 0,05 M untuk pH 8. Aktivitas enzim selulase diukur dengan metode DNS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian

Hasil isolasi dan pemurnian bakteri selulolitik, diperoleh dua isolat yang mampu tumbuh dengan baik pada media CMC dan memiliki bentuk koloni yang jelas. Isolat tersebut diberi kode K1 dan K2 (Gambar 1).

Gambar 1. Hasil Pemurnian Bakteri



Karakterisasi Bakteri

Morfologi Bakteri

Isolat bakteri dengan kode K1 memiliki bentuk morfologi tepian rata, berbentuk bulat, berwarna merah muda dan memiliki elevasi timbul. Isolat dengan kode K2 memiliki bentuk tepian tidak beraturan, berbentuk bulat, berwarna putih serta elevasi yang timbul (Gambar 1).

Menurut Dwijoseputro (2005), koloni bakteri secara umum memiliki sifat-sifat yang khusus pada medium padat. Bentuk koloni dapat digambarkan sebagai titik, bulat atau *circular*, *filamentus* dan tidak beraturan (*irregular*). Permukaan koloni dapat berbentuk rata, timbul, melengkung dan cembung, sedangkan tepian koloni berbentuk utuh atau *entire*, berbelah atau *lobate*, berbenang atau *filamentus* dan *keriting* (*curled*).

Pewarnaan Gram

Bentuk sel bakteri setelah dilakukan pewarnaan yaitu *coccus* dan bersifat Gram negatif (Gambar 2). Hal ini ditandai dengan sel bakteri yang berwarna merah karena kompleks zat warna kristal violet larut pada saat pemberian larutan aseton-alkohol (Gram C) tetapi sel terwarnai oleh pewarna tandingan yaitu safranin (Gram D). Menurut Pelczar and Chan (1986), mekanisme pewarnaan gram didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang cukup tipis dan komposisi lipid yang cukup tinggi yaitu 11-12%, sedangkan bakteri gram positif memiliki dinding sel yang cukup tebal dan hanya memiliki kandungan lipid sebesar 1-4%. Selain itu, bakteri gram negatif memiliki kandungan peptidoglikan pada dinding sel yang lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri gram positif.

Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram



Keterangan : (K1) sel berbentuk coccus dan bersifat Gram negatif, (K2) sel berbentuk coccus dan bersifat Gram negatif. Pengamatan dilakukan pada perbesaran 1000x.

Uji Fermentasi Karbohidrat

Pada uji fermentasi karbohidrat, diperoleh hasil bahwa isolat yang mampu melakukan fermentasi ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada media

dan mampu menghasilkan gas. Namun, isolat yang tidak mampu melakukan fermentasi ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna pada media setelah dilakukan perlakuan uji fermentasi (Tabel 1)

Pada fermentasi karbohidrat terjadi perubahan warna pada media uji dari warna merah menjadi kuning, hal ini menandakan bahwa bakteri dapat membentuk asam dari fermentasi. Selain itu, terbentuk juga gelembung pada tabung Durham yang diletakkan secara terbalik di dalam media. Terbentuknya gelembung ini menandakan bahwa hasil fermentasi berbentuk gas. Indikator yang digunakan pada media ini adalah *phenol red*, yang berguna untuk melihat adanya pembentukan asam.

Mikroorganisme yang berbeda akan menggunakan karbohidrat yang berbeda juga, tergantung dari komponen enzim yang dimilikinya.

Tabel 1. Uji Fermentasi Karbohidrat

No.	Nama Isolat	Uji Fisiologis					
		Laktosa		Glukosa		Sukrosa	
		G	F	G	F	G	F
1.	K1	+	+	-	+	-	+
2.	K2	-	+	-	-	-	-

Keterangan : (G) gas, (F) fermentasi. + (dapat menghasilkan asam dan gas), - (tidak dapat menghasilkan asam dan gas).

Uji Kualitatif Selulase

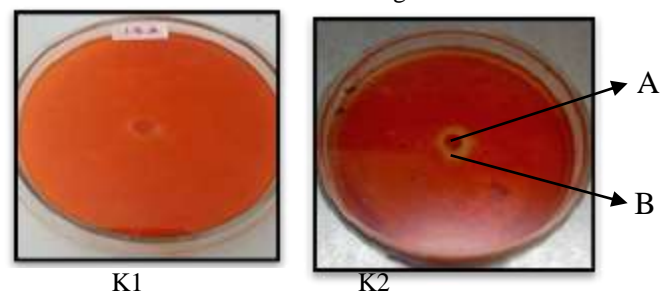
Kemampuan bakteri selulolitik dalam mendegradasi selulosa ditandai

dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni yang tumbuh di media CMC setelah ditetaskan *Congo red* (Gambar 3). Kemampuan bakteri dalam menghidrolisis selulosa dinyatakan dalam bentuk IAS (indeks aktivitas selulolitik), dimana IAS yang dimiliki isolat K1 sebesar 1,57 mm dan isolat K2 sebesar 1,88 mm.

