

PEMANFAATAN BERBAGAI JENIS PATI SEBAGAI SUMBER KARBON UNTUK PRODUKSI α -AMILASE EKSTRASELULER *Bacillus* sp SW₂

Trismilah, Budiasih Wahyuntari

Bidang Teknologi Biokatalis, Pusat Teknologi Bioindustri, BPPT

Lab. Teknologi Bioindustri - LAPTIAB, PUSPIPTEK, Serpong, 15314.

Tel. /Fax 3169513/3169510 dan Tel./ Fax 7560536 ext.122, e-mail: trismilah_m@yahoo.com

Abstract

Currently enzymes become a need of food and non-food industries. Alpha amylase (α -1,4 glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) is an enzyme that hydrolyses starch into oligosaccharides and dextrin. The enzyme has been commercially available which mostly produced by *Bacillus* spp. The bacterium used in this experiment was *Bacillus* sp SW₂, which was isolated from Composting Unit at Bumi Serpong Damai, Tangerang. The aim of this experiment was to find the most appropriate starch as a carbon source for enzyme production. The starches observed were tapioca, potato, and cornstarch at concentration of 5%. The fermentation was conducted in shaking incubator, in 125 ml Erlenmeyer at 60°C, various pHs, and agitations. The pHs observed were 6, 7.5, 8 and 9 while the rates of agitation applied were 150, 200, and 250 rpm. The results showed that the highest enzyme activity was 20.99 Unit/ml, which was reached after 42 hours of fermentation using cornstarch, pH 8 and 200 rpm agitation.

Kata kunci: α - amylase, *Bacillus* sp SW₂, cornstarch

1. PENDAHULUAN

Sebagai negara yang banyak menghasilkan bahan berpati seperti ubi kayu, sagu, jagung dan lain-lain, Indonesia sangat berpotensi untuk mengembangkan industri penghasil enzim, terutama α -amilase. Pemanfaatan bahan berpati yang selama ini belum maksimal dan masih terbatas pada cara-cara yang konvensional dapat ditingkatkan dengan proses pengembangan secara enzimatis. Hal ini akan dapat meningkatkan nilai ekonominya dan sekaligus dapat meningkatkan pendapatan negara. Di lain pihak, pakar dari negara maju mengakui bahwa negara 2005 adalah 200-250 ton untuk industri tekstil, 100-190 ton untuk industri makanan dan Farmasi, 500-610 ton untuk industri deterjen, diprediksi kenaikan per tahun 5-10%. Perkiraan nilai pasar enzim di Indonesia untuk industri Farmasi (kesehatan) adalah 2.25 triliun rupiah, industri deterjen adalah 18 triliun rupiah, industri tekstil 21,9 miliar rupiah dan pakan ternak 9,6 miliar rupiah.

Salah satu enzim yang saat ini sangat besar penggunaannya dalam industri makanan dan minuman Indonesia adalah α -amilase. Enzim ini

yang kaya biodiversitasnya (termasuk Indonesia) merupakan sumber mikroba maupun tanaman yang potensial untuk *bioprocessing* (Fox, 1994).

Enzim adalah protein yang tersusun atas serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Di dalam sel, enzim memegang peranan dalam berbagai reaksi biokimia, antara lain konversi energi, metabolisme pertahanan sel, komunikasi antarsel sampai ke konversi sifat keturunan.

Penggunaan enzim dalam industri di Indonesia akhir-akhir ini meningkat dengan tajam. Menurut Pharma Material Management Clubs (2008) konsumsi enzim di Indonesia tahun 2003- dimanfaatkan untuk konversi bahan berpati. Selain dimanfaatkan dalam industri pangan, amilase juga digunakan dalam industri tekstil, deterjen, dan digunakan juga pada pengujian diabetes dalam bidang kedokteran. Walaupun penggunaan amilase sangat besar, seperti dalam industri bahan pangan, farmasi dan tekstil dan harga impor yang amat tinggi, namun dipihak lain untuk memproduksi enzim masih terdapat kendala-kendala yaitu kurangnya kajian tentang teknologi produksi enzim skala besar serta tidak tersedianya galur mikroba unggul penghasil amilase.

