

Aktivitas Enzim Selulase dari Khamir *Candida* sp. dan *Debaryomyces* sp. yang Diisolasi dari Lahan gambut Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi

Atit Kanti

Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi-LIPI

Jl. Juanda 18 Bogor 16122, tel. 0251-324006, Fax: 0251-325854

E-mail : atitkanti@yahoo.com

ABSTRACT

Cellulalytic Activity of *Candida* sp and *Debaryomyces* sp Isolated from Peat Soil of Bukit Duabelas Natural Park, Jambi. *Candida* sp. and *Debaryomyces* sp. Yeast Degrading cellulose Isolated from Peat Soil in Bukit Duabelas National Park, Jambi. The objective of study was to investigate the characteristic of yeast that are able to solubilize cellulose. The yeast was isolated from soil of Taman Nasional Bukit Duabelas Jambi. Out of 21 ioslates tested 2 isolates *Candida* sp. (Isolate J1) and *Debaryomyces* sp. (Isolate J2) were able to solubilize Carboxymethyl cellulose. Other isolated soil yeasts were *Rhodotorula* sp, and *Cryptococcus* sp. Medium acidity during cell cultivation varied between 5.8 to 7.2. The CMC-ase activity was 5.9 unit and 5.4 unit for isolate J1 and isolate J2 respectively. The Km of isolate J1 and isolate J2 were 7.7×10^{-2} and 8.4×10^{-2} (% b/v) respectively. Vmaks of isolate J1 and J2 was 8.28×10^{-3} dan 30.66×10^{-3} μ g glukosa/ml enzyme /minute, respectively.

Key words: Cellulolytic Yeasts, *Candida* sp., *Debaryomyces* sp., Enzymes Activity, Taman Nasional Bukit Duabelas

PENDAHULUAN

Luas lahan gambut di Taman Nasional Bukit Duabelas, semakin berkurang. Hal tersebut diantaranya disebabkan oleh adanya konversi lahan gambut menjadi lahan pertanian. Adanya kegiatan eksploitasi tersebut dikhawatirkan akan menyebabkan punahnya banyak mikroba potensial yang berfungsi menjaga kelangsungan dan keseimbangan ekosistem. Salah satu mikroba potensial tersebut adalah kelompok khamir.

Penelitian keragaman khamir pada ekosistem lahan gambut belum banyak dilakukan, khususnya khamir yang berperan pada proses perombakan bahan organik. Di samping bakteri, dan jamur khamir memegang peran penting dalam proses perombakan material organik (Stevens & Payne. 1977; Hatano *et al.*, 1991; Alexander, 1997). Hasil penelitian Nakase *et al.*, (1994), Stevens & Payne. (1977) menemukan beberapa khamir selulolitik. Isolat khamir tersebut diantaranya: *Candida*, *Williopsis*, dan

Trichosporon. Ketiga isolat khamir tersebut diketahui mempunyai peranan dalam siklus karbon di dalam tanah. Senyawa selulosa adalah unsur karbon terbesar dari material tanaman yang mendominasi lahan gambut. Adanya populasi mikroba yang mampu memecah senyawa kompleks selulosa di lahan gambut akan membantu kesuburan tanah (Deng *et al.*, 1994). Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi khamir yang mempunyai kemampuan merombak selulosa serta mempelajari karakteristik fisiologinya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Pengambilan Sampel Tanah

Sebanyak 1 kg tanah diambil dari 10 titik lapisan atas tanah dengan kedalaman 0-15 cm di lahan Gambut Taman Nasional Bukit Dua Belas. Sampel dimasukkan kedalam kantong plastik steril, dan ditempatkan didalam bok steril, untuk dikirim ke laboratorium.