CMC merupakan substrat yang sangat baik digunakan untuk produksi selulase karena mampu menginduksi bakteri untuk menghasilkan selulase (Abou-Taleb *et al.*, 2009).

Uji degradasi dengan mengamati zona bening merupakan uji secara kualitatif karena data yang diperoleh berupa perbandingan antara diameter zona bening dan diameter koloni. Zona bening yang terbentuk terkait dengan kelarutan dari selulase (Mustika *et al.*, 2013).

Gambar 3. Pembentukan Zona Bening



Keterangan : (A) Koloni bakteri, (B) Zona bening.

Aktivitas Selulase Secara Kuantitatif

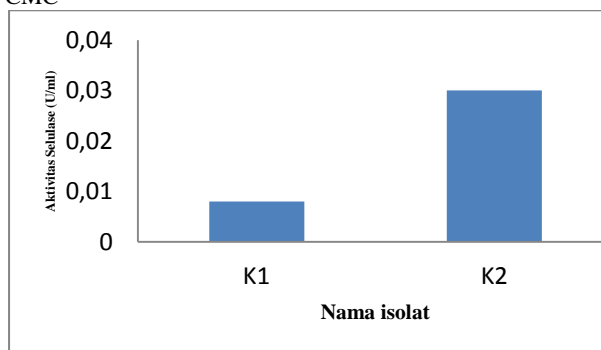
Uji aktivitas enzim secara kuantitatif dilakukan dengan pengukuran aktivitas selulase menggunakan metode DNS. Sampel yang telah disentrifuse merupakan enzim ekstrak kasar yang akan

diuji aktivitas selulase. Komponen enzim terbanyak terdiri atas protein yang rentan terhadap suhu sehingga saat sentrifugasi suhu dipertahankan dalam keadaan rendah yaitu 4 °C.

Hasil aktivitas selulase yang dihasilkan oleh isolat K1 yaitu 0,001 U/ml dan K2 mampu menghasilkan aktivitas yang lebih besar yaitu 0,30 U/ml (Gambar 4).

Aktivitas selulase diukur dari jumlah glukosa yang dihasilkan oleh enzim ekstrak kasar karena selulase bekerja untuk memutus ikatan glikosidik pada selulosa menjadi glukosa. Apabila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menghasilkan warna jingga kemerahan. Menurut Rosyada (2015), semakin gelap warna DNS maka jumlah gula yang tereduksi semakin banyak.

Gambar 4. Aktivitas selulase yang diuji terhadap substrat CMC



Karakterisasi Selulase

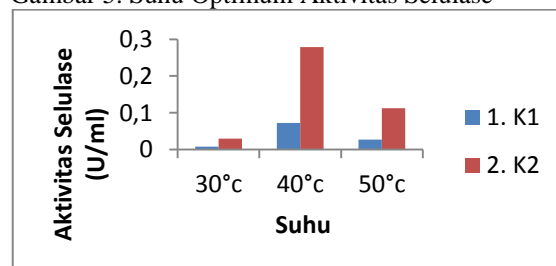
Suhu Optimum

Suhu sangat berpengaruh pada aktivitas selulase. Suhu optimum merupakan suhu yang menyebabkan terjadinya suatu reaksi kimia dengan kecepatan paling besar. Apabila suhu yang digunakan melebihi suhu optimum maka akan terjadi kerusakan struktur enzim (Mutia *et al.*, 2013).

Aktivitas optimum selulase tertinggi terjadi pada suhu 40 °C dengan aktivitas sebesar 0,279 U/ml yang dihasilkan oleh isolat K2 dan isolat K1 menghasilkan aktivitas selulase sebesar 0,073 U/ml (Gambar 5). Berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Sonia dan Kusnadi (2015), isolat bakteri OS-16 memiliki aktivitas selulase yang optimum pada suhu 85 °C.

Menurut Volk and Wheeler (1993), suhu optimum yang berbeda pada masing-masing bakteri menandakan bahwa selulase yang dihasilkan oleh setiap bakteri memiliki karakteristik yang berbeda-beda. Pada umumnya enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki aktivitas optimum pada suhu 20-50 °C (Saropah dkk., 2012).

