

## Penapisan Kapang Endofit Ranting Kayu Meranti Merah (*Shorea balangeran* Korth.) sebagai Penghasil Enzim Xilanase

SHIRLY KUMALA\*, NUR ANNISA FITRI

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila  
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640

Diterima 18 Desember 2007, Disetujui 26 Februari 2008

**Abstract:** Endophytic microbes are microorganisms that live in the plant. These microbes, are able to produce secondary metabolites, such as oligosaccharide degrading enzymes, growth factors, antibacterial substances and xylanase enzyme, an enzyme that can reduce the use of chlorine as bleaching agent in paper industries. This study was aimed to isolate endophytic fungi that can produce extracellular xylanase. Isolation of endophytic fungi from red *meranti* (*Shorea balangeran* Korth.) branches was carried out using surface sterilization and direct seeding methods on CMM (Corn Meal Malt) medium. Xylanase was produced by using shaking fermentation methods on PDY (Potato Dextrose Yeast) for 12 days. Enzyme activity was assessed by using DNS (Dinitro salicylic acid) method. The results showed that of nine endophytic fungi isolates, eight have xylanase enzyme activity, ranging from 1.279 u/ml (highest) to 0.12 u/ml (lowest).

**Key words:** Endophytic fungi, shaking fermentation, xylanase, enzyme activity, *Shorea balangeran* Korth.

### PENDAHULUAN

ENZIM telah banyak dikembangkan menjadi komoditas yang diproduksi dan diperdagangkan di beberapa negara maju. Enzim dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan, seperti dalam pengolahan di berbagai industri (terutama industri pangan), diagnosis, analisis, biologi molekuler, transformasi senyawa kimia (terutama yang memiliki aktivitas farmakologis), sebagai bahan aditif dalam deterjen, dan juga digunakan sebagai obat<sup>(1)</sup>. Pemakaian enzim di Indonesia dewasa ini semakin meningkat, terutama di bidang farmasi, makanan, minuman, dan industri kertas. Kebutuhan domestik atas enzim cukup besar, namun ketersediaannya masih tergantung impor. Selain itu, penelitian dan pengembangan enzim di Indonesia sampai saat ini masih dalam skala laboratorium<sup>(2)</sup>. Karena itu, perlu dicari terobosan dengan memanfaatkan bahan alam dan organisme hidup seperti tanaman, hewan, dan mikroba.

Mikroba yang berada di dalam jaringan tanaman dikenal dengan nama mikroba endofit. Mikroba yang sebagian atau seluruh hidupnya berada dalam jaringan tanaman inang ini dapat

menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki potensi komersial, seperti enzim-enzim perombak, zat antimikroba, zat pengatur tumbuh, dan enzim yang dapat mendegradasi polisakarida menjadi gula sederhana. Beberapa mikroba endofit juga mampu mendegradasi xilan<sup>(3)</sup>. Selama fase pertumbuhannya, mikroba tersebut menghasilkan enzim ekstraselular yang mampu merombak komponen penyusun kayu, seperti lignin, selulosa, hemiselulosa, dan xilan<sup>(4)</sup>.

Xilanase merupakan enzim hidrolase yang mempunyai kemampuan menghidrolisis xilan menjadi xilosa. Kompleks enzim xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dipecahnya, yaitu  $\beta$ -xiloxidase, endoxilanase, eksoxilanase<sup>(5)</sup>. Enzim xilanase mempunyai nilai komersial yang tinggi dalam bidang industri. Pada industri kertas, xilanase dapat digunakan untuk mengurangi jumlah kebutuhan bahan kimia pada proses pemutihan pulp. Kelebihan dari penggunaan xilanase pada proses pemutihan pulp adalah meningkatkan hasil yang bebas dari penggunaan klorin. Dengan demikian, penggunaan xilanase dapat mengurangi limbah industri yang selama ini menjadi salah satu faktor pencemar lingkungan.

