



Submitted Date: Desember 26, 2017

Accepted Date: Desember 29, 2017

Editor-Reviewer Article: I Wayan Wirawan dan Ni Wayan Siti

AKTIVITAS ENZIM LIGNASE DARI BAKTERI LIGNOLITIK YANG DIISOLASI DARI CACING TANAH PADA SUBSTRAT GULMA TANAMAN PANGAN

Wijana, I W. dan I M. Mudita

Fakultas Peternakan Universitas Udayana, Jl. P. B. Sudirman Denpasar

email: muditafapet_unud@yahoo.com HP. 087784792574

ABSTRAK

Evaluasi aktivitas enzim lignase dari 8 isolat bakteri lignolitik yang diisolasi dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) pada substrat gulma tanaman pangan (eceng gondok dan daun apu) telah dilakukan dalam upaya mendapatkan isolat bakteri unggul perombak pakan kaya serat. Penelitian dilaksanakan dengan rancangan acak lengkap (RAL) 8 perlakuan dan 3 ulangan, dimana perlakuan didasarkan pada 8 isolat bakteri selulolitik yang telah diisolasi dengan kode EB₁LG, EB₂LG, EB₃LG, EB₄LG, EB₅LG, EB₆LG, EB₇LG and EB₈LG. Aktivitas enzim lignase diukur pada waktu inkubasi 10 menit, 20 menit, 30 menit dan 60 menit menggunakan standar vanilin pada panjang gelombang 209 nm mengikuti persamaan $Y = 0,00635 X + 0,21098$ ($r^2 = 0,89$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri lignolitik cacing tanah dengan kode EB₃LG menghasilkan aktivitas enzim tertinggi dan berbeda nyata ($P < 0,01$) pada substrat eceng gondok yaitu 0,448 IU, 0,269 IU, 0,201 IU dan 0,110 IU, sedangkan isolat bakteri dengan kode EB₁LG menghasilkan aktivitas enzim lignase tertinggi pada substrat daun apu, yaitu 0,586 IU; 0,346 IU; 0,248 IU dan 0,130 IU masing-masing pada periode waktu inkubasi 10; 20; 30 dan 60 menit dan keduanya berbeda nyata dengan isolat bakteri dengan kode EB₈LG. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri lignolitik dengan kode EB₁LG dan EB₃ LG merupakan isolat bakteri lignolitik unggul pendegradasi substrat gulma tanaman pangan

Kata Kunci: Bakteri Lignolitik, Cacing Tanah, Aktivitas Enzim, Gulma Tanaman Pangan

ENZYME ACTIVITY OF LIGNOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM EARTHWORM ON WEEDS CROPS SUBSTRATES

ABSTRACT

Evaluation of enzyme activity by eight lignolytic bacteria isolated from earthworm (*Lumbricus rubellus*) on weeds crops especially water hyacinth and water lettuce e leaves had been carried out for have the best lignolytic bacteria as weeds crops degrader. The experiment was conducted with completely randomized design (CRD) 8 treatments and 3 replications, treatments based on the eight cellulolignolytic bacteria isolates coded EB₁LG, EB₂LG, EB₃LG, EB₄LG, EB₅LG, EB₆LG, EB₇LG and EB₈LG. Lignase enzyme activity measured on 4 (four) incubation time periods were 10; 20; 30 and 60 minute using vanillin callibration curve was $Y = 0,00635 X + 0,21098$ ($r^2 = 0,89$). The results showed that lignolytic bacteria isolated from earthworm coded EB₃LG have highest and significantly ($P < 0,05$) enzyme activity on water hyacinth substrates were 0,448 IU, 0,269 IU, 0,201 IU and 0,110 IU on incubation time periods respectively, while bacteria isolates coded EB₁LG have highest

($P < 0,05$) enzyme activity on water lettuce leaves were 0,586 IU; 0,346 IU; 0,248 IU and 0,130 IU, and both significant different with bacteria isolates coded EB8LG. Based on this study concluded that lignolytic bacteria isolates coded EB1LG and EB3LG were excellent bacteria isolates degrader weeds crops especially the water hyacinth and water lettuce leaves than the other isolates.