Isolasi dan Pengamatan Khamir

Untuk mendapatkan khamir selulolitik dilakukan melalui dua tahap isolasi. Tahap pertama isolasi dilakukan dengan menggunakan medium cair *YNB* (*yeast nitrogen base*) yang ditambah dengan 20 % (b/v) glukosa. Sebanyak 1g sampel tanah gambut hasil pengayakan dimasukkan secara aseptik ke dalam tabung berisi 5 mL media *YNB* 20 % glukosa cair steril. Senyawa tersebut dilarutkan dalam 100 mL akuades sambil diaduk diatas *magnetic stirer*. Setelah itu, di ambil sebanyak 5 mL ke dalam tabung reaksi untuk membuat media *YNB*,

sisanya di tambah dengan 2,4 g agar untuk pembuatan media *YNB agar*. Isolasi dilakukan dengan metoda cawan sebar. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 3 hari atau lebih sampai koloni khamir tumbuh. Setelah tumbuh, koloni yang terpisah dan memiliki penampakan berbeda diambil sebanyak satu mata ose, diinokulasikan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL media *YNB agar* untuk pengujian selanjutnya.

Pengujian kemampuan selulolitik

Media *CMC* yang digunakan untuk pengujian kemampuan selulolitik terdiri dari dua macam media yaitu media padat dan cair (Enari, 1983). Media padat digunakan untuk mengisolasi khamir, sedangkan media cair digunakan untuk propagasi dan uji biomassa serta uji aktivitas enzim. Sebanyak 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g MnSO_4 , 0,1 g FeCl_3 , 0,01 g glukosa, 0,1 g *yeast extract*, dan 1 g *CMC* ditimbang. Setelah larut, pH media dibuat menjadi 6,8-7,5 dengan penambahan larutan HCl atau NaOH. Setelah itu biomassa khamir di pindahkan ke dalam media *CMC* padat menggunakan metode gores. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2 hari. Tahapan ini diperlukan untuk memurnikan koloni khamir. 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 khamir. Pengujian zona bening dilakukan dengan menggunakan larutan *congo red* 1 M sebagai larutan penguji dan NaCl 0,1 N sebagai larutan pencuci. Pertama-tama

sekitar 2 mL larutan *congo red* dituangkan ke dalam media yang berisi isolat, kemudian dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu, larutan dibuang kemudian dibilas dengan menggunakan larutan NaCl 0,1 N. Setelah itu diamati keberadaan zona beningnya. Kemudian isolat tersebut dipindahkan ke dalam media CMC padat yang baru untuk digunakan sebagai stok. Kemurnian khamir selanjutnya diamati di bawah mikroskop. Analisis kemurnian isolat khamir yang diperoleh dapat dilihat berdasarkan karakter morfologi koloninya.

Parameter Karakteristik Enzim Selulolitik yang Diamati

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

Pengukuran Biomassa

Biomassa khamir yang telah diukur pH-nya, diukur biomasanya berdasarkan metode kerapatan optik (*optical density*). Pengukuran tersebut dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dengan 5 kali ulangan. Hal tersebut dilakukan setiap pengambilan sampel biomassa khamir.

Pengukuran pH

Pengukuran pH kultur khamir selulolitik dilakukan untuk mengetahui besarnya pH yang dapat menghasilkan

aktivitas enzim tertinggi (maksimum). Besaran pH ini disebut pH optimum kerja enzim yang diperlukan untuk mengukur K_m dan V_{maks} . Pengukuran pH dilakukan pada saat pengambilan sampel yang berisi biomassa khamir, yaitu setiap 24 jam sampai diperoleh pH optimum, dengan 5 ulangan.

Pengukuran Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam satuan unit yaitu jumlah glukosa (mMol) yang terbentuk oleh 1ml larutan enzim permenit, yang diukur setiap 24 jam, dengan 5 kali ulangan. Penentuan aktivitas enzim CMC-ase diawali dengan sentrifugasi biomassa khamir pada kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Setelah itu, larutan enzim hasil sentifuse diambil sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi bertutup, lalu di tambah 1mL substrat CMC 1%. Untuk pengukuran gula reduksi awal (G_0), 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 dua jam. Setelah itu ditambah 1ml DNS, dipanaskan selama 7 menit pada air mendidih. Setelah dingin setiap larutan pada tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Perlakuan untuk *blanko* sama dengan gula reduksi hanya sampel diganti dengan akuades.

