

SELEKSI BAKTERI TERMOFILIK SELULOLITIK PASCA ERUPSI MERAPI

Anna Rakhmawati¹, Evy Yulianti¹, Eli Rohaeti²

¹Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY, ²Jurusan Pendidikan Kimia FMIPA UNY
Email: wannawijaya@yahoo.com, No hp: 081328076689

Abstract

Thermophilic bacteria after the eruption of Merapi in 2010 have been isolated from the Gendol Atas river with dilution and enrichment methods. The purpose of this study was to conduct the selection of these bacteria as producers of cellulase enzymes. Selection was done by growing 348 bacterial isolates on selective media Mandels-CMC 0.5% using Carboxy Methyl Cellulose (CMC) as carbon source. Incubation was performed at 55 °C for 24 hours. The results showed 255 isolates (73.27%) were able to grow in Mandels medium-CMC 0.5%. Bacterial isolates were isolated by enrichment method (69.8%) were more able to grow on selective media compared with the dilution method (30.2%). The diameter of the three largest colonies were isolates D13a (2.44 cm); E135 (2.33 cm); and D110a (1.98 cm).

Key words: selection, bacteria, thermophilic, cellulolytic,

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan salah satu biopolimer melimpah di alam dan merupakan limbah pertanian yang dominan. Namun pemanfaatan selulosa masih sangat terbatas. Selulosa merupakan polimer glukosa yang dihubungkan dengan ikatan glikosidik β 1-4 dan dapat didegradasi oleh enzim selulase. Jaradat *et al* (2008) mengemukakan enzim selulase menempati 20% perdagangan enzim di dunia. Shaikh *et al* (2013) menerangkan enzim selulase merupakan kompleks enzim yang merupakan sistem sinergis dan secara bertahap mampu mengubah

selulosa menjadi sumber energi dan glukosa tersedia sehingga berperan penting dalam pemanfaatan biomassa. Salah satu kelompok organisme yang mampu menghasilkan enzim selulase adalah mikroorganisme. Kosim, Putra (2010) dalam Yusriah & Kuswyasari (2013) menyatakan mikroorganisme merupakan sumber enzim dan lebih menguntungkan dibandingkan organisme lain karena pertumbuhannya cepat, dapat tumbuh pada substrat yang murah, lebih mudah ditingkatkan hasilnya melalui pengaturan kondisi pertumbuhan dan rekayasa genetika, serta mampu menghasilkan enzim yang

ekstrim. Sadhu, S & T.K. Maiti (2013) menyatakan konversi biomassa selulosa oleh mikroorganisme berpotensi untuk mengembangkan bioproses dan produk-produk baru. Enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme telah diproduksi secara komersial oleh beberapa industri global dan banyak digunakan dalam bidang pangan, pakan, bahan bakar, industri kertas dan tekstil, serta berbagai industri kimia. Periode tahun 2004-2014 menunjukkan terjadi peningkatan penggunaan enzim selulase hampir mencapai 100%. Penelitian mengenai enzim selulase umumnya dilakukan pada fungi tetapi saat ini terjadi peningkatan penelitian pada bakteri. Produksi enzim selulase oleh bakteri memiliki keunggulan dibandingkan fungi yaitu kecepatan pertumbuhan bakteri lebih cepat sehingga memungkinkan produksi enzim rekombinan lebih tinggi, properti kestabilan pada keadaan suhu tinggi, dan lebih tahan kondisi basa. Selain itu enzim selulase yang dihasilkan bakteri lebih kompleks dan multi enzim sehingga meningkatkan fungsi serta sinerginya. Habitat bakteri pada lingkungan yang lebih bervariasi seperti termofilik, psikrofilik, alkalifilik, asidofilik, halofilik sehingga mampu resisten pada tekanan lingkungan. Acharya *et al* (2012) berhasil

mengisolasi bakteri termofilik selulolitik *Bacillus subtilis* yang berpotensi mendegradasi limbah selulosa dengan memproduksi enzim selulase termotoleran. Hal ini merupakan alternatif konversi lignoselulosa menjadi gula sederhana dan bahan bakar etanol.

