

Isolasi Bakteri Selulolitik Termofilik Dari Sumber Air Panas Pacet Mojokerto Dan Pengujian Aktivitas Enzim Selulase

Arifatul Mukminin (NIM. 10620049)

Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang

Arif196.m@gmail.com

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi yang berlangsung di dalamnya. Enzim dikenal memiliki dua tipe yaitu enzim ekstraseluler dan enzim intraseluler. Selulase merupakan salah satu enzim ekstraseluler. Selulase banyak dimanfaatkan bidang industri yang beroperasi pada suhu tinggi. Enzim bisa dihasilkan oleh berbagai organisme. Organisme yang banyak dimanfaatkan dalam menghasilkan enzim adalah bakteri. Bakteri mampu hidup diberbagai lingkungan termasuk lingkungan suhu panas misalnya air panas. Salah satu sumber air panas adalah sumber di Pacet Mojokerto. Oleh sebab itu perlu dilakukan isolasi bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas Pacet Mojokerto dan pengujian aktivitas enzim selulasenya. Bahan air yang digunakan dalam penelitian ini adalah air yang bersuhu 45°-50°C. Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi bakteri dengan cara mengambil air panas kemudian dilakukan pengenceran hingga 10^{-10} . Koloni bakteri yang didapat dilanjutkan uji selulolitik kualitatif. Isolat yang menghasilkan zona bening dikarakterisasi morfologi koloni dan pewarnaan gram. Isolat berbeda diidentifikasi spesiesnya dan diuji aktivitas selulolitik kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan ada 4 isolat yang berbeda yaitu isolat PS 2 dan isolat PS 3 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus megaterium*, isolat PS 4 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus stearothermophyllus* dan isolat PS 8 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus laterosporus*. Besar zona bening dari isolat PS 2, isolat PS 3, isolat PS 4 dan isolat PS 8 masing-masing sebagai berikut 27 mm, 24 mm, 30 mm dan 20 mm. Aktivitas enzim dari isolat PS 2, isolat PS 3, isolat PS 4 dan isolat PS 8 masing-masing sebagai berikut $3,9 \times 10^{-3}$ U/mL, $1,9 \times 10^{-3}$ U/mL, $7,8 \times 10^{-3}$ U/mL dan $4,2 \times 10^{-3}$ U/mL. Potensi enzim selulase tertinggi pada isolat PS 4 dengan besar zona bening 30 mm dan aktivitas $7,8 \times 10^{-3}$ U/mL.

Kata Kunci : Isolasi, Bakteri Selulolitik Termofilik, Aktivitas Enzim Selulase

PENDAHULUAN

Enzim adalah protein yang khusus disintesis oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi yang berlangsung di dalamnya (Martoharsono, 2006). Enzim dikenal memiliki dua tipe yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi diluar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi didalam sel). (Pelczar dan Chan, 2010). Selulase merupakan salah satu enzim ekstraseluler (Maryandinin, 2009).

Selulase dapat diaplikasikan dalam industri kertas, tekstil, makanan, dan detergen. Selain itu, enzim ini digunakan untuk meningkatkan kualitas nutrisi pakan ternak dan berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia (Ibrahim dan El-diwany, 2007).

Industri-industri yang memanfaatkan selulase umumnya beroperasi pada suhu tinggi sehingga dibutuhkan enzim yang memiliki stabilitas dan aktivitas yang tinggi pada kondisi suhu tersebut. Kegiatan yang saat ini semakin intensif dilakukan adalah eksplorasi mikroba termofilik yang dapat menghasilkan selulase termostabil dari berbagai sumber alam (Edwards, 1990). Bakteri penghasil selulase dapat diisolasi dari berbagai sumber, antara lain lambung sapi (Bai, 2012), kompos pertanian (Baharuddin, 2010), sumber air panas (Aminin, 2007).

