

SKRINING BAKTERI SELULOLITIK ASAL *VERMICOMPOSTING* TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT

(SCREENING OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM *VERMICOMPOSTING* EMPTY FRUIT BUNCH OF PALM OIL)

Siti Nur Azizah, Kahar Muzakhar, Sattya Arimurti,
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
Koresponden Penulis: kaharmzk@unej.ac.id

Abstrak

Biomassa Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) dihasilkan dalam jumlah melimpah selama pemanenan, sehingga harus didekomposisi dalam waktu singkat. Melalui *vermicomposting*, TKKS dikonversi menjadi kompos yang berlangsung selama 2-3 bulan, sehingga untuk mempercepat proses dekomposisi, penelitian ini perlu dilakukan. Lima puluh satu isolat bakteri selulolitik berhasil diisolasi dari *vermicomposting* limbah TKKS. Hasil uji pada media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) plate, empat isolat memiliki aktivitas selulolitik tertinggi, yaitu isolat 20, 40a, 40b dan 49 dengan indeks aktivitas sebesar 11,90; 10,97; 11,29, dan 11,24. Selama hidrolisis menggunakan substrat CMC dan TKKS, isolat 20 mampu memproduksi gula reduksi tertinggi yaitu sebesar 12,27 µg/mL dan 49,31 µg/mL, sedangkan isolat 40a, 40b, dan 49 sebesar 3,48 µg/mL, 6,28 µg/mL dan 3,10 µg/mL di substrat CMC dan sebesar 24,83 µg/mL, 11,21 µg/mL dan 8,25 µg/mL di substrat TKKS. Keempat isolat bakteri termasuk bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang.

Kata Kunci: bakteri selulolitik, gula reduksi, *vermicomposting* TKKS.

Abstract

Cellulosic empty fruit bunch biomass of palm oil (Tandan Kosong Kelapa Sawit, TKKS) were released in large amount during harvesting, so that it should be decomposed as much as possible in a short time. Through vermicomposting, TKKS will be converted to material use compost but for complete process had 2-3 month so that to accelerate this process an investigation must be done. Fifty one cellulolytic bacteria were successfully isolated from vermicomposting TKKS. The results in CMC (Carboxymethyl Cellulose) medium on plate, four isolates had the highest of cellulolytic activity, named isolates 20, 40a, 40b and 49 with activity index 11,97; 10,97; 11,29 and 11,24. During hydrolization using CMC and TKKS substrates, isolates 20 capable to produce reducing sugar at level 12,27 ug/mL and 49,31 ug/mL, but other isolates 40a, 40b, and 49 had produce reducing sugar at level 3,48 ug/mL, 6,28 ug/mL, 3,10 ug/mL on CMC substrates and 24, 54 ug/mL, 11,21 ug/mL, 8,25 ug/mL on TKKS substrates. All isolates are Gram-negative bacteria with bacil cell form.

Keywords: cellulolytic bacteria, reducing sugar, *vermicomposting* TKKS

PENDAHULUAN

Vermicomposting adalah biokonversi materi organik dengan menggunakan cacing tanah sampai menjadi humus yang disebut vermikompos [1]. Cacing tanah berperan sebagai *pioneer* dekomposisi untuk memfragmentasi limbah organik sehingga dapat meningkatkan luas permukaan bahan organik tersebut untuk didekomposisi lanjut oleh mikroba [2]-[3]. Keunggulan *vermicomposting* adalah waktu lebih cepat dibanding pengomposan secara spontan [4], dan vermikompos yang dihasilkan mengandung unsur hara makro dan mikro yang tersedia lebih besar [5]. *Vermicomposting* telah berhasil digunakan dalam pengolahan berbagai jenis limbah organik [3].

Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS) adalah limbah utama dari industri minyak sawit di Indonesia dengan tingkat ketersediaan berlimpah setiap tahunnya sekitar 37 juta ton [6]. *Vermicomposting* TKKS masih berlangsung

dalam waktu sekitar 2-3 bulan [4]. Hal ini disebabkan TKKS mengandung lignoselulosa yang sukar terdegradasi [7], dengan bahan organik utama yaitu selulosa mencapai 45,95 % [8]. Bahan organik yang mengandung selulosa merupakan substrat bagi pertumbuhan bakteri selulolitik [9], sehingga diduga bakteri selulolitik juga terdapat pada *vermicomposting* TKKS yang mengandung selulosa tinggi.

Bakteri selulolitik berperan sebagai pendegradasi selulosa karena menghasilkan selulase [10]. Saraswati *et al* [9] menyatakan bahwa penggunaan bioaktivator yang mengandung bakteri selulolitik banyak dimanfaatkan dalam pengolahan limbah selulosa menjadi kompos dan sebagai strategi untuk mempersingkat proses dekomposisi. Oleh karena itu untuk memperoleh agen potensial pendegradasi selulosa dan mempercepat *vermicomposting* TKKS dilakukan skrining bakteri selulolitik *indigenous* TKKS. Oktavia [11] menyatakan bahwa bakteri *indigenous* memiliki sifat toleransi yang lebih tinggi terhadap kondisi

lingkungan tempat bakteri berasal. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri selulolitik yang aktivitasnya tinggi dari *vermicomposting* TKKS.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dengan metode deskriptif. Sampel *vermicomposting* TKKS diperoleh dari PT. Bengkelden Agrobisnis di Bandung, yang diketahui suhu sampel saat sampling adalah 29,7-30,2 °C sedangkan pH nya adalah 7-7,3.

Isolasi bakteri dari *vermicomposting* TKKS

Sebanyak 25 gram sampel dimasukkan kedalam erlenmeyer berisi 225 ml larutan NaCl 0,85%. Pengenceran dilakukan secara berseri dengan seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} . Pada masing-masing seri pengenceran diambil 100 µl dan diinokulasikan dengan metode sebaran pada media *Nutrien Agar* (NA). Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam. Pemurnian bakteri dilakukan terhadap koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan karakter morfologi yang berbeda dan dilakukan secara *streak* kuadran pada media NA baru. Isolat murni yang sudah didapat ditumbuhkan pada media NA miring yang digunakan sebagai stok untuk uji lanjut.

Skrining bakteri selulolitik secara semikuantitatif

Isolat berumur 24 jam pada NA *plate* diinokulasikan menggunakan metode titik ke dalam media CMC *plate* dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48 jam. Pengujian aktivitas selulolitik dilakukan dengan metode *Gram's Iodin* [12] dan dilakukan secara *duplo*. Aktivitas selulolitik bakteri diindikasikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni setelah diuji dengan *Gram's Iodin* dan dibiarkan selama 3-5 menit. Indeks aktivitas selulase ditentukan pada rasio diameter zona bening dengan diameter koloni.

Pola pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih

Empat isolat yang indeks aktivitas enzim tertinggi diremajakan pada media NA *plate* hingga berumur 24 jam, selanjutnya diambil 1 ose dan diencerkan pada 1 ml akuades steril. Sebanyak 50 µl suspensi isolat diinokulasikan ke dalam 50 ml media TKKS cair 1% dan di inkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm suhu 30 °C selama 60 jam. Pertumbuhan koloni bakteri pada media kultur diamati berdasarkan perhitungan jumlah sel bakteri menggunakan metode *Total Plate Count*. Setiap interval 6 jam mulai jam ke-0 selama 60 jam isolat diambil sebanyak 1 ml sebagai pengenceran 10^{-1} yang dimasukkan ke dalam garfis 9 ml. Pengenceran dilakukan sampai dengan 10^{-8} . Kemudian 5 µl dari masing-masing pengenceran diinokulasikan secara *drop plate* dalam media NA, diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dan dihitung jumlah koloninya dengan menggunakan *colony counter*.

