

## ***Total colony of cellulolitic bacteria in the rumen of aceh cattle***

**Safika<sup>1</sup>, Siti Wardianah Matondang<sup>2</sup>, Darmawi<sup>3</sup>, Mahdi Abrar<sup>3</sup>, Erina<sup>3</sup>, M. Jalaluddin<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>3</sup>Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>4</sup>Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: fikakhan@yahoo.com

### **ABSTRACT**

*The aim of this study was to count the total sum of cellulolitic bacteria colony in aceh cattle rumen. The sample used was aceh cattle rumen liquid which taken from salughtered house in Banda Aceh. Aceh cattle rumen liquid were diluted from  $10^{-2}$  to  $10^{-5}$ , then inoculated to agar BHM-CMC media with pour plate method. Petri dish was entered to candle jar to be incubated in an incubator with temperature  $37^{\circ}\text{C}$  about 96 hours. Colony of cellulolitic bacteria which were grown then were observed by using colony bacteria criteria (colour, position, edge, and diameter of colony), counting total of bacteria which was grown, and Gram staining. The results showed that there is a white translucent colony morphology, growth inside agar, smooth periphery, Gram-positive bacil. The average number bacteria of total bacteria in the cattle rumen liquid was  $4,81 \times 10^5$  cfu/ml.*

*Keywords : cellulolitic bacteria, morphology, liquid, colony, aceh cattle*

### **PENDAHULUAN**

Sapi lokal Indonesia umumnya termasuk ke dalam rumpun bangsa Zebu dengan ciri-ciri punuk diatas pangkal leher, telinga lebar, kulit kendur, dan berembun pada moncongnya. Terdapat beberapa jenis sapi lokal, diantaranya sapi Jawa, sapi bali, sapi madura dan sapi aceh. Sapi ini memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap makanan yang berkualitas rendah, daya tahan yang sangat baik dalam melawan panas dan iklim tropis, sistem pemeliharaan yang ekstensif dan tahan terhadap penyakit parasit, namun agak peka terhadap hawa dingin. Sapi lokal yang mempunyai keunggulan ini perlu dipertahankan sebagai plasma nutfah Indonesia dan perlu dikembangkan sebagai kekayaan genetik yang dimiliki Indonesia (Basri, 2006).

Sapi aceh merupakan salah satu sapi asli Indonesia yang tersebar di Provinsi aceh dan dibudidayakan secara turun temurun sebagai penghasil daging. Keunggulan dari sapi aceh ini selain memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap terhadap lingkungan yang buruk, penyakit, parasit juga mempunyai keunggulan dalam adaptasi pakan yang berkualitas rendah dan banyak mengandung serat kasar yang tinggi

(Martoyo, 2003; Abdullah dkk., 2007; BPTU-HPT, 2014). Sehingga ternak inilah yang paling cocok untuk dipelihara dan dikembangkan, walaupun produksinya lebih rendah dari ternak impor (Noor, 2008).

Produktivitas ternak secara biologis ditentukan oleh kinerja sistem pencernaan dalam mencerna bahan pakan. Saluran pencernaan sapi banyak mengandung mikroorganismenya, yang berperan membantu proses pencernaan baik di rumen, retikulum maupun usus. Kelompok utama mikroorganismenya yang berperan dalam pencernaan terdiri dari bakteri, protozoa dan jamur yang jumlah dan komposisinya bervariasi tergantung pada pakan yang dikonsumsi, waktu pengambilan, spesies hewan, individu, musim dan ketersediaan hijauan pakan (Preston dan Leng, 1987; Marganingtyas, 2011).

Di dalam rumen sapi mengandung mikroorganismenya terutama jenis bakteri, yang mampu memecah lignoselulosa, lignohemiselulosa dan selulosa dari pakan seperti rumput, jerami padi menjadi bentuk yang lebih sederhana. Sapi tidak memiliki kemampuan mendegradasi selulosa, namun degradasi dilakukan oleh bakteri dan mikroba lainnya yang ada di saluran pencernaan. Bakteri

selulolitik memiliki kemampuan mendegradasi selulosa dengan menghasilkan enzim selulase (Aklyosov, 2004). Bakteri ini dapat mendegradasi molekul kompleks pada substrat tidak larut dalam air dengan menggunakan enzim selulase. Proses perombakan secara enzimatis bersifat spesifik untuk menghidrolisis ikatan  $\beta$ -(1,4)-glikosidik, rantai selulosa dan derivatnya (Ambriyanto, 2010).