Pengelompokan bakteri berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya dapat dibedakan menjadi 3 yaitu psikrofilik (suhu rendah yaitu -10 sampai 20 °C), mesofilik (suhu sedang yaitu 10-50 °C), dan termofilik (suhu tinggi yaitu 40-70 °C). Keuntungan utama penggunaan bakteri termofilik adalah memperoleh enzim selulase dengan karakter tahan panas sehingga dapat dimanfaatkan dalam bidang industri yang menggunakan suhu tinggi. Aplikasi di bidang industri memerlukan enzim selulase yang dapat diproduksi dalam jumlah besar dan aktivitas tinggi tetapi dengan biaya yang ekonomis. Selulase yang diproduksi oleh bakteri termofilik menunjukkan stabilitas terhadap suhu tinggi sehingga banyak bermanfaat. Otajevwo & Aluyi (2011) menerangkan bahwa strain bakteri yang tahan kondisi tidak menguntungkan umumnya memproduksi enzim yang stabil pada kondisi ekstrim. Hal ini memungkinkan kenaikan kecepatan hidrolisis enzimatik,

fermentasi, dan pemulihan produk. Oleh karena itu, isolasi dan karakterisasi bakteri yang memproduksi selulase termostabil merupakan aspek penting untuk penelitian biofuel dan produk lainnya. Hasil penelitian Prasad *et al* (2014) menunjukkan enzim-enzim termostabil dapat tahan suhu lebih tinggi sehingga menguntungkan dalam proses industri serta berhasil mengisolasi bakteri termofilik selulolitik *Streptomyces matensis* strain St-5. Vielle & Zeikus (2001) keuntungan enzim termofilik yaitu lebih mudah purifikasi dengan perlakuan panas; termostabilitasnya berkaitan dengan resistensi terhadap denaturasi kimiawi; reaksi enzimatik pada temperatur tinggi memungkinkan konsentrasi substrat lebih tinggi, viskositas lebih rendah, resiko kontaminan lebih sedikit, dan kecepatan reaksi lebih tinggi. Sharma *et al* (2013) mengemukakan keunggulan bakteri sebagai produser selulase yaitu kecepatan pertumbuhan tinggi, ekspresi kompleks multienzim, stabilitas di suhu dan pH ekstrim, feedback inhibisi lebih sedikit, dan kemampuan bertahan pada tekanan lingkungan. Anna R & Evy Y (2012) telah melakukan penelitian mengenai eksplorasi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi sebagai penghasil enzim ekstraseluler. Bakteri termofilik

diambil dari sampel air dan pasir Sungai Gendol Atas kemudian dilakukan isolasi dengan 2 metode yaitu metode *dilution* dan metode *enrichment*. Salah satu enzim yang diteliti yaitu enzim selulase tetapi hanya dibatasi pada suhu inkubasi 70 °C dan hanya mendapatkan 1 isolat yang positif memproduksi selulase. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut pada suhu inkubasi berbeda yaitu 55 °C. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri dapat diketahui dengan menggunakan medium selektif salah satunya yaitu medium Mandels-CMC yang mengandung *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) sebagai sumber karbon.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan : akuades, Nutrien Agar/NA(Oxoid); KH_2PO_4 ; K_2SO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaCl_2 ; NaCl ; Carboxy Methyl Cellulose (CMC); yeast ekstrak; agar; iod

Alat : autoklaf (All American No 25X), erlenmeyer (Pyrex), Gelas beker, hot plate, inkubator (EYELA SU-600N), jangka sorong, Laminair Air Flow/LAF (Shimadzu), lampu spiritus, petridish (Pyrex), pipet ukur, tabung reaksi (Pyrex), timbangan analitik (AND HF-300), ose, oven (UCHIDA IST-150D).