Untuk memproduksi enzim, fermentasi menggunakan media cair banyak dipilih karena banyak keuntungan yang dapat diperoleh, seperti kemudahan dalam pengontrolan kondisi lingkungan, biaya operasional lebih rendah, dan tidak memerlukan tempat terlalu luas. Produksi enzim dengan cara tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu seleksi mikroba, komposisi media fermentasi, faktor lingkungan yang meliputi pH, suhu, agitasi, dan aerasi (Whitaker, 1972).

Peneliti sebelumnya telah mengisolasi *Bacillus sp* SW2 dari pusat pengolahan kompos Bumi Serpong Damai, Tangerang dan dikoleksi di Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika (LAPTIAB), Pusat Teknologi Bioindustri (PTB), Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPP Teknologi). *Bacillus sp* SW2 merupakan bakteri termofil yang memproduksi enzim amilolitik (Long-Liu Lin *et al.*, 1998) Karakterisasi menunjukkan bahwa enzim tersebut merupakan enzim α -amilase yang memiliki suhu dan pH optimum masing-masing 70°C, pH 7 dan diperkirakan memiliki berat molekul 150 kD (Apriliani, 2003; Kohji O. *et al.*, 1999; Sanoja, R.R. *et al.*, 2000). Pemakaian *Bacillus sp* SW2 yang diisolasi dari alam memberikan alternatif lain dalam pendayagunaan mikroba, selain itu *Bacillus sp* SW2 bersifat termofilik yang tidak menunjukkan pertumbuhan pada 37°C (Widyasti, 2003) sehingga diharapkan dapat memproduksi α -amilase yang mempunyai stabilitas baik dan tahan pada suhu tinggi. Kondisi optimum untuk memproduksi enzim α -amilase dari *Bacillus sp* SW₂ disesuaikan dengan kondisi optimum pertumbuhan sel yang telah dilakukan oleh penelitian sebelumnya yaitu : pH 7,5, suhu 60°C dan agitasi 150 rpm (Widyasti, 2003).

Tujuan penelitian ini adalah mencoba berbagai jenis pati kentang, singkong dan jagung sebagai sumber karbon yang sesuai dan mudah didapatkan untuk produksi enzim α -amilase. Pati yang digunakan dalam percobaan adalah pati kentang, singkong dan jagung. Diharapkan dari penelitian ini dapat diperoleh α -amilase termostabil dari *Bacillus sp* SW₂ yang dapat digunakan pada industri pangan maupun industri non pangan.

2. BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri termofil *Bacillus sp* SW2 yang diisolasi dari pusat pengolahan sampah (kompos) Bumi Serpong Damai, koleksi Laboratorium Teknologi, Bioindustri, PTB, BPPT. Media yang digunakan untuk regenerasi baakteri adalah media *starch* agar yang telah dimodifikasi (Atlas dkk. 1997). Komposisi media *starch* agar yang digunakan adalah maizena 2%, agar teknis

1,65%, gum gellan "Gelrite" 0,35%, ekstrak ragi 0,5%, *bacto peptone* 0,5%, K₂HPO₄ 0,05%, MgSO₄·7H₂O 0,05%, CaCl₂·2H₂O 0,1%. Inkubasi regenerasi bakteri dilakukan di inkubator pada suhu 60°C, selama 24 jam, dan biakan tersebut siap digunakan untuk produksi enzim α -amilase.

Pembuatan media inokulum dengan komposisi : pati kentang 1%, ekstrak ragi 0,5%, *bacto pepton* 0,5%, K₂HPO₄ 0,05%, MgSO₄·7H₂O 0,05%, dan CaCl₂·2H₂O 0,1%. Selanjutnya sebanyak 2-3 ose bakteri yang telah diregenerasi diinokulasikan pada media *starch* cair, secara aseptik, lalu diinkubasi selama 8 jam pada suhu 60°C di dalam *shaker incubator* yang berkecepatan 150 rpm sampai jumlah sel mencapai 10⁷ – 10⁸/ml. Jumlah sel dihitung di bawah mikroskop dengan menggunakan alat *counting chamber*.

Tahapan berikutnya adalah fermentasi yang dilakukan di dalam lrlenmeyer 125 ml, volume kerja 25 ml menggunakan *shaker incubator*. Komposisi media fermentasi adalah pati kentang 5%, atau pati singkong 5%, atau pati jagung 5%, urea 0,2%, dan molases 0,5%. Kondisi fermentasi untuk masing-masing pati adalah pH 7,5 (awal), suhu 60°C, agitasi 150 rpm, dan waktu 42 jam. Pengamatan dilakukan setiap 6 jam sekali. Fermentasi tahap pertama untuk menentukan komposisi media yang bagus yang selanjutnya akan digunakan pada fermentasi tahap kedua, yaitu menentukan kondisi pH dan agitasi yang sesuai. Variasi pH 6; 7,5 ; 8; 9 dan variasi agitasi 150, 200 dan 250 rpm.

