

Isolasi dan Uji Aktivitas Selulolitik Bakteri Asal Limbah Bagas (Isolation and Cellulolytic Activity Assay of Bacteria from Bagasse)

Dewi Chusniasih*, Erma Suryanti, Erina Safitri

(Diterima Juli 2022/Disetujui Mei 2023)

ABSTRAK

Bagas merupakan salah satu hasil samping dari pembuatan gula pasir atau olahan minuman yang menjadi limbah di lingkungan. Bagas akan ditumbuhi oleh bakteri selulolitik yang menghasilkan enzim selulase. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi, mencirikan, dan mengukur aktivitas selulase bakteri secara kualitatif dan kuantitatif. Tahap penelitian meliputi isolasi dan pencirian bakteri, uji aktivitas selulase secara kualitatif, pembuatan kurva standar dan kurva pertumbuhan bakteri, produksi selulase ekstrak kasar, pembuatan kurva standar glukosa, uji aktivitas enzim secara kuantitatif, dan analisis data. Diperoleh 6 isolat dengan ciri makroskopis beragam dari segi warna, elevasi, tepian dan bentuk koloni, 3 isolat basil, 1 isolat basil pendek, dan 2 isolat kokus. Semua isolat menunjukkan hasil positif uji amilum, *triple sugar iron agar*, dan katalase, 5 isolat positif sitrat, dan 3 isolat positif motil. Dari uji kualitatif selulase pada 6 isolat, terdapat 2 isolat yang memiliki indeks selulolitik tertinggi, yaitu AT1 (1,79) dan BAW3 (1,72) pada media CMC 0,5%. Hasil uji kuantitatif selulase dari dua isolat terpilih ialah 0,01176 U/mL untuk AT1 dan 0,01170 U/mL untuk BAW3, yang keduanya masih tergolong ke dalam kemampuan degradasi rendah.

Kata kunci: bagas, indeks selulolitik, selulase

ABSTRACT

Bagasse is one of the by-products of granulated sugar industries or processed beverages that become waste in the environment. The bagasse will be overgrown by cellulolytic bacteria that produce cellulase enzymes. This study aims to isolate, characterize, and measure bacterial cellulase activity qualitatively and quantitatively. The research phase included isolation and characterization of bacteria, qualitative cellulase activity test, preparing standard curves and bacterial growth curves, crude extract cellulase production, constructing standard glucose curves, quantitative enzyme activity tests, and data analysis. Six isolates with macroscopic characteristics varied in color, elevation, margins, and colony shape; three bacillus isolates, one short bacillus isolate, and two cocci isolates were obtained. All isolates showed positive test results of amylum, triple sugar iron agar, and catalase; five citrate-positive isolates, and three motile-positive isolates. From the cellulase qualitative test, two bacterial isolates had the highest cellulolytic index, namely AT1 (1.79) and BAW3 (1.72) on 0.5% CMC media. The quantitative cellulase test results of the two selected isolates were 0.01176 U/mL for AT1 and 0.01170 U/mL for BAW3, both of which are still classified as low degradation capabilities.

Keywords: cellulase activity, cellulolytic index, Sugarcane waste

PENDAHULUAN

Bagas (ampas tebu) merupakan salah satu hasil samping dari pabrik industri gula dan penjualan minuman berbahan dasar tebu. Jumlah bagas yang dihasilkan dari industri gula dapat mencapai 90% dari tebu yang diolah (Yudo & Jatmiko, 2008). Berdasarkan analisis kimia, rata-rata komposisi bagas ialah selulosa 37,65%, pentosa 27,97%, lignin 22,09%, abu, 3,28%, SiO₂ 3,01%, dan sari 1,81% (Setiati *et al.* 2016). Bagas biasanya dimanfaatkan di industri kertas, pakan ternak, pembuatan kompos, dan bioetanol. Dalam pembuatan bioetanol dan kompos, pengolahan bagas didasarkan pada proses fermentasi, dengan mikro-

organisme yang berperan dalam menguraikan selulosa menjadi glukosa.

Pada umumnya bagas yang tertumpuk di area pabrik terdegradasi secara alami oleh mikroorganisme, ditandai dengan adanya bagian timbunan bagas yang bersuhu tinggi dan juga sudah terurai dari tekstur yang keras dan kaku menjadi lebih halus seperti serbuk dan lembap. Menurut Mentari *et al.* (2021), suhu bagas yang tinggi menandakan aktivitas mikroorganisme selulolitik dalam mendegradasi bahan organik menjadi glukosa dan digunakan sebagai energi bakteri untuk tumbuh. Degradasi bahan organik dapat terjadi karena mikroorganisme selulolitik menghasilkan enzim selulase yang berperan dalam pemecahan bahan organik menjadi glukosa. Budi *et al.* (2018) menjelaskan selulase merupakan enzim yang berperan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa. Menurut Utami *et al.* (2019), mikroorganisme penghasil selulase dapat

Program Studi Biologi, Jurusan Sains, Institut Teknologi Sumatera, Jl. Terusan Ryacudu, Way Huwi, Kec. Jati Agung, Lampung 35365

* Penulis Korespondensi:

Email: dewi.chusniasih@staff.itera.ac.id

berasal dari golongan khamir, jamur, dan bakteri selulolitik.

Bakteri selulolitik merupakan salah satu mikro-organisme yang mampu memproduksi selulase dan menghidrolisis selulosa menjadi produk lebih sederhana, yaitu glukosa (Murtiyaningsih & Hazmi 2017). Bakteri selulolitik dapat dijumpai pada bahan-bahan yang kaya akan selulosa, yaitu bahan organik seperti bagian-bagian tumbuhan yang melapuk. Jannah *et al.* (2017) menjelaskan terdapat beberapa genus bakteri yang dilaporkan memiliki aktivitas selulolitik, yaitu *Achromobacter*, *Angiococcus*, *Cytophaga*, *Cellivibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Polangium*, *Sorangium*, *Sporocytophaga*, *Vibrio*, *Cellfalcicula*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Thermonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Acetivibrio*, *Misrobispora*, dan *Streptomyces*. Sejauh ini, bakteri selulolitik sudah banyak diaplikasikan dalam beberapa bidang, contohnya pada bidang peternakan, lingkungan, dan industri. Dalam bidang peternakan, salah satu bakteri selulolitik yang digunakan berasal dari *Acetobacter liquefaciens*, yang sangat efektif meningkatkan bobot badan harian ternak ayam dan menurunkan angka konversi pakan hewan ternak. Fauziah dan Ibrahim (2020) menyatakan bahwa bakteri selulolitik dalam bidang lingkungan digunakan sebagai bioaktivator dalam pembuatan kompos untuk mempercepat proses dekomposisi organik pada lahan gambut, sehingga dapat dijadikan sebagai dekomposer bahan organik yang membantu tersedianya unsur hara bagi tumbuhan di lahan gambut. Pada bidang industri, bakteri selulolitik anggota spesies *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas diminuta* telah dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen anggota spesies *Edwardsiella tarda*, sehingga berpotensi sebagai kandidat probiotik (Maulani *et al.* 2016). Keberadaan bakteri selulolitik dalam bagas belum dieksplorasi secara luas sehingga isolasi dan pencirian bakteri selulolitik dari limbah bagas perlu diteliti untuk memperoleh isolat dengan potensi tinggi dalam menghasilkan selulase dan selanjutnya dapat dimanfaatkan di berbagai bidang industri, lingkungan, peternakan, pertanian, dan lain-lain. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mencirikan isolat bakteri selulolitik asal bagas serta mengukur aktivitasnya secara kualitatif dan kuantitatif.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari–Mei 2022 di Laboratorium Mikrobiologi, Institut Teknologi Sumatera.

