

Eksplorasi Mikroorganisme Termofil Indigenus Dari Sumber Air Panas Gedongsongo Sebagai Penghasil Enzim Termostabil

Isworo Rukmi, Agung Suprihadi, Arina T. Lunggani dan Budi Rahardjo

Departemen Biologi- Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedharto, SH. Tembalang, Semarang 50275, Indonesia.
Email: isworo.rukmi@gmail.com

ABSTRAK

Mikroorganisme termofil merupakan suatu sumber untuk mendapatkan enzim ekstraseluler termotoleran yang penting dalam industri. Isolasi bakteri termofil dari dua sampel air yang berasal dari sumber air panas geotermal di Gedongsongo Jawa Tengah pada lokasi yang telah ditentukan ini bertujuan untuk mendapatkan isolat-isolat bakteri termofil indigenus yang potensial menghasilkan enzim amilase, protease dan selulase termotoleran. Isolasi dilakukan dengan medium selektif Skim Milk Agar, CMC Agar dan Nutrien Amilum Agar. Inkubasi dilakukan pada suhu 55°C. Koloni yang menunjukkan aktivitas enzim diisolasi ke dalam medium Nutrient Agar. Uji aktifitas enzim dilakukan pada medium yang mengandung skim milk untuk protease, amilum untuk amilase dan CMC untuk selulase, inkubasi dilakukan pada 55°C selama 72 jam. Pengamatan morfologi dan sifat gram isolat juga dilakukan. Penelitian ini menghasilkan 4 isolat bakteri proteolitik termotoleran yang terdiri dari 2 isolat gram positif kokus dengan indeks proteolitik tertinggi 1,40; 2 isolat gram negatif kokus dengan indeks proteolitik tertinggi 3,5. Enam isolat bakteri amilolitik termofil terdiri dari 2 isolat gram positif kokus, 2 isolat gram negatif kokus, satu isolat gram positif batang dan satu isolat gram negatif batang. Indeks amilolitik berkisar dari 1,29-2,50. Tujuh bakteri selulolitik termofil terdiri dari 5 isolat gram positif kokus dengan indeks selulolitik tertinggi 5,0; satu isolat kokus gram negatif, dengan indeks selulolitik 7,5 satu isolat batang gram positif dengan indeks selulolitik 3,0.

Kata kunci: *termofil, bakteri, amilase, protease, selulase*

ABSTRACT

Thermophilic microorganisms are good source of extracellular termotolerant enzymes for industrial purposes. Isolation of bacteria from water samples taken from specified location at Gedongsongo geothermal hot springs in Central Java has been conducted to obtain indigenous bacterial isolates potential in producing termotolerant amylase, protease and cellulase. Isolation was done using selective medium Skim Milk Agar, CMC Agar and Nutrient Starch Agar, incubated at 55°C. Representative colonies that showed enzyme activities isolated into Nutrient Agar. Enzymes activities from the isolates were examined on media containing skim milk for protease, starch for amylase and CMC for cellulase. Plates incubated at 55°C for 72 hours. Observations of the morphology and properties of gram isolates were also conducted. The result showed that 4 termotolerant proteolytic bacteria has been isolated consisting of 2 isolates gram-positive cocci with the highest proteolytic index 1.40; 2 isolates gram-negative cocci with the highest proteolytic index 3.5. Six isolates of amylolytic bacteria consisted of 2 gram-positive cocci, 2 isolates gram-negative cocci, one isolates of gram-positive rod and one isolates gram-negative rod, with amylolytic indexes almost the same ranging from 1.29-2.50. Seven cellulolytic thermophile bacteria isolated consisted of 5 isolates gram-positive cocci with the highest cellulolytic index 5.0; one isolate gram-negative coccus with cellulolytic index 7.5 and one isolate of gram-positive rod with cellulolytic index 3.0.

