



DOI: <https://doi.org/10.38035/jgit.v2i3>
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Pengaruh Konsentrasi Substrat Bekatul dan Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Selulase *Bacillus sp*

Khairul Amri¹, Fitri Adifa²

¹Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia, khairulamri1091@gmail.com

²Universitas Jambi, Jambi, Indonesia, fitriadifa19@gmail.com

Corresponding Author: fitriadifa19@gmail.com²

Abstract: Rice bran is a by-product of rice milling which is frequently considered as waste. Even though it contains a variety of useful components, including cellulose. Hydrolysis of cellulose by cellulase enzymes will produce glucose compounds. Cellulase enzymes can be obtained from various sources, one of which is *Bacillus sp.* bacteria. The purpose of this research was to determine the effect of the rice bran substrate concentration and incubation temperature on the activity of cellulase enzymes of *Bacillus sp.* Cellulase enzyme activity assay on rice bran substrate was conducted at concentration of 0.5%; 1.0%; 1.5% and incubation temperature of 30°C, 40°C, 50°C using the DNS method (3,5-Dinitrosalicylic acid). The data obtained were analyzed using Two Way ANOVA and post hoc test with Least Significant Difference at $P < 0,05$. The results indicated that no significant effect was given by the interaction between concentration of rice bran substrate and incubation temperature on the activity of the enzyme cellulase of *Bacillus sp.* However, there is an effect given by each treatment variation of substrate concentration and incubation temperature on enzyme activity. The highest activity of the cellulase enzyme on rice bran substrate was 0.0185 U/ml, obtained at a substrate concentration of 1.5% and an incubation temperature of 50°C.

Keywords: Rice Bran, Cellulose, Cellulase Enzyme, *Bacillus sp.*, DNS

Abstrak: Bekatul merupakan hasil samping penggilingan padi yang seringkali hanya dianggap limbah. Padahal di dalamnya terdapat kandungan yang dapat dimanfaatkan seperti selulosa. Hidrolisis selulosa oleh enzim selulase akan menghasilkan senyawa glukosa. Enzim selulase dapat diperoleh dari berbagai sumber, salah satunya bakteri *Bacillus sp.* Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh konsentrasi substrat bekatul dan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase *Bacillus sp.* Uji aktivitas enzim selulase pada substrat bekatul dilakukan dengan konsentrasi 0,5%; 1,0%; 1,5% dan suhu inkubasi 30°C, 40°C, 50°C menggunakan metode DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid). Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan Two Way ANOVA dan uji lanjut Beda Nyata Terkecil pada $P < 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh signifikan yang diberikan oleh interaksi antara konsentrasi substrat bekatul dengan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase dari *Bacillus sp.* Namun, terdapat pengaruh yang diberikan oleh masing-masing variasi perlakuan konsentrasi substrat dan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim. Aktivitas enzim

selulase tertinggi terhadap substrat bekatul diperoleh pada variasi perlakuan konsentrasi substrat 1,5% dan suhu inkubasi 50°C yaitu 0,0185 U/mL.

Kata Kunci: Bekatul, Selulosa, Enzim Selulase, *Bacillus sp.*, DNS

PENDAHULUAN

Pemanfaatan bekatul sampai saat ini masih sangat terbatas dan seringkali hanya dianggap sebagai limbah yang digunakan sebagai pakan ternak saja (Kurniawati, 2010). Padahal, telah banyak penelitian yang melaporkan tentang kandungan dan pemanfaatan bekatul. Salah satu kandungan bekatul yang dapat dimanfaatkan adalah selulosa. Bekatul mengandung selulosa sebanyak 33,6% (Ghodrat, et al., 2015). Selulosa merupakan karbohidrat kompleks yang tersusun atas sepuluh hingga ribuan unit rantai monosakarida (glukosa) (Lavanya, 2011). Hidrolisis selulosa menghasilkan gula pereduksi berupa glukosa dan jika diolah lebih lanjut dapat menghasilkan produk-produk yang bermanfaat seperti biopolimer, biosolven, biosurfaktan, asam organik, dan bioproduk (Sutini et al., 2019).

