



AKTIVITAS ENZIM ISOLAT BAKTERI SELULOLITIK YANG DIISOLASI DARI CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*) PADA BERBAGAI SUBSTRAT SELULOSA

Antari, N. L. D., I G. L. O. Cakra, I M. Mudita dan I N. S. Utama

Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Udayana, Denpasar

E-mail: dewiantari66@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim dari isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah pada berbagai substrat yang mengandung selulosa telah dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan Universitas Udayana selama 3 bulan. Penelitian dilaksanakan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) 8 perlakuan dan 3 ulangan yaitu isolat bakteri dengan kode EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL dan EB₈CL. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah aktivitas enzim pada substrat CMC (*endo-1,4 glukonase*), avicel (*ekso-1,4-glukanase*), eceng gondok dan daun apu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat dengan kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang lebih tinggi pada berbagai substrat baik substrat sintesis (CMC dan avicel) maupun substrat gulma tanaman pangan (eceng gondok dan daun apu), kecuali pada menit ke-10 pada substrat eceng gondok. Periode menit ke-10, isolat dengan kode EB₆CL mempunyai aktivitas enzim tertinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan isolat lainnya. Periode berikutnya (20 menit, 30 menit, dan 60 menit), isolat dengan kode EB₁CL kembali menghasilkan aktivitas enzim yang tertinggi. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa secara umum isolat bakteri dengan kode EB₁CL merupakan isolat yang mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya.

Kata Kunci: Isolat bakteri, cacing tanah, substrat selulosa, aktivitas enzim

ENZYME ACTIVITIES OF ISOLATE CELLULOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM A EARTHWORM (*Lumbricus rubellus*) ON VARIOUS SUBSTRATES CELLULOSE

ABSTRACT

The research aimed to determine the enzyme activity of cellulolytic bacteria isolated from earthworm on a variety of substrates containing cellulose have been carried out in the Laboratory of Animal Nutrition and Feed Faculty of Animal Science, Udayana University for 3 months. The experiment was conducted with completely randomized design (CRD) 8 treatments and 3 replications by the bacterial isolates with the code EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL and EB₈CL. The variables were observed in this research is the enzyme activity on substrates CMC (*endo-1,4 glucanase*), Avicel (*exo-1,4 glucanase*), duck weed and leaf lettuce. The results showed that isolates with code EB₁CL having cellulase enzyme activity higher on various substrates both synthetic substrates (CMC and Avicel) and substrate weed crops (duck weed and leaf lettuce), except in the 10 minute on a substrate duck weed. Period 10 minutes on substrate duck weed, isolates with code EB₆CL having the highest enzyme activity and significantly different ($P < 0,05$) with other isolates. Period 20 minutes, 30

minutes and 60 minutes, isolates with EB₁CL code again produced the highest enzyme activity. Based on the results of this research concluded that in general the bacterial isolates with code EB₁CL an isolate that has cellulase enzyme activity higher than the other isolates.

Keywords: Isolates bacteria, earthworms, cellulose substrate, enzyme activity

PENDAHULUAN

Optimalisasi pemanfaatan gulma tanaman pangan sebagai pakan ternak merupakan suatu cara untuk menekan biaya produksi dalam pengembangan usaha peternakan. Gulma tanaman pangan mempunyai potensi untuk dapat dimanfaatkan sebagai bahan penyusun pakan ternak ditinjau dari kandungan nutrisi yang cukup memadai, harga yang relatif murah, mudah didapat, serta tidak bersaing dengan kebutuhan manusia. Eceng gondok dan daun apu merupakan salah satu contoh gulma tanaman pangan yang dapat dimanfaatkan sebagai pakan.

Hasil analisis kandungan nutrisi daun apu yang bersumber dari sawah, menunjukkan bahwa protein kasar daun apu sebesar 14,00%; serat kasar 19,71%; lemak kasar 1,54%; abu 19,70% dan kandungan energi termetabolis 1444,47 kkal/kg bahan (Sumaryono, 2003). Radjiman *et al.* (1999) menyatakan bahwa kandungan nutrisi eceng gondok yaitu protein kasar sebesar 13%, lemak kasar 1%, serat kasar 21,30% dan energi termetabolis 2.096,92 kkal/kg. Berdasarkan kandungan nutrisi tersebut, gulma tanaman pangan berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai pakan ternak.

Pemanfaatan gulma tanaman pangan sebagai pakan ternak juga mempunyai faktor pembatas antara lain tingkat pencernaan yang rendah akibat kandungan serat yang cukup tinggi. Serat kasar merupakan bagian dari makanan yang sulit dicerna secara enzimatik (enzim yang dikeluarkan oleh unggas) dan tidak digolongkan sebagai zat makanan (Linder, 1985), sehingga kandungan serat kasar yang cukup tinggi dalam ransum dapat menurunkan produktivitas ternak. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Mudita *et al.* (2009) yang menunjukkan bahwa pemanfaatan ransum berbasis limbah tanpa aplikasi teknologi pengolahan akan menurunkan produktivitas sapi bali maupun kambing dibandingkan dengan pemanfaatan ransum dengan aplikasi teknologi fermentasi maupun suplementasi. Hal ini menunjukkan bahwa, faktor pembatas utama dalam memanfaatkan gulma tanaman pangan sebagai pakan ternak yaitu kandungan serat kasar yang cukup tinggi, antara lain selulosa.