Keywords: *thermophile, bacteria, amylase, protease, cellulase,*

1. Pendahuluan

Mikroorganisme termofil merupakan kelompok mikroorganisme yang mampu hidup pada suhu tinggi (Edwards, 1990), baik kelompok bakteri maupun jamur merupakan makhluk hidup yang perannya di dalam ekosistem adalah sebagai agen biodegradasi berbagai macam bahan organik, karena kemampuannya untuk menghasilkan berbagai enzim ekstraseluler. Banyak proses industri baik yang konvensional maupun modern berbahan baku senyawa organik menggunakan mikroorganisme untuk menghasilkan produk. Mikroorganisme industri merupakan galur-galur unggul dalam menghasilkan berbagai enzim. Beberapa tahun terakhir kegiatan eksplorasi mikroorganisme termofil meningkat, untuk mendukung kegiatan industri. Indonesia merupakan salah satu negara yang terletak pada jalur gunung api Pasifik dan lintas Asia, sebanyak 129 gunung api ada di wilayah Indonesia yang sekaligus menjadikannya sebagai negara dengan gunung api terbanyak di dunia (16%) (Darmanto, 2012). Sebagai negara tropis Indonesia merupakan lokasi yang sangat menjanjikan untuk mendapatkan mikroorganisme termofil untuk industri. Kehadiran mikroorganisme di habitat geotermal merupakan suatu peluang untuk mendapatkan isolat-isolat mikroorganisme baik bakteri maupun jamur yang mempunyai potensi untuk menghasilkan berbagai enzim termotabil untuk digunakan dalam berbagai kegiatan penelitian molekuler maupun industri. Selama 40 tahun terakhir mikroorganisme ini telah ditemukan di berbagai habitat yang semula diyakini tidak dapat ditinggali oleh makhluk hidup, misalnya sumber air panas, gunung berapi, kawah gunung berapi, laut dalam dan di berbagai area geothermal (Herbert, 1992 *dalam* Khalil, 2011; Haki & Raskit, 2003 *dalam* Zuraidah, *et al.*, 2011). Kawasan area panas bumi Yellow National Park banyak dihuni oleh kelompok bakteri dan archae, yang beberapa diantaranya bersifat kemoorganotrof, diantaranya kelompok bakteri aerob yaitu *Thermomicrobium*, *Thermoleophylum*, juga kelompok bakteri anaerob *Thermosiphon* dan *Thermotoga* (Willey *et al.*, 2008).

Mikroorganisme yang berasal dari kawasan geotermal merupakan mikroorganisme termofil, atau paling tidak termotoleran, bahkan ekstremofil yang mampu bertahan dan berkembang biak di daerah dengan kondisi yang ekstrem, karena lintasan metabolismenya telah teradaptasi dengan lingkungan tersebut. (Madigan and Mars, 1997 *dalam* Khalil, 2011). Enzim-enzim dari kelompok mikroorganisme ini mendapatkan perhatian khusus dari ilmuwan di seluruh dunia, karena enzim-enzim ini tahan terhadap reagen kimia, pH ekstrem dan suhu yang tinggi, dibandingkan dengan mikroorganisme homolognya yang mesofil. (Akmar *et al.*, 2011 *dalam* Yakhlef & Darbouch, 2012). Contoh aplikasi enzim yang telah dipasarkan luas adalah Taq polimerase, yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* hipertermofil, enzim ini digunakan dalam biologi molekuler sebagai elemen kunci dalam proses polimerisasi DNA. Penggunaan enzim termofilik dalam proses pengolahan polisakarida sangat menguntungkan, karena dapat mengurangi resiko kontaminasi, penurunan kekentalan substrat yang terlalu rendah dan kemungkinan untuk menjaga nilai pH selama proses biotransformasi (Di Lerni *et al.* 1998 *dalam* Khalil, 2011). Eksplorasi enzim mikroorganisme yang dapat mendegradasi polimer misalnya amilase, protease, selulase, xilanase, pululanase masih sangat dibutuhkan oleh berbagai industri, baik makanan, farmasi, kertas, pengolahan limbah, dsb. (Schiraldi *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi mikroorganisme dari habitat geotermal yang berpotensi untuk menghasilkan enzim termotabil baik selulase, amilase maupun protease untuk dikembangkan sebagai mikroorganisme termofil indigenous untuk keperluan industri. Eksplorasi dilakukan di sumber air panas geotermal Gedongsongo Jawa Tengah.