Selulosa pada bekatul merupakan substrat kasar atau mentah (*raw*), penggunaan selulosa mentah telah dilakukan dalam beberapa penelitian sebelumnya. Enzim selulase dari bakteri selulolitik yang ditumbuhkan dalam CMC relatif mampu untuk mendegradasi substrat kulit pisang, Jerami padi dan tongkol jagung dengan aktivitas secara berurut yaitu 0,262 nkat/mL (0,0157 U/mL); $\pm 0,18$ nkat/mL (0,0107 U/mL) dan $\pm 0,14$ nkat/mL (0,0084 U/mL) (Meryandini, et al, 2009). Enzim selulase isolat bakteri perut larva *Cossus cossus* dapat mendegradasi jerami padi dengan aktivitas enzim selulase sebesar 0,03576 U/mL (Baharuddin, 2014).

Bakteri *Bacillus sp.* merupakan salah satu bakteri selulolitik yang dapat memproduksi enzim selulase secara ekstraseluler (Salahudeen, 2018). *Bacillus sp.* mampu memproduksi enzim selulase endo- β -1,4-glukanase. Begitu pula dengan beberapa bakteri lain dalam genus *Bacillus*, seperti *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus pumilus* menghasilkan endo- β -1,4-glukanase dan *Bacillus cereus* memproduksi kompleks enzim selulase endo- β -1,4-glukanase, ekso- β -1,4-glukanase, dan β -glukosidase (Chantarasiri, 2015).

Enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme mempunyai karakteristik yang berbeda-beda, hal ini dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti, suhu, pH lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat tertentu dan waktu inkubasi. Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis mikroorganisme (Saropah, et al, 2012). Berdasarkan penjelasan di atas diketahui bahwa aktivitas enzim selulase yang diproduksi oleh *Bacillus sp.* dapat dipengaruhi oleh suhu dan konsentrasi substrat. Sehingga pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas enzim selulase dengan variasi konsentrasi substrat bekatul dan suhu inkubasi.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratorium di mana sampel yang digunakan adalah ekstrak kasar enzim selulase yang diproduksi pada media CMC *broth* 1% dan substrat berupa serbuk bekatul. Analisis dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi substrat dan suhu inkubasi terhadap kemampuan ekstrak kasar enzim selulase yang dihasilkan oleh *Bacillus sp.* hasil isolasi dari bekatul dalam mendegradasi substrat selulosa dalam bekatul.

Metode dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial di mana terdapat dua faktor kondisi yang digunakan, yaitu konsentrasi substrat bekatul dan suhu inkubasi dengan pengulangan sebanyak tiga kali sebagai penetapan. Tabel 1 menunjukkan hubungan antara faktor kondisi konsentrasi substrat dan suhu inkubasi serta ulangan yang dilakukan.

Tabel 1 Hubungan Faktor Konsentrasi Substrat dan Suhu Inkubasi

Faktor A (i)	Faktor B (j)	Ulangan (k)			Total (yij.)
		1	2	3	
1	1	y111	y112	y113	y11.
	2	y121	y122	y123	y12.
	3	y131	y132	y133	y13.
2	1	y211	y212	y213	y21.
	2	y221	y222	y223	y22.
	3	y231	y232	y233	y23.
3	1	y311	y312	y313	y31.
	2	y321	y322	y323	y32.
	3	y331	y332	y333	y33.

Keterangan: Variasi Konsentrasi Substrat (Faktor A)

A1 = Konsentrasi substrat 0,5%

A2 = Konsentrasi substrat 1,0%

A3 = Konsentrasi substrat 1,5%

Variasi Suhu Inkubasi (Faktor B)

B1 = Suhu C 30°C

B2 = Suhu C 40°C

B3 = Suhu C 50°C

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, yaitu preparasi dan pembuatan media, peremajaan isolat, pembuatan kultur starter *Bacillus sp.*, uji kualitatif aktivitas selulolitik oleh *Bacillus sp.*, produksi enzim selulase, pembuatan kurva standar glukosa, pengukuran aktivitas enzim selulase dengan metode DNS, dan analisa data.

