

Skrining dan Identifikasi Kapang Selulolitik Alkalin pada Jerami Padi Asal Sawah Pantai Watu Ulo Jember

Screening and Identification Alkaly-Cellulolytic Molds from Rice Straw on Coastal-field of Watu Ulo Jember

Esti Utarti^{*)}, Su'udah Hasanah dan Siswanto
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

^{*)}Email: adiest.95@gmail.com

ABSTRACT

About 28 molds were obtained from rice straw on coastal-field of Watu Ulo Jember, were screened for their cellulolytic activities at pH alkaline. In semiquantitatively screening on CMC and Avicel plate at pH 8 showed that 27 isolates have cellulolytic activities. Based on clearing zone in CMC plate, isolates 7, 9, 14, 19 and 24 have higher cellulase (CMC-ase) activities index at pH alkaline. Further, in quantitatively examination using rice straw in Basic Salt Mandel's modification medium showed isolate 19 (0,60 U/ml) that identified as *Aspergillus terreus* have higher FP-ase activity than isolate 7 (0,56 U/ml), 9 (0,55 U/ml), 14 (0,53 U/ml) and 24 (0,56 U/ml).

Keywords: Screening, alkaly-cellulolytic molds, rice straw, coastal-field, *A. terreus*.

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan polimer linier glukosa yang membentuk struktur dasar dinding sel dan bagian-bagian berkayu dari tanaman. Struktur polisakarida selulosa bersama-sama dengan hemiselulosa mencapai 50% dari biomassa tanaman. Banyaknya selulosa dalam biosfer menyebabkan enzim selulase, enzim yang mampu mendegradasi polimer linier glukosa dari selulosa, sangat penting dalam proses biokonversi selulosa menjadi produk yang bermanfaat (Gupta et al. 2012).

Selulase dapat dihasilkan oleh kapang, bakteri dan aktinomicetes. Kapang dianggap sebagai dekomposer selulosa yang lebih aktif dan merupakan mikro penghasil selulase utama (Gautam et al., 2010). *Trichoderma viride* misalnya, dapat mengubah selulosa alami menjadi glukosa (Li et al., 2010) karena mempunyai kompleks selulase yang lengkap, sedangkan *Bacillus* tidak mampu menghasilkan kompleks selulosa yang lengkap (Sreenath et al., 1996). Selanjutnya, meskipun produksi selulase oleh bakteri memerlukan waktu yang lebih singkat, dibandingkan dengan *Trichoderma*, aktivitas enzimnya lebih kecil (Gilbert dan Hazlewood, 1993).

Selulase berperan penting dalam proses pembuatan pulp, kertas, serta serat daur ulang. Salah satu cara untuk mendapatkan enzim ini adalah dengan memanfaatkan kapang sebagai produsen selulase utama. Pada umumnya selulase kapang aktif pada kondisi asam, padahal selulase yang mempunyai aktivitas pada pH alkalin sangat penting dalam industri-industri tersebut (Maki et al., 2009). Pada proses pulping, pemasakan menggunakan bahan kimia seperti NaOH dan NaS, menghasilkan serat yang masih berwarna cokelat dan mengandung sisa cairan pemasak aktif (Gullichsen dan Fogelholm, 2000). Oleh karena itu, proses pulping menyebabkan pH serat menjadi alkali. Selain itu, dalam industri tersebut seringkali menggunakan kalsium karbonat, yang menyebabkan pH menjadi alkali (Bajpai, 2012).

Salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan memanfaatkan kapang selulolitik yang dapat menghasilkan selulase yang aktif pada pH alkali. Isolasi dan identifikasi kapang dari sumber-sumber selulosa di daerah alkalin merupakan suatu cara untuk memilih kapang penghasil selulase alkalin yang berpotensi tinggi dalam mendegradasi selulosa (Bajpai, 2012).