Fermentasi tahap kedua substrat pati yang digunakan adalah substrat pati yang terbaik 5% setelah diketahui nilai aktivitas enzim α -amilase dan kandungan gula reduksinya tinggi.

Jumlah sel dihitung dengan menggunakan hemasitometer. Kemudian sampel disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 20 menit pada suhu ruang. Penentuan aktivitas α -amilase dilakukan dengan metode DNS (Bernfeld, 1955). α -amilase akan mereduksi pati menjadi maltosa yang dengan asam 3,5-Dinitrosalisilat membentuk kompleks warna yang dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer (Stellmach 1988), dan selanjutnya dilakukan analisis kandungan gula reduksi.

Prosedur analisis yang dilakukan adalah: sebanyak 0,1 ml larutan pati 1% dalam larutan buffer fosfat pH 6 dicampur dengan 0,1 ml filtrat enzim, kemudian diinkubasi 15 menit dalam *water bath* dengan suhu 70°C. Setelah dingin ditambahkan 0,2 ml *reagen* DNS kemudian divorteks dan dipanaskan dalam air mendidih (100°C) selama 5 menit lalu didinginkan sampai mencapai suhu ruang dan ditambahkan akuades sebanyak 2 ml kemudian divorteks. Sampel diukur

menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm. Maltosa yang dihasilkan dihitung dengan persamaan: $Y = 1759,7X - 31,285$.

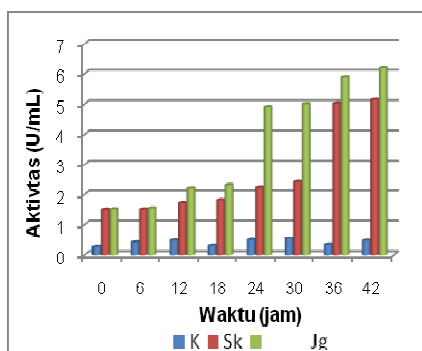
Aktivitas enzim α -amilase dinyatakan berdasarkan dalam satuan Unit per ml cairan enzim. Satu unit aktivitas setara dengan satu mikromol maltosa yang dihasilkan dari perlakuan enzim terhadap larutan pati 1 % selama 1 menit.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sumber karbon merupakan salah satu komponen yang paling penting dalam media fermentasi, karena komponen sel mikroba sebagian besar terdiri atas unsure- unsure karbon. Karbohidrat merupakan sumber karbon yang paling banyak digunakan dalam suatu proses fermentasi dan salah satunya adalah pati.

Penentuan media fermentasi terbaik didasarkan atas hasil analisis yang meliputi analisa aktivitas enzim α -amilase dan kandungan gula reduksi yang dihasilkan.

Gambar 1 menunjukkan hubungan antara penggunaan substrat pati dan aktivitas enzim α -amilase pada kondisi fermentasi pH 7,5, suhu 60°C dan agitasi 150 rpm. Aktivitas enzim α -amilase meningkat secara bertahap, peningkatan aktivitas dimulai setelah jam ke-12, diduga persediaan komponen utama sumber nutrisi dan sumber karbon yang dipergunakan untuk aktivitas bakteri masih tersedia dan hal ini akan berpengaruh pada terbentuknya enzim dan aktivitasnya dalam menghidrolisis substrat. Pati kentang memiliki nilai aktivitas sebesar 0,47 U/ml dan pati singkong sebesar 5,15 U/ml. Pada gambar tersebut juga terlihat bahwa aktivitas enzim α -amilase tertinggi diperoleh dari substrat pati jagung dibandingkan dengan kedua substrat lainnya, yaitu sebesar 6,22 U/ml yang dicapai pada jam ke 42.