Key words: Cellulolytic Bacteria, Earthworm, Ability on degrading substrates, Weed Crops

PENDAHULUAN

Penurunan produktivitas dan efisiensi usaha peternakan serta peningkatan resiko pencemaran lingkungan dari usaha peternakan yang diberi pakan kaya serat seperti limbah pertanian termasuk gulma tanaman pangan disinyalir akibat tingginya kandungan lignoselulosa bahan pakan asal limbah pertanian yang mengakibatkan nutrisi yang terkandung tidak dapat dimanfaatkan secara optimal (Abdullah dan Soeharsono, 2010; Mudita *et al.*, 2010).. Howard *et al.* (2001) mengungkapkan semakin tinggi kandungan lignin semakin sulit bahan pakan tersebut dirombak/dipecah/dicerna. Hal ini mengingat lignin mempunyai ikatan kompleks yang sangat kokoh dan secara fisik bertindak sebagai penghalang proses perombakan dinding sel bahan pakan oleh mikroba rumen. Degradasi senyawa lignin hanya dapat dilaksanakan oleh enzim dari mikroba tertentu salah satunya bakteri lignolitik penghasil enzim lignase kompleks (Howard *et al.*, 2001; Perez *et al.* (2002).

Bakteri lignolitik merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan kompleks enzim lignase yang terdiri dari *lignin-peroksidase/Li-P*, *mangan-peroksidase/Mn-P*, dan *lakase/Lac* yang akan merombak senyawa lignin menjadi komponen penyusunnya (Perez *et al.*, 2002). Semakin tinggi dan seimbang produksi serta kualitas kompleks enzim lignase yang dihasilkan semakin baik perombakan lignin dapat dilakukan. Di alam berbagai sumber konsorsium mikroba lignolitik dapat diperoleh seperti saluran pencernaan hewan, lahan gambut/pertanian, rayap, cacing tanah, maupun sumber konsorsium mikrona lainnya (Pathma dan Sakthivel, 2012; Mudita *et al.* 2012 – 2015; Utama *et al.*, 2013; Dewi *et al.* 2014).

Cacing tanah merupakan binatang yang mampu mendegradasi berbagai bahan organik karena dalam saluran pencernaannya mengandung berbagai konsorsium mikroba sinergis seperti bakteri, protozoa dan mikro fungi serta berbagai enzim seperti *amilase*, *protease*, *selulase*, *lipase*, *chitinase*, dan *urease*. Disamping itu, mukus dalam saluran pencernaan cacing tanah mengandung berbagai nutrisi (karbohidrat, protein, bahan mineral dan bahan organik, serta berbagai asam amino) serta hormon (Pathma dan Sakthivel, 2012). Lebih lanjut diungkapkan mikroba cacing tanah mampu mendegradasi senyawa lignoselulosa dan antinutrisi, memproduksi antibiotika, pigmen fluorescent, siderophores, *chitinase* dan

glucanase serta berbagai *growth promotor* melalui pelarutan mineral, memproduksi hormon *1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase*, dan menekan mikroba patogen.

Pemanfaatan cacing tanah sebagai sumber inokulan konsorsium mikroba dalam produksi bioinokulan feed suplemen berprobiotik terbukti mampu menghasilkan produk inokulan berkualitas yang mampu meningkatkan produktivitas itik bali (Sutama *et al.*, 2014). Namun hasil penelitian Mudita *et al* (2010-2011) menunjukkan bahwa penggunaan bahan/sumber konsorsium mikroba alami secara langsung tidak memberikan kepastian kestabilan kualitas produk inokulan yang dihasilkan. Hasil penelitian Mudita *et al.* (2013-2015) menunjukkan pemanfaatan isolat bakteri murni lebih menjamin kestabilan kualitas inokulan yang dihasilkan. Sehingga penelitian ini penting untuk dikembangkan dalam upaya menghasilkan isolat unggul pendegradasi senyawa lignin

MATERI DAN METODE

Tempat dan Lama Penelitian

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

Isolat Bakteri Lignolitik Hasil Isolasi dari Cacing Tanah

Penelitian memanfaatkan 8 isolat bakteri lignolitik (belum teridentifikasi) dengan kode EB₁LG, EB₂LG, EB₃LG, EB₄LG, EB₅LG, EB₆LG, EB₇LG dan EB₈LG hasil isolasi dari cacing tanah.

Substrat Limbah dan Gulma Tanaman Pangan

Sampel limbah dan gulma tanaman pangan yang akan dimanfaatkan dalam penelitian ini adalah enceng gondok dan daun apu. Bahan gulma tersebut terlebih dahulu dikeringkan 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 bersaring 1 ml. Selanjutnya sampel bahan substrat disterilisasi dengan sinar ultra violet dalam *laminar airflow* selama 30 menit untuk mencegah kontaminasi.

Medium Pertumbuhan Bakteri

Medium pertumbuhan bakteri yang diproduksi pada penelitian ini adalah 2 jenis yaitu medium cair dan medium padat. Medium pertumbuhan cair dipergunakan untuk produksi kultur isolat bakteri yang akan dipakai sebagai sumber isolat yang akan dievaluasi

kemampuan degradasi substratnya, sedangkan medium padat dipakai sebagai medium substrat yang akan dievaluasi tingkat degradasinya oleh isolat bakteri.