Bakteri selulolitik merupakan salah satu mikroba yang paling banyak ditemukan di rumen sapi terutama sapi-sapi yang pakannya mengandung serat kasar tinggi seperti sapi aceh, namun belum ada laporan tentang jumlah dan jenis bakteri selulolitik pada sapi aceh. Menurut Hernawati dkk. (2010). jumlah bakteri selulolitik di dalam isi rumen sapi lokal berkisar  $8,1 \times 10^4$  sel/gram isi rumen. Dimana kondisi lingkungan dan pakan yang berbeda akan menghasilkan populasi bakteri selulolitik yang berbeda (Ulrich dkk., 2008).

Pada umumnya bakteri aerobik selulolitik termasuk dalam kelompok *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* dan *Proteobacteria*. Beberapa bakteri selulolitik yang ditemukan pada rumen sapi antara lain *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Cellvibrio*, dan *Pseudomonas* (Lynd dkk., 2002), *Bacteriodessuccinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvent*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium lockheadii* dan *Cillobacterium cellulosolvens* (Dilly dkk., 2001; Ulrich dkk., 2008; Pattanachomsri dkk., 2011). Penelitian ini bertujuan mengetahui jumlah total bakteri yang mempunyai aktivitas selulose pada cairan rumen sapi aceh. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang mikrobiologi dengan memberikan informasi tentang jumlah bakteri yang menghasilkan enzim selulose pada rumen sapi aceh.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif yang dilakukan di dalam Laboratorium dan terdiri dari beberapa tahap. Tahap pertama adalah isolasi Bakteri selulolitik dari cairan rumen sapi aceh. Tahap kedua adalah pewarnaan Gram. Tahap ketiga adalah menghitung jumlah koloni bakteri selulolitik pada cairan rumen sapi aceh. Pembuatan media *Bushnell Haas Medium* (BHM)-(CMC) *carboxy methyl cellulose* agar. Media BHM-CMC agar dibuat sebanyak 500 ml, yaitu dengan menggunakan *carboxy methyl cellulose* (CMC) (10g),  $K_2HPO_4$  (1g),  $KH_2PO_4$  (1g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,2g),  $NH_4NO_3$  (1g),  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (0,05g),  $CaCl_2$  (0,02g), dan agar (20g), aquadest. Kemudian larutan tersebut dipanaskan sampai mendidih di dalam *hotplate*. Setelah mendidih, gelas Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan disterilisasi selama 15 menit didalam autoklaf dengan suhu  $121^\circ C$  dan tekanan 1 atm.

### Isolasi Bakteri Selulolitik

Isolasi bakteri selulolitik ini akan dilakukan dengan menggunakan media BHM-CMC agar. Sampel cairan rumen sapi aceh dilakukan pengenceran. Pengenceran ini bertujuan untuk memperkecil kuantitas mikroba yang tersuspensi di dalam media, sehingga mempermudah dalam mengamati koloni yang tumbuh. Pengenceran yang dilakukan adalah pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-5}$  (Cappucino, 2001).

Pengenceran  $10^{-1}$  dibuat dengan cara mencampurkan 1 ml cairan rumen dengan 9 ml aquadest steril lalu homogenkan selanjutnya, dengan menggunakan mikropipet diambil sebanyak 1 ml sampel dari tabung reaksi pertama dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya yang berisi aquadest steril 9 ml untuk pengenceran  $10^{-2}$  dan selanjutnya divorteks. Pengenceran  $10^{-3}$  dibuat dengan cara mengambil 1 ml sampel dari pengenceran  $10^{-2}$  dan

dimasukkan ke dalam tabung reaksi berikutnya. Cara pengenceran ini terus dilakukan hingga diperoleh pengenceran  $10^{-5}$ . Hasil pengenceran, diambil 1 ml dengan menggunakan mikropipet dan dikultur kedalam media BHM-CMC agar dengan metode tuang (*pour plate*) pada cawan petri dan dihomogenkan. Pengenceran yang dikultur pada media adalah hanya pada pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-5}$ . Selanjutnya, cawan petri yang berisi media BHM-CMC agar yang sudah mengeras dimasukkan ke dalam kaleng (*candle jar*), kemudian diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 96 jam (Singh dkk., 2013). Selanjutnya koloni yang tumbuh dihitung dan dilakukan pewarnaan Gram.