Isolasi dan Pemurnian Bakteri

Bakteri penghasil selulase diisolasi menggunakan metode pengenceran. Sampel bagas diambil di tiga lapisan berbeda, yaitu lapisan atas, tengah, dan

bawah, sesuai dengan tinggi timbunan bagas yang ada di lokasi penimbunan pada PT Gunung Madu Plantation. Sampel sebanyak 5 g dari lapisan tumpukan berbeda dimasukkan ke dalam 45 mL media kaldu nutrisi + CMC 1% dan digoncang menggunakan *shaker* selama 24 jam. Bakteri yang telah diinkubasi diencerkan berseri, mulai dari 10^{-1} sampai 10^{-8} . Bakteri ditumbuhkan dengan metode sebar pengenceran 10^{-7} dan 10^{-8} pada media CMC agar-agar 1% dan diinkubasi selama 3×24 jam. Komposisi media CMC 1% agar-agar terdiri atas 10 g CMC, 0,02 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,075 g KNO_3 , 0,05 g K_2HPO_4 , 0,002 g $FeSO_4$, 0,004 g $CaCl_2$, 0,1 g ekstrak khamir, dan 15 g agar-agar dalam 1000 mL akuades. Bakteri dimurnikan dengan menginokulasi bakteri yang sudah tumbuh menggunakan ose dan digoreskan pada media CMC dengan goresan sinambung dan diinkubasi selama 24 jam.

Pencirian Bakteri Selulolitik

Bakteri yang tumbuh diamati secara makroskopik dengan melihat ciri morfologi koloninya, yaitu bentuk, tepian, warna, dan elevasi koloni. Ciri mikroskopik diamati dari hasil pewarnaan Gram. Bakteri selulolitik diuji secara biokimia, meliputi uji amilum, *triple sugar iron agar* (TSIA), uji sitrat, motilitas, dan katalase.

- **Uji amilum**

Uji ini dimaksudkan untuk menetapkan kemampuan amilase dalam isolat bakteri dalam menghidrolisis pati (amilum). Isolat bakteri digoreskan pada media kanji kemudian diinkubasi selama 24 jam, setelah itu kultur bakteri ditetesi dengan iodine selama beberapa menit lalu iodine dibuang. Hasil positif uji ini ditandai dengan keberadaan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni bakteri uji pada pati yang telah ditetesi iodine/lugol.

- **Triple sugar iron agar (TSIA)**

TSIA merupakan media yang digunakan untuk mengukur kemampuan bakteri dalam menghidrolisis 3 jenis gula, yaitu laktosa, sukrosa, dan glukosa, serta kemampuannya menghasilkan gas. Bakteri digoreskan pada media TSIA miring dan ditusuk sampai $\frac{1}{2}$ dari bagian miring sampai ke bagian dasar tabung, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Hasil positif uji ini ditandai dengan perubahan warna media yang semula merah menjadi kuning dan terdapat keretakan media serta terbentuknya endapan hitam pada media.

- **Motilitas**

Motilitas diuji dengan menggunakan media *sulfide indole motility* (SIM) dengan komposisi (g/L): pepton dari kasein (20), pepton dari daging (6,6), ion amonium(III) sitrat (0,2), dan natrium tiosulfat (0,2), agar-agar (3,0), untuk menentukan apakah bakteri yang diuji mampu motil (bergerak) dalam media. Bakteri ditusuk ke dalam media SIM sampai $\frac{1}{2}$ bagian tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil

positif uji motil ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar di sekitar tusukan.

• Uji sitrat

Uji sitrat dimaksudkan untuk mengevaluasi apakah bakteri dapat memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon dan energi bagi bakteri, ditandai dengan perubahan warna media yang awalnya hijau menjadi biru. Isolat bakteri digoreskan pada media miring *Simmon sitrate agar*, dengan komposisi (g/L): amonium dihidrogen fosfat (1), dikalium hidrogen fosfat (1), natrium klorida (5), natrium sitrat (2), magnesium sulfat (0,2), biru bromotimol (0,08), dan agar-agar (13), kemudian diinkubasi selama 24 jam.

• Katalase

Katalase diuji untuk mengukur kemampuan bakteri dalam menghidrolisis H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Isolat bakteri diambil menggunakan ose dan diletakkan di atas kaca objek kemudian ditetesi dengan H_2O_2 3%. Hasil positif uji katalase ditandai dengan munculnya gelembung pada saat H_2O_2 ditetaskan ke atas kaca objek berisi bakteri.

Seleksi Bakteri Selulolitik melalui Uji Aktivitas Selulase secara Kualitatif

Uji aktivitas selulase secara kasar pada penelitian ini mengikuti prosedur Syukri *et al.* (2021). Media CMC agar-agar 0,5% disiapkan kemudian dituang ke dalam cawan petri, lalu cawan petri dibagi menjadi 3 bagian sama rata. Isolat bakteri selulolitik yang sudah dimurnikan diambil dan ditotolkan pada setiap bagian cawan menggunakan tusuk gigi, lalu diinkubasi. Zona bening diamati pada media CMC dengan menuang larutan merah kongo 0,1% pada media, didiamkan selama 15 menit, dibilas dengan NaCl 0,3 M, lalu didiamkan selama 15 menit, dan cairan dibuang. Diameter koloni bakteri dan diameter zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Diameter zona bening dan diameter koloni bakteri diamati dan diukur pada hari ke-7 inkubasi. Setelah data pengamatan diperoleh, indeks selulolitik bakteri dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{Diameter zona bening} - \text{Diameter koloni bakteri}}{\text{Diameter koloni bakteri}}$$

Kurva Standar Bakteri

Isolat dengan nilai indeks selulolitik tinggi diambil menggunakan jarum ose kemudian dimasukkan ke dalam media CMC 0,5% cair 50 mL, lalu diinkubasi menggunakan *shaker* selama 9 jam. Media CMC 0,5% berisi bakteri yang telah diinkubasi selama 9 jam diambil sebanyak 3 mL kemudian diencerkan secara berseri 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, dan dimasukkan ke media CMC 0,5% cair sebanyak 3 mL. Hasil dari setiap pengenceran diambil sebanyak 1 mL untuk diukur nilai absorbansnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Setelah itu, hasil setiap pengenceran juga disebar ke dalam cawan petri yang

berisi media *plant count agar* (PCA) sebanyak 50 μ L kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dihitung koloni yang tumbuh pada cawan petri.