Medium pertumbuhan cair untuk menumbuhkan stok isolat bakteri lignolitik dari cacing tanah dibuat menggunakan *Nutrient Broth* (NB) dengan substrat Asam Tanat sebagai sumber lignin. Medium pertumbuhan cair bakteri lignolitik cacing tanah akan dibuat dengan cara melarutkan 1,30 gram NB ditambah 0,2 gram substrat dalam 100 ml aquades. Semua bahan dimasukkan dalam *elemmeyer* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrers* (750 rpm) pada suhu 100 °C selama \pm 15 menit untuk menghomogenkan campuran. Selanjutnya disterilkan pada *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

Sedangkan medium pertumbuhan bakteri padat dibuat dengan bahan dan cara yang sama seperti pembuatan medium pertumbuhan cair hanya ditambahkan 2 g bakto agar sebagai pematat dengan konsentrasi 2 % dalam medium.

Peralatan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah pembangkit gas CO₂, *laminar air flow*, *incubator 39°C*, *micropipet*, pengaduk magnetik, *fortex*, timbangan elektrik, penggilingan, autoklaf, sentrifuse, *spectrophometer uv-vis*, shaker bath, *drough force oven*, lampu uv, desikator, dan alat-alat gelas.

Produksi Medium Pertumbuhan Bakteri

Medium pertumbuhan bakteri lignolitik cair dibuat untuk penumbuhan stok isolat bakteri lignolitik dan untuk produksi ekstra enzim dari isolat bakteri lignolitik murni. Medium pertumbuhan bakteri lignolitik cair dibuat dengan cara tiap 100 ml medium dibuat menggunakan 2,981,30 gram NB ditambah 0,2 gram substrat asam tanat (sumber lignin) kemudian ditambahkan aquades hingga volume medium 100 ml. Selanjutnya medium dicampurkan hingga homogen menggunakan vorteks selama 15 menit suhu 100 °C. Setelah homogen medium disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C.

Medium pertumbuhan bakteri lignolitik padat dibuat dengan evaluasi degradasi substrat dengan bahan dan cara yang sama seperti pertumbuhan medium pertumbuhan cair hanya ditumbuhkan bakto agar sebagai pematat dengan konsentrasi 2 % medium.

Produksi Kultur Bakteri

Kultur bakteri diproduksi dengan cara menumbuhkan kembali isolat bakteri (stok) dalam medium pertumbuhan cair bakteri selulolitik. Kultivasi diawali dengan melarutkan stok isolat bakteri menggunakan larutan NaCl 0,9% dan dilanjutkan dengan menginokulasikan 20% larutan isolat bakteri dengan absorbansi 0,5 pada 660 nm ke dalam medium

pertumbuhan cair, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur bakteri yang tumbuh siap dimanfaatkan untuk kegiatan penelitian.

Preparasi Sampel Limbah Usaha Pertanian Terintegrasi

Sampel limbah pertanian yang akan dimanfaatkan dalam pertanian ini adalah enceng gondok dan daun apu. Bahan limbah tersebut terlebih dahulu dikeringkan 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 untuk mencegah kontaminasi.

Evaluasi Aktivitas Enzim Lignase

Evaluasi kemampuan aktivitas enzim dari isolat bakteri lignolitik pada substrat gulma tanaman pangan dilakukan pada substrat enceng gondok dan daun apu. Seleksi dilaksanakan dengan cara terlebih dahulu menumbuhkan isolat bakteri lignoselulolitik yang telah diisolasi pada medium selektif padat ke dalam medium pertumbuhan cair lignolitik. Isolat bakteri dari medium padat dilarutkan dalam larutan pengencer pada absorbansi 0,5 λ 600 dan diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam tabung erlenmeyer yang telah berisi medium pertumbuhan cair tersebut. Kemudian diinkubasikan pada suhu 39°C selama 7 hari dan setiap hari digojok. Kultur medium cair ini selanjutnya digunakan sebagai sumber ekstrak enzim.

Pengambilan ekstrak enzim dilakukan dengan cara mensentrifuse kultur medium cair pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Ekstrak enzim lignase diuji pada substrat uji (eceng gondok atau daun apu), masing-masing mengandung 1% substrat uji 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 diinkubasi dalam water bath bergoyang, kemudian aktivitas enzimnya diukur menggunakan spektrofotometer uv. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan cara menghitung banyaknya produk yang dihasilkan dari reaksi enzim tersebut (Efiok, 1996). Pengukuran produk dilakukan menggunakan methanol pada panjang gelombang 209 nm, mengikuti persamaan $Y = 0,00635 X + 0,21098$ ($r^2 = 0,89$) (Mudita *et al.*, 2013).