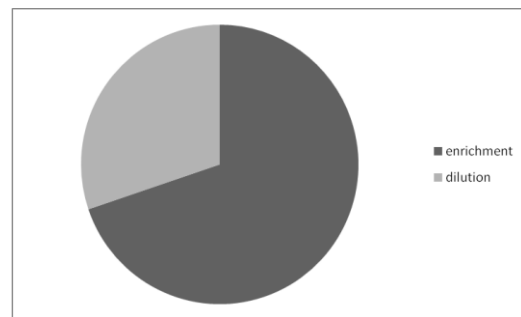
Seleksi dilakukan dengan menumbuhkan 348 isolat bakteri yang telah diremajakan berumur 24 jam pada media selektif Mandels-CMC 0,5% menggunakan sumber selulosa yaitu *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Basuki, 1995). Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada 55 °C, ditetesi larutan 0,1 % larutan iod. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Zona jernih di sekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas selulase (Bragger *et al.*, 1989). Apabila tidak terbentuk zona jernih selanjutnya diukur diameter koloni dengan 3 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Isolat murni bakteri yang diuji sejumlah 348 isolat. Hasil penelitian menunjukkan 255 isolat (73,27%) mampu tumbuh pada media Mandels-CMC 0,5%. Skrining awal uji aktivitas selulase menunjukkan tidak adanya zona jernih di sekitar koloni pada medium Mandels-CMC 0,5% setelah inkubasi 24 jam.

Perbedaan metode isolasi bakteri dari sampel menunjukkan perbedaan jumlah isolat bakteri yang mampu tumbuh pada medium selektif Mandels-CMC 0,5%. Gambar 1 memperlihatkan isolat bakteri hasil isolasi dengan metode *enrichment* (69,8%) lebih banyak yang mampu tumbuh pada media selektif dibandingkan dengan metode *dilution* (30,2%).

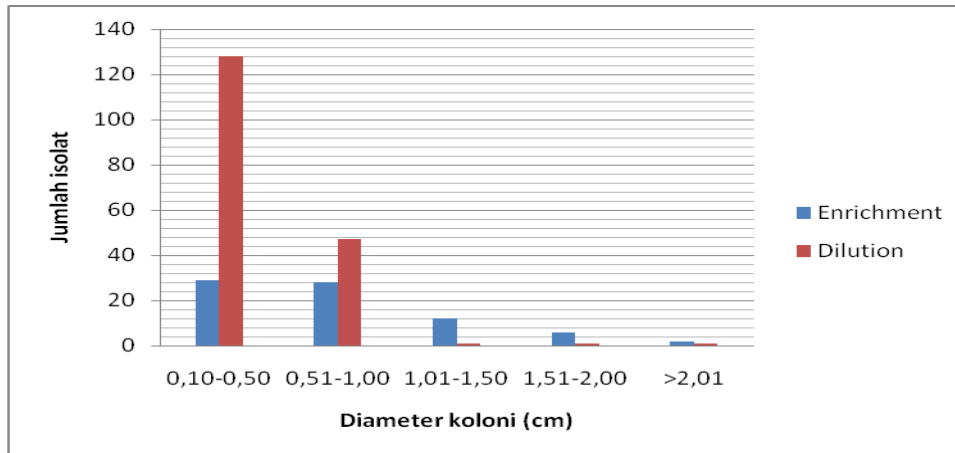


Gambar 1. Diagram persentase isolat hasil isolasi metode *enrichment* dan *dilution* yang mampu tumbuh pada medium Mandels CMC.

Distribusi jumlah koloni yang diisolasi dengan metode *enrichment* dan *dilution* dikelompokkan berdasarkan diameter koloni ditunjukkan pada Tabel 1. Diameter koloni didominasi pada kisaran 0,10-0,50 cm dan yang terkecil >2,01 cm.

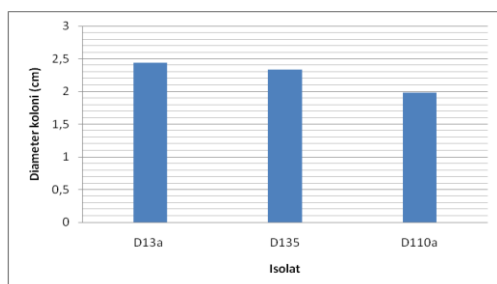
Tabel 1. Diameter koloni isolat bakteri hasil isolasi dengan metode *enrichment* dan *dilution*

Diameter koloni (cm)	Jumlah isolat		Persentase (%)	
	<i>Enrichment</i>	<i>Dilution</i>	<i>Enrichment</i>	<i>Dilution</i>
0,10 - 0,50	29	128	11,37	50,19
0,51 - 1,00	28	47	10,98	18,43
1,01 - 1,50	12	1	4,71	0,39
1,51 - 2,00	6	1	2,35	0,39
>2,01	2	1	0,78	0,39
Total	77	178	30,20	69,80



Gambar 2. Distribusi diameter koloni

Gambar 2. menggambarkan perbedaan metode isolasi mempengaruhi jumlah koloni yang tumbuh pada medium selektif. Metode dilution dominan pada kisaran diameter 0,10-0,50 cm.