2. Metode

2.1. Pengambilan sampel

Lokasi pengambilan sampel ditentukan secara purposive. Sumber air sampel diukur suhu dan

pH nya, dengan menggunakan termometer dan pH meter. Sampel air sebanyak 500 ml diambil dari dua sumber air panas di Gedongsongo Jawa Tengah dengan menggunakan botol kaca steril, suhu selama perjalanan ke laboratorium tidak dijaga.

2.2. Isolasi mikroorganisme.

Isolasi mikroorganisme dilakukan pada media selektif Skim Milk Agar, CMC Agar dan Amylum Agar secara *pour plate* dan *spread plate*, diinkubasi suhu 55°C pada medium basal untuk isolasi mikroorganisme termofil yang mengandung yeast extract 0,4%, polypepton 0,8%, NaCl 0,2% dan glukosa 0,1% (Baker *et al.*, 2001). Koloni yang representatif dipindahkan ke dalam medium NA miring dan diinkubasikan pada suhu 55°C. (Khalil, 2011).

2.3. Uji aktivitas amilolitik

Uji aktivitas amilase dilakukan dengan menginokulasikan kultur murni isolat bakteri berumur 24 jam pada medium NA yang mengandung pati 1%, diinkubasi pada suhu 55°C selama 72 jam. Permukaan medium selanjutnya dituangi dengan Lugol's iodine, untuk mengamati munculnya daerah halo di sekitar koloni yang menunjukkan terjadinya hidrolisis pati (Khalil, 2011).

2.4. Uji aktivitas selulolitik

Uji aktivitas selulase dari isolat murni kultur bakteri dilakukan dengan menginokulasikan kultur isolat berumur 16 jam pada medium agar yang mengandung 1% CMC, selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu 55°C selama 72 jam. Pengamatan aktivitas selulase dilakukan dengan menuangkan larutan 0.1% (w/v) Congo red dan didiamkan selama 1-2 menit, selanjutnya dibilas dengan 1 M NaCl untuk melihat adanya daerah halo di sekitar koloni (Teather and Wood, 1982 *dalam* Khalil, 2011).

2.5. Uji aktivitas Proteolitik

Aktivitas protease dari isolat termofil diamati dengan menginokulasikan kultur isolat berumur 16 jam pada medium agar yang mengandung casein, selanjutnya cawan petri diinkubasi pada

suhu 55°C selama 72 jam. Pengamatan aktivitas protease dilakukan dengan mengamati adanya daerah halo di sekitar koloni (Teather and Wood, 1982 *dalam* Khalil, 2011).

2.6. Penghitungan indeks aktivitas ensim.

Indeks aktivitas ensim ditentukan dengan menghitung perbandingan diameter daerah bening atau daerah halo dengan diameter koloni.

2.7. Pengamatan morfologi dan pewarnaan gram

Morfologi isolat bakteri potensial, dan sifat gramnya diamati dengan pewarnaan gram terhadap kultur isolat berumur 24 jam.

3. Hasil dan Pembahasan

Mikroorganisme termofilik yang hidup apa ekosistem bersuhu tinggi, mendapat perhatian yang sangat luas pada tahun-tahun terakhir ini (Vieille & Zeikus, 2001 *dalam* Yakhlef & Darbouch, 2012). Mikroorganisme termofil dikelompokkan menjadi 3 kategori berdasarkan suhu optimal (kardinal) nya, yaitu termofil (35-70°C), termofil ekstrem (55-85°C) dan hipertermofil (75-103°C).