Jerami padi merupakan produk samping tanaman padi yang mengandung selulosa hingga 43,8%. Hal ini dapat memberikan asumsi bahwa jerami merupakan habitat yang baik untuk mikroba selulolitik. Tanah pantai dapat mempunyai pH hingga lebih dari 8,5 (Kuswandi, 2002). Oleh karena itu dari jerami padi sawah pantai diduga terdapat kapang sebagai dekomposer selulosa utama yang bersifat alkalin.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kapang penghasil selulase alkalin ekstraseluler, dengan sampel jerami padi sawah pantai dan mengidentifikasi kapang dengan aktivitas selulolitik terbaik pada pH alkali. Dari penelitian ini diharapkan akan diperoleh satu spesies kapang terpilih yang dapat menghasilkan enzim selulase ekstraseluler dengan aktivitas terbaik pada pH alkali. Kemampuan selulolitik dan identifikasi kapang tersebut dapat digunakan sebagai langkah awal untuk produksi enzim selulase yang mempunyai aktivitas tinggi pada pH alkali.

METODE

Pengambilan sampel

Sampel jerami beserta tanah diambil dari sawah pasca tanam padi di pantai Watu Ulo Jember Jawa Timur. Sampel diambil secara acak dari 5 petak sawah yang berbeda.

Pengukuran pH dan Salinitas

Pengukuran pH dan salinitas bertujuan untuk mengetahui kondisi habitat alami kapang yang akan digunakan dalam proses penapisan kapang selulolitik.

Pengukuran pH tanah berdasarkan metode Kuswandi (2002) dengan menggunakan pH meter 3320 JENWAY. Sedangkan pengukuran salinitas tanah berdasarkan cara Notohadiprawiro (1985) menggunakan refraktometer.

Isolasi kapang

Media yang digunakan untuk isolasi kapang ini adalah PDA yang sebelumnya ditambahkan streptomisin 0,01% untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Pengenceran terhadap sampel jerami beserta tanah sawah dilakukan 10^{-1} - 10^{-3} . Dari setiap pengenceran diambil 300 μ l dan diinokulasi secara *spread plate* pada media PDA dalam cawan petri yang berbeda serta diinkubasi pada suhu kamar selama 96 jam.

Seleksi Kapang Selulolitik Alkalin Secara Semikuantitatif

Seleksi kapang selulolitik secara semikuantitatif dilakukan pada media CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) plate dan avisel (Sigmacell-20) plate dalam basal mineral PM pada pH 8 yang dibuat dengan dua lapis (*two layer*). Pada setiap plate (cawan petri) diinokulasi 3 isolat kapang dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam.

Penentuan indeks aktivitas selulase secara semikuantitatif dilakukan dengan metode *congo red*. *Congo red* akan berikatan dengan polisakarida yang mengandung ikatan β -(1-4)-D-Glukopiranosil (Theather dan Wood, 1981). Selulosa yang sudah terhidrolisis akan terlihat jernih pada pewarnaan *congo red* (terbentuk zona bening) sedangkan yang belum terhidrolisis berwarna ungu. Indeks aktivitas selulase dihitung berdasarkan perbandingan diameter zona bening dan diameter koloni.

Seleksi Kapang Selulolitik Alkalin Secara Kuantitatif

Persiapan inokulum. Sebanyak 5 isolat kapang terbaik hasil skrining secara semikuantitatif ditumbuhkan secara merata ke permukaan media PDA dan diinkubasi selama 96 jam pada suhu 30°C.

Produksi selulase. Sebanyak 2,5 ml inokulum ditumbuhkan pada 22,5 ml media jerami 2% dalam basal mineral modifikasi Mandel (Mandel *et al.*, 1976) dan diinkubasi pada inkubator bergoyang 90 U/min pada suhu 30°C selama 96 jam. Terhadap jerami yang digunakan sebagai substrat produksi selulase terlebih dahulu dilakukan *pre-treatment*, menggunakan NaOH 0,5% yang berfungsi untuk mendegradasi ikatan lignoselulosa sehingga lignin terpisah dari selulosa (Fengel dan Wegener, 1995).

Pemanenan kultur dan uji aktivitas selulase (FP-ase). Pemanenan kultur dilakukan dengan sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Substrat yang digunakan untuk uji aktivitas FP-ase adalah kertas saring tipe Whatman no.1 (Mandels *et al.*, 1976), selanjutnya produksi gula (gula reduksi) dideteksi dengan metode DNS berdasarkan Miller (1956).

Pengukuran aktivitas FP-ase dilakukan dengan menginkubasikan enzim dalam tabung

reaksi yang berisi buffer fosfat pH 8 dan satu strip kertas saring pada suhu 50°C selama 60 menit. Pembacaan absorbansinya dilakukan dengan spektrofotometer SPECTRONIC 21 pada panjang gelombang 550 nm.

