

# Uji Potensi Khamir yang Diisolasi dari Kawasan Mangrove Pantai Kenjeran Surabaya dalam Mendegradasi Selulosa

Martha Emiliarsari dan Nur Hidayatul Alami, S.Si, M.Si

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

*e-mail:* hidayatulalami@bio.its.ac.id

**Abstrak**— Molekul selulosa merupakan polimer linier, bersifat kristalin dan tidak mudah larut. Hal ini membuat selulosa tidak mudah didegradasi secara kimia dan mekanis, sehingga dibutuhkan kajian tentang penanganan degradasi selulosa secara biologis dengan bantuan mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme potensial yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi selulosa adalah khamir. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genus khamir hasil isolasi dari mangrove pantai Kenjeran Surabaya yang berpotensi dalam mendegradasi selulosa, untuk mengetahui indeks hidrolisis selulosa tertinggi dari khamir, serta kadar gula reduksi tertinggi dari khamir. Isolat khamir yang diperoleh diidentifikasi hingga tingkat genus. Uji potensi selulolitik khamir secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan medium CMC. Sementara, uji potensi secara kuantitatif dilakukan dengan pengukuran kadar gula reduksi dengan metode DNS pada isolat terbaik dari hasil uji kualitatif. Hasil penelitian diperoleh lima isolat dengan kode K 1.2, K 2.2, K 2.3, K 2.4, dan K 4.2. Isolat-isolat tersebut berpotensi dalam mendegradasi selulosa. Nilai indeks selulolitik tertinggi dicapai oleh isolat K 1.2 dengan nilai sebesar 0,725. Kadar gula reduksi tertinggi yang dicapai oleh isolat K 1.2 adalah 0,190ppm pada hari ketiga.

**Kata kunci**—khamir, selulosa, degradasi, gula reduksi

## I. PENDAHULUAN

S elulosa ditemukan berlimpah pada biomassa tumbuhan, terdapat di alam secara khusus pada dinding sel tumbuhan dalam bentuk mikrofibril melalui ikatan inter dan intra yang terdiri dari rantai molekul glukosa. Mikrofibril selulosa terdiri dari dua tipe, yaitu amorf dan kristalin [1]. Tipe amorf terbentuk karena adanya kelompok fibril yang tidak teratur, sedangkan tipe kristalin terbentuk karena adanya kelompok fibril yang teratur. Selulosa merupakan polimer yang tersusun dari rantai monomer glukosa melalui ikatan  $\beta(1\rightarrow4)$  [2]. Struktur selulosa seragam dan saling berikatan dengan ikatan glikosidik antara molekul glukosa yang satu dengan molekul glukosa yang lain [3]. Adanya sifat kristalin dan tidak mudah larut pada selulosa, menjadikan komponen ini tidak mudah didegradasi secara kimia dan mekanis [4].

Dewasa ini, kajian terkait degradasi senyawa organik selulosa secara biologi dengan bantuan mikroorganisme telah banyak dilakukan. Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler eukariotik yang masuk dalam kelompok fungi dengan potensi degradasi senyawa organik selulosa. Hal ini

dikarenakan khamir memiliki enzim selulase untuk memutus selulosa menjadi produk sederhana berupa glukosa [5]. Khamir dapat dibedakan atas dua kelompok yaitu bersifat fermentatif dan oksidatif. Jenis fermentatif dapat melakukan fermentasi alkohol yaitu memecah gula (glukosa) menjadi alkohol dan gas contohnya pada produk roti. Sedangkan oksidatif (respirasi) maka akan menghasilkan karbon dioksida dan air [6]. Khamir memiliki beberapa enzim penting diantaranya adalah selulose yang menyebabkan khamir memegang peran yang penting dalam membantu proses dekomposisi senyawa organik [7]. Dijelaskan Tanaka *et al.* (1990) dalam Kanti (2005), bahwa peran ekologi khamir adalah menentukan kecepatan dan arah proses degradasi limbah organik yang ada di dalam tanah. Menurut Balia (2004), salah satu genus khamir yang dapat menghasilkan enzim selulase adalah dari kelompok *Trichosporon*.