### Menghitung Jumlah Koloni dan Total Bakteri Selulolitik

Koloni yang tumbuh pada masing-masing media BHM-CMC agar dari pengenceran  $10^{-2}$  sampai pengenceran  $10^{-5}$  akan dihitung seluruhnya. Setelah diperoleh jumlah koloni dari setiap pengenceran, selanjutnya dihitung total bakteri selulolitik dengan cara mengalikan jumlah koloni dengan satu per faktor pengenceran yang dipakai. Jumlah koloni yang digunakan untuk menghitung total bakteri selulolitik adalah koloni yang berjumlah antara 25-250. Satuan yang digunakan untuk penghitungan jumlah bakteri adalah cfu/ml. Jumlah koloni bakteri yang digunakan dalam penghitungan total bakteri selulolitik ini adalah koloni yang berjumlah 25 sampai 250 koloni (Lukman dkk., 2009). Selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram. Jumlah total bakteri per ml dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Jumlah total bakteri} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

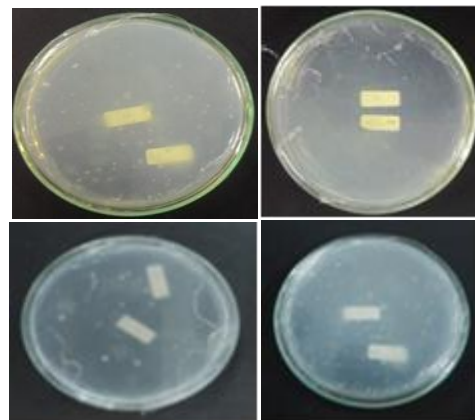
### Analisis Data

Data yang didapatkan dari penelitian isolasi bakteri selulolitik pada cairan rumen sapi aceh ini dianalisis secara deskriptif meliputi: morfologi koloni, jumlah koloni, total bakteri selulolitik yang tumbuh pada media BHM-CMC agar dan hasil pewarnaan Gram.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfologi Koloni Bakteri Selulolitik

Isolasi bakteri selulolitik yang berasal dari cairan rumen sapi aceh dilakukan dengan menggunakan media selektif bakteri selulolitik, yaitu BHM (*Bushnell Haas Medium*)-CMC (*carboxy methyl cellulose*) agar. Cairan rumen yang dikultur ke dalam media sebelumnya dilakukan pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-5}$ . Pada sampel cairan rumen sapi aceh setelah diinkubasi selama 96 jam, koloni bakteri yang tumbuh menyebar di dalam media dari pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-5}$ . Koloni bakteri yang tumbuh pada media BHM-CMC agar dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Koloni bakteri yang tumbuh pada media BHM-CMC agar. cairan rumen sapi aceh pengenceran  $10^{-2}$ - $10^{-5}$ (a). Pengenceran  $10^{-2}$  b). Pengenceran  $10^{-3}$  (c). Pengenceran  $10^{-4}$  (d). Pengenceran  $10^{-5}$

Pada penelitian ini koloni baketeri selulolitik yang tumbuh diamati morfologinya yang meliputi warna, bentuk, posisi, pinggiran dan diameter koloni. Berdasarkan dari

pengamatan yang dilakukan, koloni bakterinya pada umumnya berwarna putih dengan bentuk bulat, dan pinggirannya halus, dengan diameter koloni yang bervariasi (Tabel 1).

**Tabel 1.** Morfologi koloni bakteri pada media BHM-CMC agar

Koloni	Warna	Posisi	Pinggiran	Diameter Koloni (Mm)
FKH_USK_5	Putih bening	dii dalam agar	halus	1 mm
FKH_USK_6	Putih bening	di dalam agar	halus	1,4 mm
FKH_USK_7	Putih bening	di dalam agar	halus	2 mm
FKH_USK_8	Putih bening	di dalam agar	halus	2,5 mm

**Penghitungan Jumlah Koloni Bakteri Selulolitik**

Penghitungan jumlah koloni bakteri selulolitik dilakukan pada setiap cawan Petri dari masing-masing pengenceran. Berdasarkan

hasil penghitungan, jumlah koloni bakteri selulolitik dari sampel sapi A, B, dan C pada pengenceran  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  yang tumbuh pada media BHM-CMC agar setelah diinkubasi selama 96 jam dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Rata- rata jumlah koloni bakteri selulolitik dari masing-masing pengenceran.

