

Actinomycetes Selulolitik dari Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi

Cellulolytic Actinomycetes isolated from soil in Bukit Duabelas National Park, Jambi

ATIT KANTI*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16122.

Diterima: 4 Juni 2004. Disetujui: 18 Januari 2005.

ABSTRACT

The objective of study was to investigate the enzymatic activities of cellulolytic Actinomycetes. The soil sample was collected from Bukit Duabelas National Park, Jambi. Actinomycetes was isolated by Casein Agar Medium, and its cellulolytic capacity was determined by measuring the activity of CMC-ase. Two isolates of cellulolytic Actinomycetes belonged to genus *Streptomyces* were isolated. The CMC-ase activity was 7.7 unit and 13.4 unit for isolate I and isolate II respectively. The *K_m* of isolate I and isolate II were 1.356×10^{-3} and 1.595×10^{-3} (% b/v) respectively. *V_m* of isolate I and II was 1.658×10^{-4} and 6.166×10^{-4} μ g glukosa/mL enzyme /minute, respectively.

© 2005 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Keywords: Actinomycetes, *Streptomyces*, Cellulolytic, Bukit Dua Belas National Park.

PENDAHULUAN

Actinomycetes merupakan mikroorganisme tanah yang umum dijumpai pada berbagai jenis tanah. Populasinya berada pada urutan kedua setelah bakteri, bahkan kadang-kadang hampir sama (Alexander, 1961; Elberson *et al.*, 2000). Actinomycetes hidup sebagai saprofit dan aktif mendekomposisi bahan organik, sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah (Nonomura dan Ohara, 1969a,b). Actinomycetes merupakan salah satu mikroorganisme yang mampu mendegradasi selulosa di samping bakteri, kapang, dan khamir (Abe *et al.*, 1979; Nakase *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1996).

Jenis Actinomycetes tergantung pada tipe tanah (Davies dan Williams, 1970), karakteristik fisik, kadar bahan organik, dan pH lingkungan (Xu *et al.*, 1996). Jumlah Actinomycetes meningkat dengan adanya bahan organik yang mengalami dekomposisi (Nonomura dan Ohara, 1971a,b,c,d). Pada umumnya Actinomycetes tidak toleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada keadaan lingkungan dengan pH di bawah 5,0 (Jiang dan Xu, 1985; Jiang *et al.*, 1988). Rentang pH yang paling cocok untuk perkembangbiakan Actinomycetes adalah antara 6,5-8,0. Tanah yang tergenang air tidak cocok untuk pertumbuhan Actinomycetes, sedangkan tanah gurun yang kering atau setengah kering dapat mempertahankan populasi dalam jumlah cukup besar, karena adanya spora (Nonomura dan Ohara, 1971a,b,c,d; Alexander, 1961). Temperatur yang cocok untuk pertumbuhan Actinomycetes adalah 25-30°C, tetapi pada suhu 55-65°C Actinomycetes masih dapat tumbuh dalam jumlah cukup besar, khususnya genus *Thermoactinomyces* dan *Streptomyces* (Rao, 1994).

Berdasarkan klasifikasinya, Actinomycetes termasuk kelas Schizomycetes, ordo Actinomycetales yang dikelompokkan menjadi empat familia, yaitu: Mycobacteriaceae, Actinomycetales, Streptomyces, dan Actinoplanaceae. Genus yang paling banyak dijumpai adalah *Streptomyces* (hampir 70%), *Nocardia*, dan *Micronospora*. Koloni Actinomycetes muncul perlahan, menunjukkan konsistensi berbutir dan melekat erat pada permukaan media. Pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan adanya miselium ramping bersel satu yang bercabang membentuk spora aseksual untuk perkembangbiakannya (Lechevalier dan Lechevalier, 1967; Nonomura dan Ohara, 1971a).

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari karakteristik aktivitas enzim CMC-ase dari Actinomycetes tanah asal Taman Nasional Bukit Dua Belas (TNBDB), Jambi.