Indonesia kaya akan sumber air panas sebagai media untuk pertumbuhan bakteri termofilik yang dikenal mampu menghasilkan enzim yang bernilai ekonomis (Dewi, 2008). Asnawi (2006) telah berhasil mengisolasi 8 genus bakteri termofilik namun belum tereksplorasi tentang kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan enzim selulose termostabil. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi serta uji aktivitas enzim selulase bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas pacet Mojokerto.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif. Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif meliputi karakteristik makroskopis, uji screening, mikroskopis, identifikasi secara biokimia, identifikasi spesies dengan mikrobact dan aktivitas enzim selulase dari jenis bakteri selulolitik yang berhasil diisolasi dari mata air panas.

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah Mikroskop, *micropipet*, cawan petri, *Erlenmeyer*, tabung reaksi, timbangan analitik, gelas ukur, *beaker glass*, *autoclave*, *laminar air flow*, shaker inkubator, *vortex*, kuvet, *spectrofotometer uv-vis*, gunting, bunsen, jarum ose, pipet tetes, inkubator, hot plate stirer, lemari es, termos, penggaris kompor dan panci.

Bahan Penelitian

Bahan air panas bersuhu 45°C-50°C yang diambil dari sumber mata air panas kawasan wisata Ubalan Pacet Mojokerto.

Sampel yang digunakan untuk isolasi bakteri selulolitik adalah air panas. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) agar dan *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) broth (2 g CMC, 0,04 g MgSO₄, 0,15 g KNO₃, 0,1g KH₂PO₄, 0,004 g CaCl₂, 0,4 g *Beef extract*, 3,4 g Agar), kongo merah 1% (1 gram kongo merah dalam 100 ml aquades), reagen pewarnaan gram (*Crystal violet*, *Safranin*, alkohol 70 %), minyak imersi, H₂O₂, *green malachite*, reagen 3,5-dinitrosalisilat (DNS), K-Na-Tartrat 40% (garam *rochelle*), NaCl, aquades, plastik, spirtus, alumunium foil, kertas label, blue tip, tissue dan kapas secukupnya.

Isolasi Bakteri dari Air Panas

Diambil air panas dari termos yang berisi air panas dari sumber mata air Pacet Mojokerto. Air panas sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 90 ml CMC broth (pengenceran 10⁻¹)

kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam, selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10⁻¹⁰ dengan mengambil 1 ml dari pengenceran sebelumnya lalu diencerkan dengan 9 ml aquadest steril. Pengenceran 10⁻¹ sampai 10⁻¹⁰ diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri untuk ditanam secara *pour plate* menggunakan media CMC agar, kemudian diinkubasi didalam inkubator suhu 50°C selama 48 jam (Hartanti, 2010).

Uji Bakteri Selulolitik Secara Kualitatif

Isolat-isolat bakteri diinokulasikan ke dalam media CMC agar. Kultur kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 50°C. Visualisasi zona bening dilakukan dengan menambahkan *congo red* (1 mg/ml) selama 15 menit kemudian dicuci dengan NaCl 1 M. Koloni yang tumbuh diamati dan diukur zona beningnya sebagai selisih diameter total koloni zona bening dengan diameter koloni. Zona bening menunjukkan bahwa koloni bakteri tersebut menghasilkan enzim selulolitik dan mendegradasi selulosa yang ada disekitarnya. Hasil isolat-isolat yang memiliki kemampuan degradasi selulosa dilakukan peremajaan pada media agar miring kemudian diambil satu ose untuk ditumbuhkan dalam media CMC cair yang mengandung substrat CMC 1% dengan diinkubasi suhu 50°C selama 24 jam.

Identifikasi Isolat Bakteri

Isolat bakteri murni kemudian dikarakterisasi dan diidentifikasi yang dilakukan secara biokimia. Karakterisasi yang dilakukan meliputi:

Pengamatan makroskopik

Pengamatan karakteristik koloni bakteri hasil isolasi pada media CMC agar datar yaitu berdasarkan bentuk koloni, Permukaan, tepi koloni dan warna koloni.

Pewarnaan Gram

Pengamatan mikroskopik dilakukan untuk melihat bentuk sel bakteri dan untuk melihat kemurnian dari isolat serta

pengidentifikasian isolat hingga mencapai genus. Pengamatan mikroskopis yang dilakukan adalah pewarnaan gram karena pengidentifikasian spesies isolat bakteri dengan *Microbact*.