Uji pembentukan gula reduksi oleh 4 isolat bakteri terpilih

Tahap pertama adalah pembuatan inokulum. Inokulum yang digunakan untuk produksi enzim diambil pada pertengahan fase logaritmik dari empat isolat berdasarkan pola pertumbuhan. Inokulum dari empat isolat yang diinokulasikan ke media produksi terlebih dahulu disetarakan jumlah selnya.

Tahap kedua adalah produksi enzim. Inokulum 2,5 ml diinokulasikan ke dalam 47,5 ml media produksi TKKS cair 1% dan diinkubasi dalam *shaker* 150 rpm. Produksi enzim dibuat *duplo* pada masing-masing isolat. Ekstraksi enzim dilakukan setiap selang waktu 12 jam selama 72 jam dengan sentrifugasi 4000 rpm pada suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak enzim kasar dan disimpan pada suhu -20 °C.

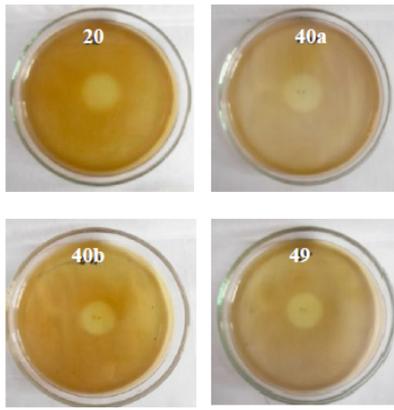
Tahap ketiga adalah analisis gula reduksi berdasarkan metode [13]-[14], yang dilakukan pada substrat 0,5% CMC dalam 0,5 ml buffer pH 7 50 mM dan 0,5 % substrat alkali ekstrak TKKS dalam 0,5 ml buffer pH 7 50 mM. Pada kedua substrat tersebut masing-masing ditambahkan ekstrak kasar enzim 100 µl dan diinkubasi pada inkubator suhu 37 °C selama 2 jam. Setelah inkubasi ditambahkan 0,5 ml reagen *Somogyi* lalu dididihkan pada suhu 100 °C selama 15 menit dan didinginkan. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml reagen *Nelson* dan diencerkan dengan 2,5 ml akuades. Pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada α 500 nm. Perlakuan kontrol sama dengan sampel hanya penambahan enzim kasar dilakukan setelah penambahan reagen *Somogyi*.

Karakterisasi Isolat Bakteri Selulolitik Terpilih

Karakterisasi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati morfologi koloni bakteri (bentuk, elevasi, tepi dan struktur dalam koloni) [15]. Sedangkan karakterisasi mikroskopis dilakukan dengan cara pengecatan Gram berdasarkan metode [16].

HASIL DAN PEMBAHASAN

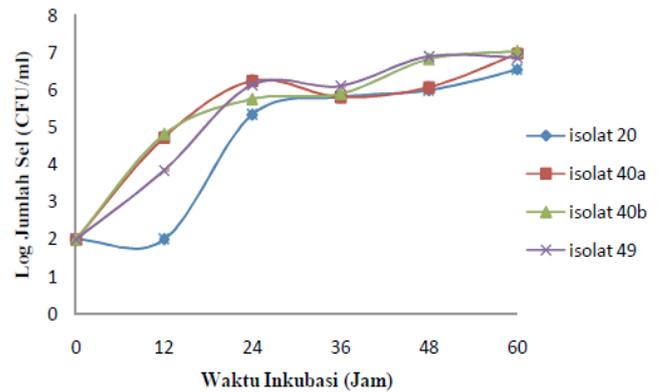
Sebanyak 51 isolat bakteri telah berhasil diisolasi dari *vermicomposting* TKKS. Lima puluh satu isolat tersebut merupakan bakteri selulolitik yang mampu tumbuh pada media CMC *plate*. Secara umum aktivitas selulolitik isolat bakteri ditunjukkan dengan kemampuan tumbuh pada media CMC *plate* yang mengandung selulosa sebagai satu-satunya sumber karbon untuk pertumbuhannya dan terbentuknya zona bening di sekitar koloni selama inkubasi 48 jam (Gambar 1). Zona bening menunjukkan adanya aktivitas hidrolitik oleh enzim ekstraseluler selulase yang diekskresikan oleh isolat-isolat bakteri. Produk hidrolisis tersebut berupa gula sederhana yang tidak membentuk ikatan kompleks dengan iodin. Sedangkan warna kehitaman menunjukkan sisa selulosa yang tidak terhidrolisis sehingga terbentuk kompleks selulosa-iodin [12].