Gambar 5. Suhu Optimum Aktivitas Selulase



pH Optimum

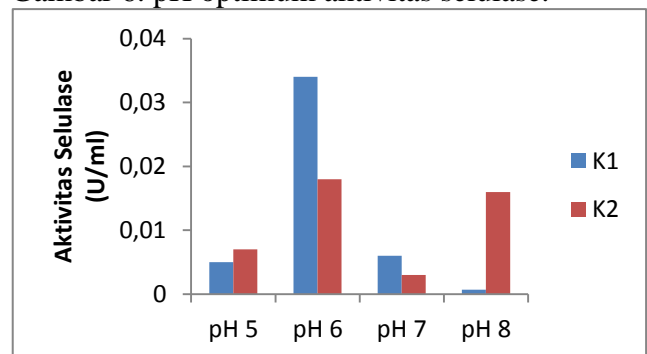
Enzim memiliki karakteristik pH optimum, dimana pada pH tersebut mampu menghasilkan aktivitas enzim secara maksimal dalam mengkatalisis suatu reaksi. Pada saat pH berubah, maka akan sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim melalui pengubahan struktur asam amino yang berfungsi dalam pengikatan substrat (Masfufatun, 2009).

Menurut Poedjiadi dan Supriyanti (2006), enzim yang dihasilkan oleh mikroba memiliki pH optimum yang berbeda-beda. Isolat bakteri yang diperoleh memiliki aktivitas selulase optimum pada pH yang berbeda-beda, dimana aktivitas tertinggi berada pada pH 6. Data hasil aktivitas selulase pada pH optimum disajikan secara lengkap pada Gambar 6.

Menurut Nelson and Cox, (2005), pH sangat mempengaruhi struktur suatu enzim, dimana interaksi ionik yang terjadi di dalam strukturnya akan menstabilkan dan memungkinkan enzim untuk mengenali substratnya. Perubahan pH akan menyebabkan denaturasi pada protein penyusun enzim.

Hasil data menunjukkan bahwa kedua isolat yang diperoleh merupakan bakteri selulolitik yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan selulosa dengan aktivitas tertinggi dihasilkan oleh isolat K2 sebesar 0,279 U/ml pada suhu 40 °C dan pH 6 yang merupakan kondisi optimum.

Gambar 6. pH optimum aktivitas selulase.



UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Laboran (Sami Bukang S.P dan Dra.Happy) di lab. Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tadulako.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Taleb, K.A.A., Mashhoor, W.A., Nasr, S.A., SHaraf, M.S., Abdel-Azeem, H.H.M. 2009. Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacili. *AJBAS*. 3 (3): 2429-2436.
- Dwijoseputro, D., 2005, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Djambatan, Jakarta.
- Kader, A.J., and Omar, O. 1988. Isolation of Cellulotic Fungi from Sayap-Kinabalu Park, Sabah, Serawak. *J Biodiversity Bio-Century*. 1-6.
- Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18, 110–115.
- Masfufatun. (2009), "Hidrolisis CMC dengan Enzim Selulase dari *Bekicot*, *Achatina fulica* untuk Produksi

- Etanol dengan Zymomonas mobilis”, Tesis Magister Kimia, ITS, Surabaya.
- Mustika R., Martina A, Leni B, Zul D, Ramadhan N. 2013. Isolasi dan Seleksi Jamur Selulolitik dari Tanah Gambut di Perkebunan Karet Desa Rimbo Panjang Kabupaten Kampar Riau.Lampung. Indonesia.
- Mutia M, Seniwati D, Rugaiyah A, Firdaus Z. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Akar Rimpang Alang- Alang (*Imperata cylindrica*).
- Nelson, D.L dan Cox, M.M. 2005.Principles of Biochemistry.Ed ke-4.Worth Publisher. New York.
- Onsori, H., Zamani, M.R., Motallebi, M., Zhargami, N. 2005. Identification of over producer strain of endo- β -1,4-glucanase in *aspergillus* species : characterization of crude *carboxymethyl cellulase*. *African Journal of Biotechnology*. 4 (1) : 26-30.
- Pelczar, M.J. and E. C. S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi.UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, F.M. 1992.Dasar-Dasar Biokimia. UI Press. Jakarta.
- Rosyada, N. 2015.Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*).Skripsi.Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Sari, R. F. 2010.Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri RF- 10.Skripsi.Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Saropah, A., Jannah, A., Maunatin, A. 2012. Kinetika Reaksi Enzimatik Ekstrak Kasar Enzim Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Alchemy*. 2 (1): 34-45.
- Sonia, N. M. O dan J. Kusnadi. 2015. Isolasi dan karakterisasi parsial enzim selulase dari isolat bakteri OS-16 asal padang pasir Tengger-Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(4): 11-19
- Volk, W. A., and Wheeler M.F., 1988, Mikrobiologi Dasar, Erlangga. Jakarta.
- Wood TM and Saddler JN., 1988.Increasing the Availability of Cellulose in Biomass Materials.In Wood WA and Kellog JA, editor.Method in Enzymology Cellulose and Hemicellulose.Volume ke 160.Academic press. Hal 3-11. New york.