Pretreatment Substrat Bekatul

Substrat bekatul dibersihkan dan direndam dalam NaOH 2N dengan rasio 1:10 (w/v) selama 8 jam. Selanjutnya bekatul disaring dan dicuci dengan akuades hingga pH menjadi netral (pH 7) (Gunam, et al., 2019). Bekatul hasil delignifikasi dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 18 jam. Tahap selanjutnya bekatul digiling hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan 60 mesh (Lazuardi, et al., 2018).

Uji Kualitatif Aktivitas Selulolitik *Bacillus sp.*

Uji kualitatif dilakukan dengan pengamatan zona bening pada media selektif selulolitik sebagai tempat pertumbuhan bakteri, media yang digunakan berupa media CMC 1% agar dalam cawan petri. Isolat Bakteri *Bacillus sp.* ditotolkan dan kemudian diinkubasi dalam media CMC 1% agar pada suhu ruang selama 24 jam. Media yang ditumbuhi oleh isolat kemudian ditambahkan 5 mL congo red 0,1% secara merata di seluruh permukaan media dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan NaCl 1M dan pengamatan zona bening yang terbentuk (Rahayu, et al., 2014). Nilai Indeks Selulolitik dihitung melalui pembagian diameter zona bening dengan diameter koloni atau dengan rumus berikut (Nababan, et al., 2019):

$$\text{Indeks Selulolitik} = \frac{\text{Diameter Zona Bening} - \text{Diameter Koloni}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Produksi Enzim Selulase

Sebanyak 5 mL starter *Bacillus sp.* dengan nilai OD 0,5 kultur diinokulasikan dalam media CMC cair 1% 100 mL (Lazuardi, et al., 2018). Kemudian diinkubasi di rotary shaker pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm selama 24jam. Selanjutnya kultur didinginkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit (Rahayu, et al., 2014). Supernatan

yang diperoleh kemudian digunakan sebagai ekstrak kasar enzim selulase analisis aktivitas selulase.

Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase *Bacillus sp.*

Sebanyak 0,025 g; 0,05 g dan 0,075 g substrat bekatul masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi berbeda dan ditambahkan 5 mL buffer fosfat 0,2 M (pH 7) serta 5 mL ekstrak kasar enzim. Sedangkan sebanyak 0,025 g; 0,05 g dan 0,075 g substrat bekatul dimasukkan ke dalam tabung reaksi berbeda lainnya sebagai kontrol kemudian ditambahkan 5 mL buffer fosfat dan 5 mL CMC cair tanpa penambahan ekstrak kasar enzim. Reaksi dilakukan dengan variasi suhu 30°C, 40°C, dan 50°C selama 60 menit. Setelah itu reaksi dihentikan dengan inkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit. Kemudian suspensi tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya supernatant yang diperoleh diambil sebanyak 2 mL, ditambahkan 3 mL DNS lalu diinkubasi pada suhu 100°C selama 15 menit dan ditambahkan 1 mL K-Na tartrat. Seluruh sampel diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang 540 nm (McCleary dan McGeough, 2015). Aktivitas enzim selulase dapat diketahui berdasarkan persamaan berikut (Utami, et al., 2019):

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{\text{Konsentrasi Glukosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times (\text{Volume total enzim-Substrat})}{\text{Berat Molekul glukosa} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \times \text{waktu inkubasi (menit)} \times \text{Volume enzim (mL)}}$$

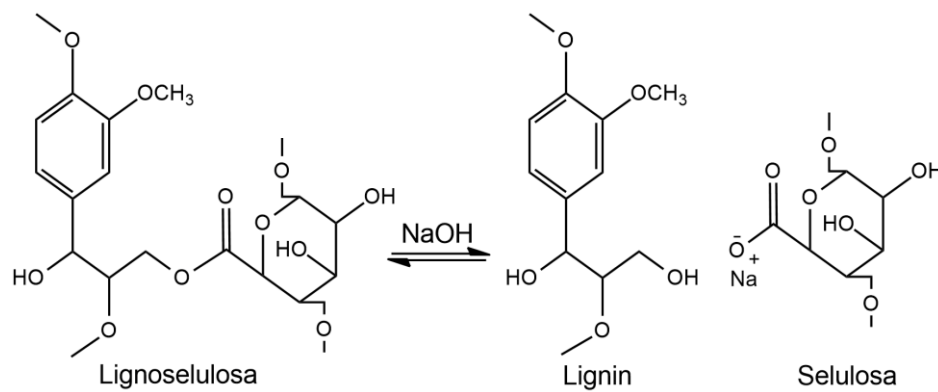
Analisis Data

Penelitian menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor, yaitu faktor konsentrasi substrat dan suhu inkubasi. Data tersebut dianalisis menggunakan uji faktorial dengan tingkat kepercayaan 5% dan apabila hasil analisis varians (*Two Way ANOVA*) menunjukkan perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pretreatment Substrat Bekatul