Penentuan 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; Schiner *et al.*, 1996).

Penentuan K_M dan V_{maks} ini dilakukan pada pH dan waktu inkubasi optimum yang diperoleh pada saat optimasi kerja enzim. Kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim bergantung pada konsentrasi substrat. Prosedur pengukuran K_m dan V_{maks} pada dasarnya sama dengan prosedur pengukuran aktivitas enzim. Perbedaannya yaitu pada pengukuran K_m dan V_{maks} konsentrasi substrat *CMC* yang digunakan bervariasi, yaitu : 0,3, 0,6, 0,9 dan 1,2% *CMC*, juga pH yang digunakan pada pengukuran adalah pH optimum dari kerja aktivitas enzim.

Identifikasi khamir

Khamir diidentifikasi berdasarkan pada morfologi sel, reproduksi seksual dan aseksual, serta karakter fisiologi dan biokomia (Kurtzman & Fell 1998).

HASIL

Khamir Selulolitik

Dari 21 isolat khamir yang diisolasi, sebagian besar termasuk ke dalam kelompok marga *Candida*. Ditemukan satu jenis *Rhodotorula* sp., dan satu jenis *Cryptococcus* sp. (Tabel 1). Ditemukan

dua isolat yang membentuk zona bening pada media *CMC* yaitu isolat J1 dan J2. Berdasarkan karakter morfologi, fisiologi dan biokimia isolat J1 teridentifikasi sebagai *Candida* sp, dan J2 merupakan jenis *Debaromyces* sp. Karakter fisiologi dan morfologi khamir selulolitik J1 dan J2 tertera pada Tabel 2.

Pertumbuhan biomassa

Hidrolisis selulosa oleh enzim selulase menghasilkan senyawa organik dengan molekul sederhana seperti glukosa. Senyawa ini mudah diasimilasi oleh kebanyakan jenis khamir tanah. Asimilasi glukosa oleh isolat J1, dan J2 menyebabkan terjadinya pertumbuhan biomassa sel seperti terlihat pada gambar 1. Isolat J1 dan J2 mempunyai pola pertumbuhan yang serupa. Pertumbuhan logaritmik terjadi pada hari ke dua inkubasi, dan akhirnya statik pada hari ke 4.

Profil pH

Hasil pengukuran pH selama waktu inkubasi dapat dilihat pada Gambar 2. Keadaan pH meningkat pada awal inkubasi, dan menurun pada akhir waktu kultivasi, capaian pH maksimum dari kedua kultur berbeda yaitu : 7,76 untuk kultur J1 dan 7,73 untuk kultur J2. Hal ini menunjukkan bahwa enzim selulase yang diperoleh dari koloni khamir dapat bekerja maksimum pada pH tersebut di atas (Abe *et al.* 1979; Joson & Coronel 1986; Coughlan & Meyer 1992).

Aktivitas Enzim Selulase

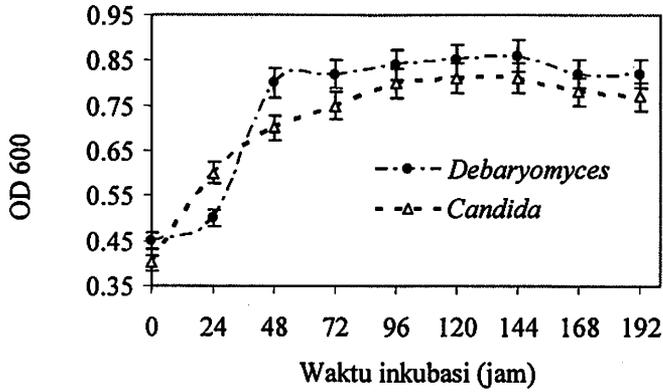
Aktivitas enzim selulase berkaitan dengan jumlah biomassa, dan pH