Penentuan Standar Glukosa. Pembuatan larutan standar glukosa menggunakan larutan glukosa 1%. Kadar standar glukosa disiapkan 0,25 – 1,5 mg. Standar dan blanko diperlakukan sama dengan sampel, kemudian dibuat kurva standar antara OD dan mg glukosa.

Penentuan aktivitas FP-ase dilakukan dengan nilai:

Satu unit = pelepasan 1 μ mol glukosa dalam 1 menit.

$$\text{FPU/ml} = \frac{0,185 \times (\text{mg glukosa sampel} - \text{mg glukosa kontrol})}{2 \times \text{ml enzim yang dipipet}}$$

Identifikasi kapang selulolitik.

Satu isolat kapang dengan aktivitas FP-ase terbaik diidentifikasi baik secara makroskopis maupun mikroskopis untuk ditentukan spesiesnya. Identifikasi makroskopis meliputi diameter koloni, warna pigmentasi, warna koloni, ada tidaknya eksudat dan warnanya, garis radial, ada tidaknya zonasi, ada tidaknya bau yang khas. Pengamatan mikroskopis meliputi bentuk dan ukuran seluruh organ. Identifikasi dilakukan berdasarkan Samson dan Hoekstra (1995) dalam bukunya *Introduction to Food-Borne Fungi* serta Klich dan Pitt (1988) dalam *A Laboratory Guide To Common Aspergillus Species And Their Telemorphs*. Medium yang digunakan untuk identifikasi kapang adalah CYA (*Czapek Yeast Extract Agar*), Sukrosa, MEA (*Malt Extract Agar*), dan *Czapek* konsentrat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Kapang Selulolitik secara Semi Kuantitatif.

Sejumlah 28 kapang telah berhasil diisolasi dari 5 lokasi tanah sawah pasca tanam padi di pantai Watu Ulo Jember. Selanjutnya dari hasil seleksi

aktivitas selulolitiknya secara semi kuantitatif pada CMC dan Sigmacell-20 dengan pH 8, terdapat 27 isolat yang mempunyai aktivitas selulolitik (CMC-ase dan aviselase) (Tabel 1). CMC merupakan substrat yang digunakan untuk menguji aktivitas CMC-ase yang merombak selulosa amorf, (Ponambalam *et al.*, 2011). Sedangkan Sigmacell-20 merupakan substrat untuk menguji aktivitas aviselase yang merombak selulosa kristal (Fikrinda *et al.*, 2001).

Seleksi kapang selulolitik secara semi kuantitatif dapat ditentukan dengan mengamati besarnya indeks aktivitas selulase kapang tersebut pada media yang mengandung selulosa. Indeks aktivitas selulase ditentukan berdasarkan perbandingan diameter zona bening terhadap diameter koloni. Pengamatan terhadap terbentuknya zona bening dilakukan dengan metode *congo red*. Beguin (1983) menyatakan bahwa *congo red* berikatan kuat dengan polisakarida yang mengandung ikatan $\beta(1 - 4)$ D-glukopiranosil.

Pengamatan zona bening terhadap CMC lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan Sigmacell-20. Pembentukan zona bening yang menunjukkan aktivitas aviselase pada Sigmacell-20 tidak tampak jelas. Hal ini diduga karena CMC merupakan selulosa amorf yang mudah untuk dihidrolisis, sedangkan substrat Sigmacell-20 diduga tidak terhidrolisis dengan sempurna. (Enari dalam Fikrinda *et al.*, 2001) menyatakan bahwa Sigmacell-20 merupakan salah satu bentuk dari selulosa kristal yang sulit dihidrolisis. Kim *et al.*, 1995 mengindikasikan bahwa bagian amorf dari selulosa terhidrolisis sekitar dua kali lebih cepat dari pada bagian kristalin.