Gambar 3. Diameter koloni isolat pada medium Mandels-CMC

Kemampuan tumbuh isolat pada medium selektif ditandai dengan terbentuknya koloni-koloni bakteri dengan diameter yang berbeda ukurannya. Gambar 3 menunjukkan diameter tiga koloni terbesar pada yaitu isolat D13a (2,44 cm); E135 (2,33 cm); dan D110a (1,98 cm).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan 73,27% isolat mampu tumbuh pada medium selektif Mandels-CMC berarti mampu menggunakan CMC sebagai sumber karbon. Hal ini dipengaruhi oleh sumber isolat diperoleh yaitu air dan pasir Sungai Gendol Atas pasca erupsi Merapi. Jumlah isolat yang diperoleh dengan metode isolasi *enrichment* (pengkayaan) lebih banyak dibandingkan metode *dilution* (pengenceran). Metode *enrichment* dilakukan dengan menginkubasi sampel ditambah air Sungai Gendol Atas selama 3 hari sehingga memungkinkan lebih banyak bakteri yang tumbuh. Sedangkan metode *dilution* dilakukan dengan melakukan pengenceran berseri langsung pada sampel. Prasad *et al* (2014) menemukan sampel tanah dapat

digunakan sebagai sumber strain bakteri selulolitik. Hatami *et al* (2008) keberadaan bakteri selulolitik di tanah pertanian lebih berpotensi dibandingkan di tanah hutan ditentukan oleh tipe bahan organik yang terkandung. Ivanen *et al* (2009) meneliti sampel *freshwater* dan tanah merupakan sumber bagus untuk mendapatkan bakteri pendegradasi selulosa setelah melalui tahap *enrichment*. Kazue *et al* (2006) dalam Ibrahim & El-Diwany (2007) isolat bakteri dari sumber air panas yang mampu memproduksi selulase jumlahnya sedikit. Hal ini berkaitan dengan kandungan bahan organik dalam sampel dan pentingnya tahap *enrichment* untuk isolasi enzim penghidrolisis polisakarida.

Isolat bakteri walaupun dapat tumbuh, tetapi tidak menunjukkan adanya zona jernih di sekeliling koloni bakteri pada medium Mandels CMC setelah ditetesi iod. Apabila zona jernih terbentuk menunjukkan adanya degradasi carboxymethylcellulose (CMC) menjadi glukosa. Otajevwu & Aluyi (2011) menggunakan media CMC untuk menumbuhkan bakteri yang bersifat strict aerob, fakultatif aerob, dan anaerob. Wood & Bhat (1988) dalam Shaikh *et al* (2013)

mengemukakan pemilihan CMC sebagai substrat akan menghasilkan enzim yang tinggi karena CMC kompleksitasnya kurang sehingga akan mudah diasimilasi oleh bakteri.

Sadhu, S & T.K. Maiti (2013) menyatakan penentuan aktivitas enzim selulase menggunakan metode agar plate yang digunakan dalam penelitian ini bukan merupakan metode kuantitatif yang menggambarkan korelasi antara aktivitas enzim dan ukuran diameter zona jernih. Koloni bakteri selulolitik *Cytophaga* sp tidak menunjukkan zona jernih sehingga diameter zona jernih mungkin tidak akurat merefleksikan aktivitas selulase yang sebenarnya. Penelitian Siti U. dkk (2011) juga menunjukkan tidak terbentuknya zona jernih sekitar koloni dari isolat bakteri yang diisolasi dari rayap lokal Indonesia. Hal ini disebabkan bakteri biasanya tidak langsung mengeluarkan enzim selulase ke luar sel tetapi masih terperangkap di sel. Ramasamy & Verachtert (1980) dalam Purwadaria dkk (2003) menyatakan β -glukosidase *Pseudomonas* sp dihasilkan pada periplasma tidak disekresikan. Apabila enzim akan diekstrak hanya berasal dari fraksi ekstraseluler, ketidakberadaan enzim ini merugikan karena sangat

berperan dalam aktivitas sinergistik sakarifikasi selulosa bahan alami.