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva tumbuh isolat dengan nilai indeks selulolitik tinggi diukur untuk mengevaluasi fase pertumbuhan dan digunakan untuk acuan waktu kultur awal serta pemanenan supernatan. Kurva tumbuh bakteri dibuat dengan menyiapkan media CMC 0,5% cair sebanyak 50 mL dan disterilkan menggunakan autoklaf. Ke dalam media CMC 0,5% steril ditambahkan 1–2 ose bakteri untuk dibuat kultur starter. Media yang telah ditambah isolat bakteri kemudian digoncang menggunakan *shaker* sampai mencapai fase eksponensial dengan kecepatan 120–150 rpm pada suhu 30°C. Setelah pertumbuhan bakteri mencapai fase eksponensial, diambil 1 mL kultur starter untuk membuat kultur baru. Sampel kultur kemudian diambil setiap 2 jam, yaitu dengan mengambil 1 mL dari kultur erlenmeyer yang terdapat dalam *shaker* dan dimasukkan ke dalam mikrotube. Hasil sampel kemudian diencerkan bertingkat hingga 10^{-5} dan koloni bakteri dihitung dengan metode tuang. Sampel diambil hingga 24 jam. Dari setiap sampel, diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam kuvet dan dihitung absorbansnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Produksi Selulase Ekstrak Kasar

Isolat bakteri terpilih diremajakan kembali menggunakan media CMC agar-agar dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, bakteri yang tumbuh diinokulasikan ke dalam 25 mL media CMC cair sebagai starter, kemudian diinkubasi pada suhu ruang dan digoncang menggunakan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 7 jam (fase eksponensial). Sebanyak 2,5 mL media starter diinokulasikan ke dalam 50 mL media CMC 0,5% cair dan digoncang kembali pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Setelah 24 jam, produk enzim ekstrak kasar dipanen, dengan cara mengambil 5 mL kultur ke dalam tabung falkon kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit pada suhu 40°C. Produk dipanen secara berkala mulai hari ke-1 sampai hari ke-5. Supernatan yang diperoleh kemudian disimpan di dalam kulkas.

Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Kurva standar glukosa dibuat menggunakan pereaksi DNS guna menentukan gula reduksi yang dihasilkan. Pereaksi DNS disiapkan dengan komposisi: 1 g DNS serbuk, 20 mL NaOH 2 M, dan 30 g natrium tatarat tetrahidrat. Kurva standar glukosa dibangun dengan membuat larutan stok glukosa, 1 g (1000 mg) glukosa dilarutkan dalam 100 mL akuades steril, yang artinya dalam 1 mL stok larutan mengandung 10 mg glukosa. Dalam pembuatan standar glukosa, diperlukan konsentrasi 1 mg/mL. Sebanyak 1 mL larutan stok diencerkan dengan 9 mL akuades steril, setelah itu

diencerkan berseri dengan konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm. Sebanyak 0,1 mL larutan glukosa konsentrasi 1mg/mL ditambahkan dengan 1,9 mL akuades, 2 mL DNS, dan dihomogenkan dengan vorteks. Campuran diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Setelah campuran stok glukosa dan DNS dingin, absorbans ditetapkan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. bertingkat hingga 10⁻⁴. Dari pengenceran 10⁻⁴, diambil 100 µL untuk dihitung koloni bakterinya dengan metode tuang. Sampel diambil hingga 24 jam. Dari setiap penarikan sampel, diambil 1 mL untuk dimasukan ke dalam kuvet dan jumlah sel bakteri dihitung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Biakan dalam cawan diinkubasi selama 24 jam.

Uji Aktivitas Selulase secara Kuantitatif

Aktivitas enzim selulase secara kuantitatif diuji dengan mengukur kadar gula reduksi (konsentrasi glukosa) pada sampel dan blanko. Uji aktivitas enzim selulase secara kuantitatif mengacu pada prosedur Murtiyaningsih dan Hazmi (2017). Sampel disiapkan dengan cara berikut: 1 mL enzim ekstrak kasar (supernatan hasil prosedur produksi enzim ekstrak kasar) ditambah dengan 1 mL larutan CMC 0,5%, kemudian campuran tersebut dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan DNS sebanyak 2 mL dan sampel diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit dan didinginkan. Blanko disiapkan dengan cara mengambil 1 mL larutan CMC 0,5%, lalu ditambah dengan 2 mL DNS kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks dan diinkubasi pada 100°C selama 10 menit. Setelah sampel dan blanko dingin, tahap selanjutnya adalah pengukuran absorbans menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim secara kuantitatif dapat dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Aktivitas Enzim } \left(\frac{U}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Konsentrasi glukosa} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{BM glukosa} \times \text{waktu inkubasi}}$$

Keterangan:

BM = bobot molekul glukosa (180,18 g/mol)

Analisis Data

Data penelitian disajikan baik dalam bentuk tabel maupun gambar, kemudian dianalisis secara deskriptif. Data morfologi koloni disajikan dalam bentuk table; data zona bening dan koloni dihitung berdasarkan rumus indeks selulolitik (IS), data kurva standar dan kurva pertumbuhan bakteri diolah menggunakan rumus regresi linear (y = ax + b), uji aktivitas enzim enzim dihitung menggunakan rumus yang tertera pada prosedur, dengan glukosa didapatkan dari perhitungan regresi linear.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat dan Ciri Bakteri Selulolitik secara Makroskopik, Mikroskopik, dan Biokimia

Isolasi bakteri selulolitik asal limbah bagas menghasilkan 6 isolat bakteri dengan morfologi yang berbeda, yaitu AT1, AT3, TNG2, BAW1, BAW2, dan BAW3. Keenam isolat tersebut adalah isolat yang berhasil tumbuh pada media CMC agar-agar 1% dan dipilih berdasarkan ciri morfologi yang berbeda berdasarkan pengamatan makroskopis. Dapat diduga keenam isolat bakteri termasuk ke dalam jenis bakteri selulolitik karena dapat memanfaatkan nutrisi berupa selulosa yang terkandung dalam media CMC. Selain ciri morfologi secara makroskopik, ciri lain yang diamati meliputi ciri mikroskopis (pewarnaan Gram) dan biokimia. Ciri 6 isolat bakteri selulolitik yang berasal limbah bagas dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan ciri makroskopik isolat, diperoleh morfologi koloni yang berbeda antara isolat satu dengan lainnya. Perbedaan ciri morfologi ini dapat