Rancangan Percobaan

Penelitian dilaksanakan dengan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 3 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan pada penelitian ini adalah isolat bakteri lignolitik hasil isolasi dari

cacing tanah yaitu isolat dengan kode EB₁LG, EB₂LG, EB₃LG, EB₄LG, EB₅LG, EB₆LG, EB₇LG dan EB₈LG sehingga keseluruhan terdapat 24 unit percobaan.

Variabel yang Diamati

Variabel yang diamati meliputi kemampuan degradasi dari isolat bakteri selulolitik terhadap substrat daun apu dan eceng gondok.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam/Anova. Apabila terdapat hasil yang berbeda nyata ($P \leq 0,05$), analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur/Honestly Significant Different (Sastrasupadi, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri lignolitik yang diisolasi dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) mempunyai aktivitas enzim lignase pada substrat gulma tanaman pangan khususnya eceng gondok dan daun apu yang cukup tinggi pada tiap periode waktu inkubasi, dimana secara umum peningkatan periode waktu inkubasi dari 10 menit menjadi 20, 30, sampai 60 menit cenderung menurunkan unit aktivitas enzim lignase yang dihasilkan (Tabel 1 dan 2). Pada substrat eceng gondok, aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh 2 isolat bakteri yaitu isolat dengan kode EB₃LG dan EB₁LG. Isolat EB₁LG dan EB₃LG pada menit ke-10 inkubasi dengan substrat eceng gondok menghasilkan aktivitas enzim lignase yang sama-sama tertinggi yaitu 0,4478 IU Vs 0,3905-0,4350 IU. Pada menit ke-20 waktu inkubasi dengan substrat, isolat EB₃LG mempunyai aktivitas enzim tertinggi ($P < 0,05$) yaitu 0,2688 IU Vs 0,2311 – 0,2682 IU, sedangkan pada waktu inkubasi ke-30 dan ke-60 menit, isolat bakteri dengan kode EB₁LG menghasilkan aktivitas enzim tertinggi yaitu 0,2012 IU Vs 0,1741 – 0,2006 IU dan 0,1101 IU Vs 0,0944 – 0,1099 IU (Tabel 1).

Terhadap substrat daun apu, hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri dengan kode EB₁LG mampu menghasilkan aktivitas enzim lignase tertinggi ($P < 0,05$) pada seluruh periode waktu inkubasi dari observasi 10-60 menit, yaitu 0,5861 IU; 0,3460 IU; 0,2482 IU; dan 0,1300 IU, sedangkan isolat bakteri dengan kode EB₆LG; EB₇LG dan EB₈LG merupakan isolat bakteri dengan aktivitas enzim terendah. Pada penelitian ini juga tampak bahwa isolat EB₃LG juga mampu menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi yang berbeda tidak nyata dengan isolat EB₁LG (Tabel 2).

Tabel 1. Aktivitas Enzim dari Isolat Bakteri Lignolitik pada Substrat Eceng Gondok pada Berbagai Periode Waktu Inkubasi

Isolat Bakteri	Aktivitas Enzim Lignase pada S. Eceng Gondok (IU)			
	10 menit	20 menit	30 menit	60 menit
EB 1 LG	0,4478 d	0,2682 d	0,2012 e	0,1101 d
EB 2 LG	0,4350 cd	0,2653 d	0,1985 de	0,1079 d
EB 3 LG	0,4478 d	0,2688 d	0,2006 e	0,1099 d
EB 4 LG	0,4250 bc	0,2491 c	0,1880 c	0,1017 c
EB 5 LG	0,4263 bc	0,2513 c	0,1906 cd	0,1023 c
EB 6 LG	0,4230 bc	0,2456 c	0,1830 bc	0,0999 bc
EB 7 LG	0,4127 b	0,2413 bc	0,1786 ab	0,0971 ab
EB 8 LG	0,3905 a	0,2311 a	0,1741 a	0,0944 a
SEM	0,0038	0,0022	0,0019	0,0010

Keterangan: ¹⁾ EB₁LG, EB₂LG, EB₃LG, EB₄LG, EB₅LG, EB₆LG, EB₇LG dan EB₈LG merupakan kode isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah. ²⁾Superskrips sama pada kolom yang sama berbeda tidak nyata ($P>0,05$), ³⁾ SEM== Standart Error of The Treatment Means