Identifikasi dengan Menggunakan Microbact

Pengidentifikasian isolat bakteri hingga tingkat spesies dibantu dengan *microbact*. Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 dan 24 jenis. (Oxoid, 2004).

Produksi Ekstrak Kasar Enzim Selulase

Isolat bakteri selulolitik termofilik diinokulasikan sebanyak 2 ose dalam 50 mL media CMC Broth dan diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm pada suhu 50°C selama 18 jam, inokulum kemudian diambil sebanyak 5 mL medium CMC Broth dan diinkubasi pada shaker inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam(Hartanti, 2010). Ekstrak kasar enzim diperoleh dengan mensentrifugasi kultur pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C, supernatan yang diperoleh adalah ekstrak kasar enzim selulase.

Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 ml dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan KNa-Tartrar 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur

absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Pengukuran Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase Berdasarkan Kadar Glukosa

Sebanyak 1 ml ekstrak kasar enzim selulase dicampur dengan 1 ml substrat (CMC 1% , dalam buffer pH 7) lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 40 menit. Dari campuran larutan diambil 1 ml dan ditambahkan dengan 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung reaksi dengan alumunium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan KNa-Tartar 40%. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 ml dan dihomogenkan. Selanjutnya dikur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Satu unit aktivitas selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol glukosa per menit pada kondisi tertentu (Dybkaer, 2001). Aktivitas selulase ditentukan dengan mengkonversi nilai absorbansi yang diperoleh dari konsentrasi glukosa standart, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus (Kombong, 2004) :

$$AE = \frac{C}{BM \text{ glukosa} \times t} \times \frac{H}{E}$$

Keterangan :

- AE : Aktivitas Enzim
 C : Konsentrasi Glukosa
 BM : Berat Molekul Glukosa (180 g/mol)
 t : Waktu Inkubasi (menit)
 H : Volume total enzim-substrat (ml)
 E : Volume enzim (ml)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri

Hasil isolasi bakteri yang dilakukan dengan menggunakan media *Carboxil Methyl Cellulosa* (CMC) agar diperoleh 6 isolat yang memiliki karakteristik koloni

yang berbeda satu sama lain setelah dilakukan tahap pemurnia.

Uji Bakteri Penghasil Selulase secara Kualitatif

Uji bakteri selulolitik secara kualitatif dengan CMC agar dilakukan pada 6 isolat bakteri yang telah berhasil diisolasi sebelumnya, dari hasil pengujian didapatkan 6 isolat yang mempunyai aktivitas selulolitik berupa visualisasi zona bening disekitar koloni. 6 isolat tersebut memiliki lebar zona bening yang hampir sama besar. Tapi terlihat bahwa isolat PS 4 memiliki lebar zona bening yang sedikit lebih lebar dari pada isolat-isolat yang lain (Gambar 1)



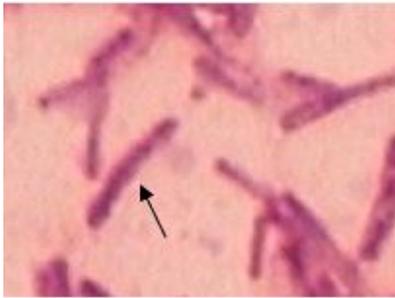
Gambar 1. Zona bening isolat 4. Ket : B : zona bening, K : Koloni bakteri

Tabel 1 Hasil Pengujian dan Pengukuran Zona bening bakteri selulolitik secara kualitatif

No	Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)
1.	PS 2	27
2.	PS 3	24
3.	PS 4	30
4.	PS 5	17
5.	PS 6	20
6.	PS 8	20

Pewarnaan Gram

Pengujian gram menunjukkan gram positif pada semua isolat bakteri selulolitik hasil isolasi dari sumber air panas Pacet Mojokerto (Gambar 2)



Gambar 2. Pewarnaan gram isolat bakteri

Identifikasi Isolat Bakteri Selulolitik dengan Mikrobact 12A/E

Berdasarkan perbedaan karakteristik koloni, morfologi sel dan zona bening yang dihasilkan maka terpilih empat isolat bakteri selulolitik termofilik yang dilakukan pengujian lanjutan identifikasi bakteri dengan menggunakan *Mikrobact 12 A/E*. Berdasarkan hasil identifikasi maka isolat bakteri PS 2 dan PS 3 teridentifikasi sama sebagai spesies *Bacillus megaterium*, isolat bakteri PS 4 teridentifikasi sebagai spesies *Bacillus stearothermophyllus* dan isolat bakteri PS 8 teridentifikasi sebagai spesies *Bacillus laterosporus*.