Gambar 1. Analisis semikuantitatif isolat bakteri pada media CMC 1% setelah inkubasi 48 jam

Berdasarkan indeks aktivitas enzim didapatkan bahwa sebanyak 30 isolat memiliki indeks aktivitas selulolitik 1 artinya besarnya diameter zona bening yang terbentuk sama dengan diameter koloni isolat tersebut dan 21 isolat bakteri lainnya memiliki indeks aktivitas selulolitik lebih dari 1. Isolat 20, 49b, 49 dan 40a memiliki nilai indeks selulolitik berturut-turut yaitu 11,90, 11,29, 11,24, dan 10,97 yang lebih tinggi dibandingkan 47 isolat selulolitik lainnya yang mempunyai indeks aktivitas antara 1 sampai 10,75. Perbedaan indeks aktivitas selulolitik tersebut diduga karena selulase diekskresikan oleh masing-masing isolat bakteri yang berbeda potensinya untuk menguraikan substrat dalam media pertumbuhan [17]. Sehingga isolat 20, 40a, 40b dan 49 dipilih karena merupakan isolat potensial yang memiliki indeks selulolitik tertinggi dibanding 47 isolat lainnya. Apun *et al* [18] menyatakan bahwa semakin besar indeks aktivitas selulase pada isolat maka semakin besar aktivitas selulolitik yang dihasilkan.

Pola pertumbuhan isolat bakteri di media TKKS 1% menunjukkan bahwa media tersebut mampu mensuplai nutrisi bagi pertumbuhan sel bakteri dengan baik. Pertumbuhan isolat bakteri terjadi antara jam ke-0 dan terus mengalami peningkatan jumlah sel hingga jam ke-60 (Gambar 2). Pertengahan fase logaritmik (*logarithmic growth*) merupakan fase yang tepat untuk inokulasi ke media produksi. Pada penelitian ini isolat 20, 40a, 40b menunjukkan fase pertengahan logaritmik dengan jumlah sel berturut-turut adalah $2,9 \times 10^5$ CFU/mL, $9,5 \times 10^6$ CFU/mL, $9,2 \times 10^5$ CFU/mL pada jam ke-18, sedangkan isolat 49 sebesar $1,4 \times 10^6$ CFU/mL pada jam ke-24. Pada fase logaritmik jumlah sel meningkat dengan cepat sampai pada batas tertentu hingga memasuki fase statis, metabolisme sel maksimal, dan sintesis bahan sel cepat dengan jumlah konstan sampai nutrisi habis [19]. Pada jam ke-30 sampai jam ke-60, keempat isolat diduga berada pada akhir fase logaritmik karena jumlah sel masih meningkat namun sudah terjadi penurunan percepatan pertumbuhan yang disebut *decelerated phase* [20].