Kemampuan kapang yang bersifat selulolitik tersebut diduga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan pertumbuhannya. Lingkungan tumbuh berupa tanah sawah pasca tanam padi yang banyak mengandung limbah jerami menstimulasi kapang untuk memproduksi selulase. Jerami padi mengandung selulosa 43,8% (Mohan *et al.*, 1998) sehingga merupakan habitat yang baik untuk kapang selulolitik.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Indeks Aktivitas CMC-ase 28 Isolat

No	Kode Isolat	CMC-ase			Aviselase
		Diameter koloni (cm)	Diameter Zona Bening (cm)	Indeks	
1	1	2.00	3.36	1.69	+
2	2	1.26	1.26	1.00	+
3	3	-	-	-	-
4	4	1.93	1.93	1.00	+
5	5	1.35	1.66	1.22	+
6	6	1.87	2.05	1.10	+
7	7	0.42	2.75	6.74	+
8	8	6.13	6.19	1.02	+
9	9	0.19	1.69	9.20	+
10	10	6.53	6.53	1.00	+
11	11	1.39	2.66	1.91	-
12	12	0.47	0.71	1.53	+
13	13	1.27	2.38	1.88	-
14	14	0.43	1.88	4.45	+
15	15	1.63	2.11	1.30	+
16	16	1.68	2.17	1.30	+
17	17	1.37	1.77	1.30	+
18	18	1.60	1.70	1.06	+
19	19	1.21	3.03	2.51	+
20	20	0.91	1.61	1.77	+
21	21	2.19	3.29	1.50	+
22	22	1.60	2.48	1.55	+
23	23	3.01	3.20	1.07	+
24	24	0.39	1.99	5.14	+
25	25	1.53	1.72	1.12	+
26	26	3.20	3.48	1.09	+
27	27	1.92	3.32	1.72	+
28	28	2.73	2.86	1.05	+

Ket: (+) = Kapang tumbuh ; (-) = Kapang tidak tumbuh

Hasil pengujian di atas menunjukkan bahwa ke-27 isolat bersifat selulolitik yang aktif pada pH alkali karena dapat tumbuh dan mempunyai aktivitas selulolitik pada media alkali (pH 8). Pemilihan pH 8 ini berdasarkan pengukuran pH sampel (jerami dan tanah sawah) di pantai Watu Ulo yang digunakan sebagai sumber isolat. Dari pengukuran ini diketahui bahwa pH sampel berkisar 7.23 – 8.08. Tanah alkali merupakan tanah yang mempunyai pH di atas 7 (Waterer, 2002) sehingga tanah sawah di pantai Watu Ulo merupakan tanah alkali karena mempunyai pH lebih dari 7.

Meskipun sampel diambil di sawah pantai, ternyata salinitasnya tidak terlalu tinggi, yaitu kurang dari 1‰. Oleh karena itu dalam penelitian ini tidak ada perlakuan penambahan

garam sebab kadar garam di habitat alami kapang relatif rendah.

Berdasarkan hasil pengukuran indeks aktivitas CMC-ase tersebut juga didapatkan 5 isolat kapang yang mempunyai aktivitas selulolitik lebih baik daripada isolat yang lain. Isolat-isolat tersebut adalah isolat 7, 9, 14, 19, dan 24 dengan indeks CMC-ase masing-masing sebesar 6,74; 9,20; 4,45; 2,51 dan 5,14.

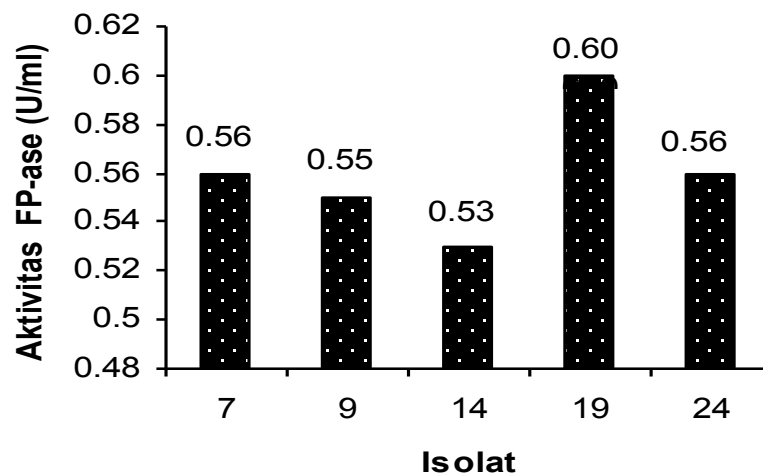
Seleksi Kapang Selulolitik secara Kuantitatif.