Berdasarkan hasil penelitian maka pemilihan isolat terpilih berdasarkan diameter koloni. Koloni bakteri menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada medium selektif Mandels-CMC. Melzoch *et al* (2004) mengemukakan apabila sel-sel bakteri mengalami pembelahan biner secara setara maka koloni akan tumbuh seperti *disc* (cakram) dengan berat dan radius konstan. Beberapa kasus menunjukkan radius koloni naik secara eksponensial seiring berjalannya waktu. Namun pada umumnya koloni bakteri dengan ukuran pertumbuhan yang terlihat di permukaan media padat tidak menyebar keluar pada laju eksponensial dan diobservasi menggambarkan kenaikan jumlah sel atau massa serta tidak dapat dibandingkan ketika ditumbuhkan pada medium cair. Setelah inokulasi di agar plate maka sel bakteri akan menerima nutrisi dengan konsentrasi di atas nilai limit pertumbuhan. Konsekuensinya koloni akan tumbuh eksponensial. Pada fase eksponensial maka pertumbuhan akan terjadi setara ke semua arah permukaan dan menyebabkan bentuk koloni hemispherical. Selama fase ini akan

terjadi penurunan kandungan nutrisi di bawah koloni dan akhirnya pertumbuhan terhenti.

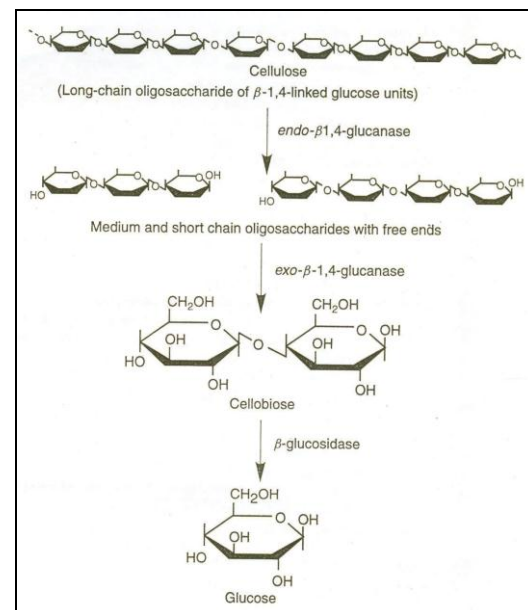
Salah satu faktor yang berpengaruh adalah kompleksitas produksi enzim selulase. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan. Pada penelitian ini semua isolat tumbuh pada media padat Mandels CMC yang mengandung Carboxy Methyl Cellulose 0,5% sebagai komponen inducernya (Meryandini *et al*, 2009). Isolat bakteri selulolitik *Bacillus licheniformis* WBS1 dan *Bacillus* sp WBS3 tidak menunjukkan aktivitas CMCase ketika ditumbuhkan pada CMC sebagai satu-satunya sumber karbon dan sumber N inorganik. Hal ini menunjukkan sumber karbon organik dan nitrogen (N) esensial untuk isolat bakteri. Efektifitas sumber N dari yang terbaik yaitu yeast ekstrak > beef ekstrak > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Achrya & Chaudhary, 2011). Kashem *et al* (2004) juga meneliti efek sumber karbon dan nitrogen terhadap produksi enzim selulase. Induksi maupun represi enzim selulase disebabkan penambahan sumber karbon dan nitrogen berbeda. Hasil penelitian menunjukkan sumber

karbon paling potensial yaitu laktosa untuk avicelase dan β -glucosidase sedangkan NH_4Cl potensi untuk aktivitas CMCase