BAHAN DAN METODE

Isolasi dan pengamatan Actinomycetes

Sebanyak 1 g sampel tanah dimasukkan secara aseptik ke dalam tabung berisi 5 mL media *soluble-casein* cair steril. Media *soluble-casein* terdiri dari: 1 g *soluble starch*, 0,03 g casein, 0,2 g KNO₃, 0,2 g K₂HPO₄, 0,005 g MgSO₄·7H₂O, 0,002 g CaCO₃, dan 0,001 g FeSO₄·7H₂O. Senyawa tersebut dilarutkan dalam 100 mL akuades sambil diaduk di atas *magnetic stirrer*. Setelah itu, diambil sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi untuk membuat media *soluble-casein* cair, sisanya di tambah dengan 2,4 g agar bacto untuk pembuatan media *soluble-casein* agar. Inokulan *dishaker* selama 3-5 hari. Inokulan diambil sebanyak 0,2 mL dan diinokulasikan ke dalam media *soluble-casein* agar dengan metode cawan sebar. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari atau lebih sampai koloni Actinomycetes tumbuh. Setelah tumbuh, koloni yang terpisah dan memiliki penampakan berbeda diambil sebanyak satu mata ose, diinokulasikan ke

* Alamat korespondensi:

Jl. Ir. H. Juanda 18, Bogor 16122.
Tel.: +62-251-324006. Faks.: +62-251-325854
e-mail: atitkanti@yahoo.com

dalam tabung reaksi berisi 5 mL media NA steril, kemudian di *shaker* selama 2 hari.

Pengujian kemampuan selulolitik

Media CMC yang digunakan untuk pengujian kemampuan selulolitik ada dua macam, yaitu: media padat dan cair. Media padat untuk mengisolasi Actinomycetes, sedangkan media cair digunakan untuk kultivasi dan analisis pertumbuhan sel, serta uji aktivitas enzim. Sebanyak 0,1 g (NH₄)₂SO₄, 0,1 g MgSO₄·7H₂O, 0,1 g MnSO₄, 0,1 g FeCl₃, 0,01 g glukosa, 0,1 g *yeast extract*, dan 1 g CMC ditimbang. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL akuades sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* (pH 6,8-7,5). Derajat pH diatur dengan penambahan larutan HCl atau NaOH. Untuk medium padat ditambah 2% agar serbuk.

Biakan Actinomycetes dipindahkan ke dalam media CMC padat menggunakan metode gores, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Setelah itu dilakukan pengujian ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk pada medium CMC. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas enzim dari Actinomycetes. Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan congo red 1 M sebagai larutan penguji dan NaCl 0,1 N sebagai larutan pencuci. Sebanyak 2 mL larutan congo red dituangkan ke dalam media yang berisi isolat, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Larutan dibuang kemudian dibilas dengan larutan NaCl 0,1 N, setelah itu diamati keberadaan zona bening.

Parameter karakteristik enzim selulolitik yang diamati

Parameter yang diamati untuk mengetahui karakteristik enzim CMC-ase ini meliputi pengukuran biomassa, pH, dan aktivitas enzim yang dinyatakan dalam unit, yaitu: jumlah mikromol gula pereduksi yang terbentuk/mL enzim/menit, penentuan *K_m* (konstanta Michaelis), dan *V_{maks}* (kecepatan maksimum reaksi enzim).

Pengukuran pH

Pengukuran pH dilakukan setiap kali pengambilan sampel yang berisi biomassa Actinomycetes, yaitu: setiap 24 jam sampai diperoleh pH optimum untuk pertumbuhan sel dan aktivitas enzim.

Pengukuran biomassa

Biomassa Actinomycetes yang telah diukur pH-nya, diukur biomasanya berdasarkan metode kerapatan optik (*optical density*) dengan spektrofotometer (Spectronic, Gynesis 20) pada panjang gelombang 600 nm. Hal ini dilakukan setiap pengambilan sampel biomassa Actinomycetes.