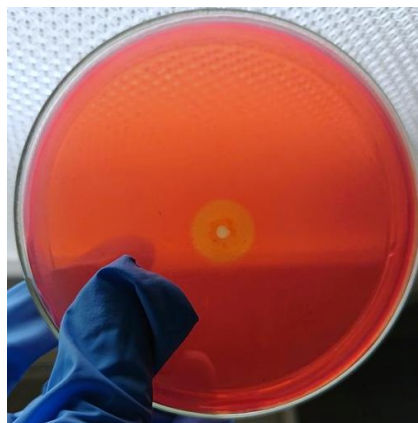
Substrat bekatul merupakan bahan mentah (*raw material*) sehingga selulosa yang terkandung di dalamnya masih berbentuk matriks yang berikatan dengan lignin dan hemiselulosa. Matriks ini dapat menghalangi reaksi antara enzim selulase dan selulosa sehingga perlu dihilangkan. Delignifikasi dilakukan untuk memutus matriks dimana perendaman bekatul dalam NaOH encer dapat memutus ikatan ester antara lignin dengan hemiselulosa dan selulosa serta melemahkan atau memutus ikatan hidrogen pada selulosa dan mendepolimerisasi fiber selulosa. Selain itu penggunaan NaOH encer juga mempermudah proses pencucian untuk menetralkan pH substrat bekatul, sedangkan penggunaan konsentrasi NaOH yang terlalu tinggi dapat menyebabkan hilangnya selulosa pada substrat (Kodali & Pogaku, 2006). Substrat selulosa bersifat tidak larut dalam air sehingga luas permukaan menjadi suatu hal yang penting dalam proses hidrolisis. Oleh karena itu dilakukan *pretreatment* dengan penggilingan substrat. *Mechanical pretreatment* dilakukan dengan penggilingan dan pengayakan bekatul untuk meningkatkan luas permukaan pada substrat bekatul (Abo, et al., 2019).



Gambar 1 Reaksi Delignifikasi Lignoselulosa

Uji Kualitatif Aktivitas Selulolitik *Bacillus* sp.

Uji kualitatif merupakan tahapan awal untuk mengetahui kemampuan bakteri selulolitik dalam menghasilkan enzim selulase. Aktivitas selulolitik bakteri dapat diketahui dengan pengamatan zona bening yang terbentuk di sekitar koloni (Rahayu, et al., 2014). Zona bening tersebut menunjukkan hasil aktivitas hidrolisis selulosa oleh enzim yang dieksresikan bakteri menjadi produk yang lebih sederhana seperti monosakarida (Murtiyaningsih & Hazmi, 2017).


 Gambar 2 Zona Bening Hasil Aktivitas Selulolitik *Bacillus* sp.

 Tabel 2 Indeks Selulolitik *Bacillus* sp.

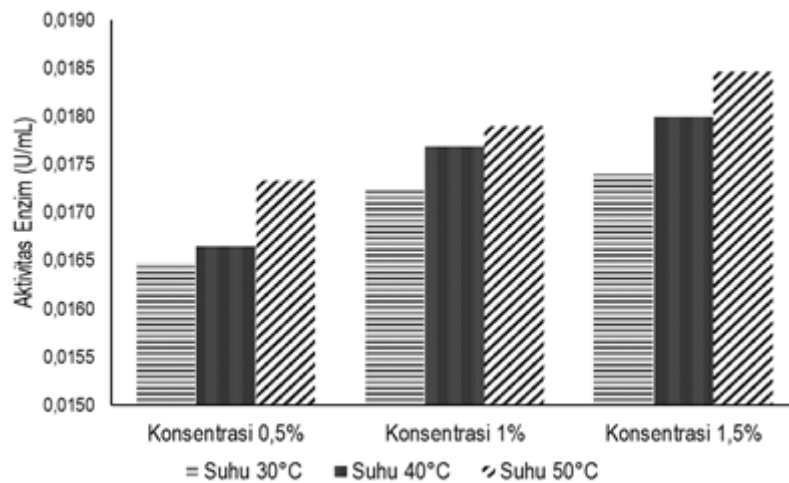
Ulangan	Diameter Koloni (mm)	Diameter Zona Bening (mm)	Indeks Selulolitik	Rata-rata Indeks Selulolitik
1	7,2	15,6	1,1667	1,2029
2	6,15	13,6	1,2114	
3	6,5	14,5	1,2308	