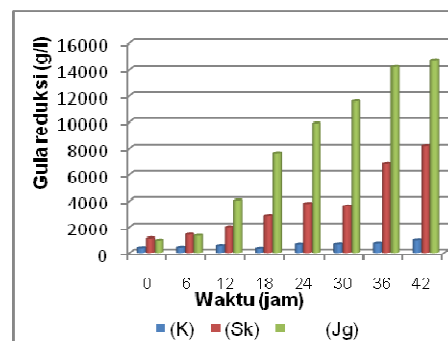


Gambar 1 : Aktivitas α -amilase dengan substrat pati kentang(K), pati singkong (Sk), pati jagung(Jg) dari *Bacillus sp* SW2 di dalam erlen meyer, suhu 600C, pH awal 7.5, agitasi 150 rpm.

Perbedaan aktivitas enzim α -amilase ini juga dapat disebabkan oleh perbedaan kandungan nutrisi di dalam masing-masing substrat, bentuk granula, viskositas, dan terbentuknya busa pada saat proses fermentasi berlangsung karena agitasi, sebagai pengaruh adanya protein dalam substrat. Busa ini akan membentuk lapisan penutup yang tidak akan segera hilang dan menyebabkan perpindahan sel dari medium ke permukaan yang dapat menyebabkan autolisis.

Perbedaan kandungan protein dan lemak pada substrat juga dapat menyebabkan perbedaan aktivitas enzim α -amilase. Kandungan protein dan lemak pada pati jagung adalah sebesar 10% dan 4,5% sedangkan pada pati singkong adalah sebesar 0,5% dan 0,1% (Brautlecht, 1983).

Gula reduksi merupakan produk yang dihasilkan dari proses hidrolisis pati oleh enzim yang disekresikan oleh bakteri di dalam cairan fermentasi. Kandungan gula reduksi dalam cairan fermentasi yang dihasilkan dari semua substrat pati cenderung mengalami kenaikan yang terus menerus. Gula reduksi hasil fermentasi dapat dilihat pada Gambar 2, untuk substrat pati kentang, pati singkong dan pati jagung gula reduksi mengalami nilai tertinggi pada jam ke-42 masing-masing yaitu sebesar 0.994 g/l, 8,187 g/l dan 14,697 g/l. Laju hidrolisis akan lebih cepat pada rantai molekul yang lurus, sehingga hidrolisis amilosa lebih cepat daripada hidrolisis rantai molekul yang bercabang seperti amilopektin (Suhartono 1989).



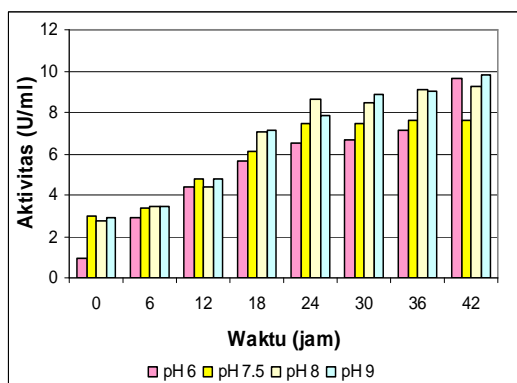
Gambar 2 : Gula reduksi pada produksi α -amilase dengan substrat pati kentang(K), pati singkong (Sk), pati jagung(Jg) dari *Bacillus sp* SW2 didalam erlen meyer, suhu 600C, pH awal 7.5, agitasi 150 rpm.

Perbedaan kandungan amilosa dan amilopektin pada pati singkong dan pati jagung juga dapat menyebabkan terjadinya perbedaan aktivitas enzim dan gula reduksi yang dihasilkan dengan menggunakan pati tersebut. Pati jagung berdasarkan analisis (Joslyn 1984) mengandung amilosa sebesar 27% dan amilopektin sebesar 73%, kandungan amilosa dan amilopektin ini lebih

besar dari pada pati singkong yang kandungan amilosanya hanya sebesar 19% dan amilopektin sebesar 81% (Norman, 1979 dalam Shahib,1997). Pemecahan pati oleh enzim tergantung sumber enzim, tipe atau jenis granula patinya selain itu derajat kristalisasi pati juga akan mempengaruhi pula kemampuan enzim untuk memecah ikatan granula pati. Banks dan Greenwood dalam Pomeranz (1976) mengemukakan bahwa di atas suhu gelatinasi, kristalisasi membentuk suatu senyawa struktur yang kompak yang sulit dilalui oleh enzim α -amilase. Berdasarkan pernyataan tersebut diduga adanya perbedaan derajat kristalisasi antara pati kentang, pati singkong, dan pati jagung juga menyebabkan terjadinya perbedaan aktivitas enzim α -amilase pada ketiga pati tersebut.