No	Nama Sapi	Faktor Pengenceran	Jumlah Koloni
1	Sapi A	$10^{-2}$	TBDH
		$10^{-3}$	TBDH
		$10^{-4}$	126
		$10^{-5}$	17
2	Sapi B	$10^{-2}$	TBDH
		$10^{-3}$	51
		$10^{-4}$	4
		$10^{-5}$	1
3	Sapi C	$10^{-2}$	TBDH
		$10^{-3}$	131
		$10^{-4}$	14
		$10^{-5}$	3

Prinsip pengenceran adalah untuk mengurangi kuantitas bakteri, sehingga apabila semakin besar pengenceran yang dilakukan

maka makin sedikit jumlah koloni yang tumbuh pada media. Faktor utama yang menyebabkan terjadinya kegagalan pertumbuhan kolo bakteri

pada media biakan adalah kesalahan dalam prosedur pengenceran dan pengenceran yang terlalu besar, misalnya mengambil terlalu banyak atau terlalu sedikit bakteri dari larutan suspensi awal. Kesalahan lain yang mungkin terjadi adalah akibat larutan suspensi yang kurang homogen, sehingga jumlah bakteri yang terambil tidak mewakili populasi bakteri yang ada (Waluyo, 2004).

Jumlah total bakteri selulolitik per ml berdasarkan penghitungan total bakteri selulolitik cairan rumen sapi aceh 1 adalah  $126 \times 10^4$ , sapi aceh 2 adalah  $5,1 \times 10^4$ , sedangkan sapi aceh 3 adalah  $13,1 \times 10^4$ . Berdasarkan hasil diatas didapatkan rata-rata dari jumlah koloni sapi 1, sapi 2, dan sapi 3 adalah  $4,81 \times 10^5$ . Jumlah rata-rata koloni bakteri selulolitik pada sapi aceh 1,2 dan 3 :

No	Asal sapi	Jumlah koloni
1	Sapi A	$126 \times 10^4$
2	Sapi B	$5,1 \times 10^4$
3	Sapi C	$13,1 \times 10^4$

$$= \frac{\text{Jumlah total koloni}}{3}$$

$$= \frac{126 \times 10^4 + 5,1 \times 10^4 + 1,3 \times 10^4}{3}$$

$$= 48,1 \times 10^4$$

$$= 4,81 \times 10^5$$

Dari hasil di atas dapat di hitung jumlah total bakteri selulolitik sapi A, sapi B, sapi C :

$$\text{Jumlah total bakteri} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

$$= 4,81 \times \frac{1}{10^5}$$

$$= 4,81 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$$

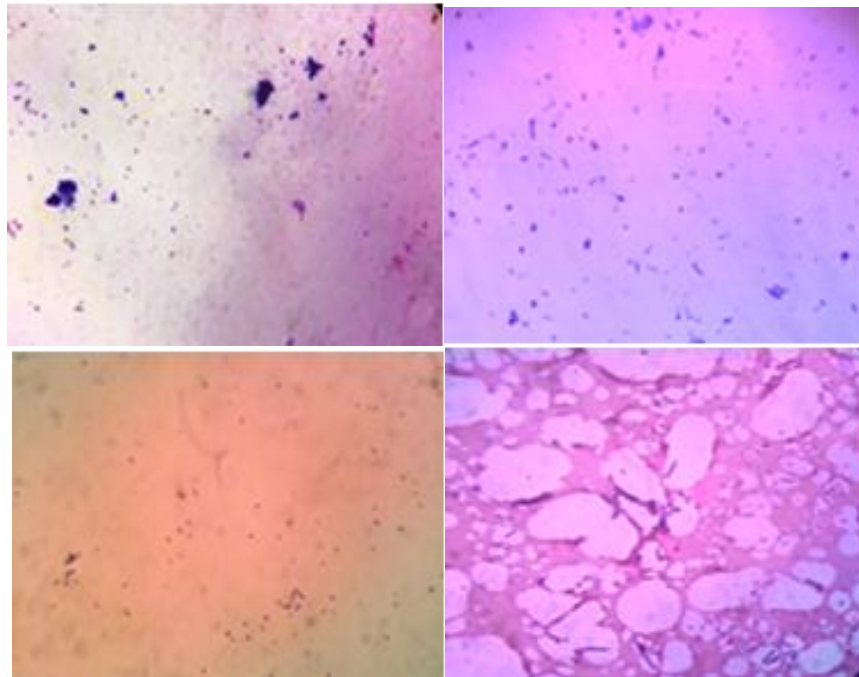
Hasil penelitian jumlah rata-rata bakteri selulolitik cairan rumen sapi aceh ini lebih tinggi