Pengukuran aktivitas enzim

Sebelum mengukur aktivitas enzim terlebih dahulu dibuat substrat CMC 1%, pereaksi DNS, dan kurva standar. Substrat CMC 1% dibuat dengan melarutkan 1 g CMC dalam 100 mL akuades. Pereaksi DNS (*dinitrosalicylic acid*) yang spesifik untuk gula pereduksi dibuat dengan melarutkan 1 g DNS di dalam 100 mL akuades, ditambah 12,5 mL NaOH 2N di atas pengaduk magnetik. Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0-500 ppm. Setelah itu, diambil 1 mL dari setiap konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup, ditambah 1 mL akuades dan 1 mL DNS, dipanaskan dalam air mendidih selama 7 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Penentuan aktivitas enzim CMC-ase diawali dengan memisahkan biomassa Actinomycetes dengan media kultivasi dengan sentrifus pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Setelah itu, larutan enzim yang mengandung CMC-ase hasil sentrifus diambil 1 mL ke dalam tabung reaksi bertutup, lalu di tambah 1 mL substrat CMC 1%. Untuk pengukuran gula reduksi awal (*G₀*), 1 mL supernatan langsung ditambah 1 mL substrat dan 1 mL pereaksi DNS, lalu dipanaskan. Sedangkan pada penentuan gula pereduksi akhir (*G_t*), sebelum ditambah pereaksi DNS larutan enzim ditambah 1 mL substrat lalu diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu ditambah 1 mL DNS, dipanaskan selama 7 menit pada air mendidih. Setiap larutan pada tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perlakuan untuk blanko sama dengan gula reduksi, namun sampel diganti dengan akuades. Satu unit aktivitas enzim adalah jumlah mikromol glukosa yang dihasilkan 1 mL enzim CMC-ase setiap menit (Dwiati dkk., 1999).

Penentuan *K_m* dan *V_{maks}*

Prosedur pengukuran *K_m* dan *V_{maks}* pada dasarnya sama dengan prosedur pengukuran aktivitas enzim. Perbedaannya, pada pengukuran *K_m* dan *V_{maks}* konsentrasi substrat CMC yang digunakan bervariasi, yaitu: 0,3%, 0,6%, 0,9%, dan 1,2% CMC; pH yang digunakan pada pengukuran adalah pH optimum dari kerja aktivitas enzim.

Pengujian dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 mL larutan enzim dari media uji lalu ditambahkan 1 mL substrat dari masing-masing konsentrasi substrat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1,5 jam setelah itu ditambahkan NaN₃ 1 mL dan pereaksi DNS 1 mL, dipanaskan pada air mendidih selama 7 menit. Glukosa yang dibebaskan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 540 nm. Dalam menentukan kinetika enzim digunakan persamaan Michelis-Menten (Abe *et al.*, 1979):

$$V_0 = \frac{d(\text{produk})}{dt}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{maks}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{maks}}}$$

K_m = konstanta michelis
S = konsentrasi substrat
V₀ = kecepatan reaksi awal
V_{maks} = kecepatan reaksi maksimum

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik isolat Actinomycetes selulolitik hasil isolasi

Dari 31 isolat Actinomycetes didapatkan dua isolat yang membentuk zona bening pada media CMC. Karakteristik morfologi dari kedua isolat tersebut berbeda. Koloni Actinomycetes yang diperoleh memiliki bentuk hampir bulat, tepiannya rata, dan permukaannya licin. Sedangkan warna koloni yang tampak berbeda adalah abu-abu kusam dan abu-abu terang. Perbedaan ukuran koloni kemungkinan disebabkan perbedaan usia koloninya. Menurut Lechevalier dan Lechevalier (1980) warna yang muncul pada koloni Actinomycetes ini terjadi akibat pigmentasi, sehingga timbul warna koloni yang berbeda sesuai jenis Actinomycetes yang diperoleh.

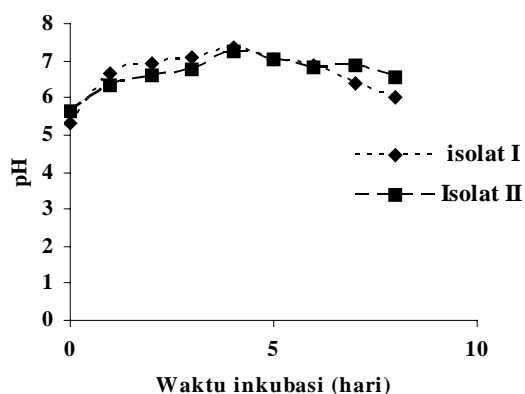
Pengamatan koloni Actinomycetes di bawah mikroskop dilakukan untuk mengetahui morfologi miselia dan kemurnian dari koloni yang diperoleh. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa koloni yang diperoleh dari isolasi tanah hutan TNBDB, Jambi ini memiliki bentuk miselium panjang bercabang seperti bentuk akar; miselium berkembang dari cabang miselia vegetatif membentuk serabut. Kedua biakan bersifat gram positif, katalase positif, miselium bercabang. Kedua biakan tersebut termasuk dalam genus *Streptomyces* (Shirling dan Gottlieb, 1966; Nonomura dan Ohara, 1960; Lechevalier dan Lechevalier, 1980; Hanka dan Schaadt, 1988; Hayakawa dan Ohara, 1987; Hayakawa *et al.*, 1988). Xu *et al.*, (1996) dan Jiang *et al.*, (1988) menyatakan bahwa *Streptomyces* merupakan genus dominan Actinomycetes di tanah hutan. Untuk menentukan jenis kedua biakan tersebut perlu dilakukan analisis komponen sel (Lechevalier dan Lechevalier, 1980) dan analisis DNA (Liesack *et al.*, 1991; Pace *et al.*, 1986). Pengamatan terhadap pembentukan zona bening pada daerah di sekitar koloni menunjukkan adanya zona bening, yang berarti bahwa isolat yang diperoleh aktif mendegradasi selulosa (CMC).