Tabel 1. Jenis-jenis khamir yang diisolasi dari lahan gambut Taman Nasional Bukit Duabelas dan kemampuan selulolitiknya

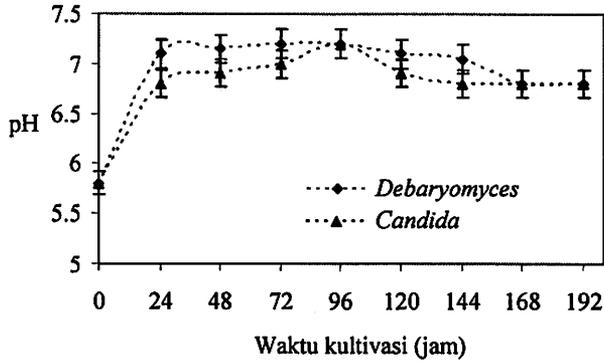
No.	Isolat	Pembentukan Zona Bening	Nama Jenis
1	J1	+	<i>Candida</i> sp.
2	J2	+	<i>Debaryomyces</i> sp
3	J3	-	<i>Candida</i> sp.
4	J4	-	<i>Cadnida</i> sp.
5	J5	-	<i>Candida</i> sp.
6	J6	-	<i>Candida</i> sp.
7	J7	-	<i>Candida</i> sp.
8	J8	-	<i>Candida</i> sp.
9	J9	-	<i>Cryptococcus</i> sp.
10	J10	-	<i>Candida</i> sp.
11	J11	-	<i>Candida</i> sp.
12	J12	-	<i>Rhodotorula</i> sp.
13	J13	-	<i>Candida</i> sp.
14	J14	-	<i>Candida</i> sp.
15	J15	-	<i>Candida</i> sp.
16	J16	-	<i>Candida</i> sp.
17	J17	-	<i>Candida</i> sp.
18	J18	-	<i>Candida</i> sp.
19	J19	-	<i>Candida</i> sp.
20	J20	-	<i>Candida</i> sp.
21	J21	-	<i>Candida</i> sp.

Tabel 2. Karakter fisiologi dan morfologi isolat khamir selulolitik dari tanah Hutan Bukit Dua belas Jambi

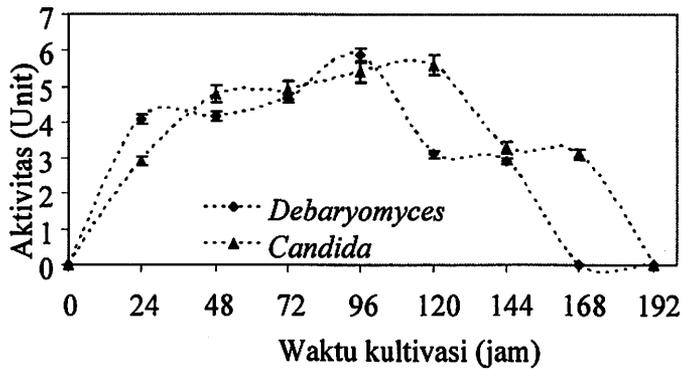
Isolat	Morfologi	Fisiologi	Nama marga
J1	Morfologi sel <i>globose</i> , <i>ellipsoidal</i> atau <i>elongate</i> . Reproduksi dengan <i>holoblastic budding</i> . <i>Pseudohypa</i> kadang-kadang membentuk septa. Tidak membentuk <i>arthroconidia</i> dan <i>ballistoconidia</i> selama siklus hidupnya.	Reaksi <i>Diazonium Blue D</i> dan tes DNase negatif. Tidak memproduksi bahan <i>stacrh</i> .	<i>Candida</i> sp
	Morfologi sel <i>globose</i> . Pertumbuhan vegetatif dengan <i>multilateral budding</i> . <i>Pseudomycellium</i> terbentuk dengan baik. Askospora berbentuk <i>globose</i> , dengan permukaan sel yang licin. Askospora terbentuk 2 atau 4 pada tiap askus.	Fermentasi negatif untuk beberapa sumber karbon yang diuji. Tidak dapat mengasimilasi nitrat sebagai satu-satunya sumber nitrogen. Reaksi <i>Diazonium Blue D</i> dan tes DNase negatif.	<i>Debaryomyces</i> sp