Selulosa merupakan komponen utama dinding sel yang tersusun atas polimer glukosa yang berbentuk rantai linier seragam yang dihubungkan oleh ikatan β -1,4glikosidik (Howard *et al.*, 2003; Hermiawati *et al.*, 2010). Struktur yang linier menyebabkan selulosa bersifat kristalin dan tidak mudah larut, sehingga tidak mudah didegradasi secara kimia maupun

mekanis (Dewantiet *et al.*, 2012). Namun degradasi secara sempurna polimer tersebut mampu menyediakan semua potensi nutrisi yang terkandung dalam bahan pakan asal limbah inkonvensional (Mudita *et al.*, 2014). Selulosa dapat didegradasi secara sempurna dengan bantuan aktivitas enzim *selulase* yang diproduksi oleh mikroorganisme pendegradasi selulosa, antara lain oleh kelompok bakteri selulolitik.

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang mampu menghasilkan enzim *selulase* yang menghidrolisis selulosa menjadi produk yang lebih sederhana yaitu glukosa (Meriyandini *et al.*, 2009). Lynd *et al.* (2002) dan Beauchemin *et al.* (2003) menyatakan bahwa perombakan selulosa secara enzimatik berlangsung karena adanya kompleks enzim *selulase* yang bersifat spesifik untuk menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik, rantai selulosa dan derivatnya melalui beberapa tahapan yang terdiri dari enzim *endo- β -glukanase/CMC-ase*, *eksoglukanase*, dan *β -glukosidase*. Di alam, bakteri selulolitik banyak terdapat pada lahan pertanian, tanah gambut, saluran pencernaan ruminansia, sel tubuh maupun saluran pencernaan hewan invertebrata dan berbagai sumber bakteri lainnya (Watanabe *et al.*, 1998; Purwadaria *et al.*, 2003^{ab}; 2004; Mudita *et al.*, 2009; Anam *et al.*, 2012).

Cacing tanah merupakan hewan invertebrata yang memakan sisa-sisa tumbuhan atau hewan yang mampu mendegradasi bahan organik (Suhartanti *et al.*, 2013). Yurmiati (2006) menyatakan bahwa hasil dari aktivitas cacing tanah pada limbah peternakan adalah pupuk organik *kascing* yang mengandung unsur hara mikro dan makro yang lengkap, sedangkan secara fisik bersifat remah dan mudah diserap tanaman. Hal itu disebabkan karena di dalam saluran pencernaan cacing tanah mengandung berbagai konsorsium mikroba sinergis seperti protozoa, bakteri dan mikro fungi yang mampu mendegradasi senyawa selulosa, antinutrisi dan mengandung berbagai enzim seperti *lipase*, *protease*, *urease*, *selulase*, *amilase*, dan *chitinase* (Patma dan Saktivhel, 2012).

Hasil penelitian Suhartanti *et al.* (2013) menunjukkan bahwa dalam saluran pencernaan cacing tanah dan *kascing* terdapat bakteri selulolitik yang terdeteksi berbentuk batang dan bersifat gram negatif. Bakteri selulolitik dalam saluran pencernaan cacing tanah dapat mendegradasi selulosa, hasil degradasi dari bakteri tersebut bermanfaat untuk meningkatkan senyawa-senyawa yang diperlukan untuk pertumbuhan tanaman atau mikroorganisme lain (Reanida *et al.*, 2012). Berdasarkan hasil penelitian Hadisusanto (1992) dalam Suhartanti *et al.* (2013), hewan invertebrata yang mengkonsumsi sisa-sisa tumbuhan atau hewan yang ada dalam tanah, ditemukan bakteri yang dapat mendegradasi selulosa dalam saluran pencernaan. Bakteri tersebut dapat menghasilkan enzim *selulase* yang dapat memutus ikatan β -1,4 glikosida pada rantai selulosa (Suhartanti *et al.*, 2013). Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini

dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim *selulase* isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah pada berbagai substrat yang mengandung selulosa. Melalui penelitian ini diharapkan memperoleh isolat bakteri ungu asal cacing tanah berdasarkan aktivitas enzim yang dimilikinya sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi inokulan sebagai fermentor dalam produksi pakan berbasis limbah pertanian dan produksi pupuk organik.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Lama Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Udayana selama 3 bulan.

Isolat Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Cacing Tanah

Penelitian ini memanfaatkan delapan isolat bakteri selulolitik (belum teridentifikasi) hasil isolasi dari cacing tanah dengan kode EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL dan EB₈CL yang merupakan hasil penelitian dari Mudita (2015).

Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu substrat selulosa, medium cair, larutan buffer asetat 50 mM pH 5,5, larutan pengencer, larutan DNS. Sedangkan alat yang digunakan adalah *laminar air flow*, *water bath*, inkubator 39°C, mikropipet, pengaduk magnetik, fortex, timbangan elektrik, penggilingan, autoklaf, *sentrifuse*, *spectrophotometer uv-vis*, *drough force oven*, lampu uv, desikator, dan alat-alat gelas.

