

## OPTIMASI SUHU, pH DAN AMOBILISASI SELULASE DARI KONSORSIUM MIKROBA SELULOLITIK (KMS.UU1a) PADA KALSIUM ALGINAT

Ro'yal Aini<sup>1</sup>, I Nengah Wirajana<sup>1,2\*</sup>, Ketut Ratnayani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Magister Kimia, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia 80361  
royalaini03@gmail.com

<sup>2</sup> Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Bali-Indonesia 80361

\*nengah\_wirajana@unud.ac.id

ratnayaninew@gmail.com

**ABSTRAK:** Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui suhu dan pH optimum selulase dari konsorsium mikroba selulolitik KMS.UU1a dalam kondisi bebas dan teramobilisasi, konsentrasi kalsium alginat optimum untuk amobilisasi selulase, serta keberulangan (*reusability*) dan efisiensi selulase teramobilisasi. Pengukuran aktivitas selulase dilakukan berdasarkan kandungan gula pereduksi sebelum dan sesudah reaksi enzimatis dengan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS). Aktivitas selulase KMS.UU1a baik dalam kondisi bebas dan teramobilisasi diuji pada suhu 35, 40, 45, 50, 55 dan 60 °C; dan pH 4, 5, 6, 7, 8, dan 9. Konsentrasi sodium alginat yang digunakan dalam proses amobilisasi selulase KMS.UU1a adalah 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 dan 3,0 % (b/v) dalam CaCl<sub>2</sub> 0,15 M. Uji keberulangan dilakukan dengan mengukur aktivitas selulase KMS.UU1a amobil pada 4 (empat) kali pemakaian enzim, sedangkan efisiensi diketahui dari uji aktivitas selulase bebas sebelum dan setelah amobilisasi. Konsentrasi kalsium alginat optimum untuk amobilisasi selulase KMS.UU1a adalah 2,0 % (b/v). Suhu optimum selulase KMS.UU1a bebas lebih rendah (40 °C) dibandingkan dengan selulase amobil (45 °C), dengan aktivitas selulase bebas 0,005636 U/mL, lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas selulase amobil 0,003617 U/mL. Selulase KMS.UU1a bebas dan amobil sama-sama memiliki pH optimum 6,0 dengan aktivitas selulase berturut-turut sebesar 0,006444 U/mL dan 0,003771 U/mL. Keberulangan dilihat dari besarnya aktivitas selulase KMS.UU1a amobil pada pemakaian kedua, ketiga, dan keempat terhadap pemakaian pertama berturut-turut sebesar 70,53; 61,66; dan 23,92 %. Efisiensi amobilisasi selulase KMS.UU1a pada kalsium alginate diperoleh sebesar 63,8711 %.

**Kata kunci:** Selulase KMS.UU1a, amobilisasi, alginat.

**ABSTRACT:** The purpose of this study was to determine the optimum temperature and pH of cellulase from the KMS.UU1a cellulolytic microbial consortium in free and immobilized conditions, the optimum percentage of calcium alginate used for cellulase immobilization, reusability and efficiency of immobilized cellulase. The enzyme activity was determined by the *Dinitrosalicylic acid* (DNS) method KMS.UU1a cellulase activity in both free and immobilized conditions was tested at temperatures of 35, 40, 45, 50, 55 and 60 °C; and pH 4, 5, 6, 7, 8, and 9. The concentration of alginate used in the immobilization process of KMS.UU1a cellulase was 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0% (w/v) in 0.15 M CaCl<sub>2</sub>, was done by measuring the immobilized KMS.UU1a cellulase activity in 4 (four) enzyme usage cycles, while the efficiency was known from the cellulase free activity test before and after immobilization. The optimum concentration of calcium alginate for immobilization of KMS.UU1a cellulase was 2.0% (w/v). The optimum temperature of free KMS.UU1a cellulases was lower (40 °C) compared to immobilized cellulases (45 °C), with free cellulase activity of 0.005636 U / mL, higher than that of immobilized cellulases of 0.003617 U / mL.