Ukuran zona bening yang terbentuk bergantung pada kemampuan enzim selulase dalam menghidrolisis substrat. Berdasarkan uji kualitatif ini diketahui bahwa isolat *Bacillus* sp. memiliki kemampuan menghasilkan enzim selulase karena dapat membentuk zona bening. Berdasarkan hasil pengukuran zona bening pada Tabel 2. diperoleh indeks selulolitik (IS) oleh *Bacillus* sp. yaitu sebesar 1,2029. Mikroba yang dapat menghasilkan nilai indeks selulolitik dalam rentang 1,1 hingga 1,9 termasuk dalam kategori sedang (Choi, et al., 2005). Beberapa isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari bekatul memberikan aktivitas selulase (IS) dalam rentang 0,04 hingga 2,00 (Fitria, 2021).

Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase *Bacillus* sp.

Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh bakteri kerja katalitiknya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti Konsentrasi substrat, pH, lama inkubasi dan suhu (Saropah, et al.,

2012). Pada penelitian ini reaksi antara ekstrak kasar enzim dan substrat bekatul dilakukan dengan variasi konsentrasi substrat dan suhu inkubasi.



Gambar 3 Aktivitas Enzim Selulase *Bacillus sp.* Pada Substrat Bekatul

Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa interaksi antara konsentrasi substrat dan suhu inkubasi tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim selulase. Hal ini disebabkan oleh masih adanya senyawa selain selulosa pada substrat bekatul yang merupakan bahan mentah sehingga dapat menghalangi kerja enzim selulase dalam mendegradasi substrat. Namun, aktivitas enzim selulase terhadap substrat bekatul mengalami peningkatan seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat dan suhu inkubasi. Aktivitas enzim selulase tertinggi diperoleh pada variasi konsentrasi substrat 1,5% dan suhu inkubasi 50°C yaitu sebesar 0,0185 U/mL sedangkan aktivitas terendah pada variasi konsentrasi substrat 0,5% dan suhu inkubasi 30°C sebesar 0,0165 U/mL. Hasil yang diperoleh menunjukkan jika aktivitas enzim belum mencapai titik optimum baik pada variasi konsentrasi substrat maupun suhu inkubasi sehingga penggunaan rentang yang lebih tinggi pada kedua variabel masih dapat meningkatkan aktivitas enzim *Bacillus sp.*

Konsentrasi substrat merupakan salah satu faktor yang memengaruhi aktivitas enzim di mana kenaikan konsentrasi substrat akan meningkatkan aktivitas enzim hingga mencapai titik tertentu (Elawati, et al., 2018). Enzim selulase yang diperoleh dari *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* menunjukkan peningkatan aktivitas enzim seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat CMC pada rentang konsentrasi 0,5% hingga 2% dengan aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat 2% yaitu sebesar 5,9 U/mL untuk *Bacillus subtilis* dan 4,9 U/mL untuk *Bacillus cereus* (Jannah, et al., 2018). Setiap enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki rentang suhu tertentu untuk bekerja secara optimum. Umumnya kenaikan suhu eksternal dapat meningkatkan kecepatan reaksi atau aktivitas enzim (Saropah, et al., 2012). Kompleks enzim selulase dari *Bacillus sp.* yang diujikan dalam rentang suhu 30°C hingga 90°C memberikan aktivitas tertinggi pada suhu 70°C yaitu sebesar 0,67 U/mL (Dobrzyński, et al., 2022). Enzim selulase yang diperoleh dari *Bacillus subtilis* dan *Bacillus cereus* menunjukkan peningkatan aktivitas enzim seiring dengan kenaikan suhu inkubasi pada rentang suhu 20°C hingga 60°C dengan aktivitas tertinggi di suhu 60°C yaitu sebesar 3,8 U/mL untuk *Bacillus subtilis* dan 2,5 U/mL untuk *Bacillus cereus* (Jannah, et al., 2018).