dibandingkan dengan hasil penelitian Hermawati (2010) pada sapi bali, madura, dan PO, dimana jumlah bakteri selulolitik di dalam isi rumen sapi adalah  $8,1 \times 10^4$  sel/gram isi rumen. Tingginya jumlah bakteri selulolitik pada sapi aceh kemungkinan disebabkan oleh pakan yang diberikan pada umumnya hijauan seperti rumput, tanpa diberi tambahan konsentrat. Hal ini disebabkan sapi tidak memiliki kemampuan mendegradasikan selulosa menjadi glukosa, namun degradasi dilakukan oleh mikroorganisme terutama bakteri yang ada di rumen. Sehingga bakteri atau mikroba selulolitik didalam rumen sapi aceh lebih banyak.

Selulase merupakan enzim ekstraseluler, yang menghasilkan glukosa. Glukosa mempunyai tiga jenis enzim selulase yang terdiri atas kompleks endo- $\beta$ -1,4-glukonase (CMCase, Cx selulase endoselulase, atau carboxymethyl cellulase), kompleks ekso- $\beta$ -1,4-glukonase (aviselase, selobiohidrolase, C1 selulase), dan  $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiase. Selulase dikenal dengan nama sistematik  $\beta$ -1,4 glukano-4-glukano hidrolase adalah enzim yang dapat menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik  $\beta$ -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Enzim ini merupakan enzim yang memegang peranan penting dalam proses biokonversi limbah-limbah organik berselulosa menjadi glukosa, makanan ternak, etanol dan lain-lain (Silva *et al.*, 2005; Meryandini *et al.*, 2009).

### Pewarnaan Gram

Empat jenis koloni bakteri yang berbeda berdasarkan pengamatan morfologi koloni selanjutnya dilakukan pewarnaan Gram (Tabel 2). Koloni yang ditemukan pada umumnya adalah bakteri Gram positif. Koloni FKH\_USK\_5 berwarna ungu dengan bentuk bulat/kokus, pada koloni FKH\_USK\_6 berwarna ungu berbentuk batang/basil panjang, sedangkan pada koloni FKH\_USK\_7 dan FKH\_USK\_8 sama berwarna ungu berbentuk batang/basil pendek. Hasil pewarnaan Gram terhadap koloni bakteri tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Hasil pewarnaan Gram terhadap koloni bakteri selulolitik pembesaran 10 x 100 a: (FKH\_USK\_5), b: (FKH\_USK\_6), c: (FKH\_USK\_7) dan d: (FKH\_USK\_8)

**Tabel 3.** Morfologi bakteri selulolitik hasil pewarnaan Gram

Koloni	Bentuk	Gram
FKH_USK_5	Kokus	+
FKH_USK_6	Basil	+
FKH_USK_7	Basil pendek	+
FKH_USK_8	Basil panjang	+

