

ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI SIMBION LARVA KUPU-KUPU *Cossus cossus* PENGHASIL ENZIM SELULASE

Maswati Baharuddin¹, Abd. Rauf Patong², Ahyar Ahmad², Nursiah La Nafie²
¹Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan teknologi, UIN Alauddin Makassar
²Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Hasanuddin
Email: bmaswati@gmail.com

Abstract: *This study was conducted to characterize bacterial symbionts of butterfly larvae Cossus cossus capable of degrading cellulose. This study successfully purify and characterize isolates originating from the intestine (CC1 and CC2), head (CC3), middle (CC4), and tail (CC5). From a qualitative test using 0.1% congo red gained the clear zone indicates that the bacteria are able to degrade cellulose. Based on the test temperature and pH on the growth of the data obtained CC5 isolates including isolates of thermophilic bacteria, while others including mesophilic bacteria. While based pH test all isolates were able to grow well at neutral pH. Based on the data obtained growth curve maximum bacterial growth at the 24th hour. Based on morphology and physiology test obtained bacteria genus Acinotobacter, Pseudomonas, and Bacillus.*

Keywords: *bacteria simbiosis, cellulase, Cossus cossus*

1. PENDAHULUAN

Selulosa merupakan biomolekul yang paling banyak ditemukan di alam dan merupakan penyusun tumbuhan. Selama ini limbah pertanian dan kehutanan seperti jerami padi, tongkol jagung, bagas, dan lain-lain belum dimanfaatkan secara optimal.

Pemanfaatan limbah berlignoselulosa dengan menggunakan mikroorganisme dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi lignoselulosa menjadi komponen gula.

Salah satu kendala dalam hidrolisis lignoselulosa adalah perlawanan biomassa lignoselulosa yang sangat tahan terhadap hidrolisis kimia dan biologi khususnya pada kristal selulosa yang menyusun inti dinding sel (Chandel and Sigh, 2011). Konversi selulosa menjadi gula sederhana memerlukan enzim hidrolase. Perkiraan menunjukkan bahwa pemanfaatan enzim selulase dalam proses bioteknologi dapat menurunkan biaya pengolahan hingga 13% (Lynd *et. al.*, 2008).

Terjadinya keterbatasan pada degradasi enzimatik dari biomassa lignoselulosa sebagian besar terikat dengan stabilitas enzimatik, inhibitor, dan produk samping (Willis *et al.*, 2010). Pencarian enzim baru dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi merupakan salah satu cara untuk mengatasi perlawanan biomassa lignoselulosa.

Pemanfaatan bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase dalam proses konversi tersebut menjadi menarik untuk diteliti. Bakteri tersebut mampu menguraikan selulosa menjadi glukosa sebagai sumber karbon dan sumber energi. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase berbeda, tergantung gen yang dimiliki dan sumber karbon yang digunakan (Vilanova *et al.*, 2012). Pemanfaatan bakteri sebagai penghasil enzim dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan antara lain: biaya produksi murah, dapat diproduksi dalam waktu singkat, mempunyai kecepatan tumbuh tinggi serta mudah dikontrol.

Beberapa serangga telah berevolusi dengan menggunakan substrat lignoselulosa sebagai sumber energi, sehingga menjadi salah satu alternatif dan sumber daya yang optimal untuk enzim selulolitik baru. Serangga yang hidup di pohon dan menghasilkan enzim selulase untuk menghidrolisis lignoselulosa sebagai komponen utama pada serat (Purwadaria, 2003). Fakta menarik teramati pada observasi pendahuluan yang dilakukan di Permandian Desa Lejja Soppeng terikat dengan sejenis serangga yang hidup pada pohon *Dao (Pometia pinnata)* dan menjadikan kulit dan batang pohon tersebut sebagai makanannya. Pohon ini merupakan pohon keras yang tergolong pohon besar dengan tinggi rata-rata 18 meter dengan diameter maksimum 100 cm. Hasil identifikasi awal menunjukkan bahwa serangga tersebut termasuk jenis larva kupu-kupu. Kemampuan serangga tersebut menarik untuk diteliti terutama enzim atau kemungkinan peran bakteri yang bersimbiosis dalam sistem pencernaannya (Delalibera and Kenneth, 2005)