Pemanfaatan mikroorganisme ekstremofil dilakukan berdasarkan sifat biomolekulnya, terutama ensim-ensim dan juga protein-protein lain yang dihasilkan (misalnya *cryoprotectant antifreeze protein*), lemak dan berbagai molekul berukuran kecil. Keberhasilan penggunaan mikroorganisme ekstremofil yang sangat dikenal adalah produk ensim *Taq DNA polymerase*, yang dihasilkan oleh bakteri *Thermus aquaticus* yang pertama kali diisolasi dari sumber air geothermal di Yellowstone National Park Amerika (Khalil, 2011). Sampel air panas yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari sumber air panas kecil di sekitar mulut gua sumber air panas Gedongsongo. Gambar 1. berikut ini menunjukkan daerah lokasi pengambilan sampel. Lingkungan mikro dari titik pengambilan sampel sangat bervariasi, dari tanah basah, genangan air, sampai air mengalir. Tanah berbatu-batu dengan cerukan yang membentuk aliran seperti parit kecil dan

ditemukan banyak mata air berbentuk genangan dengan gelembung-gelembung gas yang keluar dari dalam tanah (Gambar 2.) Suhu udara lingkungan sama, sekitar 32°C.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel.

Titik pengambilan sampel terletak di sebuah lembah kecil dengan hembusan uap panas dengan bau belerang. Air panas dari dalam tanah keluar dan dialirkan melalui pipa-pipa kecil, selain itu terdapat beberapa mata air yang membentuk kubangan-kubangan kecil. Air panas yang keluar mempunyai suhu sekitar 70°C, dengan kisaran pH 5-6.



Gambar 2. Salah satu titik pengambilan sampel

Isolasi bakteri indigenous penghasil enzim, dari sampel air panas yang dilakukan pada medium selektif yaitu medium Agar amilum, medium agar skim milk dan agar Carboxy Methyl Cellulose (CMC agar) dengan inkubasi

55°C selama 2-5 hari berhasil mendapatkan beberapa isolat bakteri dengan kemampuan ensimatik termotoleran. Protease memegang peran penting dalam industri pangan, farmasi dan deterjen, selain itu juga merupakan katalisator yang penting dalam penelitian struktur protein dan polipeptida (Bhosale, 1995 dalam Annapura *et al.*, 2012). Protease merupakan salah satu enzim penting untuk industri, beberapa industri membutuhkan protease termotabil. Penggunaan protease termotabil mempunyai berbagai keuntungan karena dapat tetap efektif digunakan pada suhu tinggi, sehingga dapat menghasilkan produk lebih cepat, meningkatkan kelarutan reaktan non dan produk, serta mengurangi terjadinya kontaminasi bakteri mesofil (Adams & Kelly, 1998; Rahman, *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2001; Sonnleitner & Fiechter, 1984; Zeikus *et al.*, 1994 dalam Santong *et al.*, 2008). Salah satu penghasil protease ekstraseluler termotoleran adalah species *Bacillus*, bakteri berbentuk gram positif berbentuk batang (Ferrari, *et al.* 1993 dalam Santong *et al.*, 2008). Isolasi bakteri proteolitik dari sampel air panas Gedongsongo menggunakan medium selektif skim milk agar dan inkubasi pada 55°C, menghasilkan 5 isolat bakteri proteolitik termotoleran, yang berasal dari sampel 1. Gambar 4. menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri proteolitik pada medium skim milk agar. Aktivitas proteolitik diketahui dengan adanya daerah bening di sekitar koloni yang menunjukkan kemampuan bakteri untuk menghidrolisis protein casein pada susu. Protease merupakan enzim yang penting dalam industri yang menggunakan bahan dasar berprotein. Industri penyamakan kulit merupakan salah satu industri yang menggunakan enzim protease. Penggunaan protease dalam industri laundry sudah semakin luas, enzim ini akan meningkatkan daya pembersih deterjen yang digunakan. Protease dalam industri makanan digunakan secara luas antara lain dalam industri keju, untuk menggumpalkan kasein susu sehingga susu dapat dipadatkan (Cowan & Taralo, 2009).



Gambar 3. Koloni bakteri proteolitik dari sampel air panas Gedongsongo, suhu inkubasi 55°C.

Koloni-koloni yang menunjukkan daerah bening diisolasi sebagai bakteri proteolitik termotoleran. Tabel 1. berikut ini menunjukkan isolat bakteri proteolitik dari sampel air panas Gedongsongo.