Both free and immobilized KMS.UU1a cellulases had an optimum pH of 6.0, with cellulase activity of 0.006444 U/mL and 0.003771 U/ mL, respectively. Repetition can be seen from the immobilized KMS.UU1a cellulase activity in the second, third, and fourth cycles of the first cycle respectively of 70.53; 61.66; and 23.92%. The immobilization efficiency of KMS.UU1a cellulase on calcium alginate was 63.8711%.

**Keywords:** KMS.UU1a cellulase, immobilization, alginate

## 1. PENDAHULUAN

Selulase merupakan enzim yang banyak dimanfaatkan dan memiliki potensi yang sangat luas dalam bidang teknologi enzim. Faktanya, selulase sangat sulit di *recovery* sehingga hanya bisa digunakan untuk satu kali proses pemakaian dan memiliki kestabilan yang rendah pada suhu dan pH yang ekstrim.

Amobilisasi enzim merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi kelemahan selulase dalam aplikasinya. Penggunaan enzim amobil memiliki beberapa kelebihan yaitu *reusable*, dapat dipisahkan dengan pelarutnya dan mudah di *recovery*, mengurangi biaya produksi, memudahkan pengendalian enzim, stabil pada kondisi ekstrim, proses hidrolisa enzimatis yang dapat menghasilkan produk lebih besar, selektivitas lebih tinggi, membutuhkan lebih sedikit energi, kondisi operasi yang lebih moderat dan ramah lingkungan [1].

Berbagai metode amobilisasi enzim seperti teknik *entrapment* telah dikembangkan pada berbagai matriks polimer, salah satunya pada kalsium alginat karena memiliki mekanisme kestabilan dan porositas yang tinggi, prosedurnya sederhana dan relatif lebih murah. Alginat merupakan polisakarida yang bisa membentuk struktur gel ketika bereaksi dengan kation divalen seperti ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Gel terbentuk melalui reaksi kimia antara kalsium dengan alginat dan mengikat molekul-molekul alginat yang panjang sehingga terbentuk struktur gel [3].

Peneliti sebelumnya telah memperoleh konsorsium mikroba selulolitik yang diisolasi dari fermentasi ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L.) dalam tanah. Salah

satu konsorsium mikroba selulolitik tersebut diberi kode KMS.UU1a, yang memiliki aktivitas selulase tertinggi. Konsorsium mikroba ini dapat menghasilkan selulase setelah ditumbuhkan dalam media pertumbuhan yang mengandung *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) [4]. CMC merupakan substrat terbaik untuk menginduksi sintesis enzim selolitik ekstraseluler [5].

Selulase dari konsorsium mikroba selulolitik (KMS.UU1a) yang diamobilisasi belum pernah ditentukan suhu dan pH optimumnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan penentuan suhu dan pH optimum, baik selulase bebas maupun selulase amobil. Selain itu, keberulangan (*reusability*) dan efisiennya juga dilakukan pengujian untuk tujuan aplikasi (riset selanjutnya) dari selulase amobil ini.

## 2. PERCOBAAN

### 2.1 Bahan dan Peralatan

Selulase dari konsorsium mikroba selulolitik dengan kode KMS-UU1a, yang diperoleh dari penelitian sebelumnya, yaitu hasil fermentasi ubi jalar ungu dalam tanah [4], glukosa anhidrat, *Carboxymethyl cellulose* (CMC), *bacto peptone*, natrium klorida, serbuk ubi jalar ungu, kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ), natrium alginat, aquades, CMC (*Carboxymetil Cellulose*), NaOH, DNS (Asam dinitrosalisilat), K-Na tartarat, etanol, asam sitrat, fenol, sodium sulfat, buffer sitrat 0,1 M pH 5,0, Buffer fosfat 0,05 M pH 6, buffer sitrat fosfat 0,05 M pH 4, 6 dan 7, buffer Tris HCl 0,05 M pH 8 dan 9.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain aluminium foil,

jarum ose, neraca analitik, *incubator shaker*, magnetik stirrer, lemari pendingin, sentrifugasi, jarum suntik, mikropipet, *waterbath*, termometer, spatula, *hot plate*, *microtube*, kertas whatman, dan instrumen BioELISA.