Banyak khamir yang ditemukan pada lingkungan darat. Akan tetapi, beberapa kelompok khamir juga banyak ditemukan pada habitat laut [8]. Peran khamir dalam ekosistem laut sering dikaitkan dengan dekomposisi dan siklus hara, serta biodegradasi xenobiotik seperti minyak bumi dan turunannya [8]. Khamir laut memiliki toleransi garam yang tinggi dan kemampuan untuk melakukan fermentasi. Daerah estuari memiliki kandungan khamir yang lebih banyak dibandingkan dengan perbatasan wilayah akuatik. Beberapa khamir telah diisolasi dari kawasan hutan mangrove tropis dan subtropis serta rawa-rawa [9].

Salah satu kawasan yang menawarkan berbagai mikrohabitat yang didalamnya terdapat potensi kandungan komunitas khamir adalah kawasan mangrove. Ekosistem mangrove memberikan sumbangan berupa bahan organik bagi perairan sekitarnya. Bahan organik terlarut yang dihasilkan dari proses penguraian (dekomposisi) dari sampah pohon (daun, propagul dan ranting) di hutan mangrove dapat dimanfaatkan oleh organisme yang menghuni kawasan tersebut [10]. Bahan organik yang ditemukan melimpah pada ekosistem ini diantaranya adalah selulosa [11]. Salah satu kawasan yang ditumbuhi oleh ekosistem hutan mangrove adalah pantai Kenjeran, Surabaya.

Khamir dari wilayah mangrove pantai Kenjeran yang mempunyai kemampuan dalam memproduksi selulase belum banyak diungkap. Berdasarkan dari latar belakang tersebut, kajian potensi khamir yang diisolasi dari pantai Kenjeran

Surabaya menjadi hal yang dibutuhkan dengan harapan dapat memberi informasi tentang pengembangan khamir sebagai agen biologis untuk mengatasi permasalahan limbah organik.

## II. METODOLOGI

### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2014 sampai Maret 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya (ITS).

### B. Metode yang Digunakan

#### Pengambilan sampel

Sampel khamir diambil dari bagian tanah rhizosfer mangrove di kawasan pantai Kenjeran Surabaya. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0-10 cm dari permukaan tanah secara komposit, yaitu pada lima titik secara acak dalam satu pohon. Sampel tanah diambil dengan cetok dan dimasukkan dalam botol sampel. Kemudian botol sampel diletakkan dalam *ice box* untuk diidentifikasi dan diuji potensi khamir di laboratorium. Selain itu, diambil pula data fisik dan kimia tanah dengan cara mengukur suhu menggunakan thermometer, mengukur salinitas menggunakan *hand salino refractometer*, serta kelembapan dan pH tanah (soil tester).

#### Isolasi khamir

Isolasi khamir dilakukan dengan cara menimbang sampel tanah yang diambil sebanyak 10 g dan dimasukkan ke dalam 90 ml air fisiologis (NaCl), kemudian dihomogenkan dan dibiarkan hingga mengendap sekitar 5 menit. Supernatan yang terbentuk diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam 40 ml media YMB. Selanjutnya, diinkubasi diatas *rotary shaker* selama 4 hari pada suhu ruang.

#### Purifikasi khamir

Purifikasi dilakukan dengan cara seri pengenceran. Suspensi dari Erlenmeyer diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan air laut steril sebanyak 9 ml. seri pengenceran adalah  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dan  $10^{-3}$ . Diambil sebanyak 0.1 ml suspensi dan dimasukkan ke dalam cawan Petri yang berisi media YMEA yang telah ditambah dengan kloramfenikol 1% dengan metode sebar. Kemudian diinkubasi selama  $\pm 4$  hari pada suhu ruang. Setelah inkubasi dilakukan pengamatan bentuk koloni dengan cara memilih 4 titik secara random yang akan diinokulasikan pada media YMEA plate dengan metode streak 16 gores. Kemudian diinkubasi selama  $\pm 4$  hari pada suhu ruang.