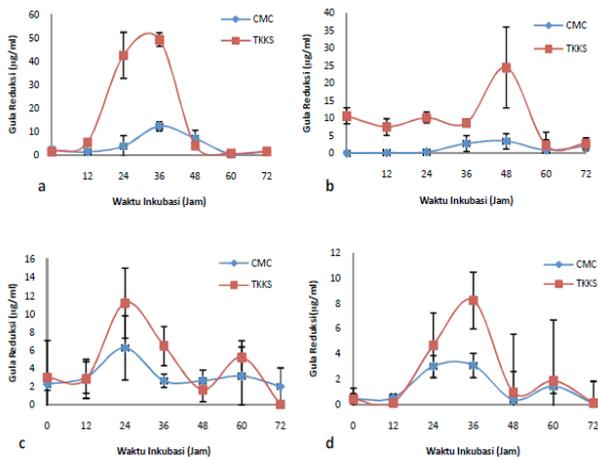


Gambar 2. Pola pertumbuhan isolat bakteri selulolitik terpilih pada media cair TKKS 1%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4 isolat bakteri selulolitik terpilih memiliki kemampuan dalam mendegradasi substrat CMC 0,5% maupun substrat alkali ekstrak TKKS 0,5% yang ditunjukkan dengan pembentukan gula reduksi yang dihasilkan (Gambar 3). Gambar 3 menunjukkan pembentukan gula reduksi oleh 4 isolat secara umum lebih tinggi pada substrat TKKS dibandingkan substrat CMC. Hal ini diduga karena adanya enzim selain selulase, yaitu hemiselulase pada ekstrak kasar enzim, yang diproduksi oleh 4 isolat bakteri terpilih saat ditumbuhkan pada substrat TKKS. Gula reduksi yang dihasilkan pada substrat alkali ekstrak TKKS diduga merupakan gula reduksi hasil hidrolisis selulosa dan hemiselulosa. Hal ini karena TKKS bukan merupakan selulosa murni karena juga mengandung hemiselulosa sebesar 22,84% [8].

Gula reduksi adalah monosakarida sederhana yang dalam penelitian ini merupakan hasil hidrolisis substrat TKKS dan CMC. Gula reduksi seperti glukosa dan gula-gula lain dicirikan dengan adanya gugus aldehid dan keton yang bersifat mampu mereduksi senyawa pengoksidasi [21]. Hidrolisis selulosa menghasilkan gula reduksi berupa glukosa, sedangkan hidrolisis hemiselulosa selain menghasilkan glukosa, juga menghasilkan gula reduksi berupa mannos, galaktosa, xilosa dan arabinosa [22]. Umumnya bakteri selulolitik juga bersifat hemiselulolitik [9], hal ini diduga karena ekspresi enzim selulase berhubungan dengan hemiselulase [23]. Secara kuantitatif, beberapa isolat bakteri memiliki aktivitas selulase dan hemiselulase yaitu isolat bakteri dari *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* dan *Rhodothermus* [24].

Keempat isolat bakteri selulolitik yang diuji memiliki kemampuan pembentukan gula reduksi maksimal dengan waktu inkubasi optimum yang berbeda-beda (Gambar 3). Isolat 20 menghasilkan gula reduksi tertinggi pada waktu inkubasi optimum jam ke-36, yaitu 12,27 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat CMC, dan 49,31 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat TKKS. Isolat 40a, terjadi pada jam ke-48 yaitu 3,48 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat CMC dan 24,54 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat TKKS. Isolat 40b pada jam ke-24 yaitu 6,28 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat CMC dan 11,21 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat TKKS. Sedangkan isolat 49 pada jam ke-36, yaitu 3,10 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat CMC dan 8,25 $\mu\text{g/mL}$ untuk substrat TKKS.



Gambar 3. Pembentukan gula reduksi oleh isolat bakteri selulolitik terpilih di substrat CMC 0,5% dan substrat alkali ekstrak TKKS 0,5%: a) isolat 20; b) isolat 40a; c) isolat 40b; dan d) isolat 49