Aktivitas enzim selulolitik bakteri simbiosis telah ditemukan Delalibera *et al.* (2005) pada usus penggerek kayu *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae) dan kumbang *Ips Pini* dan *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae) ditemukan adanya α -*Proteobacteria* yang mampu mendegradasi Carboxy Metil Cellulose (CMC), sedangkan γ -*Proteobacteria* pada larva dan dewasa kumbang Pinus *Dendroctonus frontalis* telah ditemukan oleh (Vasantakumar *et al.*, 2006)

Menurut Muin *et al.* (2010) pada serangga yang mencerna komponen kayu sebagai nutrisi sering dibantu oleh mikroorganisme dengan berbagai cara diantaranya pertama akuisisi enzim yang dihasilkan mikroba pada substrat yang dicerna, pencernaan pendahuluan substrat oleh mikroorganisme sebelum

dicerna, kemudian pengayaan bahan nutrisi dalam bentuk sel mikrobial dan metabolit, selanjutnya pengeluaran dan detoksifikasi zat ekstraktif kayu, mikroba yang hidup di usus menghasilkan dan melepaskan enzim, dan mikroorganisme yang bekerja sebagai pengurai yang melepaskan sumber karbon utama untuk asimilasi serangga.

Bakteri selulolitik merupakan suatu komunitas bakteri yang hidup pada bahan yang mengandung selulosa (Martien, 2000). Mikroorganisme selulolitik seperti bakteri dan fungi menghasilkan seperangkat enzim yang menghidrolisis selulosa kristal secara sinergis menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa yang berfungsi sebagai sumber karbon dan unsur hara bagi pertumbuhan mikroorganisme tersebut. Enzim yang berperan dalam proses hidrolisis tersebut adalah selulase yang dihasilkan mikroorganisme sebagai respon terhadap adanya selulosa pada lingkungan hidupnya dan proses tersebut berlangsung jika terjadi kontak antara sel bakteri dengan permukaan selulosa (Lynd *et al.*, 2002).

Bakteri selulolitik telah diisolasi dari berbagai sumber berbeda seperti tanah (Irfan, *etal*, 2012), ladang pertanian di India (Verma and Akhilesh, 2012), kotoran sapi (Bai *et.al*, 2012), ekosistem air hitam (Fikrida, 2000). Bakteri selulolitik juga telah diisolasi dari serangga (Willis *et.al*, 2010), rayap (Syam, 2008), kumbang kayu (Delalibera *et.al*, 2005), larva kumbang cemara dan dewasa (Vasantakumar, *et.al*, 2006).

Perbandingan ketiga komponen kompleks enzim selulase tergantung pada jenis mikrobanya. Sebagai contoh enzim ekstraselular bakteri *Cellulomonas* CSI-17 lebih berperan dalam penguraian selulosa amorf. β -D-1,4-glukosidase umumnya bersifat ekstraselular pada kapang tidak pada bakteri (Purwadaria, *et. al*, 2003).

2. METODE PENELITIAN

Penentuan Spesies Larva

Sampel larva kupu-kupu berasal dari pohon *Dao* yang berada di sumber permandian air panas Lejja. Sampel ini dipindahkan ke dalam toples dan dibawa ke laboratorium. Selanjutnya dilakukan identifikasi spesies larva. Identifikasi spesies dilakukan dengan mengamati perubahan instar dari larva, pupa dan selanjutnya menjadi dewasa. Untuk identifikasi dewasa dilakukan dengan melihat ukuran tubuh, antena, kepala, bentuk abdomen, tipe sayap, tipe alat mulut, tipe caput, dan tipe torax.

Screening dan Isolasi Bakteri Selulolitik dari Larva *Cossus cossus*

Sebanyak lima larva diambil untuk isolasi. Masing-masing larva dicincang dengan pisau steril, dihomogenkan dan supernatan diambil dan diencerkan untuk memperkirakan jumlah bakteri.

Peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil 1 ose bakteri selulolitik hasil isolasi dari larva *Cossus cossus* kemudian digoreskan pada media CMC agar (Media yang digunakan adalah media CMC agar yang terdiri dari 1 gram CMC, 0,02 gram $MgSO_4$; 0,075 gram KNO_3 ; 0,05 gram K_2HPO_4 ; 0,002 gram $CaCl_2$; 0,2 gram yeast ekstrak dan 1,25 gram bakto agar) miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil peremajaan digunakan untuk penentuan kurva tumbuh dan kurva aktivitas selulase.