Prosedur Kerja

a. Produksi substrat gulma tanaman pangan

Eceng gondok dan daun apu dikeringkan terlebih dahulu dalam *forced draught oven weight* pada suhu 70°C selama 36-48 jam (sampai tercapai berat kering udara/*Dry Weight/DW* yang ditandai dengan berat sampel tidak mengalami perubahan lagi jika pengovenan dilanjutkan pada suhu yang sama). Kemudian setiap sampel bahan substrat tersebut digiling halus dengan gilingan bersaringan 1 ml. Selanjutnya sampel bahan substrat disterilisasi dengan sinar UV dalam *laminar air flow* untuk mencegah kontaminasi.

b. Pembuatan medium cair

Medium pertumbuhan cair untuk isolat-isolat bakteri asal cacing tanah dibuat menggunakan 2,98 g FTM ditambah 0,5 g CMC dan aquadest hingga volume 100 ml. Semua bahan dimasukkan dalam *erlenmeyer* dan dihomogenkan dengan cara di fortex pada suhu

pada T 100°C selama 5 menit. Selanjutnya disterilisasi pada *autoclave* pada temperature 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan larutan buffer asetat 50 mM pH 5,5

Larutan buffer asetat 50 mM pH 5,5 dibuat dengan cara setiap 1 liter buffer asetat 50mM pH 5,5 yaitu 6,804 gram CH₃COONa yang dilarutkan dalam aquades dan ditambahkan asam asetat hingga pH menjadi 5,5. Kontrol pH larutan menggunakan pH meter serta total larutan akhir larutan sebanyak 1 liter.

Pembuatan larutan pengencer

Larutan pengencer merupakan medium No. 14 Bryant and Burkey (Ogimoto dan Imai, 1981), dengan komposisi 7,5 ml mineral I, 7,5 ml mineral II, 0,05 g HCl-cystein, 0,3 g Na₂CO₃, 0,1 ml larutan rezasurin 0,1%, 100 ml H₂O. Seluruh bahan dicampur dalam tabung *enlenmeyer* dan disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 45-50°C, tabung dialiri dengan gas CO₂ sampai indikator rezasurin berubah dari warna pink menjadi tidak berwarna, kemudian ditutup dengan penutup karet steril dan disimpan dalam refrigenerator (lemari es) sebagai sediaan.

Larutan mineral yang dibuat merupakan formula No. 32 Bryant and Burkey (Ogimoto and Imai, 1981) yang dibuat dengan cara: Larutan Mineral I adalah dengan menimbang 6 g K₂HPO₄ dan melarutkannya dalam 1 liter aquades. Sedangkan Larutan Mineral II dibuat dengan cara;menimbang 6 g KH₂PO₄, 12 g (NH₄)₂SO₄, 12 g NaCl, 2,5 g MgSO₄·7H₂O, 1,2 g CaCl₂ dalam 1 liter aquades.

e. Pembuatan larutan DNS (Dinitrosalisilat)

Larutan DNS yang digunakan dalam pengukuran kadar glukosa menggunakan 2 jenis larutan yaitu larutan 1 menggunakan NaOH dan aquades, sedangkan larutan 2 menggunakan Na K Tartrat, Na-Meta-biSulfit dan aquades. Komposisi dalam pembuatan 100 ml larutan 1 yaitu 8 gram NaOH ditambah aquades sampai mencapai volume 100 ml. Sedangkan komposisi dalam pembuatan 250 ml larutan 2 menggunakan 15 g Na K tartrat ditambah 4 g Na-Meta-biSulfit serta aquades sampai mencapai volume 250 ml. Komposisi larutan DNS dalam pembuatan 500 ml menggunakan 100 ml larutan 1 dan 250 ml larutan 2 dicampur sampai homogen, ditambahkan 5 g DNS serta aquades sampai mencapai volume 500 ml.

e. Uji aktivitas enzim *selulase*

Seleksi kemampuan aktivitas enzim dari isolat bakteri selulolitik dilakukan pada 4 jenis substrat, yaitu: (1) substrat CMC, (2) avicel, dan (3) enceng gondok dan (4) daun apu. Seleksi ini didasarkan pada besarnya aktivitas enzim *selulase* yang dihasilkan oleh tiap isolat

bakteri. Pengujian aktivitas enzim pada tiap substrat dilakukan dengan 3 kali pengulangan untuk mendapatkan hasil yang baik. Seleksi dilaksanakan dengan cara terlebih dahulu menumbuhkan isolat bakteri selulolitik yang telah diisolasi pada medium selektif padat ke dalam medium pertumbuhan cair selulosa dan/atau medium pertumbuhan cair selektif yang telah disiapkan. Isolat bakteri dari medium padat dilarutkan dalam larutan pengencer pada absorbansi 0,5 dengan panjang gelombang 600 nm dan diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam tabung *erlenmeyer* yang telah berisi medium pertumbuhan cair tersebut. Kemudian diinkubasikan pada suhu 39°C selama 5 hari dan setiap hari digojok. Kultur medium cair inilah yang selanjutnya digunakan sebagai sumber enzim *selulase*.