**Ket :** + : positif.

Pewarnaan Gram selain digunakan untuk membedakan antara bakteri Gram positif dan Gram negatif, juga digunakan untuk mengetahui bentuk bakteri dan susunan bakteri selulolitik. Bakteri Gram positif merupakan bakteri yang dapat mempertahankan zat warna gentian violet pada proses pewarnaan Gram. Bakteri golongan ini akan memperlihatkan warna biru keunguan (violet), sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah muda pada saat dilakukan pengamatan di bawah mikroskop. Perbedaan warna dari proses pewarnaan Gram ini didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel yang menyusun bakteri. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari lapisan peptidoglikan yang membentuk suatu struktur yang tebal dan kaku. Lapisan peptidoglikan yang tebal ini membuat Gram positif dapat tahan terhadap pembilasan oleh alkohol, sehingga mampu mencegah keluarnya zat warna utama gentian violet (Fitria dan yasmin, 2011).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri selulolitik yang mempunyai aktivitas selulose pada cairan rumen sapi aceh sebesar  $4,81 \times 10^5$  cfu/ml.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N., R.R. Noor, H. Martojo, D.D. Solihin, dan E. Handiwirawan. 2007. Keragaman Fenotipik Sapi Aceh di Nangroe Aceh Darussalam. **J. Indon. Trop. Anim Agric.** 32 (1): 11-21.
- Aklyosov. 2004. Cellulase Enzyme That Degrades Celulose From Fungi. **Application of Microbial.** 522-529.
- Ambriyanto, K. S. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Aerob Pendegradasi Selulosa dari Serasah Daun Rumpun Gajah (*Pennisetum purpureum schaum*). **Skripsi.** Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Basri, H. 2006. **Penelusuran Arah Pembibitan Sapi Aceh.** Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala Darussalam, Banda Aceh.
- BPTU-HPT. 2014. Keunggulan Sapi Aceh. [bptuhptindrapuri.com/keunggulan-sapi-aceh](http://bptuhptindrapuri.com/keunggulan-sapi-aceh). Diakses: 3 Oktober 2015.
- Cappucino, J.G., and N. Sherman. 2001. **Microbiology: A Laboratory Manual,** Benjamin Cummings Publishing, United State of America.
- Dilly, O, S. Bartsch, P Rosenbrock, F Buscot, J.C Munch. 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder forest. **Soil. Biol. Biochem.** 33:921-930.
- Fitria, L. dan Y. Yasmin. 2011. Isolasi dan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik. **Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi.** 3(2):20-25.
- Hernawati, T., M. Lamid, H.A. Hermadi, S.H. Warsito. 2010. Bakteri selulolitik untuk meningkatkan kualitas pakan komplit berbasis limbah pertanian. **Veterinaria Medika.** 3(3): 43-53.
- Lukman, D.W., M. Sudarwanto, A.W. Sanjaya, T. Purnawarman, H. Latif, dan Soejoedono. 2009. Higiene pangan. **Laporan Penelitian.** Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Lynd, L.R, P.J. Weimer, W.H.V. Zyl. I.S. and Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamental sand biotechnology. **Microbiol Mol. Biol.** 6(6): 506-577.
- Marganingtyas, D.D. 2011. Potensi Selulolitik Indigenous Mangrove Terhadap Komposisi Limbah Tambak Udang. **Skripsi.** Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.
- Martojo, H. 2003. **Indigenous Bali Cattle: The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farms in Indonesia.** Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University, Bogor.
- Meryandini, A. 2009. Isolasi bakteri selulolitik dan karakteristik enzimnya. **Makara Sains** 13(1):32-38
- Noor, R.R. 2008. **Genetika Ternak.** Penebar Swadaya, Jakarta.

- Pattanachomsri U, P. Kanokratana, L. Eurwilaichitr, Y. Igarashi, and Champreda V. 2011. Culture-independent phylogenetic analysis of the microbial community in industrial sugarcane bagasse feedstock piles. **Biosci Biotechol Biochem** 75:232–239.
- Preston, T.R. and R.A. Leng. 1987. **Matching Ruminant Production Systems with Available Resources in the Tropic and Sub-Tropic**. International Colour Production. Stanthorpe, Queensland, Australia.
- Silva, J.R., Silva, F. J. L, And I. Sazima. 2005. Rest, nurture, sex, release, and play: diurnal underwater behaviour of the spinner dolphin at Fernando de Noronha Archipelago, SW Atlantic. **Aqua Journal of Ichthyology and Aquatic Biology**. 9:161-176.
- Singh, S., V.S. Moholkar. and A. Goyal. 2013. Isolation, identification and characterization of a cellulolytic *bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 102. **J. Kaunia**. 10 (2): 92-102.
- Ulrich, A, G. Klimke and S. Wirth. 2008. Diversity and activity of cellulose-decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after long-term manure application. **Microb Ecol** 55: 512–522.
- Waluyo, L. 2004. **Mikrobiologi Umum**. UMM Press, Malang.