Pengaruh Suhu dan pH terhadap Pertumbuhan Bakteri

Pengaruh suhu terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan membiakkan bakteri pada berbagai suhu. Pada Penelitian ini dilakukan pada suhu 4°C, 25°C, 37°C, dan 47°C. Sedangkan pengaruh pH pada pertumbuhan bakteri dilakukan pada pH asam, netral dan Basa.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara menginokulasikan sebanyak 2 ose isolat hasil peremajaan kedalam 200 mL medium CMC broth 1 %, kemudian diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama 18 jam. Sebanyak 25 mL dimasukkan dalam 250 mL medium CMC 1 %. Diambil 4 mL tiap 4 jam sekali dan diukur densitas optik (OD). Densitas optik (OD) diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan membuat plot antara waktu dan densitas optik. Sedangkan aktivitas selulase ditentukan dengan mengukur kadar gula reduksi dengan metode Nelson-Somogy.

Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase

Pengukuran aktivitas selulase pada prinsipnya didasarkan pada jumlah gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis selulosa. Untuk medium pertumbuhan menggunakan media selektif. Gula pereduksi yang dihasilkan dihitung sebagai glukosa dengan metode Nelson Somogy. Ke dalam 0,5 mL larutan sampel ditambahkan 0,5 mL reagen Nelson, kemudian dipanaskan selama 20 menit, selanjutnya didinginkan. Setelah dingin dilakukan penambahan 0,5 mL Arsenomolibdat, kemudian dikocok dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

Karakterisasi Morfologi dan Fisiologi Bakteri

Karakterisasi morfologi dan fisiologi dilakukan sesuai metode *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Bottger, 1996) dalam Natsir (2010). Bakteri murni dan isolat terpilih ini ditumbuhkan selama 24 jam pada suhu 37°C dalam agar miring. Morfologi sel isolat penghasil selulase diamati dengan mikroskop pada pembesaran 1000 kali. Pengamatan sel mencakup pewarnaan gram, bentuk sel dan pewarnaan spora. Adapun pengamatan fisiologi mencakup reaksi indol, metil merah, *motility*, citrate, urea, oksidasi, oksidasi fermentasi glukosa, katalase, VP test dan reduksi nitrat.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan skrining bakteri selulolitik dari larva kupu-kupu dilakukan melalui beberapa tahap diantaranya; penentuan spesies larva, penentuan media yang cocok untuk bakteri selulolitik dari larva *Cossus cossus*, peremajaan isolat, pengaruh suhu dan pH pada pertumbuhan bakteri, pembuatan kurva pertumbuhan, penentuan genus dari isolat bakteri selulolitik.

Penentuan spesies dilakukan dengan mengidentifikasi tiap tahap hidupnya yang meliputi tahap larva, pupa, dan kupu-kupu ini dilakukan dengan melihat tiap perubahan instar yang terjadi. Diperoleh larva yang hidup pada pohon Dao ini merupakan larva kupu-kupu jenis *Cossus cossus*. Larva ini mampu mencerna pohon yang masih hidup sehingga diperkirakan mempunyai enzim selulase.

Peremajaan Bakteri Selulolitik

Peremajaan bakteri selulolitik dilakukan pada Media CMC agar yang terdiri dari 1 gram CMC; 0,02 gram MgSO₄; 0,075 gram KNO₃; 0,05 gram K₂HPO₄; 0,002 gram CaCl₂; 0,2 gram yeast ekstrak dan 1,25 gram bakto agar. Media ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Peremajaan isolat bertujuan untuk meregenerasi atau memperbaharui sel bakteri, menjaga ketersediaan nutrisi, dan untuk menghindari adanya perubahan karakteristik dari kultur murni yang ditanam.

Pengaruh Suhu dan pH pada Pertumbuhan Bakteri

Kisaran suhu untuk aktivitas enzim menentukan sifat pertumbuhan mikroorganisme. Suhu tertinggi di mana mikroorganisme masih dapat tumbuh. Berdasarkan data yang diperoleh isolat CC1, CC2, CC3, dan CC4 dapat tumbuh pada suhu 25-47 °C. Ini berarti isolat tersebut termasuk bakteri mesofil, sedangkan isolat CC5 mampu tumbuh pada suhu lebih dari 47°C sehingga diperkirakan termasuk bakteri termofil.