Gambar 1. Profil pertumbuhan isolat J1 dan J2 selulolitik pada media CMC



Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap perubahan pH media CMC cair pada penentuan pH optimum kerja enzim



Gambar 3. Hubungan antara waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim pada penentuan optimasi kerja enzim

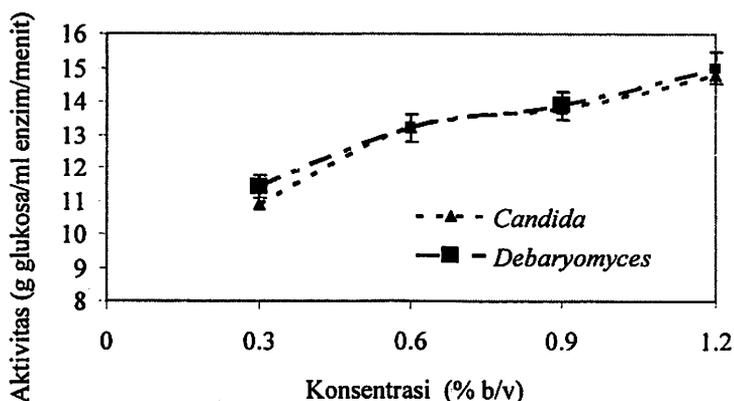
(Gambar 1,2, dan 3). Aktivitas enzim maksimum pada hari ke-4, dan menurun setelah hari ke 4 (Gambar 3). Keterkaitan antara waktu inkubasi, pH, dan jumlah biomassa, menunjukkan bahwa ketiga proses tersebut saling mempengaruhi, seperti dikemukakan oleh Kim, 1995. Pada waktu inkubasi optimum, kecepatan reaksi enzimatik maksimum (Dees *et al.*, 1995; Gal *et al.*, 1997). Setelah waktu inkubasi optimum, 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 J1 dan J2 masing-masing sebesar $7,7 \times 10^{-3}$ (μg glukosa/ml/menit) dan $8,4 \times 10^{-3}$ (μg glukosa/ml/menit).

Berdasarkan data yang diperoleh dari gambar 2 dan 4, pH optimum untuk isolat J1 adalah 7,79 dan isolat J2 adalah 7,73. Optimasi kerja enzim ini

diperlukan untuk menentukan besarnya V_{maks} dan K_m dari kerja enzim CMC-ase yang diamati.

K_m dan V_{maks}

Pengaruh perubahan konsentrasi substrat CMC terhadap kecepatan reaksi enzimatik dapat dilihat pada kurva Michaelis-Menten pada gambar 4. Menurut Enari (1983), pada konsentrasi 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



Gambar 4. Hubungan antara konsentrasi substrat dengan aktivitas enzim pada penentuan optimasi kerja enzim

enzim telah jenuh terisi oleh substrat sehingga tidak berfungsi lebih cepat lagi.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari gambar 5, 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.

Penentuan harga K_m dan V_{maks} ditentukan berdasarkan persamaan Michaelis-Menten yang menyatakan bahwa; $1/v = K_m/V_{maks} (1/[S]) + 1/V_{maks}$. Karena K_m dan V_{maks} suatu konstanta, maka persamaan ini dapat dianalogikan dengan persamaan regresi; $y = a + bx$, dimana $y = 1/v$, $x = 1/[S]$, $a = 1/V_{maks}$, dan $b = K_m/V_{maks}$, 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 6. Berdasarkan perhitungan menggunakan persamaan diatas diperoleh besarnya nilai K_m untuk isolat J1 dan J2 masing-masing adalah $6,6 \times 10^{-2}$ dan $7,5 \times 10^{-2}$ (% b/v). Sedangkan besarnya V_{maks} dari isolat 1 dan 2 masing-masing sebesar $8,28 \times 10^{-3}$ dan $30,66 \times 10^{-3}$ μg glukosa/ml enzim/menit.