Indonesia sebagai negara tropis yang memiliki aneka ragam jenis tumbuhan tentulah berpotensi

\* Penulis korespondensi, Hp. 08129026821  
e-mail: fskumala@yahoo.com

besar untuk pengkajian mikroba endofit. Seleksi dan skrining dari berbagai tanaman telah dan perlu untuk terus dilakukan guna mengisolasi mikroba endofit dari berbagai jenis tanaman. Salah satu tanaman yang menarik untuk diteliti adalah meranti merah (*Shorea balangeran* Korth.) yang banyak tumbuh di Indonesia, namun informasi terkait potensi mikroba endofitnya masih sangat terbatas. Sebagai tanaman hutan, meranti merah merupakan jenis meranti yang banyak digunakan sebagai papan pada bangunan rumah dan jembatan, serta merupakan salah satu jenis kayu perdagangan yang terpenting dari pesisir selatan Kalimantan<sup>(6)</sup>.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan kapang endofit yang diisolasi dari ranting kayu meranti merah dalam menghasilkan enzim xilanase ekstraselular. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diperoleh sumber enzim dari fungi endofit yang ramah lingkungan, khususnya dalam industri kertas.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Ranting kayu meranti merah (*Shorea balangeran* Korth.) yang diambil dari ketinggian 9 meter, ranting ke-3, memiliki diameter 0,5 cm, diperoleh dari Kebun Raya Bogor yang telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Balitbang Botani, Puslitbang Biologi LIPI, Bogor. Medium isolasi kapang, yaitu CMM (*Corn Meal Malt*) agar (Difco), medium fermentasi untuk degradasi xilan berupa PDY (*Potato Dextrose Yeast*) (Difco), pereaksi untuk analisis produk hasil hidrolisis xilan adalah asam dinitrosalisilat (DNS) (Sigma), xilan (Sigma, Beach Wood) dan xilosa (Sigma), etanol 75%, dan natrium hipoklorit (NaOCl) 5,3%.

**METODE.** **Isolasi kapang endofit dari ranting tanaman meranti merah (*Shorea balangeran* Korth).** Terhadap sampel (ranting tanaman) yang sehat, tidak terinfeksi mikroba, dan tidak terdapat luka bekas gigitan serangga, dilakukan sterilisasi permukaan dan tanam langsung pada media pertumbuhan. Sampel dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan dipotong menjadi 3 potongan dengan panjang setiap potongannya lebih kurang 1 cm. Potongan sampel disterilisasi secara bertingkat dengan mencelupkannya ke dalam etanol 75% selama 1 menit, memasukkannya ke dalam larutan pemutih (NaOCl 5,3%) selama 5 menit, dan mencelupkannya lagi ke dalam etanol 75% selama 30 detik. Proses sterilisasi ini dilakukan di dalam *laminar air flow*.

Potongan-potongan yang telah disterilkan diletakkan di atas kertas *tissue* steril dan dibiarkan sampai etanolnya menguap, kemudian dibelah

secara membujur di atas kaca objek steril menjadi 2 bagian sama besar. Masing-masing bagian diletakkan di atas media CMM yang sudah diberi antibiotik kloramfenikol dengan posisi permukaan belahan menempel pada agar medium. Inkubasi dilakukan pada suhu 27–30°C (suhu ruang) selama 5–7 hari<sup>(7)</sup>.

**Pengamatan morfologi mikroba endofit secara makroskopik.** Pengamatan koloni secara makroskopik (*visual*) dilakukan berdasarkan kriteria: warna, permukaan, dan tepian koloni. Kriteria yang sama dianggap sebagai isolat yang sama, dan kriteria yang menunjukkan perbedaan dianggap sebagai isolat yang berbeda. Setiap koloni dengan morfologi berbeda dipisahkan menjadi isolat tersendiri. Pengamatan morfologi dilakukan kembali setelah inkubasi selama 5–7 hari. Apabila masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda secara makroskopik, dilakukan pemisahan lagi sampai diperoleh isolat murni, yaitu hanya mengandung satu bentuk morfologi koloni yang sama. Masing-masing isolat murni kemudian dipindahkan ke dalam agar miring sebagai biakan stok dan biakan kerja.