Sadhu, S & T.K. Maiti (2013) mengemukakan mikroorganisme memproduksi selulase ekstraseluler baik dilepaskan ke luar sel maupun berasosiasi dalam sel untuk selulosa tidak larut dihidrolisis dan dimetabolisme. Enzim selulase merupakan suatu sistem enzim yang diklasifikasikan berdasarkan aksi katalitiknya yaitu endoglukanase (Endo-1,4 β -D-Glucan Glucanohydrolase) aktif mendegradasi selulosa amorf seperti CMC dan selooligosakarida; eksoglukanase (1,4 - β -D-Glucan selobiohydrolase) aktif mendegradasi selulosa kristalin seperti avicel tetapi inaktif terhadap selulosa amorf; β -glucosidase; selobiose; cellobiosyl fosforilase; cellobiose epimerase. Gambar 4 menunjukkan mekanisme degradasi selulosa. Menurut Lynd *et al.* (2002) dan Kodri dkk (2013) mekanisme selulolitik melibatkan 3 reaksi: 1) Endoglukanase memotong secara random sisi amorf internal rantai polisakarida menjadi oligosakarida dengan panjang bervariasi. 2). Eksoglukanase beraksi pada rantai akhir

reduksi atau nonreduksi menjadi glukosa atau selobiosa dan dapat beraksi juga pada selulosa mikrokrystal. 3) β -glucosidase menghidrolisis alodekstrin terlarut dan selobiosa menjadi glukosa

Deacon (1997) mengemukakan bahwa enzim selulase diregulasi sehingga hanya akan disekresi ketika diperlukan. Regulasi dilakukan melalui sistem *feedback* (represi katabolit) yaitu gen yang mengkode enzim akan direpresi ketika substrat yang dapat digunakan (glukosa atau selobiosa) tersedia. Keberadaan selulosa akan menginduksi sintesis enzim selulase,



Gambar 4. Mekanisme degradasi selulosa (Moat et al, 2004 dalam Qozi et al, 2011)

tetapi merupakan senyawa yang tidak dapat larut sehingga tidak dapat menginduksinya. Bakteri memproduksi

enzim selulase dalam level kecil ketika tidak ada glukosa. Produk degradasi tersebut (seperti selobiosa, sophorosa/turunan selobiosa) dapat sebagai sinyal untuk induksi. Oleh karena itu, mekanisme pelepasan enzim selulase merupakan kombinasi represi gen (glukosa, selobiosa dalam level tinggi); penghambatan kompetitif (selobiosa); dan induksi gen (glukosa tidak ada, selobiosa atau turunan dalam level rendah).

KESIMPULAN

1. Bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang mampu menghasilkan enzim selulase sebanyak 255 isolat pada media Mandels-CMC 0,5% suhu inkubasi 55 °C selama 24 jam.
2. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan enzim selulase pada suhu inkubasi 55 °C selama 24 jam lebih banyak diperoleh dengan metode enrichment dibandingkan dilution.
3. Bakteri termofilik pasca erupsi Merapi yang memiliki diameter koloni besar pada media Mandels-CMC 0,5% dengan suhu inkubasi 55 °C selama 24

jam adalah D13a, E135, dan D110a.

SARAN

1. Perlu dilakukan karakterisasi dan identifikasi isolat bakteri termofilik selulolitik sampai tingkat spesies dengan karakter molekuler.
2. Perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim selulase yang dihasilkan isolat bakteri termofilik terpilih.
3. Perlu variasi suhu, pH, substrat, dan waktu inkubasi untuk mengetahui aktivitas selulase paling optimal.
4. Penelitian lebih lanjut mengenai produk-produk bernilai ekonomis yang dapat dihasilkan dari proses degradasi selulosa oleh bakteri termofilik.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, S. and A., Chaudhary. 2011. Effect of Nutritional and environmental Factors on Cellulases activity by Thermophilic Bacteria Isolated From Hot Spring. *Journal of Scientific & Industrial Research*. **70**: 142-148
- Acharya, A., D.R. Joshi., K. Shrestha, and D.R. Bhatta. 2012. Isolation and Screening of Thermophilic Cellulolytic Bacteria from Compost Piles. *Scientific World* **10** (10): 43-46
- Anna Rakhmawati dan Evy Yulianti. 2012. Eksplorasi bakteri termofilik pasca erupsi Merapi sebagai penghasil enzim ekstraseluler. *Jurnal Saintek* **17** (1):