Tabel 1 Ciri isolat bakteri selulolitik asal bagas

Ciri	Kode isolat					
	AT1	AT3	TNG2	BAW1	BAW2	BAW3
Warna	Putih kecokelatan	Jingga	Putih tulang	Cokelat kemerahan	Biru	Putih
Elevasi Tepi	<i>cembung seluruh</i>	<i>cembung seluruh</i>	<i>timbul mengombak</i>	<i>cembung seluruh</i>	<i>cembung seluruh</i>	<i>cembung mengombak</i>
Bentuk koloni	sirkuler	sirkuler	takteratur	takteratur	sirkuler	takteratur
Gram	positif	negatif	positif	positif	negatif	positif
Bentuk sel	basil	kokus	basil	basil pendek	kokus	basil
Amilum	+	+	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+	+
Sukrosa	+	+	-	+	+	-
Laktosa	+	+	-	+	+	-
Sitrat	+	+	-	+	+	+
Motil	-	-	+	+	-	+
Katalase	+	+	+	+	+	+

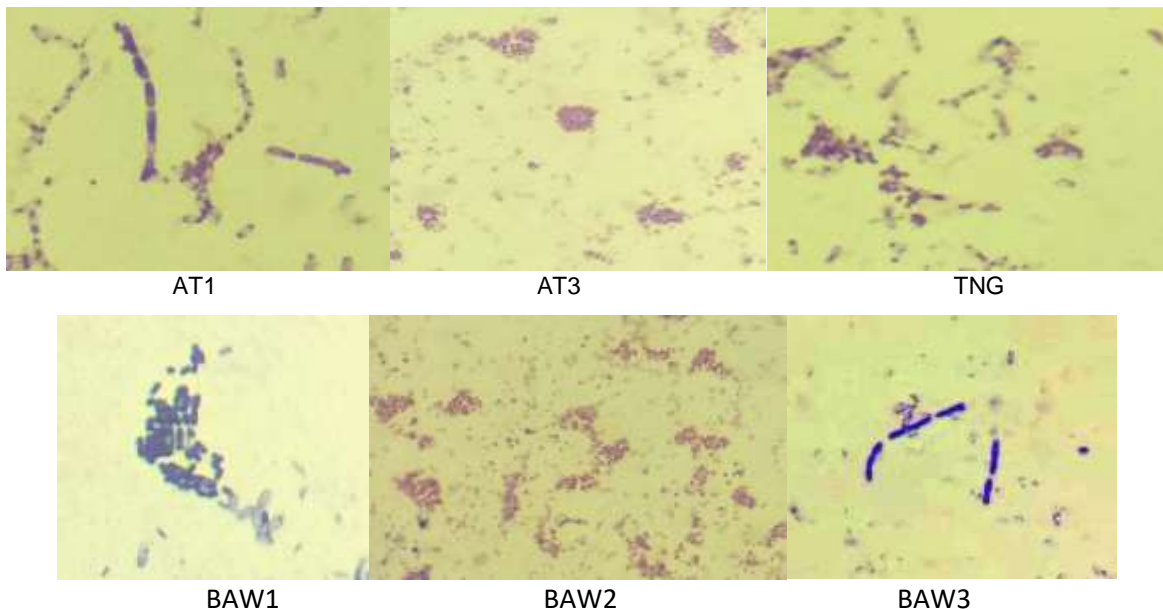
Keterangan: (+) positif dan (-) negatif.

menjadi penanda perbedaan spesies bakteri atau galur dari setiap isolat bakteri yang diperoleh. Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, keenam isolat bakteri tergolong sebagai bakteri Gram positif. Hal ini ditandai dengan terserapnya warna ungu dari pewarna kristal violet oleh sel bakteri (Gambar 1). Anuar *et al.* (2014) menjelaskan bahwa warna bakteri Gram negatif dan Gram positif yang berbeda didasarkan pada komponen penyusun dinding sel bakteri. Pengamatan bentuk sel bakteri selulolitik asal limbah bagas menunjukkan bahwa isolat AT1, TNG2, BAW3 merupakan bakteri yang berbentuk batang atau basil, isolat bakteri AT3 dan BAW2 berbentuk kokus, dan BAW1 berbentuk basil pendek. Bentuk sel batang sering ditemui pada bakteri selulolitik yang menggolongkannya ke dalam genus *Bacillus*.

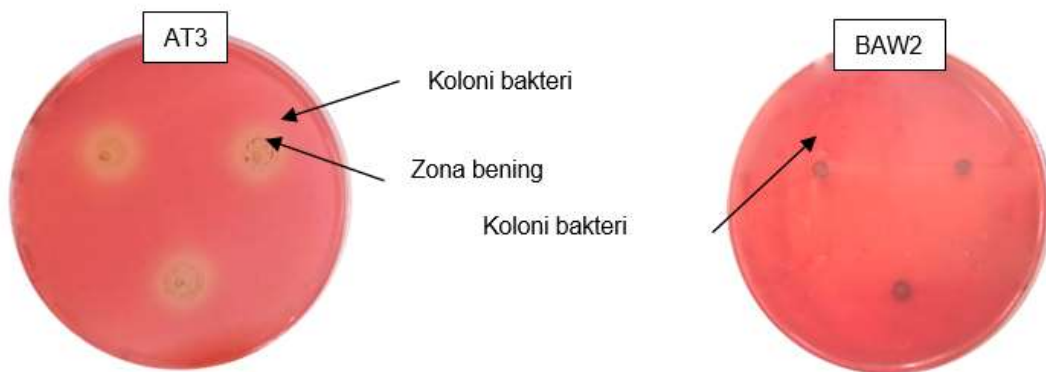
Uji amilum pada keenam isolat bakteri menunjukkan bahwa semua isolat mampu mendegradasi pati dengan zona bening yang muncul di sekitar goresan isolat. Isolat AT3 memiliki kemampuan mendegradasi pati tertinggi, ditandai dengan zona bening yang paling terlihat jelas dan lebar daripada isolat lainnya. Uji

amilum diterapkan untuk mengonfirmasi apakah suatu bakteri dapat menghasilkan amilase yang berperan dalam menghidrolisis amilum pada media dan juga dapat dikategorikan sebagai bakteri amilolitik. Menurut Sjoftan dan Ardyati (2011), bakteri yang dapat menghasilkan zona bening di sekitar media pati tergolong ke dalam bakteri amilolitik karena mampu mendegradasi amilum (Gambar 2).