Tabel 1. Hasil seleksi pertumbuhan isolat bakteri selulolitik pada variasi suhu

Isolat	4°C	25°C	37°C	47°C
CC1	-	++	+++	-
CC2	-	+	+++	+
CC3	-	+++	++	+
CC4	-	++	+	+
CC5	-	+	++	++

Pada pertumbuhan mikroorganisme sering terjadi perubahan pH media. Mikroorganisme yang melaksanakan proses fermentasi menjadi asam sehingga pH dapat turun menjadi 3,5. Sebaliknya pada saat metabolisme protein dan asam amino dilepaskan ion amonium sehingga pH menjadi basa. Pada umumnya bakteri tumbuh dengan baik pada pH sekitar 7,0. Berdasarkan data pada Tabel 2, isolat CC3 dan CC4 dapat tumbuh pada pH Asam (4) dan tidak dapat tumbuh pada pH Basa (10-13). Sedangkan Isolat CC1, CC2, dan CC5 hanya dapat tumbuh pada pH Netral.

Tabel 2. Hasil seleksi pertumbuhan isolat bakteri selulolitik pada variasi pH

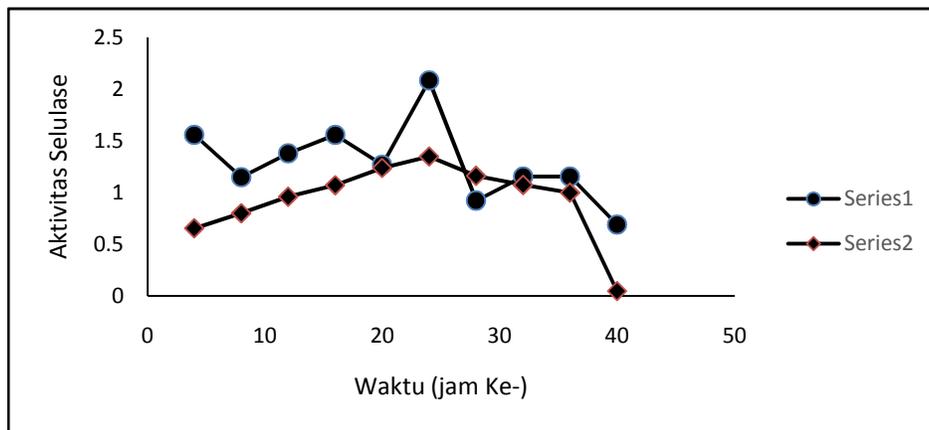
Isolat	pH Asam	pH Netral	pH Basa
CC1	-	++	-
CC2	-	++	-
CC3	+	+++	-
CC4	+	++	-
CC5	-	++	-

Keterangan :

- : Tidak ada pertumbuhan (bening)
- +
- ++ : Pertumbuhan subur (keruh)
- +++ : Pertumbuhan sangat subur (sangat keruh)

Penentuan Kurva Pertumbuhan

Pola pertumbuhan bakteri merupakan pola yang menunjukkan fase pertumbuhan dari suatu mikroorganisme. Pertumbuhan mikroorganisme dapat didefinisikan sebagai peristiwa peningkatan volume suatu organisme disertai dengan peningkatan biomassa sel. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri bertujuan untuk mengetahui waktu terjadinya fase logaritme optimum dalam rangka mengisolasi enzim selulase.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan isolat bakteri CC2

Pada penelitian ini pengukuran kadar gula reduksi dilakukan pada semua isolat, namun yang terukur kadar gula reduksinya adalah isolat CC2 dan CC4. Pada Gambar 2 diperoleh data bahwa isolat CC2 mengalami fase stationer terjadi pada jam ke-20 hingga jam ke-36. Pada fase ini mikroorganisme tidak lagi melakukan pembelahan hingga jumlah selnya cenderung tetap karena ketersediaan nutrisi tetap. Pada jam ke-24 kadar gula reduksi yang dihasilkan meningkat, hal ini diperkirakan enzim selulase telah mencapai waktu inkubasi optimal sehingga dapat menghasilkan gula reduksi yang tinggi. Berdasarkan kurva pertumbuhan dan produktivitas gula reduksi pada Gambar 2 waktu panen enzim jam ke-24 dengan kadar gula reduksi tertinggi.