Seleksi kapang selulolitik secara kuantitatif dengan menguji aktivitas FP-ase dilakukan terhadap 5 isolat yang mempunyai indeks aktivitas CMC-ase terbaik yaitu isolat 7, 9, 14, 19, dan 24. Sreenath *et al.*, (1996) menyatakan

bahwa selulase yang paling efektif adalah selulase yang dapat menunjukkan aktivitasnya terhadap kertas saring (FP-ase) pada pH netral atau alkali.

Hasil uji aktivitas FP-ase (Gambar 1) menunjukkan bahwa isolat 19 mempunyai nilai aktivitas FP-ase lebih baik (0,60 U/ml) dibandingkan 4 isolat lainnya yaitu isolat 24 (0,56 U/ml), isolat 7 (0,56 U/ml), isolat 9 (0,55 U/ml), dan isolat 14 (0,53 U/ml). Aktivitas FP-ase dari isolat 19 tersebut relatif tinggi meskipun tidak jauh berbeda dengan isolat yang lain. Hal ini diduga karena isolat 19 mampu mendegradasi selulosa kristalin lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya. Aktivitas FP-ase

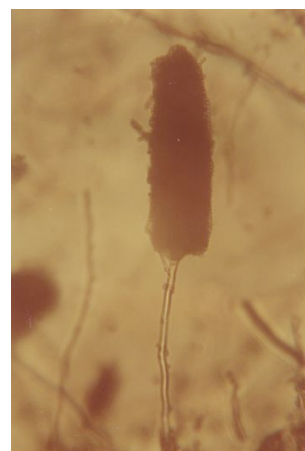
ini relatif lebih kecil jika dibandingkan dengan aktivitas FP-ase kapang lain yang diinkubasi pada pH lebih rendah. Miyamoto (1997) menyebutkan bahwa aktivitas FP-ase dari mutan-mutan *T. reesei* yang diinkubasi pada *Batch Culture* pH 4 berkisar 2,61 – 22,4 U/ml. Dalam Sreenath *et al.*, (1996) disebutkan bahwa 2 isolat yang telah berhasil diisolasi dari Gurun Sonoron menunjukkan aktivitas FP-ase sebesar 0,39 – 0,70 U/ml (inkubasi pH 7) dan 0,38 – 0,95 U/ml (inkubasi pH 8,5). Pada umumnya selulase kapang aktif kondisi asam, namun selulase yang aktif pada pH alkali (terutama pH 8,5) sangat berguna dalam industri pulp, serat dan kertas daur ulang.



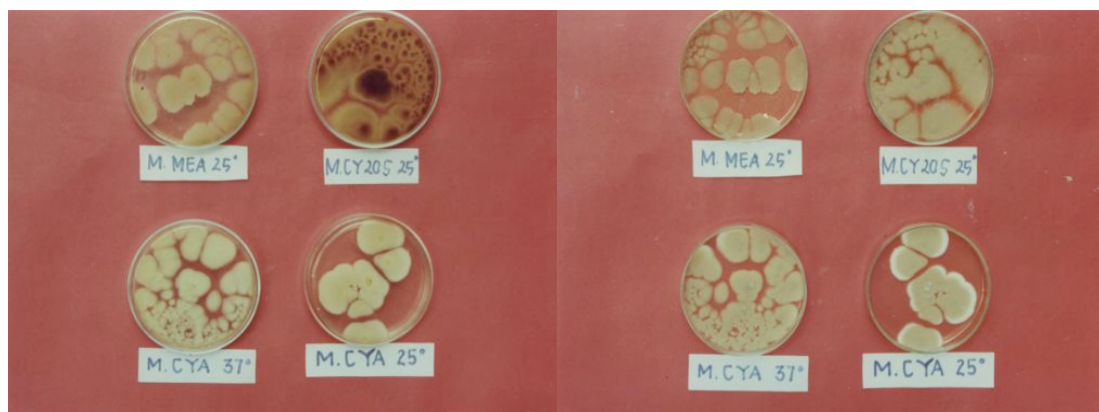
Gambar 1. Aktivitas FP-ase 5 isolat kapang terpilih

Identifikasi Kapang Selulolitik Terbaik

Identifikasi kapang isolat 19 dilakukan secara makroskopis maupun mikroskopis. menunjukkan bahwa genus kapang isolat 19 adalah *Aspergillus*. Kapang isolat 19 tersebut kemudian diinokulasikan ke media CYA, MEA dan CY20S dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Selain diinkubasi pada suhu 30°C, kapang isolat 19 yang diinokulasi pada medium CYA juga diinkubasi pada suhu 37°C. Berdasarkan metode Identifikasi genus *Aspergillus* (Samson dan Hoekstra, 1995), hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis (Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4 dan Tabel 4) menunjukkan bahwa spesies isolat 19 diduga adalah *A. terreus*.