#### Uji urease

Uji urease dilakukan dengan media *urea broth* (komposisi berdasarkan produk SIGMA-ALDRICH dan van-Rij, 1987). Uji urease dilakukan dengan cara satu ose isolat khamir diinokulasi pada media yang mengandung urea secara aseptis dan diinkubasi pada suhu ruang. Pertumbuhan khamir diamati setiap hari selama 7 hari. Jika khamir menghasilkan urease, akan ditandai dengan perubahan warna dari merah kuning menjadi merah keunguan.

#### Uji askospora

Uji askospora dilakukan dengan metode modifikasi Schaeffer-Fulton's. Suspense isolat khamir dioleskan (dibuat smear) diatas gelas obyek dan diberi *malachite green* 0.5% dan dipanaskan dengan uap air (didas air mendidih) selama 5 menit dengan sesekali ditetesi *malachite green*. Setelah gelas obyek cukup dingin, gelas obyek dimiringkan dan dibilas dengan air selama 30 detik dengan hati-hati. Selanjutnya, smear khamir ditetesi dengan safranin 0.5% selama 30 detik. Preparat diamati dibawah mikroskop perbesaran 400x dan 1000x dengan bantuan minyak imersi. Askospora dewasa akan berwarna hijau, sedangkan sel vegetatif akan tampak merah.

#### Uji fermentasi gula

Uji fermentasi gula dilakukan dengan menginokulasi sebanyak 1 ose isolat yang telah berumur 48 - 78 jam ke dalam medium steril mengandung glukosa dan ditambahkan *bromthymol blue* (sebagai indikator) (Wickerham, 1951 dalam van-Rij, 1987) sebanyak 10 mL. Hasil positif tampak jika terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kuning.

#### Uji pertumbuhan

Uji pertumbuhan diperlukan untuk mengamati ciri pertumbuhan isolat khamir pada media YMB. Uji ini dilakukan dengan cara isolat khamir diinokulasikan pada media YMB pada suhu ruang dan diamati pertumbuhannya setiap hari selama 7 hari. Karakter yang diamati adalah keberadaan cincin, membran, pelikel pada permukaan media, dan endapan pada dasar media (sedimen)

#### Identifikasi khamir hingga tingkat genus

Identifikasi khamir dilakukan dengan cara mengklasifikasikan karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis khamir berdasarkan buku panduan identifikasi *The Yeast a Taxonomic Study* (Kurtzman dan Fell, 1998; van-Rij, 1984). Isolat khamir yang telah diketahui genusnya diuji potensi dalam hidrolisis selulosa.

#### C. Uji potensi khamir dalam mendegradasi selulosa

##### Uji potensi selulolitik

Uji potensi selulolitik terhadap khamir berfungsi untuk menguji kemampuan khamir dalam mendegradasi selulosa. Uji ini dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat khamir yang telah diketahui genusnya untuk diinokulasikan pada media selektif CMC. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 hari. Setelah diinkubasi, koloni ditetesi dengan *congo red*  $\pm 5$  tetes. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya zona bening (*halo zone*) di sekitar isolat khamir. Bagian yang terdegradasi akan dikelilingi warna bening kekuningan, sedangkan yang tidak terdegradasi akan berwarna merah (Pointing, 1999). Indeks selulolitik dihitung dengan metode Lim *et al.* (1987), dengan rumus sebagai berikut :

$$IS = \frac{X_1 - X_2}{X_2}$$

Keterangan : IS : Indeks selulolitik  
 $X_1$  : Diameter total  
 $X_2$  : Diameter koloni

*Pengukuran kadar gula reduksi*

Larutan asam 3.5-dinitrosalisilat (DNS) dibuat dengan menimbang 1 g NaOH, dilarutkan dengan 60 ml akuades, ditambah 18.2 g Na-K Tartrat, 1 g asam 3.5-dinitrosalisilat (ditambahkan perlahan-lahan sambil diaduk hingga larut sempurna), kemudian ditambah 0.2 g fenol untuk menstabilkan warna dan 0.05 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Selanjutnya dipindahkan ke dalam labu ukur, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, kocok hingga homogen (Maturindo, 2014).