Berdasarkan data pada gambar fase adaptasi berada pada saat jam ke-0 sampai jam ke-8. Pada fase adaptasi, bakteri masih menyesuaikan diri dengan nutrisi yang ada dalam media, sehingga pertumbuhannya belum optimal. Pada jam ke-8 sampai jam ke-24 merupakan fase logaritma. Pada fase logaritma, bakteri membelah diri secara eksponensial. Nutrisi di dalam media pertumbuhan CMC dilakukan oleh bakteri untuk tumbuh dan membelah diri. Pada jam 32- 40 jam merupakan fase stationer. Pada fase stationer, laju pembiakan sel

samadengan laju kematian sel sehingga jumlah keseluruhan bakteri tetap. Kecepatan melambat karena semakin berkurangnya nutrisi yang terkandung dalam medium CMC, Jumlah bakteri pada fase logaritma adalah maksimal sehingga akan dihasilkan pula enzim selulase secara maksimal.

Penentuan Spesies Bakteri Selulolitik

Tabel 3. Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik

Isolat	Medium		
	NA Tegak	NA Miring	NB Cair
CC1	Echinulate	Berduri	Keruh
CC2	Filiform	Menyebar	Pelikel
CC3	Filiform	Berbutir- Butir	Keruh dan sedimen
CC4	Filiform	Menyebar	Pelikel dan Sedimen
CC5	Filiform	Berduri	Berduri

Tabel 4. Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik pada metode cawan

Isolat	Bentuk Koloni		
	Bentuk Koloni	Tepi	Elevasi
CC1	Circular	Cembung	Cembung
CC2	Keriput	Bersemak	Cembung
CC3	Circular	Bersemak	Cembung
CC4	Keriput dan Seperti kerang	Bersemak	Cembung
CC5	Irreguler	Bersemak	Cembung

Berdasarkan tabel morfologi makroskopis dan mikroskopis koloni, isolat CC1 mempunyai karakter morfologi dengan CC3 yaitu berbentuk bulat (*circular*) dan elevasi cembung (*convex*) tapi berbeda warna, dan tepi. Sedangkan untuk isolat yang lain mempunyai perbedaan dalam bentuk, tepian, warna, elevasi, namun berdasarkan uji gram kelima isolat termasuk bakteri gram negatif, hal ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengecatan gram bakteri selulolitik

Isolat	Pengecatan Gram		
	Warna	Bentuk	Keterangan
CC1	Merah	Batang	Gram Negatif
CC2	Merah	Batang	Gram Negatif
CC3	Merah	Batang	Gram Negatif
CC4	Merah	Batang	Gram Negatif
CC5	Merah	Batang	Gram Negatif

Tabel 6. Hasil uji biokimia

Isolat	TSIA		SIM				MRVP			Citr at	Ur ea	Karbohidrat			
	Slant	Butt	H ₂ S	Gas	Indol	Mot	H ₂ S	MR	VP			Glu	Lak	Suk	Mal
CC1	Alkali	Netral	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
CC2	Alkali	Asam	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
CC3	Alkali	Asam	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
CC4	Alkali	Asam	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
CC5	Alkali	Netral	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 7. Hasil uji biokimiawi beberapa isolat bakteri

Isolat	Asal Organ	Genus
CC1	Usus	<i>Acinobakter</i>
CC2	Usus	<i>Pseudomonas</i>
CC3	Kepala	<i>Bacillus</i>
CC4	Tengah	<i>Bacillus</i>
CC5	Ekor	<i>Bacillus</i>

Isolat bakteri selulolitik diujikan pada media untuk melihat aktivitas biokimia. Aktivitas biokimia setiap jenis bakteri berbeda dikarenakan setiap bakteri mempunyai aktivitas enzimatik yang berbeda. Berdasarkan hasil identifikasi diperoleh 3 genus bakteri yaitu *Acinetobakter*, *Pseudomonas*, dan *Bacillus*.

Kelima bakteri yang diperoleh menunjukkan sifat positif dalam uji kemampuan selulolitik, sehingga dapat diduga kelima isolat tersebut mampu mengekspresikan enzim selulase yang mampu memecah ikatan 1,4 β -glukosida dalam media uji. Kemampuan selulolitik dapat dilihat dari pertumbuhan koloni pada media CMC padat dan mampu tumbuh pada media CMC cair. Degradasi selulosa dilakukan dengan bantuan enzim selulase menjadi glukosa.

Kemampuan isolat bakteri tumbuh pada media selulosa membuktikan bahwa isolat tersebut mampu memanfaatkan selulosa sebagai salah satu sumber nutriennya.