Tabel 2. Aktivitas Enzim dari Isolat Bakteri Lignolitik pada Substrat Daun Apu pada Berbagai Periode Waktu Inkubasi

Isolat Bakteri	Aktivitas Enzim Lignase pada S. Daun Apu (IU)			
	10 menit	20 menit	30 menit	60 menit
EB 1 LG	0,5861 d	0,3460 e	0,2482 e	0,1300 d
EB 2 LG	0,5775 d	0,3357 de	0,2390 d	0,1261 c
EB 3 LG	0,5827 d	0,3445 e	0,2478 e	0,1297 d
EB 4 LG	0,5730 cd	0,3264 cd	0,2345 cd	0,1216 b
EB 5 LG	0,5617 bc	0,3179 bc	0,2291 bc	0,1194 b
EB 6 LG	0,5582 abc	0,3114 ab	0,2217 ab	0,1157 a
EB 7 LG	0,5516 ab	0,3091 ab	0,2183 a	0,1132 a
EB 8 LG	0,5447 a	0,3017 a	0,2157 a	0,1126 a
SEM	0,003	0,002	0,002	0,001

Keterangan: ¹⁾ EB₁LG, EB₂LG, EB₃LG, EB₄LG, EB₅LG, EB₆LG, EB₇LG dan EB₈LG merupakan kode isolat bakteri selulolitik yang diisolasi dari cacing tanah. ²⁾Superskrips sama pada kolom yang sama berbeda tidak nyata ($P>0,05$), ³⁾ SEM== Standart Error of The Treatment Means

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kedua isolat tersebut (EB₁LG maupun EB₃LG) mempunyai kualitas enzim lignase yang baik dengan karakteristik tertentu. Penampilan secara keseluruhan aktivitas enzim lignase ditentukan oleh produksi, kualitas dan keseimbangan serta kontinuitas tiap jenis enzim yang dihasilkan. Perez *et al.* (2002) dan Howard *et al.*, (2003) menyebutkan bahwa terdapat minimal 3 jenis enzim yang dapat digolongkan kedalam enzim lignase yaitu Lignin Peroksidase (Li-P), Mangan-Peroksidase (Mn-P) dan Lacase (Lac). Ketiga jenis enzim ini mempunyai peranan masing-masing

(berbeda) yang bekerja secara sinergis dalam mendegradasi senyawa lignin kompleks. Perbedaan jenis enzim yang dominan dihasilkan, keseimbangan serta kontinuitas jenis enzim yang dihasilkan oleh tiap isolat akan mempengaruhi aktivitas enzim lignase secara keseluruhan dari isolat bakteri uji.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: isolat EB1LG dan EB3LG merupakan isolat bakteri lignolitik yang mampu menghasilkan aktivitas enzim selulase yang tertinggi dan merupakan isolat unggul pendegradasi substrat mengandung lignin

UCAPAN TERIMA KASIH

Makalah ini merupakan hasil penelitian yang dibiayai Universitas Udayana melalui hibah unggulan program studi. Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Rektor, LPPM UNUD SERTA Dekan Fapet UNUD atas pendanaan kegiatan penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala dan analis Lab. Nutrisi dan Makanan Ternak Fapet Unud serta mahasiswa yang membantu pelaksanaan penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, A.F., Moahmed A., Abdel Naby.2012. Pretreatment and enzymic saccharyfication of water hyacinth cellulose. Carbohydrate polymers.
- 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.
- Howard, R. L., E. Abotsi, J. V. Rensburg, and Howards. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. African Journal of Biotechnology 2:6002-619. Available from: URL: <http://www.vtt.fi/inf/pdf>.
- 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.
- 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
- Perez, J., J. Munoz-Dorado, T. De la Rubia, and J. Martinez. 2002. Biodegradation and Biological Treatment of Cellulose, Hemicellulose and Lignin; an overview. Int. Microbial, 5: 53-56
- 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.

- Sastrosupadi, A., 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Penerbit Kanisus. Yogyakarta.
- 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.
- Sutama, I N. S., I W. Suberatha, N. W. Siti. 2014. Pemanfaatan Konsorsium Mikroba Cacing Tanah Sebagai Inokulan Suplemen Berprobiotik dalam Pengembangan Peternakan Itik Bali Rakyat Berbasis Limbah Tanaman Pangan. Laporan Penelitian Invensi Udayana. Fakultas Peternakan, Universitas Udayana.
- Sutama, I N. S., dan I W. Suberata. 2016. Isolasi dan karakterisasi bakteri selulolitik dari cacing tanah sebagai sumber inokulan dalam optimalisasi pengembangan peternakan berbasis limbah pertanian. Laporan Penelitian Grup Riset Universitas Udayana, Denpasar