Konfirmasi isolat *Streptomyces*

Kultivasi isolat dilakukan pada saat koloni yang diperoleh akan dipindahkan dari satu media ke media lain, dalam hal ini dari media SCA ke media CMC atau pada saat akan dilakukan uji aktivitas. Berdasarkan pengamatan pada saat propagasi, isolat yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi media CMC cair steril diketahui menyebabkan perubahan warna media CMC cair dari merah kekuningan menjadi kuning pucat (koloni I) dan kehitaman (koloni II). Hal ini menunjukkan bahwa koloni yang diperoleh dari hasil isolasi adalah Actinomycetes, genus *Streptomyces*, karena genus ini mampu berubah warna sesuai dengan komposisi media yang digunakan (Hayakawa dan Ohara, 1987; Zhang *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1984; Jiang *et al.*, 1991).

Profil pH

Pengukuran pH media untuk kultivasi dilakukan untuk mengetahui besarnya pH yang dapat menghasilkan aktivitas enzim tertinggi (maksimum) dan optimum untuk pembentukan biomassa. Nilai pH tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan aktivitas enzim, K_m dan V_{maks} . Hasil pengukuran pH selama waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 1.

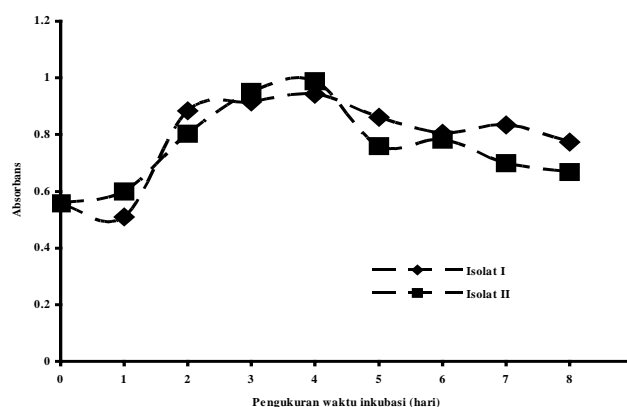


Gambar 1. Perubahan pH media CMC cair selama inkubasi isolat Actinomycetes.

Derajat pH meningkat pada awal inkubasi, dan menurun pada akhir waktu kultivasi. Nilai pH maksimum dari kedua kultur berbeda, yaitu: 7,3 untuk kultur I dan 7,2 untuk kultur II. Hal ini berarti bahwa enzim selulase yang diperoleh dari koloni Actinomycetes dapat bekerja maksimum pada pH di atas (Joson dan Coronel, 1986; Coughlan dan Mayer, 1992).

Pola pertumbuhan isolat Actinomycetes

Pengukuran biomassa dilakukan dengan metode kerapatan optik (*optical density*). Pengukuran biomassa bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan dari isolat Actinomycetes yang diperoleh. Banyaknya biomassa Actinomycetes di dalam larutan sebanding dengan besarnya absorbansi yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Semakin besar absorbansi larutan yang diperoleh, maka jumlah biomassa Actinomycetes di dalam larutan semakin banyak. Hasil pengukuran biomassa disajikan pada Gambar 2. Pada awal pengukuran, terbentuk daerah kurva yang konstan antara absorbansi dengan pertambahan waktu inkubasi. Daerah ini dikenal sebagai daerah penyesuaian; Actinomycetes beradaptasi terhadap media.



Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat Actinomycetes.

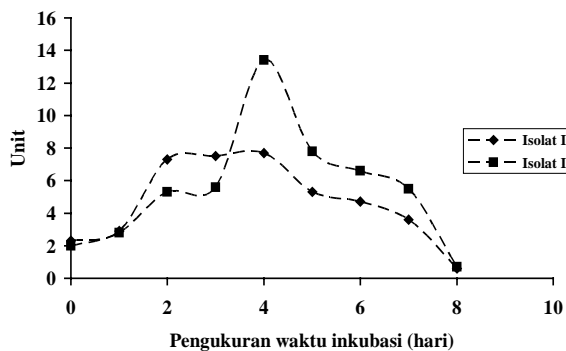
Setelah fase penyesuaian, bertambahnya waktu inkubasi menyebabkan peningkatan absorbansi yang cukup besar menyerupai kurva logaritmik. Pada fase ini jumlah biomassa Actinomycetes di dalam larutan media meningkat pesat hingga mencapai maksimum. Hal ini disebabkan nutrisi Actinomycetes yang ada pada media CMC cair masih cukup melimpah. Selanjutnya sintesis sel menjadi cepat, karena rangkaian aktivitas metabolisme sel yang dimulai dari absorpsi produk hidrolisis CMC oleh CMC-ase yang dihasilkan oleh Actinomycetes, dan konversi produk hidrolisis menjadi material sel melalui proses metabolisme yang kompleks (Dees *et al.*, 1995). Setelah biomassa maksimum tercapai, bertambahnya waktu inkubasi menyebabkan absorbansi menurun yang mungkin disebabkan banyaknya kematian biomassa dalam media CMC cair. Hal ini disebabkan nutrisi yang terdapat di dalam media CMC sudah tidak sebanding dengan jumlah biomassa, sehingga semakin lama biomassa semakin berkurang.

Aktivitas enzim selulase

Gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis enzim terhadap substrat persatuan waktu inkubasi dapat

digunakan sebagai ukuran aktivitas enzim. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan selama 9 hari hingga tercapai aktivitas maksimum. Besarnya aktivitas enzim selulase yang diperoleh dari hasil pengukuran disajikan pada Gambar 3.

Pada awal pengukuran, jumlah gula pereduksi yang terhidrolisis relatif sedikit. Hal ini disebabkan jumlah selulase yang terdapat pada larutan enzim yang diuji masih sedikit, sehingga jumlah substrat yang dapat dihidrolisis persatuan waktu inkubasi juga rendah (Blackall *et al.*, 1985; Belaich *et al.*, 1997). Bertambahnya waktu pengukuran inkubasi menyebabkan aktivitas enzim selulase meningkat sampai tercapainya waktu inkubasi optimum. Pada saat inkubasi optimum, kecepatan reaksi enzimatik maksimum (Gal *et al.*, 1997). Setelah itu, aktivitas enzim kembali menurun seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi. Dari hasil pengukuran didapat aktivitas enzim selulase mencapai maksimum pada saat pengukuran inkubasi menginjak hari keempat, dengan aktivitas maksimum untuk isolat 1 dan 2 masing-masing sebesar 7.7×10^{-3} (μg glukosa/mL/menit) dan 13.4×10^{-3} (μg glukosa/mL/menit). Berdasarkan data pada Gambar 2 dan 3 diketahui pH optimum pertumbuhan sel dan waktu optimum untuk mendapatkan aktivitas maksimum, selanjutnya data tersebut digunakan untuk penentuan K_m dan V_{maks} .



Gambar 3. Profil aktivitas enzim selama kultivasi.