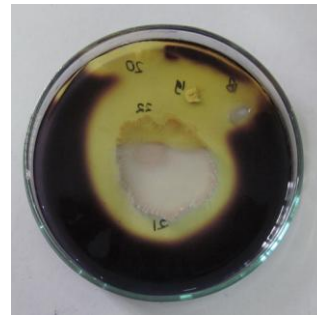
Tabel 1. Isolat bakteri proteolitik termofil dari sampel air panas Gedongsongo.

No	Kode isolat	Gram	Bentuk	Indeks proteolitik
1	II.P.1	-	kokus	1,19
2	II.P.2	+	kokus	1,09
3	II.P.4	+	kokus	1,40
4	II.P.5	-	kokus	3,50

Hasil isolat yang mempunyai potensi terbesar menghasilkan protease adalah isolat II.P.5. dengan indeks proteolitik sebesar 3,50. Isolat ini bersifat gram negatif, aerob dan berbentuk kokus.

Bakteri penghasil amilase atau bakteri amilolitik, merupakan bakteri yang penting untuk berbagai keperluan industri, karena aktivitasnya dapat menguraikan karbohidrat kompleks menjadi gula sederhana yang dapat menjadi substrat untuk berbagai produk industri (Singh, *et al.*, 2006). Bakteri amilolitik akan menunjukkan adanya daerah bening atau daerah halo di sekitar koloni ada medium agar amilum, saat medium dituangi dengan larutan Iod (Gambar 4.). Hasil isolasi bakteri amilolitik dari sampel air panas Gedongsongo pada medium agar amilum pada suhu 55°C, mendapatkan 9 isolat yang mayoritas berasal dari sampel 1,

hanya satu isolat berasal dari sampel 2 (Tabel 2).



Gambar 4. Koloni bakteri proteolitik dari sampel air panas Gedongsongo, suhu inkubasi 55°C

Perbedaan jumlah isolat bakteri amilolitik yang diperoleh dari kedua sampel disebabkan karena perbedaan ekosistem mikro pada lokasi pengambilan sampel. Hadirnya suatu mikroorganisme penghasil enzim tertentu pada suatu lingkungan, dipengaruhi oleh bahan-bahan organik yang terdapat di lingkungan yang bersangkutan, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa lingkungan mikro sampel 1 lebih banyak mengandung bahan-bahan yang mengandung pati.

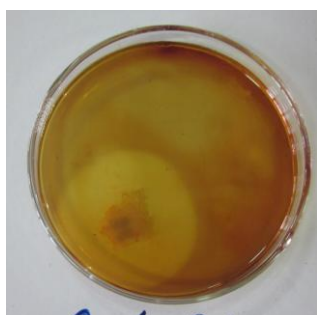
Tabel 2. Isolat bakteri amilolitik termofil dari sampel air panas Gedongsongo.

No	Kode isolat	Gram	Bentuk	Indeks amilolitik
1	II.A.1	+	kokus	2,33
2	II.A.5	-	batang	1,29
3	II.A.6	-	kokus	2,41
4	II.A.7	+	kokus	2,00
5	II.A.8	-	kokus	2,50
6	IV.A.1	+	batang	2,50

Amilase merupakan enzim penting bagi industri yang menggunakan bahan organik karbohidrat kompleks, misalnya pati. Enzim amylase terbagi dalam beberapa golongan yaitu α -amilase, β -amilase dan glukoamilase yang sangat penting dalam industri alkohol, sirup dan berbagai industri lain. Tabel 2. menunjukkan enam isolat bakteri amilolitik, 5 isolat menunjukkan indeks amilolitik yang