Gambar 2. Slide culture isolat 19



Gambar 3. Pigmentasi isolat 19 umur 7 Hari pada media CYA, MEA dan CY20S

Gambar 4. Warna koloni isolat 19 umur 7 hari pada media CYA, MEA dan CY20S

Tabel 2. Karakteristik makroskopis dan mikroskopis isolat 19

No	Media	Makroskopis				Mikroskopis						
		Diameter (cm)	Warna Konidia	<i>Soluble pigmen</i>	<i>Reverse</i>	Miselium	Karakter	Bentuk	Panjang (µm)	Lebar (µm)	Warna	
1	CYA	3,37	Cokelat muda	Kuning-keputihan	Kuning	Putih	Stipe	-	112,5 - 175	5 - 7,5	Tidak berwarna	
							Vesikel	Sperikal	15 - 17,5	-	-	
							Metulae	-	10 - 12,5	2,5	-	
							Phialide	-	5 - 7,5	2,5	-	
							Konidia	Bulat	-	2,5	Cokelat	
2	CYA 37°C	2,05	Cokelat muda	Kuning-keputihan	Kuning	Putih	Stipe	-	200 - 250	5 - 7,5	-	
							Vesikel	Sperikal	15	-	-	
							Metulae	-	10 - 12,5	2,5	-	
							Phialide	-	5 - 7,5	2,5	-	
							Konidia	Bulat	-	2,5	Cokelat	
3	MEA	3	Cokelat pucat	Kuning muda	Kecokelatan	Putih	Stipe	-	125 - 175	5 - 7,5	-	
							Vesikel	Sperikal	10 - 12,5	-	-	
							Metulae	-	10	2,5	-	
							Phialide	-	5 - 7,5	2,5	-	
							Konidia	Bulat	-	2,5	Cokelat	
4	CY20S	5,52	Cokelat	Kuning tua	Kuning pekat, hitam ditengah	Putih	Stipe	-	145 - 250	5 - 7,5	-	
							Vesikel	Sperikal	7,5 - 15	-	-	
							Metulae	-	10 - 12,5	2,5	-	
							Phialide	-	5 - 7,5	2,5	-	
							Konidia	Bulat	-	2,5	Cokelat	

Ket. Aspergilla: Kolumnar dan Biseriate; Mikotoksin: Patulin, Citrioviridin dan Gliotoksin

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil seleksi secara semi kuantitatif terhadap 28 isolat kapang yang berhasil diisolasi dari jerami pasca tanam padi sawah pantai Watu Ulo Jember, terdapat 27 isolat kapang yang bersifat selulolitik alkalin, dimana 5 isolat kapang mempunyai indeks

aktivitas CMC terbaik, yaitu isolat 7 (6.74), 9 (9.20), 14 (4.45), 19 (2.51) dan 24 (5.14). Selanjutnya seleksi secara kuantitatif (aktivitas FP-ase) terhadap 5 isolat tersebut menunjukkan bahwa kapang isolat 19 mempunyai aktivitas FP-ase lebih baik (0,60 U/ml) dibandingkan 4 isolat lainnya yaitu isolat 24 (0,56 U/ml), isolat 7 (0,56 U/ml), isolat 9 (0,55 U/ml), dan isolat