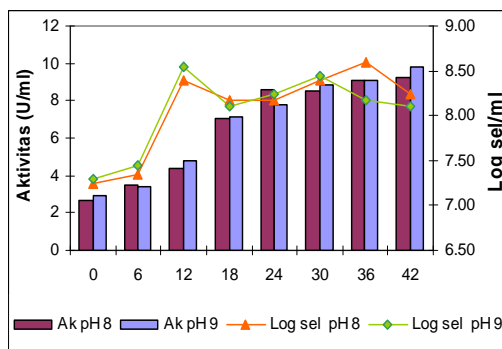
Salah satu faktor penting yang sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan aktivitas enzim adalah nilai pH media. Pengaruh ini dapat diamati pada aktivitas enzim, kandungan gula reduksi dan biomassa. Hasil pengamatan terhadap parameter-parameter tersebut dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4.

Hasil percobaan diketahui bahwa aktivitas enzim tertinggi didapat pada pH 8, yaitu sebesar 9,26 U/ml dan pH 9 sebesar 9,82 U/ml, sehingga pH 8, dan pH 9 merupakan pH optimum enzim. Untuk pH 6 dan 7,5, aktivitas enzim memiliki nilai aktivitas yang rata-rata lebih kecil dibandingkan pH 8 dan pH 9 sehingga dapat disimpulkan bahwa α -amilase dari *Bacillus sp* SW2 lebih efektif di dalam media fermentasi yang berada pada kondisi alkali. (Moat, 1979) menjelaskan bahwa nilai pH akan berpengaruh langsung pada permeabilitas sel dan aktivitas fisiologi lainnya. Di dalam cairan fermentasi, pH mempengaruhi senyawa protein, baik enzim maupun sistem transpor yang terdapat dalam sel.



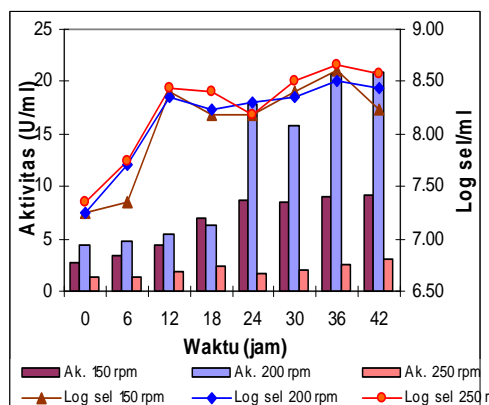
Gambar 3: Aktivitas α -amilase dari *Bacillus sp* SW2, substrat pati jagung(Jg) pH awal 8,9 suhu 60°C, agitasi 150 rpm

Peningkatan aktivitas enzim mulai terdeteksi pada jam ke -12 dan terus meningkat hingga mencapai pada fase stasionernya (jam ke-18 sampai jam ke 42). Namun, nilai kandungan gula reduksi rata-rata tertinggi untuk setiap jamnya diperoleh pada pH 8 dan pH 9. Pertumbuhan sel bakteri *Bacillus sp* SW2 dapat dilihat pada Gambar 4, mengalami fase lag selama rentang waktu 0 sampai 12 jam. Selanjutnya pada jam ke-12 sel mencapai fase stasioner yang ditandai dengan meningkatnya kekeruhan pada media fermentasi.



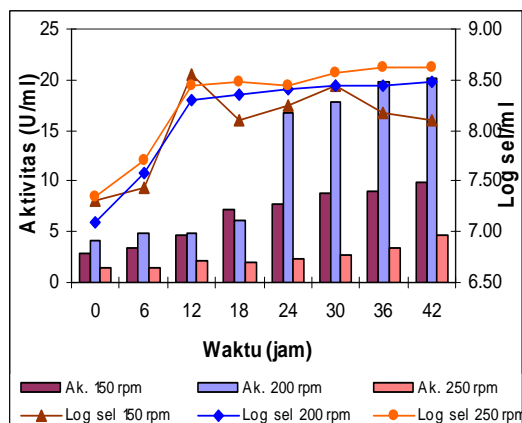
Gambar 4 : Aktivitas, Logsel/mL pada pembuatan α - amilase dari *Bacillus sp* SW2, substrat pati jagung pH awal 8,9 suhu 60°C, agitasi 150 rpm

Pertumbuhan sel untuk pH 8 dan 9 di dalam penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan nilai logaritma sel yang begitu nyata. Untuk mengetahui seberapa jauh hubungan kecepatan agitasi terhadap pertumbuhan bakteri, aktivitas enzim dan kandungan gula reduksinya, dilakukan penelitian variasi agitasi sebesar 150 rpm, 200 rpm dan 250 rpm dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5 untuk pH 8, dan Gambar 6 untuk pH 9.