Pada uji TSIA, keenam isolat menunjukkan perubahan warna media yang semula merah menjadi kuning meski ada isolat yang perubahan warnanya hanya terlihat pada dasar medianya. Isolat AT1, AT3, BAW1, dan BAW2 mampu mengubah secara keseluruhan media TSIA menjadi warna kuning, sedangkan isolat TNG2 dan BAW3 hanya dapat mengubah warna media menjadi kuning pada dasarnya saja dan bagian miring masih berwarna merah. Hasil uji TSIA menunjukkan isolat AT1, AT3, BAW1, dan BAW2 mampu memfermentasi 3 gula, yaitu glukosa, sukrosa, dan laktosa, sedangkan isolat TNG2 dan BAW3 hanya mampu memfermentasi glukosa. Pattuju *et al.* (2014) menjelaskan bahwa secara umum perubahan media



Gambar 1 Hasil pewarnaan Gram dengan mikroskop perbesaran 1000x.



Gambar 2 Zona bening pada media CMC Inkubasi 7 hari.

TSIA menunjukkan beberapa kondisi, di antaranya perubahan warna media menjadi kuning menandakan bakteri dapat memfermentasi 3 jenis gula: laktosa, glukosa, dan sukrosa. Kuning pada dasar (*butt*) dan merah pada permukaan miring (*slant*) menunjukkan adanya fermentasi glukosa; keretakan pada media mengindikasikan terbentuknya gas, dan munculnya warna hitam pada media menandakan terbentuknya gas H₂S.

Hasil pembacaan uji sitrat menunjukkan 5 isolat (AT1, AT3, BAW1, BAW2, dan BAW3) positif dan satu negatif (TNG2). Hal ini berarti isolat AT1, AT3, BAW1, BAW2, dan BAW3 menggunakan sitrat sebagai sumber karbon tunggal untuk mendapatkan energi. Warna media SCA yang berubah dari hijau menjadi biru adalah karena media SCA mengandung sitrat dan bersifat asam digunakan oleh bakteri, sehingga pH media meningkat secara perlahan kemudian media berubah menjadi basa (Ulfa *et al.* 2016).

Hasil uji motilitas menunjukkan 3 isolat (TNG2, BAW1, dan BAW3) positif motil sedangkan isolat AT1, AT3, dan BAW2 negatif motil. Hasil uji positif motil ditandai dengan menyebarnya pertumbuhan bakteri di sekitar tusukan yang telah dibuat secara vertikal pada media SIM, akibat keberadaan flagel (alat gerak aktif) yang dimiliki bakteri atau faktor luar seperti gerak Brown. Kosasi *et al.* (2019) menjelaskan bahwa motilitas merupakan pergerakan bakteri karena gerak aktif atau pasif bakteri yang ditunjukkan oleh penyebaran bakteri di sekitar tusukan pada media bila positif, dan hanya berupa garis lurus bila negatif.

Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa semua isolat positif katalase, ditandai dengan munculnya gelembung. Hal ini menandakan bakteri mampu menghasilkan katalase yang berperan dalam memecah senyawa beracun hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi oksigen (O₂) dan air (H₂O). Ciri morfologi dan biokimia suatu isolat bakteri belum dapat digunakan sebagai dasar identifikasi hingga tingkat genus atau spesies. Perlu ada analisis molekuler dengan menggunakan metode polifasik berdasarkan informasi sekuens gen 16S rRNA guna mengidentifikasi genus atau spesies. Berdasarkan Akihary dan Kolondam (2020), beberapa isolat bakteri yang teridentifikasi dalam genus yang sama memiliki morfologi atau fenotipe dan ciri biokimia yang berbeda. Berdasarkan temuan Napitupulu *et al.* (2019), beberapa isolat *Bacillus* sp. memiliki ciri yang berbeda pada koloninya (ukuran, warna, elevasi, dan bentuk koloni).

Aktivitas Selulase secara Kualitatif

Uji aktivitas selulase bakteri selulolitik asal bagas secara kualitatif menghasilkan 4 isolat yang membentuk zona bening dan 2 isolat tidak demikian. Zona bening pada media adalah karena nutrisi dalam media telah dikonsumsi oleh bakteri menjadi senyawa sederhana, yaitu selobiosa menjadi glukosa. Zona bening pada media CMC setelah dituangi merah kongo disebabkan oleh reaksi ikatan β -1,4-glikosidik dengan natrium benzenediazo-bis-1-naftilamin-4-sulfonat

(merah kongo) yang berinteraksi kuat dalam media CMC (Arifin *et al.* 2019).

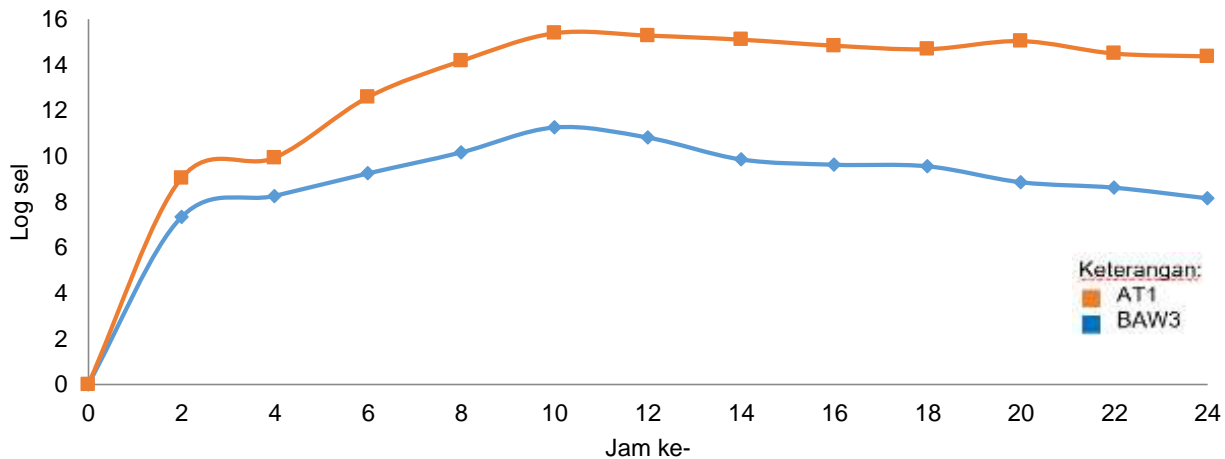
Hasil pengukuran indeks selulolitik (IS) menunjukkan 4 isolat yang memiliki zona bening dan 2 isolat lainnya tidak demikian. Pada media CMC 0,5% dengan waktu inkubasi 7 hari, nilai IS tertinggi dimiliki oleh 391 isolate AT1 (1,79), disusul oleh BAW3 (1,72), AT3 (1,27), dan BAW1 (0,71). Berdasarkan hasil ini, dipilih 2 isolat, yaitu AT1 dan BAW3 untuk dilanjutkan ke uji kuantitatif selulase. Pemilihan kedua isolat ini didasarkan pada kemampuan kedua bakteri tersebut mendegradasi CMC yang lebih tinggi dibanding keempat isolat lainnya.