**Pengamatan morfologi kapang endofit secara mikroskopik (*slide culture*).** Kertas saring diletakkan pada dasar cawan Petri, kemudian berturut-turut diletakkan di atasnya batang gelas berbentuk U dan kaca objek. Cawan Petri tersebut kemudian disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah itu, kertas saring dalam cawan Petri dibasahi dengan air suling steril hingga suasana dalam cawan Petri menjadi lembab. Dengan menggunakan jarum Ose diambil sedikit miselium yang sudah bersporulasi (sampel) dan diletakkan di atas kaca objek. Di atas kaca objek tersebut diletakkan kaca penutup, lalu cawan Petri diinkubasi pada suhu kamar (27–29°C) selama 72 jam<sup>(8)</sup>.

**Produksi enzim dengan fermentasi goyang.** Isolat kapang endofit diinokulasikan dalam medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 7 hari, setelah itu diambil 5 potong biakan kapang dengan ukuran ± 1x1 cm. Potongan tersebut dimasukkan ke dalam medium fermentasi cair PDY sebanyak 50 ml di dalam labu Erlenmeyer 250 ml. Fermentasi dilakukan dengan pengocokan selama 5 hari, kecepatan 150 rpm, dan dilanjutkan dengan fermentasi kembali menggunakan 200 ml medium PDY selama 7 hari. Supernatan dipisahkan dari biomassa dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 20 menit. Supernatan dari hasil fermentasi digunakan untuk pengujian aktivitas enzim.

**Pengujian aktivitas enzim xilanase.** Pengujian aktivitas enzim xilanase dilakukan menggunakan metode asam dinitro salisilat (DNS).

**Penetapan panjang gelombang serapan maksimum xilosa.** Larutan stok xilosa 1 mg/ml, dipipet sebanyak 0,5 ml kemudian diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,0 ml pereaksi DNS, lalu dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, dan ditambahkan air suling hingga 10,0 ml. Intensitas warna yang terbentuk diukur pada panjang gelombang 400-600 nm dengan interval 10 menit. Panjang gelombang maksimum adalah panjang gelombang yang memberikan serapan tertinggi.

**Pembuatan kurva baku xilosa.** Larutan stok xilosa 1 mg/ml dibuat menjadi lima konsentrasi, yaitu 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 mg/ml. Cara pengujian dilakukan dengan menginkubasi masing-masing larutan pada suhu 48°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 1,0 ml pereaksi DNS, dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit, dan ditambahkan air suling hingga 10,0 ml. Intensitas warna yang terbentuk diukur pada panjang gelombang maksimal 488 nm, dan data serapan yang diperoleh diolah secara statistik untuk mendapatkan hubungan antara serapan dan konsentrasi (kurva baku).

**Uji aktivitas enzim xilanase.** Supernatan hasil fermentasi kapang diambil 0,5 ml, lalu ditambah 0,5 ml larutan xilan 1% b/v, dan diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 1,0 ml, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan air suling hingga 10,0 ml, lalu diukur intensitas warnanya pada panjang gelombang maksimum. Untuk memperoleh konsentrasi sampel, maka serapan larutan sampel dikurangi dengan serapan larutan blanko.

**Pembuatan kontrol.** Supernatan hasil fermentasi kapang diambil 0,5 ml, dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit, kemudian ditambah 0,5 ml larutan xilan 1% b/v dan diinkubasi pada suhu 48°C selama 10 menit. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan pereaksi DNS sebanyak 1,0 ml, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah ditambahkan air suling hingga 10,0 ml, diukur intensitas warna (serapan)nya pada panjang gelombang maksimum. Serapan larutan kontrol dikurangi serapan larutan blanko kemudian dikonversikan pada kurva baku xilosa sehingga diperoleh konsentrasi kontrol.