PEMBAHASAN

Khamir tanah *Candida* sp merupakan khamir yang mempunyai variasi jenis yang sangat luas, khamir ini termasuk ke dalam kelompok *anamorphic ascomycetous* yang tidak melaku-

kan reproduksi secara seksual selama siklus hidupnya. *Debaromyces* sp merupakan khamir yang termasuk ke dalam kelompok *telemorphic ascomycetous* yang melakukan reproduksi secara seksual dengan pembentukan askospora. Keberadaan khamir selulolitik di tanah seperti *Candida* sp. membantu proses degradasi material organik yang sebagian besar berasal dari tanaman. Jenis khamir selulolitik bervariasi seperti misalnya *Williopsis*, *Trichosporon* juga merupakan khamir tanah selulolitik penting yang dilaporkan oleh Nakase *et al.* (1994); Steven & Payne (1977).

Selain khamir, bakteri selulolitik juga umum ditemukan pada lahan gambut dengan pH rendah (Hiroki dan Watanabe 1996). *Candida* sp, juga banyak ditemukan di tanah Kebun Biologi Wamena (Kanti dan Latupapua, 2001). Diversitas jenis khamir tanah diantaranya ditentukan oleh; kandungan dan jenis senyawa organik, temperatur, pH, aerasi, kadar air, dan kandungan senyawa alelopati (Spencer 1997). Penelitian ini juga membuktikan bahwa pH rendah dari lahan gambut bukan menjadi faktor penghambat pertumbuhan khamir. López-Archilla *et al.*, 2004 menemukan 6 marga khamir basidiomycetes (*Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Tremella*, *Holtermannia*, *Leucosporidium*, dan *Mrakia*) dan 2 dari marga ascomycetes (*Candida* dan *Williopsis*) pada air sungai dengan pH yang sangat rendah. Yarrow (1997) melaporkan bahwa khamir mempunyai kemampuan untuk hidup pada pH 3.7, akan tetapi khamir yang merupakan kelompok

marga *Schizosaccharomyces* tidak dapat tumbuh pada pH yang terlalu rendah. Jenis marga ini hanya mampu tumbuh pada kisaran pH sekitar 4,5–5,0. Kemampuan *Candida* sp J1 menggunakan selulosa mengindikasi bahwa lahan gambut Taman nasional Bukit Dua belas mengandung banyak bahan organik yang mengandung selulosa. Penggunaan selulosa yang efisien oleh mikroba yang mampu mendegradasi senyawa yang kompleks tersebut dengan aktivitas enzim selulase merupakan strategi untuk dapat hidup pada pH rendah. Keberadaan *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., dan *Cryptococcus* sp., ditanah menunjukkan bahwa keragaman jenis khamir tanah menarik untuk dipelajari. Aktivitas enzim selulase yang diproduksi selama pertumbuhan berfluktuasi menunjukkan bahwa aktivitas hidrolisis selulosa didalam tanah dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti variasi jenis organisme, pH, dan status metabolisme mikroba selulolitik.