Gambar 5 : Aktivitas, Logsel/mL pada pembuatan α - amilase dengan pati jagung dari *Bacillus sp* SW2, pH awal 8 di dalam erlenmeyer suhu 60°C, agitasi 150, 200 dan 250 rpm

Dari Gambar 5 dan Gambar 6 nampak bahwa aktivitas enzim tertinggi untuk agitasi 150 rpm diperoleh pada pH 8, yaitu sebesar 9,26 U/ml dan pada pH 9 sebesar 9,82 U/ml dengan perbedaan nilai yang tidak begitu jauh, sedangkan untuk agitasi 200 rpm yang tertera pada Gambar 5 menunjukkan bahwa aktivitas enzim tertinggi, diperoleh pada pH 8, yaitu sebesar 20,99 U/ml yang dicapai pada jam ke-42, sedangkan pH 9 nilai aktivitas enzimnya sebesar 20,22 U/ml yang dicapai pada jam ke-42. Pada awal fermentasi, yaitu pada fase lag, tidak terlihat adanya peningkatan aktivitas enzim yang begitu nyata. Peningkatan aktivitas dimulai setelah jam ke-18 dan aktivitas masih terus berlanjut sampai jam ke-42, ini dikarenakan persediaan komponen sumber karbon dan nitrogen masih mencukupi bagi mikroba untuk beraktivitas. Aktivitas α -amilase dari pati jagung hasil penelitian pada fermentasi jam ke 18 memberikan aktivitas 7,2 U/ml, kondisi pH awal 8, suhu 37°C agitasi 200 rpm, sedangkan hasil penelitian Prawira Y. (2002) α -amilase dari *Bacillus subtilis* ATCC 6633 memberikan aktivitas 8,39 U/ml fermentasi menggunakan substrat pati sagu 5%, pH awal 8, suhu 37°C agitasi 250 rpm.



Gambar 6 : Aktivitas, Logsel/mL pada pembuatan α -amilase dengan pati jagung dari *Bacillus sp* SW2, pH awal 9 di dalam erlenmeyer suhu 60°C, agitasi 150, 200 dan 250 rpm

Aktivitas enzim yang paling rendah diperoleh dari media fermentasi yang beragitasi 250 rpm seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5 dan Gambar 6, yaitu untuk pH 8 sebesar 3,12 U/ml dan pH 9 sebesar 4,67 U/ml yang sama-sama diperoleh pada jam ke-42. Untuk nilai kandungan gula reduksi pada pH 8 menghasilkan 28,966 g/l sedangkan pH 9 sebesar 50,787 g/l yang

keduanya sama-sama dihasilkan pada jam ke-42 (Gambar tidak ditampilkan).

Rendahnya nilai aktivitas enzim dan kecilnya rata-rata kandungan gula reduksi setiap 6 jamnya dari penelitian ini diduga karena pengaruh pasokan atau transfer oksigen ke dalam cairan media fermentasi dan kontak antara substrat dengan mikroba yang berlebihan akibat guncangan yang terlalu berlebihan, karena menurut (Casida 1984) mengatakan bahwa pengocokan dan transfer oksigen yang berlebihan pada medium fermentasi akan menimbulkan busa, penampakan busa ini diakibatkan karena adanya protein pada media tersebut. Busa yang terbentuk dapat juga disebabkan karena terjadinya autolisis pada mikroba, lepasnya dinding sel yang mengandung protein – protein yang berasal dari mikroba tersebut justru akan menstabilkan busa sehingga kemampuan sel untuk terus tumbuh berkembang menjadi terhambat, dengan terhambatnya perkembangan sel khususnya massa sel menyebabkan enzim yang disekresikan sedikit. Sebagai konsekuensi dari hal tersebut, aktivitas enzim menjadi rendah. Hasil penelitian para peneliti dari India (D. Dhanasekaran *et al.*, 2007) dalam memproduksi α -amilase dari *Bacillus sp.* memberikan aktivitas 1,61 μ mol/ml/min menggunakan soluble starch 0,8%, pH 7,5 dan suhu 45 °C.