Pereaksi DNS yang telah dibuat ditambahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 mL yang berisi 1 mL supernatan sampel hasil hidrolisis. Larutan tersebut dipanaskan dalam air mendidih selama 10 menit untuk mempercepat reaksi yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi lebih pekat, kemudian dipindahkan ke dalam air es untuk menghentikan reaksi. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 540 nm untuk memperoleh nilai OD. Nilai OD yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi yang dihasilkan dari pembuatan kurva standar glukosa untuk memperoleh nilai kadar gula reduksi. Pengukuran kadar gula reduksi dilakukan setiap hari selama 7 hari.

*Pembuatan kurva standar glukosa*

Penelitian ini menggunakan larutan standar glukosa untuk uji aktivitas selulase. Larutan standar glukosa dibuat dengan menimbang 0.01 g glukosa dan dilarutkan dalam 10 mL akuades steril sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm diencerkan dengan melarutkan 2 mL larutan stok ditambahkan 18 mL akuades steril sehingga diperoleh larutan stok glukosa 100 ppm. Dari larutan stok tersebut dilakukan pengukuran terhadap standar glukosa dengan konsentrasi 8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 ppm. Variasi konsentrasi dibuat dengan cara mengambil larutan standar glukosa sebanyak 0.08 mL, 0.1 mL, 0.12 mL, 0.14 mL, 0.16 mL dan 0.18 mL, 0.20 mL kemudian diencerkan dengan akuades steril hingga 1 mL.

Kurva standar glukosa dibuat mencampurkan 1 mL dengan berbagai konsentrasi (8, 10, 12, 14, 16, 18 dan 20 ppm). Selanjutnya, larutan ditambahkan dengan 4 mL larutan DNS. Larutan dipanaskan ke dalam air mendidih selama 10 menit dan didinginkan menggunakan air mengalir atau air es. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer. Metode ini dimodifikasi dari Zhang *et al.* (2009) dan Astutik *et al.* (2011). Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian diinterpolasikan dengan konsentrasi yang diukur dengan dibuat persamaan liniernya.

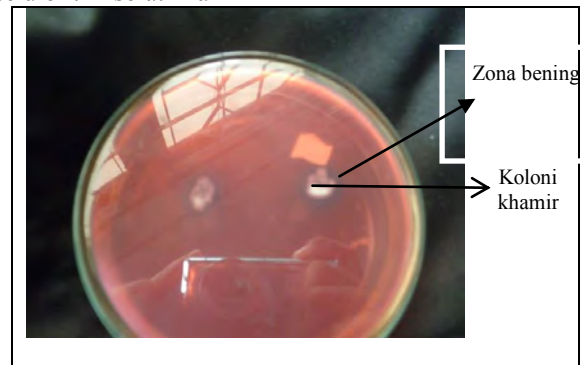
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

*A. Uji Potensi dalam Mendegradasi Selulosa*

*Uji potensi dalam mendegradasi selulosa secara kualitatif dengan pengukuran indeks hidrolisis selulosa*

Uji potensi khamir dalam mendegradasi selulosa berkaitan dengan kemampuannya dalam mensekresi enzim selulase. Hidrolisis enzimatik selulolitik memiliki tujuan untuk mendekonstruksi selulosa dan polimer karbohidrat lain menjadi fermentasi gula [12]. Uji enzim selulase dilakukan dengan

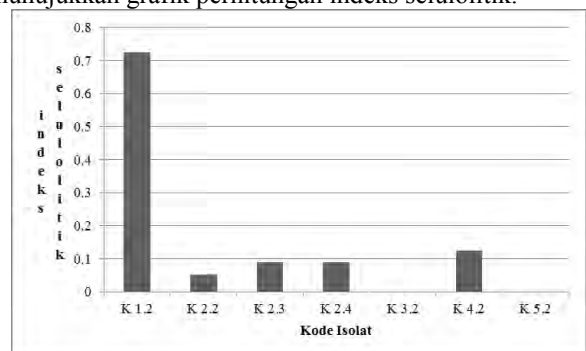
mengkultiv isolat khamir kedalam medium mengandung *Carboxy Methyl Cellulose* [13]. Senyawa CMC merupakan turunan selulosa yang mudah larut dalam air. Oleh karena itu, CMC lebih mudah dihidrolisis oleh selulase menjadi gula yang lebih sederhana [14]. Pengamatan aktivitas enzim selulase berdasarkan terbentuknya zona bening pada medium yang telah ditambahkan *congo red* 0,1% dengan tujuan untuk memperjelas terbentuknya zona bening. Zona bening yang tidak terwarnai oleh *congo red* menandakan bahwa selulosa telah terhidrolisis oleh enzim selulase sehingga tampak berwarna kekuningan atau berwarna bening, sedangkan bagian medium yang tidak terhidrolisis akan berikatan dengan *congo red* membentuk warna merah [13]. Gambar 1 menunjukkan hasil uji selulolitik isolat khamir