- Basuki, I. Anas, R.S. Hadioetomo, dan T. Purwadaria. 1995. Isolasi dan seleksi kapang termotoleran penghasil selulase untuk pengomposan tandan kosong kelapa sawit. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. **3**(1): 15-19
- Bragger, J.M., Daniel, R.M., Coolbear, T., Morgan, H.W. 1989. Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria., *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**,556-561.
- Deacon, J.W. 1997. *Modern Mycology*. 3rd ed. Blackwell Science. Berlin
- Hatami, S., H.A. Alikhani., H. Besharati., N. Salehrastin., M. Afrousheh, and Z.Y. Jahromi. 2008. Investigation on Aerobic Cellulolytic Bacteria in Some of North Forest and Farming Soils. *American-Eurasian J. Agritec. & Environ. Sci.* **3** (5): 713-716
- Ibrahim A.S.S and Al Dewany. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **1**(4): 473-478
- Ivanen, D.R., N.L. Rongjina, S.M. Shishlyannikov, G.I. Litviakova, L.S. Isaeva-Ivanova, K.A shabalin, and Kulmiskaya, A.a. 2009. Novel Presicipitated fluorescent substrates for the screeningo of cellulolytic microorganisms. *J Microbiol. Methods* **76** (3): 295-300
- Jaradat, Z., Dawagreh A., Ababneh, Q., and Saadoun, I. 2008. Influence of culture Conditions on Cellulase production by Streptomyces sp (Strain J2). *Jordan J Biol Sci*, **1**: 141-146
- Kashem, M.A., M.A., Manchur, M.S. Rahman, and M.N. Anwar. 2004. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production of Reducing Sugars, Extra-cellular Protein and Cellulolytic Enzymes by Two Cellulolytic Bacterial Isolates. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **7** (10): 1660-1663
- Kodri, B.D. Argo, dan R. Yulianingsih. 2013. Pemanfaatan enzim Selulase dari Trichoderma reseei dan aspergillus niger sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimtik Jerami Padi dengan Pretreatment Microwave. *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. **1** (1): 36-45
- Lynd L.R., J.W. Paul, H.V.Willem, and S.P. Isak. 2002. Microbial cellulase utilization *Fundamental & Biotech. Microbial and Mol. Biology*. **66** (3): 506-577
- Meryandini, A, Wahyu W, Besty M., Titi C.S.,Nisa R, dan Hasrul S. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara, Sains*. **13** (1): 33-38
- Prasad, P., Tanuja, and S., Bedi. 2014. Characterization of a Novel Thermophilic Cellulase Prducing Strain streptomyces matensis strain St-5. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **3** (3): 74-88
- Purwadaria, T., P. A. Marbun, A. P. Sinurat dan P. P. Ketaren. 2003. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari bakteri dan kapang hasil isolasi dari rayap. *JITV* **8** (4): 213-219.
- Otajevwo, F.D. and Aluyi, H.S.A. Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium. *Modern Applied Science* **5** (3): 141-151
- Qazi, J.I, N Chaudhary and S S Mirza. 2011. Biofuel from cellulosic Mass with incentive for feed industry employing thermophilic microbes. www.intechopen.com/download/pdf/20064cultural
- Sadhu, S and T.K. Maiti. 2013. Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal* **3** (3): 235-258
- Shaikh, N.M., Patel .A.A., Mehta, S.A. and Patel, N.D. 2013. Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria Inhibiting Different Environment and Optimization of Cellulase Production. *Universal Journal of Environmental Research and Technology* **3** (1): 39-49
- Sharma, N., P. Buragohain, D. Tandon, and R. Kaushal. 2013. Comparative study of Potential cellulolytic and xylanolytic bacteria isolated from Compost and Their Optimization for Industrial Use. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. **19** (3): 284-297
- Singh, S., V.S. Moholkar. And A. Goyal. 2013. Isolation, Identification, and Characterization of a Cellulolytic Bacillus amyloliquefaciens Strain SS35

- from Rhinoceros Dung *ISRN Microbiology*, Article ID 728134
- Siti, U., Anna R, dan Evy Y. 2011. *Identifikasi Bakteri Selulolitik Dari Saluran Pencernaan Rayap Lokal*. Laporan penelitian belum dipublikasikan
- Vieille, C and G.J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65** (1): 1-43