Pengambilan ekstrak enzim dilakukan dengan cara mensentrifuse kultur medium cair pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Ekstrak enzim sesuai jenis mediumnya diuji pada beberapa substrat, masing-masing mengandung 1% substrat CMC/Avicel/substrat gulma tanaman pangan (daun apu dan eceng gondok) dalam buffer asetat 50 mM, pH 5,5. Masing-masing larutan substrat dalam buffer diambil 8 ml, ditambahkan 1 ml sumber enzim dan 1 ml aquades. Campuran larutan dihomogenkan dengan *fortex*, kemudian diukur aktivitasnya setelah 10 menit, 20 menit, 30 menit, dan 60 menit diinkubasi dengan substrat. Pengukuran aktivitas spesifik dilakukan dengan cara menghitung banyaknya produk yang dihasilkan dari reaksi enzim tersebut. Produk yang diukur adalah gula reduksi (glukosa untuk sumber selulosa). Pengukuran produk yang dihasilkan dilakukan dengan cara sebagai berikut: untuk gula reduksi, pengukuran dilakukan dengan cara mengambil 1 ml sampel ditambahkan pada 3 ml reagen dinitrosalisilat (DNS) dan 1 ml aquades, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 508,5 nm untuk glukosa. Aktivitas enzim diukur menggunakan persamaan $Y = 0,00622X + 0,14277$ (Partama, 2012).

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 8 perlakuan dan 3 ulangan masing-masing substrat, sehingga terdapat 24 unit percobaan. Masing-masing unit percobaan di evaluasi tingkat aktivitas enzim *selulase* yang dihasilkan pada substrat selulosa (CMC, avicel, daun apu dan eceng gondok).

Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati dalam penelitian ini meliputi:

- a. Aktivitas enzim *selulase* pada substrat CMC setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit

- b. Aktivitas enzim *selulase* pada substrat avicel setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit
- c. Aktivitas enzim *selulase* pada substrat eceng gondok setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit
- d. Aktivitas enzim *selulase* pada substrat daun apu setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam/Anova. Apabila pengujian dengan sidik ragam terdapat hasil berbeda nyata ($P < 0,05$), maka analisis dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncans (Sastrasupadi, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 10 menit pada substrat CMC mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4 glukonase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₃CL, EB₈CL. Setelah diinkubasi selama 20 menit pada substrat CMC, isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4 glukonase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan isolat kode EB₂CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL, EB₈CL. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada substrat CMC, isolat EB₆CL mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4 glukonase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₇CL, EB₈CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₁CL. Setelah diinkubasi selama 60 menit pada substrat CMC, isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4 glukonase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₃CL, EB₈CL (Tabel 1).

Isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *ekso-1,4-glukanase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₃CL, EB₇CL, EB₈CL setelah diinkubasi selama 10 menit pada substrat avicel. Isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *ekso-1,4-glukanase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₃CL, EB₈CL setelah diinkubasi selama 20 menit pada substrat avicel. Setelah

diinkubasi selama 30 menit pada substrat avicel, isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *ekso-1,4-glukanase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₇CL, EB₈CL. Isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 60 menit pada substrat avicel, mempunyai aktivitas enzim *ekso-1,4-glukanase* yang nyata lebih ($P < 0,05$) tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₆CL, EB₇CL, EB₈CL (Tabel 1).

Isolat kode EB₆CL setelah diinkubasi selama 10 menit pada substrat eceng gondok mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata lebih ($P < 0,05$) tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₇CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₁CL. Setelah diinkubasi selama 20 menit, isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₃CL, EB₆CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₂CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₇CL, dan EB₈CL. Isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 30 menit mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₇CL, EB₈CL. Isolat EB₁CL setelah diinkubasi selama 60 menit mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₇CL dan EB₈CL (Tabel 1).

Isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 10 menit pada substrat daun apu mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₂CL, EB₆CL, EB₇CL, EB₈CL. Isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 20 menit mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₄CL dan EB₈CL. Isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 30 menit mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL, namun berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan isolat kode EB₈CL. Isolat kode EB₁CL setelah diinkubasi selama 60 menit mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat kode EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, namun berbeda tidak nyata dengan isolat EB₇CL, EB₈CL (Tabel 1).