## 2.2 Metode

### Optimasi Suhu dan pH Selulase (KMS.UU1a)

Suhu dan pH optimum selulase dari konsorsium mikroba selulolitik KMS.UU1a ditentukan dengan mengukur aktivitas selulase menggunakan metode DNS berdasarkan estimasi jumlah glukosa (gula pereduksi) yang terbentuk. Kadar gula pereduksi sampel ditentukan berdasarkan kurva standar glukosa, maka pada tahap pertama dibuat larutan standar glukosa dengan konsentrasi larutan stok glukosa 5000 ppm. Sebanyak 0,5 gram glukosa dilarutkan dengan aquades dan ditera sampai 100 mL dalam labu ukur [6]. Larutan stok tersebut diencerkan dengan konsentrasi 80, 100, 120, 140, 180, 160 dan 200 ppm. 1 mL dari masing-masing larutan standar glukosa ditambahkan dengan 1 mL reagen DNS, dihomogenkan dan dipanaskan selama 5 menit pada suhu 90-100 °C sampai larutan berwarna merah-coklat. Selanjutnya ditambahkan 1 mL K-Na tartarat, didinginkan lalu ditambahkan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Absorbansi tiap larutan diukur dengan menggunakan instrument BioELISA pada panjang gelombang 490 nm untuk mengetahui konsentrasi glukosa (x) dari sampel yang diukur absorbansinya [7].

### Optimasi suhu dan pH selulase KMS.UU1a

Optimasi suhu dan pH selulase KMS.UU1a dilakukan dengan mengukur aktivitas selulase menggunakan metode DNS seperti pada prosedur diatas (Halaman...). Perlakuan suhu yang digunakan adalah (35, 40, 45, 50, 55 dan 60 °C), yang diinkubasi selama 60 menit dengan instrumen *waterbath*. Suhu

optimum selulase digunakan untuk menentukan pH optimum. Perlakuan pH yang digunakan adalah (4, 5, 6, 7, 8 dan 9). Kontrolnya adalah campuran antara substrat CMC 1 % dan enzim selulase KMS.UU1a tanpa inkubasi yang ditambahkan dengan DNS. Sedangkan blankonya adalah campuran antara substrat CMC 1 %, DNS dan aquades [8].

Satu unit aktivitas selulase dinyatakan sebagai jumlah  $\mu\text{mol}$  produk glukosa hasil hidrolisis selulase tiap satu menit pada kondisi pengujian. Nilai aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perhitungan berikut [9]:

$$AE = \frac{C}{BM \text{ Glukosa} \times t} \times \frac{H}{E} \quad (1)$$

Dimana

AE = aktivitas enzim (Unit/mL)

C = konsentrasi glukosa

BM = berat molekul glukosa (180 g/mol)

t = waktu inkubasi (menit)

H = volume total enzim-substrat (mL)

E = volume Enzim (mL)

### Optimasi Konsentrasi Kalsium Alginat 0.5-3.0 % (b/v)

Amobilisasi selulase dengan alginat dibuat dengan cara mencampurkan 2 ml enzim selulase dengan 6 ml larutan pada berbagai konsentrasi alginat yaitu 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 dan 3,0 %, lalu diaduk hingga homogen. Kemudian campuran tersebut dimasukkan kedalam jarum suntik dan diteteskan dalam gelas kimia yang berisi  $\text{CaCl}_2$  0,15 M sebanyak 100 mL sambil digoyang-goyang hingga terbentuk gel kalsium alginat yang berisi enzim dan disimpan dalam *fryzer* selama 20 menit. Selanjutnya dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali, lalu dikeringkan pada suhu kamar [10].