4. KESIMPULAN dan SARAN

- Penggunaan berbagai jenis pati, (singkong, jagung dan kentang) sebagai sumber karbon pada fermentasi *Bacillus sp* SW2 mampu menghasilkan enzim α -amilase.
- Penggunaan substrat pati jagung sebagai media fermentasi dari *Bacillus sp* SW2 dengan kondisi pH 8, suhu 37°C dan kecepatan agitasi 200 rpm menghasilkan enzim α -amilase dengan nilai aktivitas enzim sebesar 20,99 U/ml.
- Untuk memperoleh kondisi proses produksi yang optimal dan untuk meningkatkan aktivitas enzim perlu dilakukan penelitian peningkatan skala. Misal menggunakan fermentor yang kondisi proses fermentasi (pH, suhu, aerasi, agitasi) dapat diatur dan dijaga.

DAFTAR PUSTAKA

Apriliani D. 2003. Karakterisasi enzim α -amilase ekstraseluler isolat bakteri termofil dari pusat pengolahan kompos Bumi Serpong Damai Tangerang [Skripsi]. Fakultas Matematika dan

- Ilmu Pengetahuan Alam jurusan Kimia, Universitas Indonesia, Depok.
- Atlas RM. and C. Lawrence. 1997. *Hand Book of Microbiological Media*. Ed. 2. CRC. Press. Boca Raton.
- Bernfeld P. 1955. Amylases α - and β -. Didalam : Collowick SP, Kaplan NO (ed). *Methods in Enzymology*. New York: Academic Pr. hlm 149-158.
- Brautlecht, CA. 1983. *Starch. It's Resource Production and Uses*. Book Division Reinhold Publishing Cooperation. New York.
- Casida, CE. 1984. *Introduction to the Bacteria*. Kogakhusa Company, New Delhi.
- D. Dhanasekaran, P. Sivamani, G. Rajakumar, A. Panneerselvam, N. Thajuddin 2007. Studies On Free And Immobilised Cell Of *Bacillus Species* On The Production Of α -Amylase. *The Internet Journal Of Microbiol.* 2 Number 2.
- Data Consultan, PT. 2008. Pharma Material Management Clubs, Jakarta.
- Fox JL. 1994. *Biodiversity Promise Great Prospecting*. Biotechnology. Vol 13. New York.
- Joslyn MA. 1984. *Food Prosesing Operation, The Management, Machines, Material and Methode*. The AVI Publishing comp. Inc. Westport.
- Kohji Ohdan, Takashi Kuriki, Hiroki Kaneko, Jiro Shimada, Toshikazu Takada, Zui Fujimoto, Hiroshi Mizuno & Shigetaka Okada. 1999. Characteristic of two forms of α -amilase and structural implication. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (10):4652-4658.
- Long-Liu Lin, Charng-Cherng Chyau & Wen-Hwei Hsu. 1998. Production and properties of raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28: 61-68.
- Moat GA. 1979. *Microbial Physiology*. John Wiley and Sons. New York
- Pomeranz Y. 1976. *Food Analysis : Theory and Practise*. AVI. Pub. Co. Westport, Connecticut
- Prawira Y. 2002. Pengaruh Perbandingan Kadar Unsur C/N Pada Produksi Enzim α -amilase menggunakan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Dengan Sumber Karbon Glukosa Dan Sumber Nitrogen Amonium Nitrat., [Skripsi] Jakarta : Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.
- Sanoja, R.R., J.M. Guyot, J. Pintado, N. Juge & J.P. Guyot. 2000. Comparative characterization of completed and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amilase and role of the C-terminal direct repeat in raw starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(8):3350-3356.
- Shahib MN. 1997. Pembuatan Dekstrin dari Pati Tapioka dengan Enzim α -amilase., [Skripsi] Serpong : Fakultas Teknologi Pertanian Institut Teknologi Indonesia
- Stellmach B. 1988. A Bestimmungs. Methoden Enzyme Fur Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik Biochemie Biologie. Medizen Steiinkoff Verlag Darmstadt.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor
- Whitaker JR. 1972. *Principle of Enzymology for The Food Science*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Widyasti E. 2003. Isolasi dan Optimasi Suhu dan pH Pertumbuhan Bakteri Termofil Penghasil Amilase Termotabil [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Institut Pertanian Bogor. Bogor