Identifikasi *Bacillus megaterium*

Bakteri ini termasuk kingdom monera, phylum firmicutes, class bacilli, ordo bacillales, family bacillaceae dan genus *Bacillus*. Bentuk sel genus *Bacillus* adalah batang pendek dan lurus, berukuran antara 0,5-0,25 x 1,2-10 μm , dan golongan bakteri ini termasuk gram positif dan bersifat motil karena mempunyai flagel diseluruh bagian selnya. Endospora berbentuk oval atau berbentuk silindris sangat resisten teradap perubahan lingkungan. Golongan bakteri ini bersifat aerob atau fakultatif anaerobic, mempunyai kemampuan fisiologis tahan terhadap panas, pH dan salinitas. Bakteri ini dapat melakukan metabolisme fermentasi karbohidrat dan katalase positif (Holt, 1994).

Bacillus megaterium dalam penelitian ini memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase. Hal tersebut selaras dengan temuan Shakoer dkk (2013)

yang telah mengidentifikasi isolat temuannya dari sayur-sayuran sebagai *Bacillus megaterium*. *B. megaterium* tersebut memiliki suhu dan pH pertumbuhan optimum 45°C dan 7.

Identifikasi *Bacillus stearothermophyllus*

Bakteri ini termasuk kingdom monera, phylum firmicutes, class bacilli, ordo bacillales, family bacillaceae dan genus *Bacillus*. Berdasarkan pengamatan morfologi sel bakteri *Bacillus stearothermophyllus* termasuk bakteri gram positif yang berbentuk batang atau basil kurus. Bakteri ini memproduksi endospora dalam siklus hidupnya. Isolat bakteri ini mempunyai endospora terminal, yaitu endospora yang letaknya di tengah sel. Pada uji fermentasi gula-gula bakteri *Bacillus stearothermophyllus* terdeteksi positif mampu memfermentasi xylosa, mannitol dan arabinosa sedangkan pada glukosa, laktosa, sukrosa dan maltose terdeteksi negatif. Menurut Tortora dkk (2003) umumnya bakteri lebih optimal di dalam memanfaatkan golongan karbohidrat yang paling sederhana daripada sumber karbohidrat yang lebih kompleks seperti laktosa, sukrosa dan arabinosa.

Bacillus stearothermophyllus memiliki panjang sel 0,6 – 1,0 μm dan lebar sel 2 – 3,5 μm , endospora berbentuk lonjong, sel motil, hidup antara suhu 37 - 65°C dan pH 6,0 – 8,0. Sering tersusun atau membentuk rantai. Termasuk bakteri Gram positif dan motil atau bergerak dengan flagella. Terdapat tidak atau lebih dari satu spora perselnya. Bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif dan ditemukan di berbagai macam tempat atau habitat (Claus dan Berkeley, 1986).

Identifikasi *Bacillus laterosporus*

Bakteri ini termasuk kingdom monera, phylum firmicutes, class bacilli, ordo bacillales, family bacillaceae dan genus *Bacillus*. Berdasarkan pengamatan morfologi sel bakteri ini memiliki bentuk sel batang (basil)

kurus. Bakteri *Bacillus laterosporus* tedeteksi menghasilkan endospora dalam siklus hidupnya. Endospora dari bakteri *Bacillus laterosporus* termasuk jenis endospora subterminal artinya endospora berada didekat ujung sel vegetatifnya. Pada hasil uji fermentasi gula-gula bakteri ini positif memfermentasi glukosa, mannitol, sukrosa, maltose. Bakteri *Bacillus laterosporus* mampu tumbuh pada suhu 25-55°C. Menurut Pelczar (2000) bakteri yang mampu tumbuh pada rentang suhu 25-55°C adalah bakteri golongan termofil fakultatif. Kisaran suhu tersebut sangat mempengaruhi laju pertumbuhan dari bakteri karena suhu mempengaruhi semua proses reaksi kimiawi dalam tubuh bakteri tersebut.