Aktivitas xilanase dapat dihitung dengan rumus: Aktivitas enzim (u/ml) =  $\frac{([S] - [K]) \times 1000 \times Fp}{\text{waktu inkubasi} \times \text{BM xilosa}}$ . [S] adalah konsentrasi sampel, [K] adalah konsentrasi kontrol, Fp adalah faktor pengenceran = 20 x (untuk supernatan hasil fermentasi), waktu inkubasi = 10 menit, BM xilosa adalah 150,13, dan 1 u/ml setara dengan 1 mikromol produk yang dihasilkan per menit<sup>(9)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Data isolat kapang endofit dari ranting kayu *Shorea balangeran* Korth. dan ciri-ciri morfologisnya.** Isolasi terhadap ranting kayu meranti merah dengan metode tanam langsung memberikan 9 isolat kapang endofit. Hasil isolasi disajikan pada Tabel 1.

Hasil isolasi menunjukkan, sebagian besar kapang endofit berupa koloni berwarna putih agak kekuningan, bentuk koloni umumnya memiliki tepi rata, meskipun ada yang bergelombang. Isolasi mikroba endofit dari ranting kayu meranti merah dilakukan dengan metode tanam langsung, yaitu ranting langsung ditanamkan pada medium agar. Tujuannya adalah untuk memperoleh mikroba endofit yang hidup di dalam jaringan tanaman. Dari hasil isolasi ranting kayu meranti merah (*Shorea balangeran* Korth.) diperoleh 9 isolat kapang. Pada umumnya, isolat kapang endofit mempunyai sifat lambat tumbuh, membutuhkan waktu kurang lebih 5-7 hari pada suhu kamar (27-30°C). Pemisahan isolat-isolat tersebut didasarkan pada perbedaan bentuk koloni secara makroskopik yang meliputi warna serta bentuk permukaan dan tepian koloni, yang kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan secara mikroskopik dengan metode *slide culture*.

Untuk pertumbuhan kapang endofit digunakan medium PDA, karena pada pembiakan mikroba endofit diperlukan zat hara untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme, dan pergerakan serta unsur-unsur mineral lainnya yang sesuai bagi mikroba endofit.

**Hasil aktivitas enzim ekstraselular (supernatan) fermentasi goyang isolat kapang endofit *Shorea balangeran* Korth.** Hasil uji aktivitas enzim ekstraselular dari isolat kapang endofit *Shorea balangeran* Korth. disajikan pada Tabel 2.

Data Tabel 2 menunjukkan bahwa sebagian besar kapang endofit menghasilkan enzim xilanase, kecuali kapang SB II 3<sub>5N</sub>. Kapang ini tidak menghasilkan enzim xilanase kemungkinan karena tidak membawa gen untuk menghasilkan enzim xilanase. Dari 9 isolat kapang endofit *Shorea balangeran* Korth., diperoleh 8 isolat yang memiliki aktivitas enzim ekstraselular, yaitu isolat SB II 3<sub>1A</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,413 u/ml, isolat SB II 3<sub>2D</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,360 u/ml, isolat SB II 3<sub>5M</sub> (0,386 u/ml), isolat SB II 3<sub>1C</sub> (0,120 u/ml), isolat SB II 3<sub>3F</sub> (1,132 u/ml), isolat SB II 3<sub>2E</sub> (0,933 u/ml), isolat SB II 3<sub>5L</sub> (1,279 u/ml), dan isolat SB II 3<sub>3G</sub> (0,520 u/ml). Dengan demikian, isolat SB II 3<sub>5L</sub>, menghasilkan enzim ekstraselular dengan aktivitas tertinggi, yaitu 1,279 u/ml.