KESIMPULAN

Khamir lahan gambut Bukit Dua Belas Jambi, didominasi oleh *Candida* sp., khamir lain yang ditemukan adalah *Cryptococcus* sp, dan *Rhodotorula* sp. Ditemukan 2 jenis khamir selulolitik yaitu *Candida* sp., dan *Debaryomyces* sp. Keragaman Jenis khamir Lahan gambut menarik untuk dipelajari lebih lanjut, karena beberapa dari isolat yang didapatkan mampu melakukan dekomposisi selulosa menjadi glukosa. Khamir

selulolitik akan sangat bermanfaat untuk dikembangkan lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh proyek DNA material tahun 2003-2004. Ucapan terima kasih ditujukan kepada Pusat Penelitain Biologi LIPI dan Dr. Sri Sulandari selaku koordinator kegiatan proyek ini dan juga kepada semua anggota Laboratorium Genetika, Bidang Zoologi atas kerjasamanya

DAFTAR PUSTAKA

- Abe S., S. Horii & K. Kameoka. 1979. Application of enzymatic analysis with glucoamylase, pronase and cellulase to various feeds for cattle. *J. Anim. Sci.* 48:1483-1490.
- Alexander. 1997. *Introduction to soil Microbiology*. 2nd ed. John Willey and Sons, Inc. New York.
- Coughlan MP & F. Mayer. 1992. The cellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. Dalam Balows A, HG Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (Eds). *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. 2nd eds. Edited by Springer-Verlag, New York. pp 460-516.
- Dees C., D. Ringelberg, TC. Scott, & TJ. Phelps. 1995. Characterization of the cellulose degrading bacterium NCIMB 10462. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51: 263-274.
- Deng SP. & MA. Tabatai. 1994. Cellulase Activity of soil. *Soil Biol Biochen.* 26: 1347 – 1354.

- Enari, TM. 1983. Microbial cellulase. *Dalam* Fogarty, WM. (Eds). *Microbial Enzymes Biotech.* 183-223.
- Gal L, S. Pagés, C. Gaudin, A. Belaich, C. Reverbel-leroy, C. Tardif & JP. Belaich. 1997. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) produced by *Clostridium cellulolyticum*. *Appl Environ Microbiol* 63: 903-909.
- Hatano, T., K. Mutsuko, C. Zhifeng, K. Meiko, M. Tokichi & F. Sakuzo. 1991. Purification and Characterization of a Carboxy-methylcellulose Degrading Enzyme Secreted by a Yeast Strain Newly Isolated from Soil. *J. Ferment. Bioengi.* 71: 313 – 317.
- Hiroki M & MM.Watanabe. 1996. Microbial community and rate of cellulose decomposition in peat soils in a mire. *Soil Sci Plant Nut.* 42: 893–903.
- Joson, LM & LM Coronel. 1986. Isolation, screening and characterisation of cellulose utilizing bacteria. *The Philip.J. Sci.* 3: 223-226.
- Kanti. A & HJD. Latupapua. 2001. Identifikasi Keragaman Khamir yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena Kabupaten Jayawijaya, Propinsi Papua. *J. Biologi Indonesia.* 3. (2).
- Kim CH. 1995. Characterization and substrate specificity of an endo- β -1,4-D-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Appl Environ Microbiol* 61: 959-965.
- Kurtzman CP. & JW. Fell. 1998. *The Yeast, A Taxonomic Study*. Elsevier. Amsterdam, The Netherland.
- López-Archilla, AI, AE. González, MC. Terrón & R. Amils. 2004. Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in southwestern Spain. *Can. J. Microbiol. Rev. Can. Microbiol.* 50: (11), 923-934.
- Nakase, T., S. Matofumi, T. Masako, H. Makiko, H. Takushi & 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*. *J. Gen. Appl. Microbiol* 40 : 519 – 531.
- Shoham Y., R. Lamed & EA. Bayer. 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the polysaccharide degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol* 7: 275-281.
- Spencer JFT. 1997. *Yeast in Natural and Artificial Habitats*. Springer-Verlag, Berlin Heildelberg. Germany.
- Stevens BJ & J. Payne. 1977. Cellulase and Xylase Production by Yeasts of the genus *Trichosporon*. *Journal of General Microbiology* 100: 381-393.
- Yarrow. D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. *Dalam* Kurtzman CP. & JW. Fell. *The Yeast A Taxonomic Study*. Elsevier. Amsterdam, The Netherland 77–80.