### Optimasi suhu dan pH selulase KMS.UU1a amobil

Penentuan suhu dan pH optimum selulase KMS.UU1a amobil ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim menggunakan metode DNS seperti

prosedur diatas dengan perlakuan suhu dan pH yang sama dengan selulase KMS.UU1a.

### Keberulangan (*reusability*) dan efisiensi selulase KMS.UU1a amobil

Penentuan aktivitas keberulangan dan efisiensi KMS.UU1a amobil diukur dengan menggunakan metode DNS seperti prosedur diatas (Halaman...). Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum selulase amobil yaitu suhu 45 °C, pH 6 dan waktu inkubasi 60 menit serta pada konsentrasi alginat 2,0 % (b/v) dalam CaCl<sub>2</sub> 0,15 M. Perlakuan dilakukan sampai empat kali siklus dan dihitung aktivitas enzim pada setiap siklus. Selanjutnya untuk mengetahui efisiensi selulase KMS.UU1a amobil dilakukan pengukuran aktivitas menggunakan metode DNS (Halaman....) dengan cara menghitung % selulase teramobil terhadap selulase bebas awal dan selulase bebas sisa (tidak teramobilisasi) dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ selulase teramobil} = \frac{A-B}{A} \times 100 \% \quad (2)$$

dimana

A = aktivitas selulase bebas awal

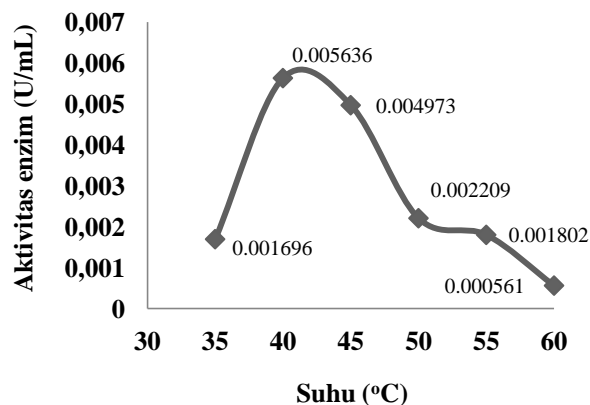
B = aktivitas selulase bebas sisa (yang tidak ter amobil)

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

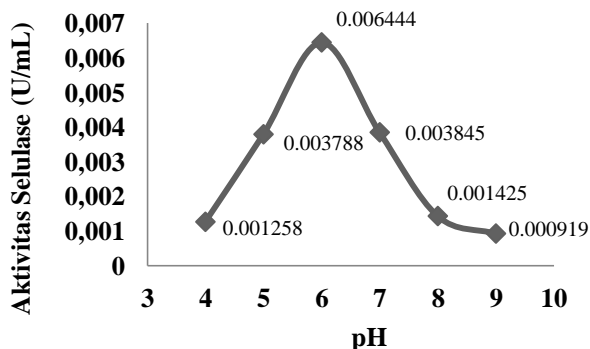
### 3.1 Suhu dan pH Optimum Selulase dari Konsorsium Mikroba Selulolitik (KMS.UU1a)

Suhu optimum selulase KMS.UU1a adalah 40 °C dengan nilai aktivitas tertinggi sebesar 0,005636 U/mL (Gambar 1). Pada suhu 35-40 °C terjadi kenaikan aktivitas selulase yang tajam disebabkan karena semakin tinggi suhu dapat meningkatkan energi kinetik sehingga menambah intensitas tumbukan antara substrat dengan enzim. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dan substrat sangat efektif, sehingga pembentukan kompleks enzim substrat semakin mudah dan produk yang dihasilkan meningkat [11]. Penurunan aktivitas selulase pada kisaran suhu (45-60 °C) disebabkan karena penambahan suhu yang semakin tinggi menyebabkan ikatan

hidrogen putus pada rantai polipeptida dan kurangnya frekuensi tumbukan antara enzim dan substrat sehingga produk glukosa yang dihasilkan sedikit [12].