Tabel 1. Aktivitas enzim *selulase* isolat bakteri selulolitik asal cacing tanah

Variabel	Isolat ¹								SEM ³
	EB ₁ CL	EB ₂ CL	EB ₃ CL	EB ₄ CL	EB ₅ CL	EB ₆ CL	EB ₇ CL	EB ₈ CL	
Aktivitas Enzim pada Substrat CMC									
10 menit	0,059 ^c	0,031 ^a	0,051 ^{bc}	0,034 ^a	0,042 ^{ab}	0,041 ^{ab}	0,041 ^{ab}	0,050 ^{bc}	0,0046
20 menit	0,101 ^b	0,071 ^a	0,092 ^b	0,090 ^b	0,098 ^b	0,097 ^b	0,090 ^b	0,095 ^b	0,0040
30 menit	0,080 ^{cd}	0,056 ^a	0,075 ^{bc}	0,072 ^b	0,074 ^b	0,084 ^d	0,072 ^b	0,076 ^{bc}	0,0019
60 menit	0,052 ^d	0,032 ^a	0,047 ^{cd}	0,045 ^{bc}	0,042 ^b	0,046 ^{bc}	0,046 ^{bc}	0,049 ^{cd}	0,0014
Aktivitas Enzim pada Substrat Avicel									
10 menit	0,074 ^c	0,044 ^{ab}	0,059 ^{bc}	0,027 ^a	0,038 ^{ab}	0,025 ^a	0,049 ^{abc}	0,060 ^{bc}	0,0090
20 menit	0,065 ^e	0,035 ^a	0,054 ^{cde}	0,039 ^{ab}	0,050 ^{bcd}	0,053 ^{cd}	0,049 ^{bc}	0,061 ^{de}	0,0036
30 menit	0,070 ^d	0,056 ^b	0,063 ^c	0,045 ^a	0,048 ^a	0,055 ^b	0,066 ^{cd}	0,067 ^{cd}	0,0020
60 menit	0,047 ^e	0,032 ^a	0,043 ^{cd}	0,037 ^b	0,042 ^c	0,046 ^e	0,045 ^{de}	0,046 ^e	0,0008
Aktivitas Enzim pada Substrat Eceng Gondok									
10 menit	0,151 ^b	0,117 ^{ab}	0,102 ^a	0,105 ^a	0,102 ^a	0,189 ^c	0,128 ^{ab}	0,145 ^b	0,0113
20 menit	0,144 ^c	0,129 ^{bc}	0,094 ^a	0,129 ^{bc}	0,139 ^c	0,122 ^b	0,137 ^{bc}	0,141 ^c	0,0048
30 menit	0,130 ^d	0,104 ^{ab}	0,102 ^a	0,109 ^{ab}	0,113 ^{bc}	0,103 ^{ab}	0,122 ^{cd}	0,126 ^d	0,0031
60 menit	0,069 ^b	0,061 ^a	0,062 ^a	0,058 ^a	0,061 ^a	0,061 ^a	0,066 ^b	0,067 ^b	0,0013
Aktivitas Enzim pada Substrat Daun Apu									
10 menit	0,225 ^d	0,202 ^{bcd}	0,152 ^a	0,179 ^{abc}	0,168 ^{ab}	0,189 ^{abcd}	0,194 ^{bcd}	0,218 ^{cd}	0,0128
20 menit	0,162 ^d	0,137 ^a	0,135 ^a	0,156 ^{bcd}	0,152 ^{bc}	0,143 ^{ab}	0,150 ^b	0,156 ^{cd}	0,0035
30 menit	0,141 ^d	0,117 ^b	0,102 ^a	0,132 ^c	0,130 ^c	0,131 ^c	0,131 ^c	0,138 ^{cd}	0,0025
60 menit	0,114 ^b	0,079 ^a	0,088 ^a	0,084 ^a	0,084 ^a	0,083 ^a	0,095 ^{ab}	0,095 ^{ab}	0,0062

Keterangan:

1. Variabel yang diamati.
2. EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL, EB₈CL merupakan kode isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah.
3. Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P > 0,05$)
4. SEM = *Standard Error of The Treatment Means*

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas enzim *selulase* dari isolat-isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah menunjukkan bahwa semua isolat yang digunakan dalam penelitian ini mampu menghasilkan aktivitas enzim pada substrat sintesis (CMC dan avicel) dan substrat gulma tanaman pangan (eceng gondok dan daun apu). Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat-isolat bakteri asal cacing tanah mampu mendegradasi selulosa menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu glukosa karena uji aktivitas enzim ini dilakukan untuk mengetahui banyaknya selulosa yang bisa dihidrolisis secara enzimatik menjadi glukosa. Semakin tinggi aktivitas enzim yang dihasilkan maka semakin banyak selulosa yang mampu dihidrolisis menjadi glukosa. Maranatha (2008) menyatakan bahwa setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim *selulase* yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan.

Substrat *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) merupakan substrat selulosa murni yang berbentuk *amorphous* sehingga aktivitas enzim *selulase* pada substrat CMC merupakan aktivitas enzim *endo-1,4-β-glukanase* (Meryandini *et al.*, 2009). *Endo-1,4-β-glukanase* bekerja pada rantai dalam CMC menghasilkan oligosakarida atau rantai selulosa yang lebih

pendek. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiap-tiap isolat bakteri selulolitik asal cacing tanah pada substrat CMC mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4-β-glukanase* yang berbeda-beda. Perbedaan aktivitas enzim yang dimiliki oleh tiap isolat asal cacing tanah pada keadaan lingkungan yang sama diduga dipengaruhi oleh faktor genetik, namun dalam penelitian ini belum mengidentifikasi spesies tiap isolat. Sumardi *et al.* (2010) menyatakan bahwa faktor genetik mempengaruhi besarnya produksi enzim. Gen setiap mikroorganisme berbeda-beda sehingga masing-masing mikroorganisme memiliki sifat yang berbeda dan dari tiap gen memiliki sifat yang spesifik untuk mengkode enzim-enzim tertentu (Sumardi *et al.*, 2010). Isolat kode EB₁CL diduga mempunyai gen-gen penghasil enzim *endo-1,4-glukanase* yang lebih baik dibandingkan dengan isolat lainnya karena mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4-β-glukanase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan isolat lainnya setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit dan 60 menit, namun setelah diinkubasi selama 30 menit mempunyai aktivitas enzim *endo-1,4-β-glukanase* yang lebih rendah dibandingkan isolat EB₆CL namun secara statistik berbeda tidak nyata ($P > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa isolat EB₆CL lebih lambat dalam menurunkan aktivitas enzimnya setelah mencapai waktu optimum enzim dalam memproduksi glukosa dibandingkan isolat EB₁CL. Hal itu menunjukkan bahwa isolat kode EB₁CL dan EB₆CL memiliki genetik yang lebih baik dalam memproduksi enzim *endo-1,4-glukanase* sehingga mampu mendegradasi selulosa yang bersifat *amorphous* menjadi senyawa yang lebih sederhana. Hal ini berarti kedua isolat tersebut mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai *starter* pendegradasi senyawa bahan pakan yang mengandung selulosa.