**Tabel 1. Isolat kapang endofit dari ranting kayu meranti merah dan ciri-ciri morfologisnya.**

No.	Kode isolat	Diameter koloni kapang hari ke-7 (cm)	Warna koloni kapang	Warna sebalik koloni kapang
1.	SB II 3 <sub>1A</sub> (kapang A)	9,2	Putih seperti kapas, tepi bergerigi	Krem kecoklatan
2.	SB II 3 <sub>5N</sub> (kapang B)	8,1	Putih, tepi halus bergelombang	Krem kecoklatan, lingkaran konsentris tidak jelas
3.	SB II 3 <sub>2D</sub> (kapang C)	3,1	Putih, tepi halus bergelombang	Putih, mempunyai lingkaran konsentris
4.	SB II 3 <sub>5M</sub> (kapang D)	4,1	Putih, tepi halus rata	Putih
5.	SB II 3 <sub>1C</sub> (kapang E)	9,2	Putih kekuningan, tepi halus	Putih kuning kecoklatan
6.	SB II 3 <sub>3F</sub> (kapang F)	7,8	Putih seperti kapas	Putih kekuningan, mempunyai lingkaran konsentris
7.	SB II 3 <sub>2E</sub> (kapang G)	9,0	Krem keputihan, tepi halus	Putih krem kecoklatan, mempunyai lingkaran konsentris
8.	SB II 3 <sub>5L</sub> (kapang H)	1,5	Putih abu-abu, tepi bergerigi	Krem keabuan
9.	SB II 3 <sub>3G</sub> (kapang I)	5,0	Putih kehijauan, tepi halus agak bergelombang	Putih kuning kecoklatan, mempunyai lingkaran konsentris

**Tabel 2. Hasil aktivitas enzim ekstraselular (supernatan) fermentasi goyang isolat kapang endofit *Shorea balangeran* Korth.**

No.	Kode Isolat	Aktivitas enzim (u/ml)
1.	SB II 3 <sub>1A</sub>	0,413
2.	SB II 3 <sub>5N</sub>	0
3.	SB II 3 <sub>2D</sub>	0,360
4.	SB II 3 <sub>5M</sub>	0,386
5.	SB II 3 <sub>1C</sub>	0,120
6.	SB II 3 <sub>3F</sub>	1,132
7.	SB II 3 <sub>2E</sub>	0,933
8.	SB II 3 <sub>5L</sub>	1,279
9.	SB II 3 <sub>3G</sub>	0,520

Penentuan medium yang paling tepat untuk suatu proses fermentasi memerlukan penelitian yang cermat. Namun pada dasarnya semua mikroorganisme membutuhkan air, sumber energi, karbon, nitrogen, mineral, vitamin, dan oksigen untuk proses aerobik<sup>(10)</sup>. Medium fermentasi yang baik harus menyediakan semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk memperoleh energi, pertumbuhan, dan bahan pembentuk sel. Senyawa-senyawa sumber karbon dan nitrogen merupakan komponen terpenting dalam medium fermentasi, karena sel-sel mikroba dan berbagai produk fermentasi sebagian besar terdiri dari unsur-unsur karbon dan nitrogen, garam-garam organik, serta beberapa vitamin dan mineral<sup>(11)</sup>. Medium fermentasi cair yang digunakan dalam penelitian ini adalah PDY. Medium PDY mengandung sumber karbon yang berasal dari kentang dan dekstrosa, serta sumber nitrogen dari ekstrak khamir.

Pada penelitian ini dilakukan pembuatan inokulum (*starter*) yang bertujuan untuk mendapatkan sel mikroorganisme yang sehat, aktif, tersedia dalam jumlah yang mencukupi, tidak terkontaminasi, dan mampu memproduksi sesuai yang diharapkan. Karena *starter* akan langsung dijadikan inokulum fermentasi, maka kemurnian, kondisi fisiologis, dan mutu genetiknya harus sangat diperhatikan. Fermentasi yang dilakukan pada penelitian ini adalah fermentasi goyang, yaitu menggunakan 50 ml PDY dalam labu Erlenmeyer 250 ml, pada suhu kamar (27–30°C) selama 5 hari dengan kecepatan penggoyangan 150 rpm dan dilanjutkan dengan dipindahkan ke 200 ml PDY dalam labu Erlenmeyer 1000 ml. Dari hasil fermentasi didapat supernatan (enzim ekstraselular) untuk diuji aktivitasnya.

Pada pengukuran aktivitas enzim xilanase, inkubasi 48°C dilakukan untuk mempercepat reaksi enzimatik antara enzim xilanase dengan substrat xilan agar reaksi berlangsung dengan sempurna. Pemanasan 100°C dilakukan untuk menginaktivkan enzim sehingga reaksi enzimatik berhenti. Dalam penelitian ini, kontrol menghasilkan serapan yang besar. Hal ini disebabkan karena terdapat gula-gula selain xilosa yang berikatan kompleks dengan DNS sehingga menghasilkan warna yang serapannya terbaca oleh spektrofotometer.