Gambar 1 Hasil Uji Selulolitik Isolat K 1.2

Keterangan: uji dilakukan dalam media yang mengandung CMC setelah inkubasi selama ±10 hari tampak adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni

Isolat khamir mampu membentuk zona bening pada selulosa karena sumber selulosa yang dipakai adalah CMC. CMC adalah selulosa murni yang dapat larut atau selulosa amorf yang lebih mudah terhidrolisis dibandingkan dengan struktur kristalin (tidak larut) yang diambil dari alam yang masih berikatan dengan lignin dan hemiselulosa. Pembentukan zona bening menunjukkan bahwa CMC didalam media telah dihidrolisis oleh enzim selulase menjadi senyawa sederhana yaitu selobiose yang kemudian disederhanakan lagi menjadi molekul glukosa [15]. Dari keseluruhan isolat yang telah diuji potensi selulolitik 5 isolat dengan kode K 1.2, K 2.2, K 2.3, K 2.4 dan K 4.2 membentuk zona bening dengan diameter yang berbeda-beda, setelah dilakukan perhitungan indeks selulolitik didapatkan isolat terbaik pada kode K 1.2. Gambar 2 menunjukkan grafik perhitungan indeks selulolitik.

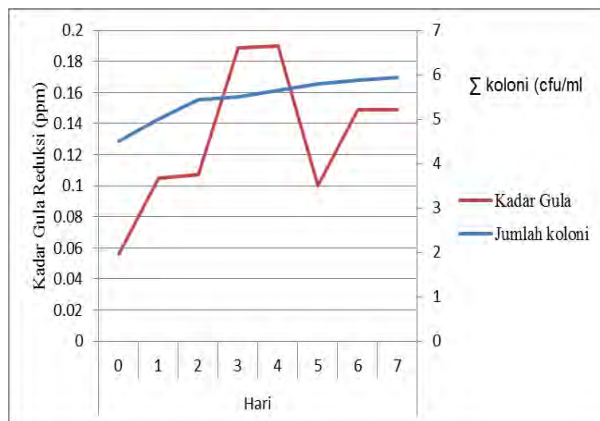


Gambar 2 Perhitungan Indeks Selulolitik

Isolat terbaik dari uji ini akan dilakukan uji lanjutan berupa uji potensi secara kuantitatif.

#### *Uji potensi mendegradasi selulosa secara kuantitatif dengan pengukuran kadar gula reduksi*

Gula reduksi adalah gula yang mempunyai kemampuan untuk mereduksi. Sifat mereduksi ini disebabkan adanya gugus hidroksi yang bebas dan reaktif [16]. Pengukuran kadar gula reduksi secara kuantitatif banyak dilakukan dengan menggunakan pereaksi DNS (dinitrosalisilat) [17]. DNS merupakan senyawa aromatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lain untuk membentuk 3-amino-5-nitrosalicylic acid, suatu senyawa yang mampu menyerap dengan kuat elektromagnetik pada 540 nm. Reaksi DNS yang terjadi merupakan reaksi redoks pada gugus aldehyd gula dan teroksidasi menjadi gugus karboksil [16]. Senyawa ini dapat dideteksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm [17]. Penentuan kadar gula reduksi didapatkan dengan pembuatan kurva standar lebih dahulu untuk memperoleh persamaan garis antara konsentrasi dan absorbansi. Dengan mensubstitusi nilai absorbansi sampel ke persamaan tersebut dan diplotkan ke kurva standar, akan diperoleh hasil kadar gula reduksi pada sampel. Hasil uji secara kuantitatif ini dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 3 Nilai Indeks Kadar Gula Reduksi Isolat K 1.2