Substrat avicel merupakan substrat selulosa yang berbentuk kristalin sehingga aktivitas enzim *selulase* pada substrat avicel merupakan aktivitas enzim *ekso-1,4-β-glukanase* (Meryandani *et al.*, 2009). Enzim tersebut bekerja memotong ujung rantai oligosakarida menjadi selobiosa, yaitu dua molekul glukosa yang berikatan secara β -1,4-glikosidik (Meryandani *et al.*, 2009). Isolat bakteri EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *ekso-1,4-glukanase* yang nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit pada substrat. Hal ini diduga disebabkan karena isolat EB₁CL mempunyai gen-gen penghasil enzim *ekso-1,4-glukanase* yang lebih baik sehingga mempunyai aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. Isolat EB₁CL juga mempunyai aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya pada substrat CMC. Hal ini menunjukkan bahwa isolat EB₁CL mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam mendegradasi selulosa yang bersifat kristalin dan *amorphous* menjadi senyawa yang lebih sederhana dibandingkan isolat lainnya, sehingga isolat EB₁CL mampu

mendegradasi selulosa secara utuh. Hal ini berarti isolat tersebut mempunyai potensi yang tinggi untuk dimanfaatkan sebagai *starter* pendegradasi bahan pakan yang mengandung selulosa.

Substrat eceng gondok dan daun apu merupakan substrat selulosa yang tidak murni. Kandungan serat kasar dari eceng gondok yaitu 21,30% (Radjiman *et al.*, 1999) dan 19,71% pada daun apu (Sumaryono, 2003). Menurut Ahmed *et al.* (2012), kandungan kimia serat kasar eceng gondok yaitu 60% selulosa, 8% hemiselulosa dan 17% lignin. Kandungan serat kasar yang cukup tinggi dalam bahan pakan sulit untuk didegradasi karena semakin banyak senyawa lignin membungkus komponen selulosa dan hemiselulosa. Meryandani *et al.* (2009) menyatakan bahwa selulosa terbungkus dan terikat secara ikatan kovalen maupun non-kovalen pada lignin dan hemiselulosa. Hemiselulosa dan lignin akan mengganggu aktivitas enzim *selulase* yang hanya spesifik memotong ikatan β -1,4-glikosidik pada selulosa (Meryandani *et al.*, 2009). Eceng gondok dan daun apu yang digunakan sebagai substrat selulosa dalam uji aktivitas enzim *selulase* yaitu dalam bentuk serbuk atau telah melalui proses penggilingan yang bertujuan untuk meningkatkan luas permukaan substrat. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Meryandani *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa untuk meningkatkan luas permukaan substrat maka jerami padi, tongkol jagung dan kulit pisang diperkecil ukurannya sampai 65 mesh.

Isolat kode EB₆CL setelah diinkubasi selama 10 menit pada substrat eceng gondok mempunyai aktivitas enzim yang lebih tinggi dan berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan isolat lainnya (EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₇CL, EB₈CL). Namun isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya setelah diinkubasi selama 20 menit, 30 menit, dan 60 menit pada substrat. Hal ini menunjukkan bahwa isolat EB₁CL lebih konsisten mempertahankan aktivitas enzim *selulase* yang dimilikinya dengan penambahan waktu setelah mencapai waktu optimum dibandingkan dengan isolat EB₆CL. Isolat EB₁CL juga mempunyai aktivitas enzim yang lebih tinggi pada substrat sintesis (CMC dan avicel) dan isolat EB₆CL juga mempunyai aktivitas enzim yang tinggi pada substrat CMC sehingga isolat tersebut mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam mendegradasi selulosa dari eceng gondok dibandingkan isolat lainnya. Hal ini berarti kedua isolat tersebut mempunyai potensi yang tinggi untuk dimanfaatkan sebagai *starter* pendegradasi bahan pakan yang mengandung selulosa.

Isolat kode EB₁CL mempunyai aktivitas enzim yang lebih tinggi dibandingkan isolat EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL dan EB₈CL setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit pada substrat daun apu. Isolat EB₁CL juga

mempunyai aktivitas enzim yang lebih tinggi pada substrat sintetis (CMC dan avicel) sehingga isolat tersebut mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam mendegradasi selulosa dari daun apu menjadi senyawa yang lebih sederhana. Hal ini menunjukkan bahwa isolat EB₁CL mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai *starter* pendegradasi bahan pakan yang mengandung selulosa.