tinggi (>2), terdiri dari 2 isolat gram positif kokus, 2 isolat gram negatif kokus, satu isolat gram positif batang. Isolat gram positif batang, kemungkinan besar adalah *Bacillus* sp. Bakteri dari genus *Bacillus* sudah digunakan luas untuk menghasilkan α -amilase termotabil (Kubrak *et al.*, 2010). Assad (2011) juga melaporkan produksi α -amilase termotabil dari *Bacillus* sp. WA21 yang diisolasi dari sumber air panas di Karachi. Subandi dkk. (2011) berhasil mengisolasi bakteri *Bacillus alvei* amilolitik termofil dari sumber air panas Cangar Batu, yang mampu hidup pada suhu 55°C dan menghasilkan diameter zona hidrolisis 20 mm. Uyari *et al.* (2003) juga meneliti *Bacillus subtilis* termotoleran penghasil amilase yang diisolasi dari sumber air panas di Diyarbakir Turkey. Ginting (2009) telah pula berhasil mengisolasi bakteri cocus gram negatif penghasil amilase dengan suhu optimum 60°C dari sumber air panas Semangat Gunung Sumatera Utara. Bakteri gram positif batang penghasil amilase juga dapat diisolasi oleh Sianturi (2008) dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru, Sumatera Utara .

Bakteri selulolitik dapat dikenali dengan adanya daerah bening di sekitar koloni pada medium CMC yang dituangi dengan larutan Iod atau Congo Red. Daerah bening menunjukkan terjadinya hidrolisis selulosa oleh enzim selulolitik yang dihasilkan oleh koloni bakteri tersebut (Gambar 5).



Gambar 5. Koloni bakteri penghasil selulase

Hasil isolasi bakteri termotoleran selulolitik dari sampel air panas dari Gedongsongo menghasilkan 7 isolat dengan indeks selulolitik yang bervariasi (Tabel 3.).

Tabel 3. Isolat bakteri selulolitik termofil dari sampel air panas Gedongsongo.

No	Kode isolat	Gram	Bentuk	Indeks selulitik
1	II.C.1	+	kokus	5,0
2	II.C.2	+	batang	3,0
3	II.C.4	+	kokus	1,6
4	II.C.5	+	kokus	3,3
5	IV.C.1	-	kokus	7,5
6	IV.C.3	+	kokus	3,5
7	IV.C.4	+	kokus	3,0

Bakteri selulolitik ditemukan dari sampel air panas, jenis bakteri ini hadir karena di lokasi pengambilan sampel ditemukan lumut yang tumbuh di bagian dinding dan dasar aliran air, yang dapat menjadi sumber karbon bagi bakteri selulolitik.

Kemampuan selulolitik dari isolat bakteri yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3. dua isolat menunjukkan aktivitas selulolitik yang sangat tinggi, yaitu isolat II.C.1 yang merupakan bakteri berbentuk kokus gram positif dengan indeks selulolitik sebesar 5,0, sedangkan isolat II.C.1. bakteri kokus gram negatif dengan indeks selulolitik 7,5. Isolat II.C.2. bakteri berbentuk batang gram positif, kemungkinan adalah *Bacillus* sp. *Bacillus licheniformis* yang mampu menghasilkan enzim hidrolitik, termasuk selulase telah ditemukan pada sumber air panas di Peru (Tamariz-Enegeles *et al.*, 2014). Mukminin (2014) berhasil mendapatkan 4 isolat bakteri selulolitik dari sumber air panas Pacet Mojokerto, yang teridentifikasi sebagai 2 isolat *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus* dan *Bacillus laterosporus* dengan besar zona bening berturut-turut 27 mm, 24 mm, 30 mm dan 20 mm.

4. Kesimpulan

Bakteri termofil indigenous yang mempunyai aktivitas proteolitik, amilolitik dan selulolitik berhasil diisolasi dari air yang berasal dari sumber air panas Gedongsongo. Isolat-isolat yang diperoleh merupakan bakteri gram positif dan gram negatif, baik berbentuk batang

maupun kokus. Isolat-isolat tersebut menunjukkan aktivitas enzim amilase, protease dan selulase yang cukup tinggi untuk dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai sumber enzim termotoleran untuk industri.