Berdasarkan Gambar 3, diketahui bahwa fase yang mendominasi kurva pertumbuhan adalah fase *lag*, fase ini mulai terjadi setelah inokulum khamir dimasukkan kedalam medium uji kuantitatif. Selama fase ini jumlah individu tetap, relatif konstan dan meningkat perlahan-lahan. Peningkatan secara eksponensial akan terjadi pada fase ini ketika inokulum yang ditambahkan ke dalam media kultur berada pada kondisi yang sesuai, ketika kondisi media memungkinkan pertumbuhan yang seimbang, populasi mencapai kondisi optimal di mana semua variabel intensif tetap stabil. Hal ini sesuai pada grafik pada hari ke-0 hingga hari ke-4, dengan adanya kenaikan yang ditunjukkan oleh garis berwarna merah pada gambar, yaitu produksi gula reduksi meningkat seiring dengan peningkatan jumlah koloni yang ditunjukkan oleh garis berwarna biru. Secara alami, kelompok khamir mampu menggunakan sumber karbon seperti polyol, alkohol, asam organik dan asam amino yang dapat mendukung pertumbuhan mereka, akan tetapi khamir lebih dominan dalam metabolisme

gula [18]. Enzim selulase diproduksi oleh mikroba selulolitik dari golongan khamir. Enzim ini mampu memecah komponen CMC menjadi glukosa. CMC merupakan senyawa turunan selulosa. *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) merupakan kopolimer dua unit  $\beta$ -D glukosa dan  $\beta$ -D -glukopiranosida 2-O-(karboksilmetil)-garam monosodium yang terikat melalui ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik. CMC memiliki kelarutan lebih tinggi daripada selulosa, sehingga mudah dihidrolisis [19]. Enzim selulase bekerja dengan memutus ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida pada rantai selulosa hingga menghasilkan monomer glukosa. Di dalam hidrolisat CMC selain glukosa juga terdapat senyawa lain seperti selobiosa, selotriosa, selotetrosa dan lain lain [20]. Kondisi lingkungan yang memiliki dampak pada fisiologi metabolisme khamir adalah ketersediaan komposisi gula dari media dan oksigen. Setelah penyerapan glukosa, glukosa intraseluler dapat digunakan dalam proses metabolisme untuk menghasilkan ATP [21]. Berdasarkan Gambar 3 terlihat bahwa pada hari ke-5 terjadi penurunan, hal ini mungkin terjadi akibat gula telah dikonsumsi akan tetapi produksi gula menurun atau sudah tidak diproduksi kembali. Fase *lag* menurut kriteria kepadatan sel ditandai dengan berhenti atau sedikit peningkatan konsentrasi mikroorganisme yang berkembang. Pada hari ke-6 dan ke-7 terlihat pada gambar bahwa masih terdapat aktivitas yang terjadi, hal ini dapat terjadi karena sel khamir yang hidup tetap melakukan aktivitas enzimatik, terbukti pada garis berwarna merah yang mengalami peningkatan kembali. Saat kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi yang berbeda, pada kondisi seperti ini sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan-bahan kimia [22]. Beberapa mikroorganisme bahkan mampu bertahan dengan mengubah sel menjadi spora [22].