Analisis Data

Hasil uji *Two Way ANOVA* pada interaksi konsentrasi substrat bekatul dan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase *Bacillus sp.* menunjukkan nilai $F_{hitung} < F_{tabel}$ ($0,799 < 2,93$) dengan probabilitas (sig.) sebesar 0,542 lebih tinggi dibanding nilai $\alpha = 0,05$ sehingga dapat dinyatakan tidak terdapat pengaruh signifikan yang diberikan terhadap aktivitas enzim selulase

Bacillus sp. Namun, hasil uji pada variabel konsentrasi substrat menunjukkan perbedaan nyata dengan nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ ($34,120 > 3,55$) dan probabilitas (sig.) sebesar 0,000 lebih kecil dibanding nilai $\alpha = 0,05$. Begitu pula dengan variabel suhu inkubasi dengan nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ ($18,683 > 3,55$) dan probabilitas (sig.) sebesar 0,000 lebih kecil dibanding nilai $\alpha = 0,05$. Berdasarkan hal ini dapat diketahui jika terdapat minimal satu pasang variabel konsentrasi substrat dan suhu inkubasi yang memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim selulase. Hasil uji lanjut BNT menunjukkan bahwa seluruh variasi baik pada faktor konsentrasi substrat bekatul maupun suhu inkubasi memiliki selisih aktivitas selulase yang berbeda secara signifikan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh signifikan yang diberikan oleh interaksi antara konsentrasi substrat bekatul dengan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim selulase dari *Bacillus* sp. Namun, terdapat pengaruh yang diberikan oleh masing-masing variasi perlakuan konsentrasi substrat dan suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim. Aktivitas enzim selulase tertinggi terhadap substrat bekatul diperoleh pada variasi perlakuan konsentrasi substrat 1,5% dan suhu inkubasi 50°C yaitu 0,0185 U/mL, sedangkan aktivitas terendah diperoleh pada perlakuan konsentrasi substrat 0,5% dan suhu inkubasi 30°C yaitu 0,0165 U/mL.

REFERENSI

- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., & Wang, Q. (2019). Lignocellulosic for : An Overview on Pretreatment, Hydrolysis And Fermentation Processes. *Reviews on Environmental Health*. 34(1): 57–68.
- Baharuddin, M. 2014. Aktivitas Enzim Selulase Kasar dari Isolat Bakteri Larva *Cossus cossus* dalam Hidrolisis Jerami Padi. *Jurnal Kimia Valensi*. 4(2): 128–133. <https://doi.org/10.15408/jkv.v0i0.3610>.
- Barman, D. N., Haque, M. A., Hossain, M. M., Paul, S. K., & Yun, H. D. (2020). Deconstruction of Pine Wood (*Pinus sylvestris*) Recalcitrant Structure Using Alkali Treatment for Enhancing Enzymatic Saccharification Evaluated by Congo Red. *Waste and Biomass Valorization*. 11(5): 1755–1764.
- Chantarasiri, A. (2015). Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 Isolated From The Muddy Sediments Of Mangrove Swamps In Thailand and Characterization of Its Cellulolytic Activity. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. doi: 10.1016/j.ejar.2015.08.003.
- Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., & Hyde, K. D. (2005). Enzyme Production by Endophytes of *Brucea javanica*. *Water*. 55–66.
- Dobrzyński, J., Wróbel, B., & Górka, E. B. (2022). Cellulolytic Properties of a Potentially Lignocellulose-Degrading *Bacillus* sp. 8E1A Strain Isolated from Bulk Soil. *Agronomy*. 12(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy12030665>
- Elawati, N. E., Pujiyanto, S., & Kusdiyantini, E. (2018). Karakteristik dan Sifat Kinetika Enzim Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*. 5(1): 1.
- Fitria, L. (2021). Isolasi Bakteri Selulolitik dari Bekatul dan Uji Aktivitas Enzim Selulase dengan Variasi Suhu Inkubasi. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ghodrat, A., Yaghobfar, A., Ebrahimnezhad, Y., Shahryar, H. A., & Ghorbani, A. (2015). In Vitro Binding Capacity of Organic (Wheat Bran and Rice Bran) and Inorganic (Perlite) Sources for Mn, Zn, Cu, and Fe. *Journal of Applied Animal Research*. 45(1): 80–84. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1124338>.