Isolat EB₁CL setelah diinkubasi selama 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit pada substrat eceng gondok mempunyai aktivitas enzim *selulase* yang lebih rendah dibandingkan pada substrat daun apu. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kandungan serat kasar dari eceng gondok lebih tinggi dibandingkan dengan daun apu. Kandungan serat kasar yang cukup tinggi dalam bahan pakan sulit untuk didegradasi karena semakin banyak senyawa lignin membungkus komponen selulosa dan hemiselulosa. Menurut Meryandani *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa hal yang menghambat aktivitas *selulase* pada substrat jerami padi dan tongkol jagung adalah komponen lignin karena lignin membungkus dan mengikat selulosa secara fisik sehingga menghalangi enzim *selulase* bekerja maksimal pada substrat.

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas enzim *selulase* dari isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah menunjukkan bahwa aktivitas enzim *selulase* tiap isolat lebih tinggi pada substrat gulma tanaman pangan dibandingkan substrat selulosa sintetis. Hal ini disebabkan karena kandungan selulosa pada substrat sintetis lebih tinggi dibandingkan dengan substrat gulma tanaman pangan, serta dalam substrat gulma tanaman pangan terdapat senyawa pati dan hemiselulosa yang kemungkinan didegradasi membentuk glukosa sehingga glukosa yang terbentuk lebih banyak dibandingkan selulosa sintetis. Hal ini sesuai dengan pendapat Meryandani *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa aktivitas enzim *selulase* yang lebih tinggi pada substrat limbah pertanian dibandingkan dengan selulosa sintetis kemungkinan disebabkan oleh adanya enzim hemiselulolitik pada ekstrak kasar yang diproduksi oleh bakteri. Han *et al.* (2003) menyatakan bahwa bakteri *Clostridium cellulovorans* mensintesis enzim hemiselulolitik saat tumbuh pada substrat selulosa seperti selobiosa. Han *et al.* (2003) juga mengungkapkan bahwa ekspresi enzim *selulase* berhubungan dengan ekspresi enzim *hemiselulase* (*xylanase*). Kemungkinan hal ini juga terjadi pada isolat yang digunakan dalam penelitian ini.

Penurunan aktivitas enzim *selulase* yang dihasilkan oleh isolat bakteri yang diisolasi dari cacing tanah (EB₁CL, EB₂CL, EB₃CL, EB₄CL, EB₅CL, EB₆CL, EB₇CL dan EB₈CL) terjadi setelah diinkubasi selama 30 menit pada substrat CMC dan semakin lama waktu inkubasi maka semakin rendah aktivitas enzim yang dihasilkan. Penurunan aktivitas enzim

yang dihasilkan oleh tiap isolat pada substrat daun apu terjadi setelah kontak selama 20 menit dan semakin lama waktu inkubasi maka semakin rendah aktivitas enzim yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Susanti (2011) yang menyatakan bahwa apabila waktu reaksi enzimatik telah mencapai optimum dalam menghasilkan produk yang maksimum maka aktivitas enzim mengalami penurunan dengan penambahan waktu inkubasi lebih lanjut. Susanti (2011) juga menyatakan bahwa produk gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatik sebanding dengan lama waktu inkubasi, tetapi jika sisi aktif enzim telah jenuh oleh substrat maka penambahan waktu inkubasi kurang berpengaruh terhadap jumlah produk.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Simpulan penelitian ini adalah semua isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah mampu mendegradasi selulosa dan isolat EB₁CL merupakan isolat unggul karena secara umum isolat tersebut mempunyai aktivitas enzim yang tinggi pada berbagai substrat baik substrat sintesis maupun substrat gulma tanaman pangan.

Saran

Saran yang dapat disampaikan berdasarkan hasil penelitian ini adalah kepada peneliti untuk memanfaatkan isolat EB₁CL dalam memproduksi bioinokulan sebagai fermentor dalam produksi pakan berbasis limbah pertanian dan produksi pupuk organik oleh masyarakat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada bapak Andi Udin Saransi; Dr. Ir. I Nyoman Tirta Ariana, MS dan Dr. Ir. Ni Wayan Siti, M.Si yang telah membantu penulis dari awal penelitian sampai akhir penulisan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, A.F., Moahmed A., Abdel Naby.2012. Pretreatment and enzymic saccharyfication of water hyacinth cellulose. Carbohydrate polymers.
- Anam,M., W.Darmanto, Tri P.N.N., dan Suwarno, 2005.Isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik dengan aktivitas tinggi dalam saluran pencernaan keong emas (*Pomacea canaliculata*). Anim. JBPVol. 14: 86-92.
- Beauchemin, K.A., D. Colombatto, D.P. Morgavi And W.Z. Yang. 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. J. Anim. Sci. 81 (E. Suppl. 2): E37-E47.