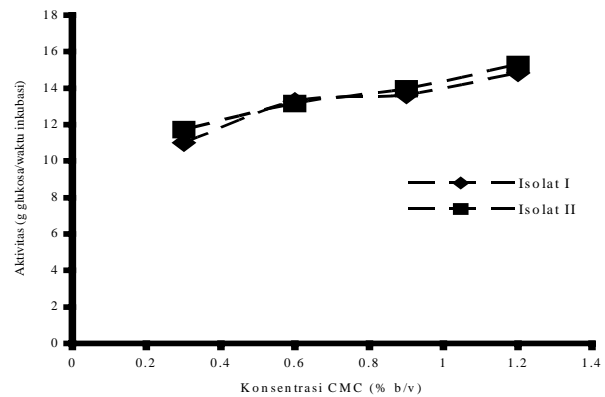
K_m dan V_{maks}

K_m (konstanta Michaelis) dan V_{maks} (kecepatan maksimum reaksi) merupakan dua parameter kinetika enzim. Nilai K_m tidak tergantung pada besarnya konsentrasi enzim, sedangkan V_{maks} besarnya dipengaruhi oleh besarnya konsentrasi enzim. K_m dapat diartikan sebagai ukuran afinitas enzim terhadap substrat. Semakin kecil nilai K_m , aktivitas enzim semakin tinggi dan afinitasnya semakin besar. V_{maks} dapat diartikan sebagai kecepatan reaksi pada saat enzim telah jenuh oleh substrat (Kim, 1995; Schinner *et al.*, 1996).

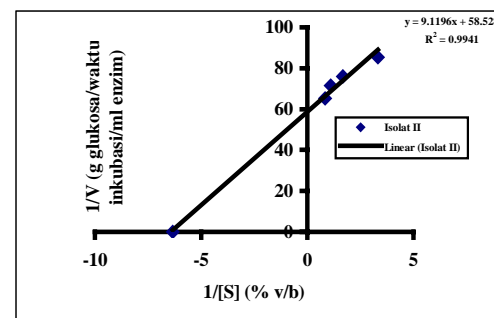
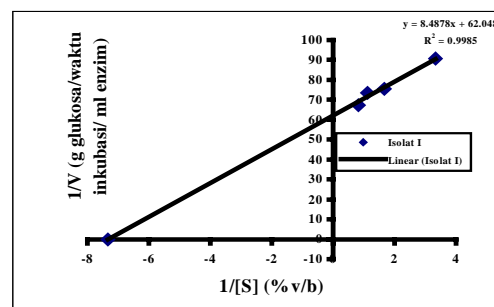
Pengaruh perubahan konsentrasi substrat CMC terhadap kecepatan reaksi enzimatik dapat dilihat pada kurva Michaelis-Menten pada Gambar 4. Menurut Enari (1983), pada konsentasi substrat yang rendah sampai tercapai nilai K_m , kecepatan reaksi meningkat secara tajam. Hal ini disebabkan substrat telah berikatan dengan enzim membentuk kompleks enzim-substrat (ES), tetapi masih belum jenuh dengan substrat. Sedangkan setelah nilai K_m tercapai dan sebelum tercapainya nilai batas kecepatan kerja enzim, peningkatan kecepatan reaksi enzim berjalan secara perlahan sampai tercapai kecepatan maksimum. Setelah titik ini peningkatan konsentrasi substrat relatif tidak dapat meningkatkan kecepatan reaksi. Hal ini disebabkan

sisi katalitik enzim telah jenuh terisi oleh substrat, sehingga tidak dapat berfungsi lebih cepat lagi.

Berdasarkan hasil pada Gambar 4, besarnya kecepatan reaksi enzimatik hampir sebanding dengan kenaikan konsentrasi substrat. Pada konsentrasi substrat yang rendah, kecepatan reaksi relatif rendah dan pada konsentrasi yang tinggi kecepatan reaksi enzimatik pun berjalan dengan cepat.



Gambar 4. Konsentrasi substrat dengan aktivitas enzim pada penentuan optimasi kerja enzim.



Gambar 5. Kurva Lineweaver-Burk pada penentuan K_m dan V_{maks} .

Penentuan harga K_m dan V_{maks} ditentukan berdasarkan persamaan Michaelis-Menten yang menyatakan bahwa: $1/v = K_m/V_{\text{maks}} (1/[S]) + 1/V_{\text{maks}}$. Karena K_m dan V_{maks} suatu konstanta, maka persamaan ini dapat dianalogikan dengan persamaan regresi: $y = a + bx$, dengan $y = 1/v, x = 1/[S], a = 1/V_{\text{maks}}$, dan $b = K_m/V_{\text{maks}}$, sehingga jika dimasukkan ke dalam grafik diperoleh persamaan garis lurus. Penentuan K_m dan V_{maks} dengan kurva garis lurus ini dikenal sebagai metode Lineweaver-Burk seperti terlihat pada Gambar 5. Berdasarkan perhitungan menggunakan persamaan di atas diperoleh nilai K_m untuk isolat I dan II masing-masing sebesar

1.356x10⁻³ dan 1.595x10⁻³ (% b/v). Sedangkan nilai Vmaks dari isolat 1 dan 2 masing-masing sebesar 1,658x10⁻⁴ dan 6,166x10⁻⁴ µg glukosa/mL enzim/menit.