Nilai IS isolat bakteri dari bagas yang didapat dari penelitian ini masih tergolong rendah. Selain IS yang rendah, bahkan tidak terdapat zona bening pada 2 isolat, waktu inkubasi juga lebih lama dibandingkan dengan penelitian bakteri selulolitik dari sampel lain. Jika dibandingkan dengan temuan Puspawati *et al.* (2018) mengenai eksplorasi bakteri selulolitik dari sampah organik kota Denpasar dengan konsentrasi CMC 1% dan waktu inkubasi selama 24 jam, IS yang dihasilkan jauh lebih tinggi, yaitu isolat B-6 dengan IS 7,3 dan isolat U-6 dengan IS 3, dan termasuk ke dalam tingkat degradasi tinggi. Agustinur dan Yusrizal (2021) menjelaskan bahwa bakteri dengan IS >4 termasuk dalam kategori degradasi tinggi, sedangkan IS dengan kisaran 2–3,9 termasuk sedang, dan IS 0,5–1,9 termasuk rendah. Razie *et al.* (2011) menjelaskan bahwa semakin tinggi nilai IS, semakin besar pula kemampuannya mendegradasi CMC. Alkahfi *et al.* (2021) juga menegaskan bahwa IS yang berbeda disebabkan oleh mekanisme bakteri yang berbeda-beda dalam mendegradasi selulosa pada media CMC. Hasil akhir yang didapat dari proses degradasi selulosa CMC bergantung pada beberapa factor, di antaranya adalah pH, kecocokan konformasi enzim dengan substrat, konsentrasi produk, dan reaksi redoks.

Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan bakteri selulolitik asal limbah bagas berkaitan dengan pengukuran nilai absorbans kurva standar bakteri pada spektrofotometer UV-vis. Kurva pertumbuhan isolat AT1 dan BAW3 dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan grafik, kedua bakteri mengalami pertumbuhan yang nyata selama 24 jam pengamatan dengan interval pengukuran setiap 2 jam. Kurva pertumbuhan berisi informasi mengenai fase hidup bakteri yang pada umumnya meliputi adaptasi (lag), logaritmik (pertumbuhan eksponensial), dan stasioner (kematian).

Pada kurva terlihat bahwa isolat AT1 dan BAW3 mengalami beberapa fase pertumbuhan selama 24 jam pengukuran kurva tumbuh. Fase pertama pertumbuhan bakteri ialah fase lag atau adaptasi. Isolat AT1 mengalami fase lag pada jam ke-2 sampai mendekati jam ke-4, isolat BAW3 mengalami fase lag pada jam ke-2. Hal ini ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang masih sedikit dan belum naik secara cepat. Mardalena (2019) menyatakan bahwa pada



Gambar 3 Kurva pertumbuhan isolat bakteri AT1 dan BAW3.

fase lag peningkatan jumlah bakteri berlangsung lambat, akibat dari aklimatisasi atau penyesuaian terhadap kondisi lingkungan (pH, suhu, dan nutrisi). Isolat AT1 mengalami fase eksponensial pada jam ke-4 dan memuncak pada jam ke-10. Tidak jauh berbeda dengan isolat AT1, isolat BAW3 juga mengalami fase eksponensial pada jam ke-4 sampai jam ke-10. Fase ini ditandai dengan kenaikan pada kurva yang sangat nyata. Fase eksponensial terjadi karena sel bakteri membelah dua kali lipat sehingga pertumbuhannya sangat cepat. Sulistijowati (2012) menyatakan bahwa fase eksponensial menggambarkan pembelahan sel bakteri dengan laju yang konstan, aktivitas metabolisme bakteri konstan, massa tumbuh sel menjadi dua kali lipat dengan laju sama, serta keadaan pertumbuhan seimbang. Pada jam ke-12 sampai dengan jam ke-24 isolat AT1 mengalami fase stasioner, dengan pertumbuhan dan penurunan jumlah sel bakteri terlihat tidak nyata dan cenderung stabil. Pada isolat BAW3, fase stasioner terjadi pada jam ke-12 sampai dengan jam ke-18 meskipun sempat terlihat turun secara nyata. Fase stasioner pada isolat AT1 yang terjadi lebih lama dapat disebabkan oleh jenis isolat AT1 dan BAW3 yang berbeda serta nutrisi dalam media pertumbuhan masih tersedia dan cukup untuk pertumbuhan bakteri dibandingkan dengan media pertumbuhan pada isolat BAW3. Wijanarka *et al.* (2016) menyatakan bahwa perbedaan lama waktu pada setiap fase pertumbuhan bakteri dapat disebabkan oleh beberapa factor, di antaranya adalah perbedaan spesies dan galur yang digunakan, dan kondisi lingkungan yang berbeda.

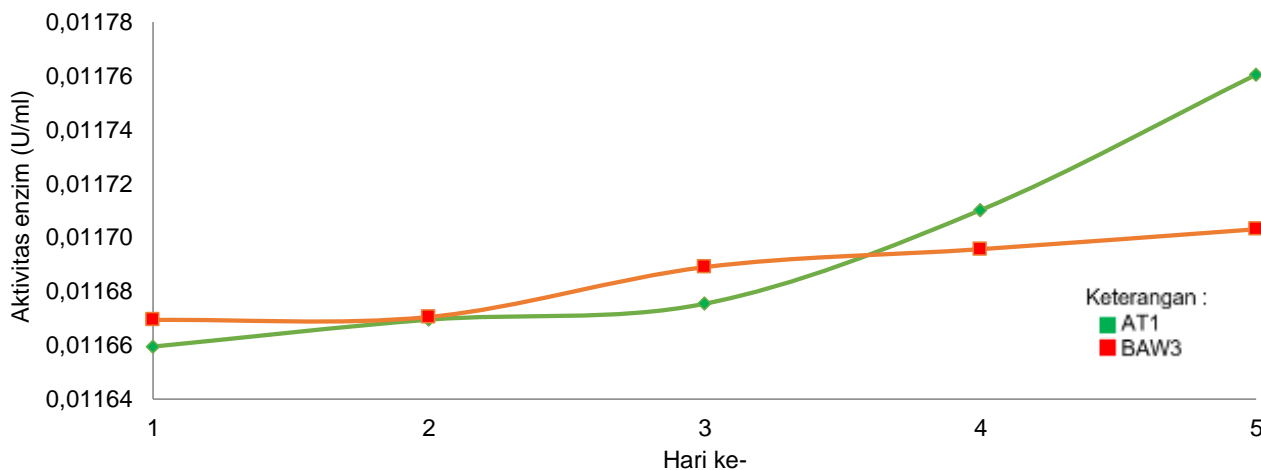
Pada isolat AT1, fase kematian belum terlihat sampai dengan jam ke-24 karena bakteri masih mengalami fase stasioner. Sebaliknya, isolat BAW3 mengalami fase kematian pada jam ke-20 hingga jam ke-24 yang ditandai dengan menurunnya jumlah bakteri. Fase kematian bakteri terjadi karena kandungan nutrisi dalam media pertumbuhan sudah sangat menipis dan bahkan habis, sehingga bakteri kematian. Ristiati (2015) menjelaskan bahwa fase kematian terjadi pada saat medium kehabisan nutrisi

sehingga populasi bakteri akan menurun. Penyebab penurunan populasi bakteri ini di antaranya adalah sel yang mati lebih cepat daripada terbentuknya sel-sel baru, laju kematian mengalami percepatan secara eksponensial, bergantung pada spesies bakteri yang diuji (setiap bakteri memiliki waktu kematian yang berbeda).