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang termasuk golongan saprofit (Lamid, 2011). Bakteri saprofit adalah bakteri yang dapat memanfaatkan sisa-sisa tumbuhan yang telah mati untuk memenuhi kebutuhannya. Pertumbuhan bakteri selulolitik dalam media CMC melalui fase-fase tertentu. Pada fase eksponensial terjadi penambahan sel secara maksimal.

4. PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa diperoleh 5 isolat bakteri selulolitik dari larva kupu-kupu *Cossus cossus* yang terdiri dari *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, dan 3 isolat termasuk genus *Bacillus*. Kelima bakteri selulolitik yang diisolasi dari larva kupu-kupu *Cossus cossus* tersebut mampu tumbuh pada media CMC agar dan CMC cair. Semua isolat tersebut mampu membentuk koloni pada CMC agar dan tumbuh pada CMC cair dengan perubahan warna media menjadi keruh.

DAFTAR PUSTAKA

- Bai, S., M. Ravi K., D.J. Mukesh K., Balashanmugan, M.D. Balakumaran., P.T. Kalaicchevian, 2012, Cellulase Production by *Bacillus subtilis* Isolated from Cow Dung, *Archives of Applied Science Research*, 4(1):269-279.
- Chandel, A., and Singh O.V., 2011, Weedy Lignocellulosic Feedstock and Microbial Metabolic Engineering: Advancing the Generation of Biofuel. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:1289-1303.
- Delalibera, I., Jo H., and Kenneth F. R., 2005, Contrast In Cellulolytic of Gut Mikroorganisms Between The Wood Borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambyidae), and The Bark Beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae), *Physiological Ecology Entomol*, 34(3) : 541-547
- Fikrida, 2000, Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase Ekstremofilik dari Ekosistem Air Hitam, *Disertasi Doktor*, Bogor: Institut Pertanian Bogor (IPB).
- Irfan, M., Safdar A., Quratuain S., Muhammad N, 2012, Isolation and Screening of Cellulolytic Bacteria from Soil and Optimization of Cellulase Production and Activity, *Journal of Biochemistry*, 37(3):287-293

- Lamid, M., Tri P. N., Sri Cusniati, Kursiningrum R., 2011, Exploration Cellulolytic of Bacterium of Rumen Liquid Beef Cattle As Inoculum of Waste Agriculture. *Journal Ilmiah Kedokteran Hewan*, 4(1):37-42
- Lynd, L. R., Willem P.J., Willem H. V. Z., and Isak S. P. 2002, Microbial Cellulose Utilization: Fundamental and Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506-577.
- Martien, R. 2000. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik serta Kemampuannya dalam Memproduksi Enzim Selulase dengan Waktu Inkubasi yang Berbeda dari Hutan Mangrove Tegakan *Rhizophora sp* di Desa Kemujan, Karimunjawa. *Skripsi Sarjana*, Semarang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro.
- Muin, M., Astuti A., dan Syahidah. 2000. *Deteorisasi dan Perbaikan Sifat Kayu*. Makassar: Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin.
- Purwadaria, T., Marbun, P.A., Arnold P.S., Pius P.K., 2003, Perbandingan Aktivitas Enzim Selulase dari Bakteri dan Kapang Hasil Isolasi dari Rayap. 8(4):213-219.
- Syam, K. A. 2008, Optimasi Produksi dan Aktivitas Enzim Selulase dari Mikroba Selulolitik Asal Rayap, *Skripsi Sarjana*, Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB.
- Vasantakumar, A., Italo D., J. Handelsman, Kier D., Patrick D., and Kenneth F. 2006, Characterization of Gut-Associated Bacteria in Larvae and Adults of the Southern Pine Beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann, *Molecular Ecology and Evolution*, 35(6): 1710-1717.
- Verma, V., Aplika V., and Akhilesh K. 2012, Isolation & Production of Cellulase Enzyme from Bacteria Isolated from Agricultural Fields in District Hardoi, Uttar Pradesh, India. *Advances in Applied Science Research*, 3(1):171-174.
- Vilanova, C., Marco G., Laura D., Salvador G., Vicente S., Esther B., Daniel R., Manuel P. 2012, Bacteria from Acidic to Strongly Alkaline Insect Midguts: Potential Sources of Extreme Cellulolytic Enzymes, *Biomass & Bioenergy*, 45 : 288-294.
- Willis, J.D., Cris O., and Juan L. J., 2010. Methods for Discovery and Characterization of Cellulolytic Enzymes from Insects, *Journal Compilation, Insect Science*, 17:184-198.