Pembentukan gula reduksi maksimal oleh keempat isolat bakteri tersebut terjadi karena pada waktu inkubasi optimum antara jam ke-24 sampai jam ke-48 yang merupakan fase logaritmik berdasarkan pola pertumbuhan bakteri (Gambar 2). Jawez (1978) dalam Pasaribu *et al* [25] menyatakan enzim termasuk metabolit primer yang diproduksi saat awal fase logaritmik dan terus meningkat seiring dengan pertumbuhan bakteri dan memiliki peran sangat esensial bagi pertumbuhan sel. Rahmi *et al* [26] menambahkan bahwa produk gula reduksi seperti glukosa yang merupakan gula sederhana langsung digunakan oleh sel bakteri sebagai sumber karbon dan energi untuk memasuki jalur glikolisis dalam proses metabolismenya. Akibatnya pada fase logaritmik pembelahan sel sangat cepat dan jumlah sel tinggi sehingga konsentrasi enzim yang dihasilkan meningkat dan produk yang dihasilkan juga semakin besar.

Penurunan gula reduksi dari keempat isolat bakteri selulolitik terjadi setelah waktu inkubasi optimum. Isolat 20, 40b dan 49 mengalami penurunan pembentukan gula reduksi pada jam ke-48 sedangkan isolat 40a pada jam ke-60. Penurunan pembentukan gula reduksi kemungkinan disebabkan adanya produk glukosa sehingga bersifat represi terhadap sintesis selulase [27]. Akibatnya sel bakteri akan menghentikan metabolisme dan mengurangi produksi enzim sehingga produk gula reduksi yang dihasilkan juga rendah [28]. Kemungkinan lain adalah pada waktu inkubasi tersebut sel mulai menghasilkan enzim lain selain selulase, yaitu protease yang dapat menguraikan atau merusak enzim selulase [29]. Hal ini menyebabkan konsentrasi enzim untuk menghidrolisis substrat TKKS menurun dan produk yang dihasilkan juga rendah.

Karakterisasi morfologi empat isolat bakteri terpilih secara makroskopis dan mikroskopis ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil karakterisasi makroskopis berdasarkan Jutono *et al* [15] diketahui bahwa keempat isolat bakteri selulolitik terpilih memiliki warna koloni yang sama yaitu berwarna putih namun memiliki bentuk, elevasi, tepi dan struktur dalam koloni yang bervariasi. Bentuk koloni isolat

20, 40a dan 40b adalah bulat (*circular*), sedangkan isolat 49 tidak beraturan (*irregular*). Permukaan koloni isolat 20 mengalami pertumbuhan tebal dengan tonjolan tumpul (*umbonate*), isolat 40a membentuk sedikit cembung (*low convex*), isolat 40b mengalami pertumbuhan tebal namun membentuk cekungan (*raised with concave belive edge*) sedangkan isolat 49 yaitu tipis biasanya merata (*effuse*). Tepi koloni isolat 20 dan 40b adalah rata (*entire*), isolat 40a seperti berfilamen (*lacerate*), sedangkan isolat 49 terdapat seperti telinga (*lobate*).

Struktur dalam koloni isolat 20 dan 40b adalah halus dan licin (*smooth*), isolat 40a adalah kasar bergranular (*coarsely granular*), sedangkan isolat 49 dapat meneruskan sinar meskipun benda dibawahnya tidak terlihat jelas (*translucent*). Karakterisasi mikroskopis menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri selulolitik merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki bentuk sel batang (*bacillus*) dengan ujung sel membulat (*rounded end*).

Tabel 1. Karakterisasi morfologi isolat 20, 40a, 40b dan 49 secara makroskopis dan mikroskopis

Karakterisasi morfologi	Isolat 20	Isolat 40a	Isolat 40b	Isolat 49
Warna koloni	Putih	Putih	Putih	Putih
Bentuk koloni	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Circular</i>	<i>Curied</i>
Elevasi koloni	<i>Co-umbonate</i>	<i>Co-umbonate</i>	<i>R/WC&D</i>	<i>Effuse</i>
Tepi koloni	<i>Crenate</i>	<i>Lacerate</i>	<i>Entire</i>	<i>Lobate</i>
Struktur dalam	<i>Smooth</i>	<i>Coarsely granular</i>	<i>Smooth</i>	<i>Translucent</i>
Pengecatan Gram	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Bentuk sel	batang	batang	batang	batang
Keterangan:	^{*)} Koloni tunggal pada media NA plate setelah inkubasi 48 Jam ^{**)} Pembesaran 1000x menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX21 dengan pembesaran gambar 20x menggunakan kamera Casio EX-Z370			