Aktivitas enzim xilanase dipengaruhi oleh beberapa faktor: pH, suhu, konsentrasi substrat, dan konsentrasi enzim<sup>(11)</sup>. Kondisi optimum untuk suatu proses fermentasi tergantung pada jenis mikroorganismenya. Pengendalian faktor-faktor fermentasi bertujuan untuk menciptakan kondisi yang optimum bagi pertumbuhan dan produksi metabolit yang diinginkan dari suatu organisme

tertentu. Secara umum, faktor fisik dan kimia utama yang mempengaruhi aktivitas suatu enzim adalah suhu, pH, dan kebutuhan oksigen<sup>(10)</sup>.

Pada penelitian ini diperoleh aktivitas enzim xilanase yang rendah hal ini mungkin disebabkan tidak menggunakan xilan sebagai sumber karbon. Untuk meningkatkan produksi xilanase perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan pemicu (*trigger*) atau medium fermentasi yang mengandung sumber karbon xilan sebagai penginduksi.

## SIMPULAN

Isolasi mikroba endofit dari ranting kayu meranti merah (*Shorea balangeran* Korth.) menghasilkan 9 isolat kapang endofit. Isolat kapang endofit dari ranting kayu meranti merah (*Shorea balangeran* Korth.) yang menghasilkan enzim xilanase ekstraselular adalah SB II 3<sub>1A</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,413 u/ml, isolat SB II 3<sub>2D</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,360 u/ml, isolat SB II 3<sub>5M</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,386 u/ml, isolat SB II 3<sub>1C</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,120 u/ml, isolat SB II 3<sub>3F</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 1,132 u/ml, isolat SB II 3<sub>2E</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,933 u/ml, isolat SB II 3<sub>5L</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 1,279 u/ml, dan isolat SB II 3<sub>3G</sub> dengan nilai aktivitas ekstraselular 0,520 u/ml.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Suhartono MT. Enzim dan bioteknologi. Bogor: PAU Bioteknologi IPB; 1989. hal. 53–171.
2. Suwahyono U. Mikrobiologi enzim dan bioteknologi dalam perspektif ekonomi dan industri. Jakarta: Direktorat Jendral Bioindustri BPPT; 2000. hal. 223–4.
3. Petrini O, Sieber TN, Toti L, Virel O. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat Toxin*. 1992;1:185–96
4. Wahyudi P. Mikroba endofitik sebagai penghasil materi yang bermanfaat. Jakarta: Sub Direktorat Bioteknologi Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan Deputi Bidang Pengkajian Ilmu Dasar dan terapan BPPT Teknologi: 1997. hal. 1–7.
5. Wahyudi P. Skrining mikroba endofitik penghasil enzim pemecah mannan, xilan, dan inulin. Jakarta: Sub Direktorat Bioteknologi Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan Deputi Bidang Pengkajian Ilmu Dasar dan terapan BPPT Teknologi: 1997. hal. 1–6.
6. Hcync K. Tumbuhan berguna Indonesia III. Cctakan ke-3. Jakarta: Badan Litbang Departemen Kehutanan; 1987. hal. 1420.
7. Tomita F. Screening of useful strains in International post graduate university course in microbiology. Japan: Japanese National Chemistry Commission for UNESCO; 1998. p. 223–33.

8. Lay BW. Analisa mikroba di laboratorium. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada; 1994. hal. 48-9, 115-7.
9. Kumala S, Mangunwardoyo W, Dethrian D. Uji aktivitas enzim xilanase ekstraselular dan intraselular bakteri endofitik tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2006.4(2): 51-4.
10. Sukmadi RB. Pengantar umum teknologi fermentasi. Disampaikan pada Pelatihan Manajemen Produksi dan Teknologi Fermentasi untuk Pembuatan Biokompos Bagi Pondok Pesantren di Propinsi Lampung, Natar, 21-23 September 1999. Jakarta: Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi; 1999.
11. Rachman A. Pengantar teknologi fermentasi. Bogor: PAU Pangan dan Gizi IPB; 1989. hal. 88-95.