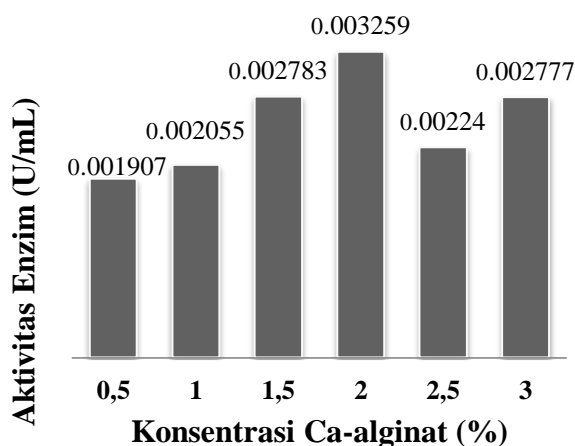
Gambar 1. Aktivitas selulase KMS.UU1a pada suhu 35-60 °C.



Gambar 2. Aktivitas selulase KMS.UU1a pada pH 4-9

pH optimum selulase KMS.UU1a adalah pH 6 dengan nilai aktivitas tertinggi sebesar 0,006444 U/mL (Gambar 2). Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan muatan pada molekul enzim sehingga dapat mempengaruhi aktivitas enzim, baik dengan perubahan struktur maupun dengan perubahan muatan [13]. Pada kondisi pH asam (pH 4-6), asam amino dapat terionisasi sehingga dapat mengaktifkan sisi aktif enzim dan dapat meningkatkan aktivitas enzim. Sedangkan pada kondisi basa tinggi (pH 8-9), asam amino dalam kondisi ion zwitter tidak

membentuk sisi aktif sehingga aktivitas enzim mengalami penurunan.

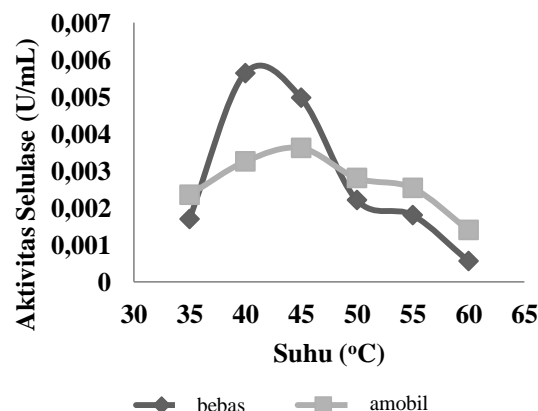


Gambar 3. Aktivitas selulase KMS.UU1a pada konsentrasi Ca-alginat 0,5-3,0 %

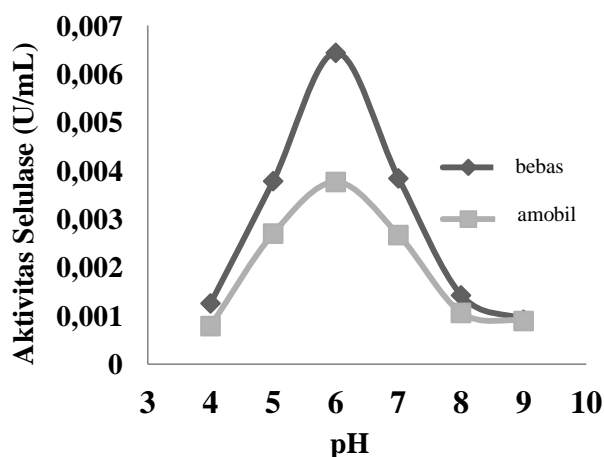
### 3.2 Persentase Kalsium Alginat Optimum untuk Amobilisasi Selulase dari Konsorsium Mikroba Selulolitik KMS.UU1a