Selain digunakan untuk mengetahui siklus pertumbuhan bakteri secara keseluruhan, kurva pertumbuhan juga digunakan sebagai acuan dalam pembuatan kultur bakteri yang nantinya akan digunakan pada proses pemanenan metabolit yang diinginkan dari bakteri yang diuji seperti halnya selulase. Pertumbuhan bakteri pada waktu ke-sekian fase eksponensial menjadi acuan waktu inkubasi untuk membuat kultur bakteri awal. Hal ini karena pada fase ini bakteri membelah cepat sehingga metabolit yang dihasilkan juga semakin banyak. Menurut Sonia dan Kusnadi (2015), produksi metabolit primer seperti enzim terjadi pada fase eksponensial akhir hingga fase stasioner, sehingga sangat baik jika ditumbuhkan pada media baru yang mengandung nutrisi lebih banyak. Dalam hal ini, waktu yang digunakan untuk membuat kultur awal isolat AT1 dan BAW3 adalah jam ke-6 sampai dengan jam ke-10, berlandaskan fase eksponensial kedua isolat bakteri yang teramat.

Aktivitas Selulase Isolat AT1 dan BAW3

Perhitungan aktivitas enzim didasarkan pada konsentrasi glukosa yang berasal dari pengukuran kurva standar glukosa. Pada hari ke-1 hingga hari ke-2, aktivitas selulase isolat BAW3 masih terlihat sama dan belum meningkat, sedangkan aktivitas selulase isolat AT1 sudah mulai menaik nyata pada hari ke-1 sampai hari ke-5 dengan nilai tertinggi 0,01176 U/mL (Gambar 4). Aktivitas selulase tertinggi yang dihasilkan isolat BAW3 pada hari ke-5 ialah 0,01170 U/mL. Kurva pengukuran aktivitas isolat AT1 dan BAW3 menunjukkan aktivitas enzim yang naik secara cukup nyata walaupun lambat. Hal ini dapat disebabkan oleh kandungan nutrisi berupa karbohidrat di dalam media CMC yang digunakan terlalu sedikit (0,5%) sehingga



Gambar 4 Kurva aktivitas selulase isolat bakteri AT1 dan BAW3.

jumlah enzim yang dihasilkan rendah. Semakin optimum kandungan karbon dalam media produksi, semakin meningkat selulase yang dihasilkan oleh bakteri.

Aktivitas enzim yang dihasilkan dari isolat bakteri selulolitik asal limbah bagas ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan aktivitas enzim yang sama pada limbah yang lain. Pada kajian Chasanah *et al.* (2013) tentang pencirian selulase PMP 0126Y dari bakteri selulolitik asal limbah pengolahan agar-agar, didapatkan hasil aktivitas enzim tertinggi, yaitu 0,120 U/mL pada media CMC 1% dengan waktu pemanenan supernatan pada inkubasi 3 hari. Akan tetapi, kurva aktivitas enzim isolat AT1 dan BAW3 memperlihatkan bahwa belum ada penurunan aktivitas enzim sampai dengan hari kelima pemanenan supernatan, yang menunjukkan aktivitas selulase kemungkinan masih akan naik sampai hari tertentu. Hal ini dapat disebabkan oleh rendahnya kemampuan bakteri memanfaatkan selulosa yang terkandung dalam media CMC. Pada hari ke-5, kandungan CMC sebagai sumber karbon masih mencukupi kebutuhan nutrisi bakteri. Selulase yang belum bekerja secara optimum akan menghasilkan produk gula (glukosa, disakarida, oligosakarida) dengan kadar yang rendah dan apabila direaksikan dengan DNS, absorbans yang terukur akan rendah pula karena DNS hanya berikatan dengan gugus hidroksida (-OH) pada glukosa, disakarida, dan oligosakarida.

Beberapa faktor seperti suhu, waktu inkubasi, dan pH sangatlah memengaruhi kerja enzim yang diujikan. Menurut Setyoko dan Utami (2016), suhu berperan sangat penting dalam reaksi enzimatik, yakni ketika suhu optimum reaksi enzimatik akan meningkat karena energi kinetik yang bertambah. Penyebab lain yang juga menjadi alasan aktivitas enzim isolat AT1 dan BAW3 rendah diduga karena bakteri berasal dari limbah bagas yang memiliki nutrisi sedikit, seperti glukosa, yang digunakan oleh bakteri untuk tumbuh. Limbah bagas yang berasal dari pabrik gula mengandung air dan glukosa alami yang sangat rendah serta hanya tersisa serat yang terdiri atas

selulosa dan bahan lain seperti lignin, hemiselulosa, dan pektin yang masih berikatan satu sama lain. Bakteri yang tumbuh pada substrat yang miskin nutrisi akan sulit mendegradasi substrat karena enzim yang dihasilkan tidak maksimum. Aktivitas enzim yang dihasilkan dipengaruhi oleh jenis sumber enzim, komposisi substrat, serta konsentrasi substrat.

KESIMPULAN

Enam isolat berhasil diisolasi dari limbah bagas dengan ciri morfologi koloni yang berbeda, yaitu AT1, AT3, TNG2, BAW1, BAW2, dan BAW3. Secara kualitatif, terdapat 2 isolat dengan indeks selulolitik tertinggi, yaitu AT1 (1,79) dan BAW3 (1,72). Secara kuantitatif, aktivitas selulase tertinggi terdapat pada isolat AT1 dengan nilai aktivitas 0,1176 U/ml dan BAW3 0,1170 U/mL, walaupun keduanya masih tergolong ke dalam kemampuan degradasi rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustinur, Yusrizal. 2021. Isolasi bakteri selulolitik indigenous pendegradasi limbah tandan kosong kelapa sawit. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 8(1): 150–155. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2021.v08.i01.p16>
- Alkahfi F, Adiyartasa W, Wirawan IGP. 2021 Isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik pada sampah Organik di TPA Suwung Denpasar. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 10(2): 153–160.
- Akihary CV, Kolondam BJ. 2020. Pemanfaatan gen 16S rRNA sebagai perangkat identifikasi bakteri untuk penelitian-penelitian di Indonesia. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi – Unsrat* 9(1): 16–22. <https://doi.org/10.35799/pha.9.2020.27405>