Data aktivitas enzim di atas menunjukkan bahwa kedua biakan mampu tumbuh dengan cepat dan aktif memproduksi enzim CMC-ase. Kemampuan biakan tersebut mendegradasi selulosa dapat membantu siklus karbon di dalam tanah hutan, sehingga populasi Actinomycetes sangat berperan dalam menjaga kelangsungan ekosistem hutan Taman Nasional Bukit Dua Belas, Jambi. Di samping itu, oleh karena kemampuan selulolitik biakan II cukup tinggi, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensinya sebagai agen pembentuk enzim selulase.

KESIMPULAN

Didapatkan dua isolat Actinomycetes dari genus *Streptomyces* yang berasal dari Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi. Aktivitas enzim CMC-ase dari kedua biakan tersebut sekitar 7,2-7,3 unit enzim. Isolat 2 mempunyai aktivitas CMC-ase lebih tinggi dibandingkan dengan isolat 1. Kedua biakan tersebut berperan dalam degradasi selulosa di Taman Nasional Bukit Duabelas. K_m untuk isolat I dan II masing-masing adalah 1.356x 10⁻³ dan 1.595x 10⁻³ (% b/v), sedangkan besarnya Vmaks dari isolat 1 dan 2 masing-masing sebesar 1.658 x10⁻⁴ dan 6.166x 10⁻⁴ µg glukosa/mL enzim/menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, S., S. Horii and K. Kameoka. 1979. Application of enzymatic analysis with glucoamylase, pronase and cellulase to various feeds for cattle. *Journal of Animal Science* 48: 1483-1490.
- Alexander, M. 1961. *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Bélaich, J.P., C. Tardif, A. Bélaich, and C. Gaudin. 1997. The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *Journal of Biotechnology* 57: 3-14.
- Blackall, L.L., A.C. Hayward, and L.I. Sly. 1985. Cellulolytic and extremophilic Gram-negative bacteria: revival of the genus *Cellvibrio*. *Journal of Applied Bacteriology* 59: 81-97.
- Coughlan, M.P. and F. Mayer. 1992. The cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. In: Balows, A., H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.H. Schleifer (eds.). *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*. 2nd eds. New York: Springer-Verlag.
- Davies, F.L. and S.T. Williams. 1970. Studies on the ecology of Actinomycetes in soil. I. The occurrence and distribution of Actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 2: 227-238.
- Dees, C., D. Ringelberg, T.C. Scott, and T.J. Phelps. 1995. Characterization of the cellulose degrading bacterium NCIMB 10462. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51: 263-274.
- Dwiati, M., P. Lestari, dan L. Prayoga. 1999. Uji aktivitas ekstrak selulase dari *Cassytha filiformis* yang berparasit pada tanaman *Duranta repens*. *Majalah Ilmiah Universitas Jendral Soedirman* 25 (2): 105.
- Elberson, M.A., F. Malekzadeh, M.T. Yazdi, N. Kameranpour, M.R. Noori-Dloii, M.H. Matte, M. Shahamat, R.R. Colwell, and K.R. Sowers. 2000. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soil. *International Journal on Systematic and Evolution Microbiology* 50: 993-996.
- Enari, T.M. 1983. Microbial cellulase. In: Fogarty, W.M. (ed.). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. New York: Academic Press.
- Gal, L., S. Pagés, C. Gaudin, A. Bélaich, C. Reverbel-leroy, C. Tardif, and J.P. Bélaich. 1997. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 903-909.
- Hanka, L.J., and R.D. Schaadt. 1988. Methods for isolation of streptovorticillia from soils. *Journal of Antibiotics* 41: 576-578.
- Hayakawa, M., and Y. Ohara. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology* 65: 501-509.
- Hayakawa, M., K. Ishizawa, and H. Nonomura. 1988. Distribution of rare actinomycetes in Japanese soil. *Journal of Fermentation Technology* 66: 67-373.
- Jiang, C.L., and L.H. Xu. 1985. Isolation methods for study of actinomycete population. *Microbiology* 12: 218-220.
- Jiang, C.L., L.H. Xu, and G.Y. Guo. 1988. The investigation on actinomycete population and resources in some areas in Yunnan. V. The actinomycetes in the frigid mountains. *Acta Microbiologica Sinica* 28: 198-205.