Konsentrasi optimum kalsium alginat untuk amobilisasi selulase KMS.UU1a terdapat pada konsentrasi 2,0 % (b/v) dengan aktivitas tertinggi sebesar 0,003259 U/mL (Gambar 3). Pada konsentrasi 0,5 % terjadi kebocoran maksimum pada gel alginat sehingga aktivitasnya paling rendah, konsentrasi kalsium alginat pada 0,5-1,5 %, distribusi selulase dalam matriks alginat terlalu padat, tidak rigid dan ukuran pori porinya besar sehingga menyebabkan selulase keluar dan tidak bisa ditahan oleh matriks alginat. Sedangkan pada konsentrasi Ca-alginat 2,0 %, porositas gel akan semakin rendah sehingga enzim akan tertahan didalam alginat dan banyaknya selulase yang terperangkap dalam alginat sudah optimum, konsentrasi alginat 2,5%, ukuran matriks alginat semakin kecil sehingga menghambat difusi substrat hidrofobik kedalam matriks alginat yang bersifat hidrofilik, konsentrasi alginat 3,0 % terjadi kenaikan aktivitas selulase disebabkan karena pada konsentrasi

tersebut porositas gel alginat semakin membaik sehingga kontak selulase dengan substrat juga semakin optimal.



Gambar 4. Aktivitas selulase KMS.UU1a amobil pada suhu 35-60 °C.



Gambar 5. Aktivitas selulase KMS.UU1a amobil pada pH 4-9.

### 3.3 Suhu dan pH Optimum Selulase KMS.UU1a Amobil

Suhu optimum selulase dari konsorsium mikroba selulolitik (KMS.UU1a) yang telah diamobilisasi pada kalsium alginat terdapat pada suhu 45 °C dengan aktivitas tertinggi selulase sebesar 0,003617 U/mL (Gambar 4). Selulase KMS.UU1a amobil memiliki stabilitas suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan selulase KMS.UU1a bebas karena bahan pendukung Ca-alginat

dalam mengamobilisasi selulase secara *entrapment* dapat mempertahankan struktur tersier enzim pada suhu yang lebih tinggi dan mampu mempertahankan aktivitasnya setelah 60 menit masa inkubasi. Aktivitas selulase bebas lebih tinggi dibandingkan dengan selulase amobil karena kontak enzim dengan substratnya lebih tinggi atau leluasa sehingga produk yang dihasilkan juga lebih banyak. Kisaran suhu 45-80 °C termasuk kedalam golongan enzim termofilik [14], sehingga enzim selulase dari konsorsium mikroba (KMS.UU1a) amobil termasuk golongan enzim termostabil (tahan terhadap panas).

pH optimum selulase dari konsorsium mikroba selulolitik (KMS.UU1a) yang telah diamobilisasi pada kalsium alginat dengan selulase KMS.UU1a bebas sama-sama terdapat pada pH 6 dengan nilai aktivitas tertinggi sebesar 0,003771 U/mL dan 0,006444 U/mL (Gambar 5). pH optimum selulase KMS.UU1a bebas dan amobil berada pada pH yang sama yaitu pH asam (pH 6) karena pada permukaan pori-pori kalsium alginat tidak mempengaruhi sisi aktif enzim. Penambahan pH asam dan basa menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim selulase.

### 3.4 Persentase keberulangan (*reusability*) dan efisiensi selulase KMS.UU1a amobil

Persentase keberulangan (*reusability*) selulase KMS.UU1a amobil dapat digunakan hingga 4 kali pemakaian dengan aktivitas selulase amobil sisa yaitu sebesar 0,000425 U/mL atau 23,92 % aktivitas selulase relatifnya. Penggunaan berulang selulase amobil dapat menurunkan aktivitasnya disebabkan karena rusaknya pori-pori Ca-alginat akibat pemakaian berulang-ulang. Rusaknya pori-pori ini menyebabkan selulase yang awalnya terjebak dapat terlepas dari matriksnya dan jumlah selulase semakin sedikit untuk berikatan dengan substrat. Enzim amobil dikatakan masih baik digunakan jika memiliki nilai efisiensi diatas 50 %, sehingga selulase KMS.UU1a cukup baik

digunakan berulang kali dengan nilai % teramobil sebesar 63.8711 %.