- Dewanti, R., M.Irham, dan Sudiyono, 2013. Pengaruh Penggunaan Enceng Gondok (*Eichornia crassipes*) Terfermentasi dalam Ransum Terhadap Persentase Karkas, Non-Karkas, dan Lemak Abdominal Itik Lokal Jantan Umur Delapan Minggu. Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Dewi, G.A.M.K., I W. Wijana, N W. Siti, I M. Mudita. 2014. Pengaruh Penggunaan Limbah Dan Gulma Tanaman Pangan Melalui Produksi Biosuplemen Berprobiotik Berbasis Limbah Isi Rumen Terhadap Ternak Itik Bali. Laporan Penelitian Tahap I. Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Han, S.O., H. Yukawa, M. Inui, R. H. Doi. 2003. Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *lostridium cellulovorans*. *J Bakteriol* 185 (20): 6067-6075.
- Hermiawati, E., D.Mangunwidjaja, T.C.Sunarti, O.Suparno dan B.Prasetya. 2010. Pemanfaatan biomassa lignoselulosa ampas tebu untuk produksi bioetanol. *Jurnal Litbang Pertanian*, 29(4), 2010.
- Howard, R.L., E. Abotsi, E. L. Jansen van Rensburg and S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (12), pp. 602-619.
- Maranatha, B. 2008. Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian. Skripsi. FMIPA Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Meryandini, A., W. Wahyu, M. Besty, C. S. Titi, R. Nisa, dan S. Hasrul .2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara, Sains*, Vol. 13, No. 1, 33-38.
- Mudita, I M., I G.L.O.Cakra, A. A.P.P.Wibawa, dan NW. Siti. 2009. Penggunaan Cairan Rumen Sebagai Bahan Bioinokulan Plus Alternatif serta Pemanfaatannya dalam Optimalisasi Pengembangan Peternakan Berbasis Limbah yang Berwawasan Lingkungan. Laporan Penelitian Hibah Unggulan Udayana, Universitas Udayana, Denpasar.
- Mudita, I M., I. Wirawan, A. A. P. P. Wibawa, dan I. B. G. Partama. 2014. Kemampuan Degradasi Senyawa Lignoselulosa Dari Isolat Bakteri Limbah Isi Rumen Sapi Bali. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan, Universitas Udayana, Denpasar.
- Ogimoto, K. and S. Imai. 1981. *Atlas of Rumen Microbiology*. Japan Scientific Societies Press. Tokyo.
- Linder M.C. 1985. *Biokimia Nutrisi dan Metabolisme*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. V. Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology Reviews*: 506-577. American Society for Microbiology.
- Partama, I. B. G., I M. Mudita, N W. Siti, I W. Suberata, A. A. A. S. Trisnadewi. 2012. Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Bakteri Serta Fungi Lignoselulolitik Limbah Isi Rumen dan Rayap sebagai Sumber Inokulan dalam Pengembangan Peternakan Sapi Bali Berbasis Limbah. Laporan Penelitian Invensi. Fakultas Peternakan, Universitas Udayana. Denpasar.
- Pathma, J. and N. Sakthivel. 2012. Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *springerplus*. Vol.1(26);1-19.

- Purwadaria, T., Pesta A. Marbun, Arnold P. Sinurat dan P. Ketaren. 2003a. Perbandingan aktivitas enzim selulase dari bakteri dan kapang hasil isolasi dari rayap. JITV Vol. 8 No. 4 Th 2003:213-219.
- Purwadaria, T., Pius P. Ketaren, Arnold P. Sinurat, and Irawan Sutikno. 2003b. Identification and evaluation of fiber hydrolytic enzymes in the extract of termites (*glyptotermes montanus*) for poultry feed application. Indonesian Journal of Agricultural Sciences 4(2) 2003; 40-47.
- Purwadaria, T., T., Puji Ardiningsip, Pius P. Ketaren dan Arnold P. Sinurat. 2004. Isolasi dan penapisan bakteri xilanolitik mesofil dari rayap. Jurnal Mikrobiologi Indonesia, Vol. 9, No. 2. September 2004, hlm. 59-62
- Radjiman, D. A., T. Sutardi, dan L. E. Aboenawan. 1999. Efek Substitusi Rumput Gajah dengan Eceng Gondok dalam Ransum Domba terhadap Kinerja proses Nutrisi dan Pertumbuhan. Laporan Penelitian, Fakultas peternakan, Institut Pertanian Bogor.
- Reanida, P. Supriyanto dan Salamun. 2012. Eksplorasi Bakteri Selulolitik Dari Tanah Mangrove Wonorejo Surabaya. Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang pertanian. Edisi Revisi. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Sumardi, Christina Nugroho Ekowati dan Dwi Haryani. 2010. Isolasi bacillus penghasil selulase dari saluran pencernaan ayam kampung. Jurusan Biologi FMIPA Unila. J. Sains MIPA, Vol. 16, No. 1, Hal.: 62-68.
- Sumaryono. 2003. Kajian Penggunaan Tepung Kayu Apu (*Pistia Stratiotes*) dalam Ransum dan Pengaruhnya terhadap Komposisi Fisik Karkas Ayam Kampung Umur 11 Minggu. Skripsi, Fakultas Peternakan, Universitas Udayana, Denpasar.
- Suhartanti, D., Anggara, D.E., dan Susanti, 2013. Deteksi Bakteri Selulolitik dari Usus dan Kacing Cacing Tanah (*Lumbricus terrestris*). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Ahmad Dahlan.
- Susanti, Evi. 2011. Optimasi Produksi dan Karakteristik Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* starin Lokaldengan Induser Avicel. Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Malang.
- Watanabe H, Noda H, Tokuda G, Lo N. 1998. A cellulase gene of termite origin. Nature 394: 330-331.
- Yurmiati, H. 2006. Biokonversi Limbah Terhadap Biomassa Pupuk Organik Dan Cacing Tanah (*Pheretima Asiatica*) Pada C/N Berbeda. Faculty of Animal Husbandry, Padjadjaran University, Indonesia.