- Jiang, C.L., L.H. Xu, Y.R. Yang, G.Y. Guo, J. Ma, and Y. Liu. 1991. *Actinobispora*, a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal on Systematic Bacteriology* 41: 526-528.
- Joson, LM and Coronel, LM. 1986. Isolation, screening and characterisation of cellulose-utilizing bacteria. *The Philippines Journal of Science* 3: 223-226.
- Kim, C.H. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo-β-1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Applied Environmental Microbiology* 61: 959-965.
- Lechevalier, H.A., and M.P. Lechevalier. 1967. Biology of Actinomycetes. *Annual Review on Microbiology* 21: 71-100.
- Lechevalier, M.P., and H.A. Lechevalier. 1980. The chemotaxonomy of Actinomycete. In: Dietz, A. and W.D. Thayer (eds.). *Actinomycetes Taxonomy*. Special publication no. 6. Arlington, Va.: Society for Industrial Microbiology.
- Liesack, W., N. Ward, and E. Stackebrandt. 1991. Strategies for molecular microbial ecological studies. *Actinomycetes* 2: 63-76.
- Liu, Z.H., Y.M. Zhang, and X.C. Yan. 1984. A new genus of the order Actinomycetales. *Acta Microbiologica Sinica* 24: 295-298.
- Nakase, T., S. Matofumi, T. Masako, H. Makiko, H. Takushi, and F. Sakuzo. 1994. A taxonomic study on cellulolytic yeasts and yeast-like microorganisms isolated in Japan I. Ascomycetous yeasts genera *Candida* and *Williopsis*, and a yeast-like genus *Prototheca*. *Journal of Genetical Applied Microbiology* 40: 519-531.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1960. Distribution of soil actinomycetes. V. The isolation and classification of genus *Streptosporangium*. *Journal of Fermentation Technology* 38: 405-409.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1969a. Distribution of soil actinomycetes. VI. culture method effective for both preferential isolation and enumeration of Microbispora and Streptosporangium strains in soil. *Journal of Fermentation Technology* 47: 463-469.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1969b. Distribution of soil actinomycetes. VII. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of Microbispora and Streptosporangium strains in soil (part II). *Journal of Fermentation Technology* 47: 701-709.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1971a. Distribution of soil actinomycetes. VIII. Green spore group of Microtetraspora, its preferential isolation and taxonomic characteristics. 49: 1-7.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1971b. Distribution of soil actinomycetes. IX. New species of the genera Microbispora and Microtetraspora, and their isolation method. *Journal of Fermentation Technology* 49: 887-894.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1971c. Distribution of soil actinomycetes. X. New genus and species of monosporic actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology* J. Ferment. Technol.49: 895-903.
- Nonomura, H., and Y. Ohara. 1971d. Distribution of soil actinomycetes. XI. Some new species of the genus *Actinomadura* Lechevalier *Journal of Fermentation Technology* 49: 904-912.
- Pace, N.R., D.A. Stahl, D.J. Lane, and G.J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advanced Microbiology and Ecology* 9: 155.
- Rao, N.S.S. 1994. *Soil Microorganisms and Plant Growth*, London: Oxford and IBM Publishing Co.
- Schinner, F., R. Oninger, E. Kandeler, and R. Margesin. 1996. *Methods in Soil Biology*. Berlin: Springer-Verlag.
- Shirling, E.B., and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal on Systematic Bacteriology*
- Xu, L.H., Q.R. Li, and C.L. Jiang. 1996. Diversity of soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Applied Environmental Microbiology* 62 (1): 244-248.
- Zhang, G. W., G. X. Xing, and X. C. Yan. 1984. Studies on the classification of Streptomycetaceae. III. A new genus of Streptomycetaceae. *Acta Microbiologica Sinica* 24: 189-194.