## 4. KESIMPULAN

Selulase KMS.UU1a amobil memiliki suhu optimum yang lebih tinggi (45 °C) dibandingkan dengan selulase bebas (40 °C), sedangkan pH optimum selulase bebas dan amobil sama-sama berada pada pH 6, walaupun dengan nilai aktivitas yang lebih rendah. Konsentrasi optimum alginat untuk amobilisasi selulase KMS.UU1a dengan metode *entrapment* terdapat pada konsentrasi 2,0 % dalam 0,15 M CaCl<sub>2</sub> dengan nilai aktivitas sebesar 0,003259 U/mL. Persentase keberulangan (*Reusability*) selulase KMS.UU1a amobil dapat digunakan hingga 4 kali penggunaan dengan aktivitas selulase amobil pada siklus kedua, ketiga, dan keempat terhadap siklus pertama berturut-turut sebesar 70,53; 61,66; dan 23,92 %. Efisiensi amobilisasi selulase KMS.UU1a pada kalsium alginat diperoleh sebesar 63.8711 % yang artinya masih cukup baik digunakan.

## 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan Staf Laboratorium Mikrobiologi Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana serta pihak-pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Chen, M., Zhao, J. and Xia, L. (2008) 'Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars', *Carbohydrate Polymers*, 71(3): 411–415.  
doi: 10.1016/j.carbpol.2007.06.011.
- [2] Anwar A., Shah Ali U. Q., Samina I., dan Abid A. 2009. Calcium Alginate

- :Support Material for Immobilization of Proteases from Newly Isolated Strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Science Journal*, 7(10): 1281-1286.
- [3] Chaudhary, Majneesh. et al. (2019) 'Immobilization of Amylase by Entrapment Method in Different Natural Matrix', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(5): 1097-1103. ISSN: 2319-7706.
- [4] Wirajana, I.N., Ratnayani, K., Bogoriani, I.W. dan Laksmiwati, A.A.I.A.M. 2020. Selulase Mikroba Selulolitik dari Fermentasi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L. Poir) dalam Tanah, *Jurnal Kimia (in press)*.
- [5] Alam, M.Z., Manchur, M.A., & Anwar, M.N. 2004. Isolation, purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by *Streptomyces somiense*. *Journal of Biological Science*, 10: 1647-1653.
- [6] Mukminin, A. 2015. Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto dan Pengujian Aktivitas Enzim Selulase. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- [7] Rosyada, N. 2015. Isolasi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Selulolitik pada Saluran Pencernaan Mentok (*Cairina moschata*). *Skripsi*. Surakarta: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret.
- [8] Maranatha, B. 2008. Aktivitas Enzim Selulase Isolat Asal Indonesia pada Berbagai Substrat Limbah Pertanian. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- [9] Kombong, H. 2004. Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmu Dasar*, 5: 16-20.
- [10] Aliya, R., Shah Ali, Abida, A., and Samina, I, 2009. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase on calcium alginate beads from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(3). 2883-2887.
- [11] Tarigan, W. F., Sumardi., Setiawan, W.A. 2015. Karakterisasi Enzim Selulase dari Bakteri Selulolitik *Bacillus* sp. Seminar Nasional Sains dan Teknologi VI.
- [12] Sari, R. F. 2010. Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri RF-10. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- [13] Dali, S., Arfah, R., Karim, A., Patong, A.R. 2013. Eksplorasi Enzim Amilase dari Mikroba yang Diisolasi dari Sumber Air Panas di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Produksi Maltodekstrin. *Laporan Akhir*. Makassar: Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanudin.
- [14] Nam, E.S. 2004. B-galactosidase Gene of *Thermus thermophilus* KNOUC112 Isolated from Hot Springs of a Volcanic Area in New Zealand: Identification of the Bacteria, Cloning and Expression of the Gene in *Escherichia coli*. *Asian-Aust J Anim Sci*. 17: 1591-1598.