14 (0,53 U/ml). Identifikasi terhadap isolat 19 menunjukkan bahwa spesies kapang tersebut diduga adalah *A. Terreus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajpai, P. 2010. Biotechnology for Pulp and Paper Processing. *Springer Science and Business Media*. DOI 10.1007/978-1-4614-1409-4_2
- Beguín, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using congo red-stained agar replicas. *Analytical Biochemistry*. 131: 333 - 336.
- Bennett, JW dan MA. Klich. 1992. *Aspergillus: Biology and Industrial Application*. Butterworth-Heinemann. Stoneham
- Bilgrami, S dan R.N. Verma. 1994. *Physiology of Fungi*. Vikas Publishing House. New Delhi.
- Fengel, D dan G. Wegener. 1995. *Kayu : Kimia, Ultrastruktur, reaksi-reaksi*. Terjemahan Sastrohamidjojo. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Fikrinda, I. Anas, T. Purwadaria, dan DA. Santosa. 2001. Identifikasi Ekstremozim Selulase Isolat Bakteri dari Ekosistem Air Hitam. *Hayati*. 8: 5 - 10.
- Gautam, SP., PS. Bundela, AK. Pandey, MK. Awasthi & S. Sarsaiya. 2010. Screening of Cellulolytic Fungi For Management of Municipal Solid Waste. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, (5):4, 391-395.
- Gilbert, HJ. dan GP. Hazlewood. 1993. Bacterial Cellulases and Xylanases. *Journal of Microbiol*. 139 : 187-194.
- Gullichsen, J dan CJ Fogelholm 2000. Chemical pulping-papermaking science and technology. *Helsinki: Fapet Oy Inc*.
- Gupta, P., K. Samant & A. Sahu. 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *Hindawi Int. J. Microbiol*.
- Hertamarwati, R.T. 1998. *Peningkatan Kualitas Jerami Padi Teramoniasi sebagai Pakan Ternak dengan Penambahan Starbio*. Lemlit UNEJ. Jember.
- Ilhan, S., R. Denrel , A. Asan , C. Baycu, & E. Kinaci. 2006. Colonial and Morphological Characteristics of Some Microfungal Species Isolated from Agricultural Soils in Eskiflehir Province (Turkey). *Turk J Bot*. (30): 95-104
- Kim, D.W., K.J. Young, H.J. Jae, K.L. Ki, & S.K. Hai. 1995. Kinetic Mechanism of Cellulose Hydrolysis by Endoglucanase I and Exoglucanase II purified from *Trichoderma viridae*. *Bull. Korean. Chem. Soc*. Available at: www.Scirus.com. Accessed Mar. 14, 2003.
- Klich, MA. dan JI. Pitt. 1988. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species And Their Telemorphs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, New South Wales.
- Kuswandi. 2002. *Pengapuran Tanah Pertanian*. Kanisius. Yogyakarta.
- Maki M., KT. Leung, W. Qin. 2009. The Prospects Of Cellulase-Producing Bacteria For The Bioconversion Of Lignocellulosic Biomass. *Int J Biol Sci. Vol: 5;5 Hal. :500-16*.
- Mandel, M. R. Adreotti. dan C. Roche. 1976. Measurement of Saccharifying Cellulase. *Biotechnol Bioeng. Symp*. 6:21-33.
- Michael, AM. 1997. *Irrigation: Theory and Practice*. Vikas Publishing House. New Delhi
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 31 : 426-428.
- Miyamoto, K (Ed). 1997. Cellulose production. Available at: www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e08.htm-25k. [Accessed Apr. 6, 2003].
- Mohan PR., B. Ramesh & O.V.S. Reddy, 2012. Biological Pretreatment of Rice Straw by Phenarocheate chrysosporium for the Production of Cellulases and Xylanases using *Asperigillus niger* Isolate. *Research Journal of Microbiology* (7): 1-12.
- Notohadiprawiro, T. 1985. *Selidik Cepat Ciri Tanah di Lapangan*. Cetakan I. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Samson, RA dan ES. Hoekstra. 1995. *Introduction to Food-Borne Fungi*. Ponsen and Looyen. Wageningen, Netherlands.
- Sreenath, H.K., V.W. Yang, H.H. Burdsall Jr. dan T.W. Jeffries. 1996. Toner removal by alkaline-active cellulases from desert Basidiomycetes, p.267-279. dalam Thomas W. Jeffries dan Liisa Viikari (ed.). *Enzymes for pulp and paper processing*. American Chemical Society. Denver.
- Theather, RM. Dan PJ. Wood. 1981. Use Congo Red-polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol*. (43):777-780.
- Worthington Biochemical Corporation. 1998. *Cellulase..* Available at: www.worthington-biochem.com. Accessed Apr. 5, 2003.