Bacillus laterosporus telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi kegunaannya oleh beberapa peneliti. Bakteri ini memiliki habitat alami pada air, tanah dan serangga. Potensi bakteri ini sebagai biopestisida terhadap beberapa serangga yang meliputi Coleoptera, Lepidoptera, dan Diptera dan juga beberapa nematode dan moluska telah dilaporkan. Selain itu *B. laterosporus* juga memiliki aktivitas antimikroba melawan bakteri dan fungi patogen. *B. laterosporus* juga terdeteksi mampu menghasilkan antibiotik, yang telah diobservasi patoenisitasnya pada bidang medis. (Ruii, 2013).

Aktivitas Enzim Selulase Yang Dihasilkan Bakteri Selulolitik Secara Kuantitatif

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai kecepatan pengurangan substrat atau kecepatan pembentukan produk pada kondisi optimum. Satu unit aktivitas enzim selulase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dihasilkan satu mikromol gula reduksi (glukosa) setiap menit (Lehninger, 1993). Aktivitas selulase dapat diukur dengan menggunakan metode asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS).

Besar kecilnya aktivitas enzim selulase ini akan mempengaruhi kadar gula

pereduksi (glukosa) yang dihasilkan. Komponen pereaksi DNS adalah asam dinitrosalisilat, garam Rochelle (KNa-Tartrat), fenol, sodium bisulfit, dan natrium hidroksida. Menurut Miller (1959), komponen-komponen tersebut memiliki fungsi yaitu asam 3,5-dinitrosalisilat untuk mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang dibantu oleh natrium hidroksida, garam Rochelle untuk menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil. Fenol berfungsi untuk stabilisasi warna yang terbentuk dan sodium bisulfit untuk menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk.

Tabel 2 Hasil Perhitungan Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Selulase

No	Kode Isolat	Aktivitas Ekstrak Kasar (U/mL)
1.	PS 2 (<i>Bacillus megaterium</i>)	$3,9 \times 10^{-3}$
2.	PS 3 (<i>Bacillus megaterium</i>)	$1,9 \times 10^{-3}$
3.	PS 4 (<i>Bacillus stearoithermophilus</i>)	$7,8 \times 10^{-3}$
4.	PS 8 (<i>Bacillus laterosporus</i>)	$4,2 \times 10^{-3}$

Berdasarkan hasil perhitungan aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dapat diketahui bahwa Isolat PS 4 memiliki aktivitas enzim yang paling tinggi yaitu $7,8 \times 10^{-3}$ U/mL. Selanjutnya diikuti Isolat PS 8, Isolat PS 2 dan Isolat PS 3 yang memiliki masing-masing aktivitas enzim sebesar $4,2 \times 10^{-3}$ U/mL, $3,9 \times 10^{-3}$ U/mL dan $1,9 \times 10^{-3}$ U/mL. Aktivitas enzim yang dimiliki oleh keempat isolat tersebut masih kecil. Hal ini disebabkan karena isolat bakteri tersebut masih merupakan tipe liar (*wild type*). Hartanti (2010) mengisolasi bakteri selulolitik termofilik dari mata air panas gunung Pancar Bogor dengan aktivitas enzim terbesar $6,11 \times 10^{-3}$ U/mL. Narasimha dkk (2005), menyebutkan bahwa produksi selulase oleh tipe liar *Bacillus pumilus*, *Cellulomonas biazotea*, dan *Trichoderma*

aureoviride dalam media cair tidak akan melebihi 1.5 U/mL. Chang dkk (2009) *Bacillus* sp. yang diisolasi dari kompos *Brassica* memiliki aktivitas maksimum selulolitiknya sebesar 1.90-2.33 U/mL.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas Pacet Mojokerto didapatkan 4 jenis isolat bakteri yang berbeda dari segi ciri-ciri morfologi koloni, pewarnaan gram, dan morfologi sel bakteri yang memiliki zona bening.