- Anuar W, Andi D, Jose AC. 2014. Isolasi bakteri selulolitik dari perairan Dumai. *JOM FMIPA*.1(2):149–159.
- Arifin Z, Gunam IBW, Antara NS, Setiyo Y. 2019. Isolasi bakteri selulolitik pendegradasi selulosa dari kompos. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 7(1): 30–37. <https://doi.org/10.24843/JRMA.2019.v07.i01.p04>
- Budi KL, Wijanarka, Kusdiyantini E. 2018. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri *Serratia marcescens* pada substrat jerami. *Jurnal Biologi*. 7(1): 35–42.
- Chasanah E, Dini IR, Mubarik NR. 2013. Karakterisasi enzim selulase PMP 0126Y dari limbah pengolahan agar. *JPB Perikanan*. 8(2): 103–114. <https://doi.org/10.15578/jpbkp.v8i2.41>
- Fauziah AI, Ibrahim M. 2020. Isolasi dan karakterisasi bakteri selulolitik pada tanah gambut di Desa Tagagiri Tama Jaya, Kecamatan Pelangiran, Kabupaten Inhil, Riau. *Lentera Bio*. 9(3): 194–203. <https://doi.org/10.26740/lenterabio.v9n3.p194-203>
- Jannah J, Safik, Jalaluddin M, Darmawi, Farida, Aliza D. 2017. Jumlah koloni bakteri selulolitik pada sekum ayam kampung (*Gallus domesticus*). *Jimvet*. 1(3): 558–565.
- Kosasi C, Lolo WA, Sedewi S. 2019. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri dari bakteri yang berasosiasi dengan alga *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh serta identifikasi secara biokimia. *Pharmacon*. 5(2): 321–359. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29301>
- Mardalena. 2016. Fase Pertumbuhan isolat bakteri asam laktat (BAL) tempoyak asal Jambi yang disimpan pada suhu kamar. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 11(1): 58–66. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.11.1.58-66>
- Maulani SH, Rahayu K, Moch AA, Kustiawan TP. 2016. Isolasi dan identifikasi bakteri selulolitik dari tanah mangrove muara Sungai Gunung Anyar, Surabaya. *Journal of Marine and Coastal Science*. 5(1): 1–8
- Mentari SD, Yuanita, Roby. 2021. Pembuatan kompos ampas tebu dengan bioaktivator mol rebung bambu. *Buletin Poltanesa*. 22(1): 1–6. <https://doi.org/10.51967/tanesa.v22i1.333>
- Murtiyaningsih H, Hazmi M. 2017. Isolasi dan uji aktivitas enzim selulase pada bakteri selulolitik asal tanah sampah. *Agritrop* 15(2): 293–308.
- Napitupulu H, Rumengan I, Wulur S, Ginting E, Rimper J, Toloh B. 2019. *Bacillus* sp. sebagai agensia pengurai dalam pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang menggunakan ikan mentah sebagai sumber nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*. 7(1): 158–169. <https://doi.org/10.35800/jip.7.1.2019.22627>
- Pattuju SM, Fatimawali, Manampiring A. 2014. Identifikasi bakteri resisten merkuri pada urine, feses dan kalkulus gigi pada individu di Kecamatan Malalayang, Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal e-Biomedik (eBM)*, 2(2): 532–540. <https://doi.org/10.35790/ebm.2.2.2014.5108>
- Puspawati NMI, Atmaja IWD, Sutari NWS. 2018. Eksplorasi bakteri selulolitik dari sampah organik Kota Denpasar. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 7(3): 363–373.
- Razie F, Iswandi A, Sutandi A, Gunarto L, Sugiyanta. 2011. Aktivitas enzim selulase mikroba yang diisolasi dari jerami padi di persawahan pasang surut di Kalimantan Selatan. *Jurnal Tanah Lingkungan*. 13(2): 43–48. <https://doi.org/10.29244/jitl.13.2.43-48>
- Ristiati NP. 2015. Uji Bioaktivitas Forbazol E terhadap hambatan pertumbuhan pada *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 4(1): 566–578. <https://doi.org/10.23887/jst-undiksha.v4i1.4934>
- Setiati R, Wahyuningrum D, Siregar S, Marhaendrajana T. 2016. Optimasi pemisahan lignin ampas tebu dengan menggunakan natrium hidroksida. *Ethos (Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat)*. 4(2): 257–264. <https://doi.org/10.29313/ethos.v0i0.1970>
- Setyoko H, Utami B. 2016. Isolasi dan karakterisasi enzim selulase cairan rumen sapi untuk hidrolisis biomassa. *Proceeding Biology Education Conference*. 13(1): 863–867.
- Sjofjan O, Ardyati T. 2011. Extracellular amylase activity of amylolytic bacteria Isolated from quail's (*Coturnix japonica*) intestinal tract in corn flour medium. *International Journal of Poultry Science*. 10(5): 411–415. <https://doi.org/10.3923/ijps.2011.411.415>
- Sonia NMO, Kusnadi J. 2015. Isolasi dan karakterisasi parsial enzim selulase dari isolat bakteri OS-16 asal Padang Pasir Tengger-Bromo. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(4): 11–19.
- Sulistijowati R. 2012. Potensi filtrat *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 sebagai biopreservatif pada rebusan daging ikan tongkol. *Indonesian Journal of Applied Sciences*. 2(2): 58–63.
- Syukri N, Kasprijo P, Tjahja H, Syakuri H, Listiowati E. 2021. Penapisan bakteri selulolitik pada saluran pencernaan ikan kerapu cantang yang dibudidayakan di Desa Babakan, Kecamatan Pangandaran, Kabupaten Pangandaran. *Jurnal Ruaya*. 9(2): 1–10. <https://doi.org/10.29406/jr.v9i2.3000>
- Ulfa A, Suarsini E, Muhdhar MH. 2016. Isolasi dan uji sensitivitas merkuri pada bakteri dari limbah penambangan emas di Sekotong Barat, Kabupaten

- Lombok Barat: Penelitian pendahuluan. *Proceeding Biology Education Conference*. 13(1): 793–799.
- Utami AP, Setyaningsih R, Pangastuti A, Sari SLA. 2019. Optimasi produksi enzim selulase dari jamur *Penicillium* sp. SLL06 yang diisolasi dari serasah daun salak (*Salacca edulis*). *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 5(2): 145–149.
- Wijanarka, Kusdiyantini E, Perman S. 2016. Skrining bakteri selulolitik dari saluran pencernaan siput (*Achatina fulica*) dan uji kemampuan aktivitas selulase. *Biosaintifika*. 8(3): 385–391.
- Yudo H, Jatmiko S. 2008. Analisa teknis kekuatan mekanis material komposit berpenguat serat bagas (bagasse) ditinjau dari kekuatan tarik dan impak. *Kapal*. 5(2): 95–101.