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil isolasi bakteri dari vermicomposting TKKS diperoleh 51 isolat bakteri dari *vermicomposting* TKKS dan 21 memiliki aktivitas selulolitik. Empat isolat yang menunjukkan indeks aktivitas selulase tinggi adalah isolat 20 (11,90), 40a (10,97), 40b (11,29), dan 49 (11,24). Isolat 20 menunjukkan kemampuan pembentukan gula reduksi tertinggi yaitu sebesar 12,27 µg/mL di CMC dan 49,31 µg/ml di TKKS, isolat 40a sebesar 3,48 µg/mL di CMC dan 24,83 µg/mL di TKKS, isolat 40b sebesar 6,28 µg/mL di CMC dan 11,21 µg/mL di TKKS, isolat 49 memiliki kemampuan pembentukan gula reduksi rendah yaitu 3,10 µg/mL di CMC dan 8,25 µg/mL di TKKS. Karakterisasi isolat menunjukkan 4 isolat bakteri selulolitik termasuk kelompok bakteri Gram negatif dengan bentuk sel batang.

Empat isolat bakteri selulolitik terpilih perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut, dan dapat ditambahkan sebagai agen hayati pada *vermicomposting* TKKS. Serta perlu dilakukan optimasi suhu dan pH untuk produksi enzim komersial yang bersubstat TKKS.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bpk. Kahar Muzakhar S.Si., Ph.D., sebagai penyedia dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] G. Munroe, "Manual of On-Farm Vermicomposting and Vermiculture" Canada: Organic Agriculture Centre of Canada (2009).
- [2] Hanafiah, Anas, Napoleon dan Ghoffar, "Biologi Tanah Ekologi & Mikrobiologi Tanah", Jakarta: PT Raja Grafindo Persada, (2005).
- [3] J. Dominguez, M. Aira, dan M.G. Brandon, "Vermicomposting: Earthworm Enhance the Work of Microbes," New York: Springer Heidelberg Dordrecht (2010).
- [4] D. Sabaruddin, (1, Maret 2012). Vermicomposting EFB/TKKS di PIPOC 2011-KLCC Malaysia (online) [www. Bengkelden .com](http://www.Bengkelden.com).
- [5] Nagavallema, Wani, Stephane, Padhane, Vineela, Babu, dan Sahrawat, "Vermicomposting: Recycling Wastes Into Valuable Organic Fertilizer," India: Published by IC, (2004).
- [6] Kementerian Pertanian. [1,Maret 2012]. Tandan Sawit untuk Industri Otomotif [online] http://pmlseapaper.pressmart.com/mediaindonesia/publications/mi/mi/2011/12/28/pageprint/28_12_2011_024.pdf.
- [7] H. Hasibuan, "Isolasi dan Uji Potensi Mikroba Selulolitik dalam Mendegradasi Limbah Tandan Kosong Sawit" Sekolah Pascasarjana Univ. Sumatra Utara., Medan (2005).
- [8] M. Afriani, [7, Mei 2012]. Tandan Kosong Kelapa Sawit (TKKS). (online) repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/25729/Chapter.
- [9] R. Saraswati, E. Santosa, dan E. Yuniar, [2 Maret 2012]. Organisme Perombak Bahan Organik (online) <http://balittanahlitbang.deptan.go.id/pupuk10.pdf>.
- [10] Meryandini, Wahyu, Besty, Titi, Nisa, dan Hasrul, "Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya.", *Makara Sains.*, 3 (1) (2009) 33-38.
- [11] B. Octavia, "Kajian Kekayaan Bakteri *Indigenous* Indonesia untuk Bioremediasi Limbah.", Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA Univ.Negeri Yogyakarta, Yogyakarta (2010).