#### IV.KESIMPULAN/RINGKASAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah berdasarkan dari uji potensi selulolitik didapatkan nilai indeks selulolitik tertinggi dicapai oleh isolat K 1.2 dengan nilai sebesar 0,725. Kadar gula reduksi tertinggi dicapai oleh isolat dengan kode K 1.2 dengan nilai sebesar 0,190 ppm pada hari ketiga. Genus khamir yang berpotensi dalam mendegradasi selulosa diduga berasal dari genus *Rhodotorula*. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait identifikasi khamir dengan melihat karakteristik genotipiknya serta perlu dilakukan penelitian terkait optimasi faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi kecepatan degradasi oleh khamir yang berasal dari kawasan mangrove pantai Kenjeran, Surabaya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis M.E. mengucapkan terima kasih kepada Ibu Nur Hidayatul Alami, S.Si, M.Si. selaku dosen Pembimbing tugas akhir, Bapak Dr. techn. Endry Nugroho P., MT selaku ketua sidang dan dosen penguji I, Ibu Tutik Nurhidayati, S.Si, M.Si selaku dosen penguji II, keluarga dan teman-teman Biologi ITS 2010 serta pihak lainnya yang senantiasa memberikan semangat dan motivasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Lynd, L. R. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamental and Biotechnology. *Microbol. Mol. Biol. Rev* 66(3): 506-577
- [2] Linder, M. and T. Teeri. 1997. The Role and Function of Cellulose Binding Domains. *Journal of Biotechnology* 57: 15-28
- [3] Anindyawati, T. 2009. Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa untuk Produk Bioetanol. *BS Vol. 44*: 49-56
- [4] Salle, A. J. 1984. *Fundamental Principles of Bacteriology*. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd.
- [5] Fessenden, R. J. dan J. S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik, Jilid 2*. Diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka, Edisi Kedua. Jakarta: Erlangga
- [6] Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- [7] Kanti, A. 2005. Keragaman Khamir Tanah Asal Taman Nasional Kelimutu dan Taman Wisata Alam Ruteng Nusa Tenggara Timur. Bidang Zoologi, Pusat Penelitian – LIPI
- [8] De Araujo, F.V., C.A.G. Soares, A.N. Hagler dan L.C. Mendonca. 1995. Ascomycetous Yeast Communities of Marine Invertebrates in a Southeast Brazilian Mangrove Ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 91-99
- [9] Araujo, F. V. dan Hangler, A. N. 2011. *Kluyveromyces Aestuarii, A Potential Environmental Quality Indicator Yeast For Mangroves In The State Of Rio De Janeiro, Brazil*. *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 954-958
- [10] Badan Lingkungan Hidup. 2012. Laporan Pengendalian Pencemaran Kawasan Pesisir dan Laut Tahun 2012. Surabaya: Pemerintah Kota Surabaya
- [11] Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T. dan Marchand, C. 2008. Organic Carbon Dynamics in Mangrove Ecosystem: A review. *Aquatic Botany*: 201-219
- [12] Yang, B., Dai, Z., You Ding, S., and Wyman, C. E. 2011. Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. *Biofuels Vol 2(4)*: 421-450
- [13] Pointing, S. B. 1999. Qualitative Methods for the Determination of Lignocellulolytic Enzyme Production by Tropical Fungi. *Fungal Diversity* 2: 17-33
- [14] Widayani, A. 2006. Isolasi, Pengelompokan Warna, dan Optimalisasi Media Pertumbuhan Aktinomiset Selulolitik Asal Hutan Sulawesi Tengah. Skripsi. Bogor: Program Pendidikan S1 Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor
- [15] Perez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: an Overview. *Int. Microbiol* 5 : 53-63
- [16] Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga, Jakarta.
- [17] Maturindo, S. 2014. Hidrolisis Enzimatis Limbah Tongkol Jagung oleh *Penicillium sp.Hg* dengan Variasi pH dan Suhu. Surabaya: Universitas Airlangga
- [18] Rodrigues, F., P. Ludovico, dan C. Leao. 2005. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. *Health Science*
- [19] Masfufatun. 2009. Hidrolisis CMC dengan Enzim Selulase dari Bekicot, *Achatina fulica* untuk Produksi Etanol dengan *Zymomonas mobilis*. Tesis. Jurusan Teknik Kimia, ITS Surabaya
- [20] Sreenath, H.K. 2002. Hydrolysis of Carboxy Methyl Cellulose by Cellulose. Departement of Food Science, Purdue University, Indiana
- [21] Van Dijken, J. P., R. A. Weusthuis, dan J. T. Pronk. 1993. Kinetics of Growth and Sugar Consumption in Yeasts. *Kluwer Academic Publishers*.
- [22] Purwoko, T., 2007. *Fisiologi Mikrobia*. Bumi Aksara, Jakarta