- Gunam, I. B. W., Antara, N. S., Anggreni, A. A. M. D., Setiyo, Y., Wiguna, I. P. E., Wijaya, I. M. M., & Putra, I. W. W. P. (2019). Chemical Pretreatment Of Lignocellulosic Wastes for Cellulase Production by *Aspergillus niger* FNU 6018. *AIP Conference Proceedings*. 2155.
- Jannah, A., Aulani`am, A., Ardyati, T., & Suharjono, S. (2018). Identification and Characterization of a Cellulase from Bacterial of Indigenous of Rice Bran. *Advances in Health Sciences Research*. 5: 256–260.
- Kodali, B., & Pogaku, R. 2006. Pretreatment Studies of Ricebran for The Effective Production of Cellulose. *Electr. J. Environ. Agric. Food Chem*. 5(2): 1253–1264.
- Kurniawati, L. (2010). Pemanfaatan Bekatul dan Ampas Wortel (*Daucus carota*) dalam Pembuatan Cookies. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 3(2): 122–126.
- Lavanya, D., P.K.Kulkarni, Dixit, M., Raavi, P. K., & Krishna, L. N. V. (2011). Sources of Cellulose and Their Applications: A Review. *International Journal of Drug Formulation and Research*. 2(6): 19–38.
- Lazuardi Budi, K., Wijanarka, & Kusdiyantini, E. (2018). Aktivitas Enzim Selulase yang dihasilkan oleh Bakteri *Serratia marcescens* pada Substrat Jerami. *Jurnal Biologi*. 7(1): 3–8.
- McCleary, B. V., & McGeough, P. (2015). A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 177(5): 1152–1163.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., & Satria, H. (2009). Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara Journal of Science*. 13(1): 33–38.
- Murtiyaningsih, H., & Hazmi, M. (2017). Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Selulase Pada Bakteri Selulolitik Asal Tanah Sampah. *Agritop*. 15(2): 293–308. <http://jurnal.unmuhjember.ac.id/index.php/AGRITROP>.
- Nababan, M., Gunam, I. B. W., & Mahaputra Wijaya, I. M. (2019). Produksi Enzim Selulase Kasar dari Bakteri Selulolitik. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*. 7(2): 190–199. <https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i02.p03>.
- Rahayu, A. G., Haryani, Y., & Puspita, F. (2014). Uji Aktivitas Selulolitik dari Tiga Isolat Bakteri *Bacillus sp.* Galur Lokal Riau. *JOM FMIPA*. 1(2): 319–327.
- Salahudeen, A., Oyewole, O., B, O. S., Abioye, O., Adamu, B., & Mohammed, S. S. (2018). Biodegradation of Cornhusk by *Bacillus cereus* Isolated from Soil. *Nigerian Journal of Scientific Research*. 7(2): 218–225.
- Saropah, D. A., Jannah, A., & Maunatin, A. (2012). Kinetika Reaksi Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul. *Alchemy*. 2(1): 34–45.
- Sutini, Widiastuty, Y. R., & Ramadhani, A. N. (2019). Review: Hidrolisis Lignoselulosa dari Agricultural Waste sebagai Optimasi Produksi Fermentable Sugar. *Equilibrium Journal of Chemical Engineering*. 3(2): 60–68.
- Utami, A. P., Setyaningsih, R., Pangastuti, A., & Lusi, S. S. A. (2019). Optimasi Produksi Enzim Selulase dari Jamur *Penicillium sp.* SLL06 yang Diisolasi dari Serasah Daun Salak (*Salacca edulis*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 5(2): 145–149. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m050201>.