- [12] Kasana, Salwan, Dhar, Dutt dan Gulati, "A Rapid dan Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine", *Curr Microbiol.*, 57 (2008) 503-507.
- [13] M. Somogyi, "A new reagent for the determination of sugars.", *J. Biology Chem.* 160 (1995) 61-73.
- [14] N. Nelson, "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.", *Biology Chem.*, 153(1994) 75-381.
- [15] Jutono, Soedarsono, Hartadi, Suhadi, dan Soesanto, "Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum". Yogyakarta. Departemen mikrobiologi Fakultas pertanian UGM (1980).
- [16] J.G. Cappuccino dan N. Sherman, "Microbiology: A Laboratory Manual". California. Cummings Publishing Company, Inc (1987).
- [17] Sudiana, Rahayu, Imaduddin, dan Rahmansyah, "Cellulolytic Bacteria of Soil of Gunung Halimun Nasional Park", *Berita Biologi.* 5(6) (2001) 703-710.
- [18] K. Apun, B.C. Jong, dan M.A. Salleh, "Screening and Isolation of A Cellulolytic and Amylolitic *Bacillus* from Sago Pith Waste.", *J.Gen. Appl. Microbiol.*, 46 (2000) 263 -267.
- [19] T. Purwoko, "Fisiologi Mikroba.". Jakarta. Bumi Aksara (2007).
- [20] Kayser, Bienz, Eckert dan Zinkernagel, "Medical Microbiology" Germany: Georg Thieme Verlag Stuttgart Germany (2005).
- [21] A.L. Lehninger, "Dasar-dasar Biokimia Jilid 1". Terjemahan oleh Thenewidjaj, M., "Principles of Biochemistry". Jakarta. Erlangga (1982).
- [22] Suparjo. [1, April 2013]. Degradasi Komponen Lignoselulosa oleh Kapang Pelapuk Putih (on line) ajo66.wordpress.com.
- [23] Han, Yukawa, Inui, dan Doi, "Regulation of Expression of Cellulosomal Cellulase and Hemicellulase Genes in *Clostridium cellulovorans*", *Journal of Bacteriol.* 185(20) (2003) 6067-6075.
- [24] P.P. Subramaniyan, "Cellulase-free xylanases from *Bacillus* & other microorganisms." *FEMS Microbiology Letters Review.* 183 (2000) 1-7.
- [25] F. L. Pasaribu, L. Yenie, dan S.R. Muria, "Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Waktu Fermentasi pada Pemanfaatan Limbah Kulit Nanas (*Ananas Comosus. L.Merr*) untuk Produksi Enzim Selulase". Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Riau, Riau (2013).
- [26] F.L. Rahmi, A. Dahliaty, dan S. Devi, "Optimalisasi Komposisi Media dan Konsentrasi Sumber Karbon Produksi Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Strain Lokal S-16 dan S-22". Program Studi S1 Kimia Bidang Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Binawidya Pekanbaru , Pekanbaru (2013).
- [27] Abolos, Arribas, Garda, dan Santamaria, " Effect of Carbon Source on the Expression of CellAI, a Cellulase-encoding Gene from *Streptomyces halstedii* JM8", *FEMS Microbial Letters*, 153 (1997) 97-103.
- [28] M. Katz, dan E.T. Reese, "Production Of Glucose By Enzymatic Hydrolysis Of Cellulose.", *J.Applied Microbiology.*, 16 (2) (1968) 419-420.
- [29] A. Martina, N. Yuli, dan M. Sutisna, "Optimasi Beberapa Faktor Fisik Terhadap Laju Degradasi Selulosa Kayu Albasia (*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen dan Karboksimetilselulosa (CMC) secara Enzimatis oleh Jamur", *Jurnal Natur Indonesia*, 4(2) 2002. 156-163.