Isolat PS 2 dan isolat PS 3 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus megaterium*, isolat PS 4 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus stearothermophilus* dan isolat PS 8 teridentifikasi sebagai spesies bakteri *Bacillus laterosporus*. Aktivitas enzim dari isolat PS 2, isolat PS 3, isolat PS 4 dan isolat PS 8 masing-masing sebagai berikut $3,9 \times 10^{-3}$ U/mL, $1,9 \times 10^{-3}$ U/mL, $7,8 \times 10^{-3}$ U/mL dan $4,2 \times 10^{-3}$ U/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Aminin, A.L.N., Madayanti, F., Aditiawati, P., dan Akhmaloka, 2007, 16S Ribosomal RNA-Based Analysis of Thermophilic Bacteria in Gedongsongo Hot Spring, *Microbiology Indonesia*, Vol. 1, No.1, ISSN 1978-3477
- Asnawi, Hafid. 2006. Keanekaragaman Bakteri Termofilik yang Terdapat Dalam Sumber Mata Air Panas di Taman Wisata Padusan Pacet, Kabupaten Mojokerto, Jawa Timur. *Skripsi*. Malang : Jurusan Biologi FMIPA, UM.
- Baharuddin, A.S., Razak, M.N.A., Hock, L.S., Ahmad M.N., Aziz, S.A., Rahman, N.A.A dan Shah, U.K.M., 2010, Isolation and Characterization of Thermophilic Cellulase-Producing Bacteria from Empty Fruit Bunches-Palm Oil Mill Effluent Compost, *American Journal of Applied Sciences*, 7: 56-62.
- Bai, S., Kumar, R.M., Kumar, D.J., Mukesh, Balashanmugam P, Kumaran. Bala M.D., dan Kalaichelvan P.T., 2012, Cellulase Production by *Bacillus subtilis* isolated from Cow Dung, Department of Biotechnology, *KSR College of Arts and Science*, Tiruchengode, TN, India.
- Chang CC, Ng CC, Wang CY, Shyu YT. 2009. Activity of cellulase from *Thermoactinomyces* and *Bacillus* spp. isolated from *Brassica* waste compost. *Sci Agric* 66:304-308.
- Claus, D., and R. C. W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, p. 1105-1139. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Dewi, I.M. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Kitinase Termofilik Kasar dari Sumber Air Panas Tinggi Raja, Simalungun Sumatera Utara. [Tesis]*. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Dybkaer, R. 2001. Unit "Katal" for Catalytic Activity. *J Pure Appl Chem* 73: 927-931.
- Edwards C. 1990. *Microbiology of Extreme Environments*. New York: Mc Graw-Hill Publishing Company.
- Hartanti. 2010. *Isolasi Dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik Dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor. Skripsi*. Bogor : Departemen Biokimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Holt, G., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. dan Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual Determinative*

- Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins Baltimore.
- Ibrahim ASS, dan El-diwany AI. 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *J Appl Sci* 1:473-478.
- Lehninger, A.I. 1993. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Martoharsono, Soeharsono. 2006. Biokimia I. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Maryandinin, Anja. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik Dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Sains*. Vol. 13, No. 1, Hal: 33-38.
- Miller GL, 1959. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Narasimha G et al. 2005. Nutrient effects on productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *J Biotechnol* 5: 472-476.
- Oxoid, 2004. Microbact Identification Kits. <http://www.oxoid.com/fst/Val.kane@oxoid.com.pdf>. Tanggal akses 05 April 2014
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 1. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, Penerjemah; Jakarta: UI Pr. Terjemahan dari: *Elements Of Microbiology*.
- Ruiu, Luca. 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad-Spectrum Antimicrobial Species. *Journal of Insects* 4 : 476-492.
- Shakoor, Shumaila., Saira Aftab dan Abdul Rehman. 2013. Characterization of Cellulose Degrading Bacterium, *Bacillus megaterium* S3, Isolated from Indigenous Environment. *Pakistan J. Zool*, Vol 45(6), pp. 1655-1662.
- Tortora. G.J, 2003. *Microbiology an Introduction*. An imprint of Addison Wesley Logman. Inc : San Fransisco Boston New York.