Daftar Pustaka

- Annapura S.A., A. Singh, S. Garg, A. Kumar & H. Kumar. 2012. Production and Characterization of Thermo toleran Alakaline Protease from *Serratia marcescens*. *Asian J. Microbiol. Biotech. Env. Sci.* 14 (4) : 591-596
- Asad, W, M. Asif & S.A. Rasool. 2011. Extracellular Enzyme Production by Indigenous Thermophilic Bacteria: partial Purification and Characterization of α -amylase by *Bacillus* sp. WA21. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1045-1052.
- Baker. G.C., S. Gajar, D.A. Cowan, A.R. Suharto. 2001. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 103-109
- Darmanto, D. 2012. Jumlah Gunung Api Indonesia Terbanyak di Dunia. *Suara Merdeka.com.* 30 September 2012.
- Ginting,J. 2009. Isolasi bakteri dan uji aktivitas amilase termofil kasar termofilik dari sumber air panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara. Thesis .Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara
- Khalil, A. 2011. Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulose and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia. *Af. J. Biotechnol.* 10(44): 8834-8839
- Koskinen P.E.P, C-H. Lay, S. R. Beck, K.E. S. Tolvanen, A.H. Kaksonen, J. Örlýgsson, C.-Y. Lin, & J.A. Puhakka. 2008. Bioprospecting Thermophilic Microorga-nisms from Icelandic Hot Springs for Hydrogen and Ethanol Production. *Energy & Fuels* . 22: 134–140
- Kubrak, O.I., J.M. Storey, K.B. Storey and V.I. Lushchak. 2010. Production and properties of α - amylase from *Bacillus* sp. BKL20. *Can. J. Microbiol.*, 56: 279-288.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl, & D. Clark. 2012. Brock's Biology of Microorganisms. 13th Ed. Pearson. Boston.
- Mukminin, A. 2014. Isolasi bakteri selulolitik termofilik dari sumber air panas Pacet Mojokerto dan pengujian aktivitas enzim selulase. Skripsi. UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Raharjo, S, Ardiansyah, P. Endang, Tien. 2010. Isolation of Thermostable α -Amylase from local Thermophilic bacteria for Liquefaction. Proc. 3rd International Conference on Mathematics and Natural Sciences (ICMNS). pp. 342-454
- Santong, K., W. Chunglok, M. Lertcanawanichakui & P. Bangkrak. 2008. Screening and Isolation of *Bacillus* sp. *Walailak J Sci & Tech.* 5(2): 151-160.
- Schiraldi C, Mariateresa G, Mario De R. 2002. Perspectives on the biotechnological applications of Archaea. *ARCHAEA*, 1: 75-86.
- Sianturi,D.C. 2008. Isolasi bakteri dan uji aktivitas amilase termofil kasar dari sumber air panas Penen Sibiru-biru Sumatera Utara. Thesis. Program Studi Biologi . Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara
- Singh,N., N Batra and CR Sobti , Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species SSI, *Proc. Biochem* , 2006, 36: 781-786. 5.
- Subandi, S.C.Resmi & Muntholib. 2011. Isolation and identification of thermostable α -amylase producing thermophilic bacteria from Cangar-Batu hot spring. Proc. 2nd Int. Seminar on Chemistry . pp.305-308.
- Tamariz-Enegales,C. P. Olivera-Gonzales , G.K. Villena & M. Gutiérrez-Correa.2014. Isolation and Identification of Cellulolytic and Xylanolytic Bacteria from Huancarhuaz Hot Spring, Peru *Ann. Res. . Rev. Biol.* 4(19): 2920-2930.
- Tarik Aanniz,T., M. Ouadghiri, M. Melloul, J. Swings, E. Elfahime, J. Ibijbijen, M. Ismaili, M.Amar. 2015. Thermophilic bacteria in Moroccan hot springs, salt marshes and desert soils. *Braz. J. Microbiol.* 46(2):443-453
- Uyari,F., Z. Baysal, M. Dog. 2003. Purification and some characterization of an extracellular α α -amylase from a thermotolerant *Bacillus subtilis*. *Ann. Microbiol.*, 53 (3), 315-322 (2003)
- Willey, J.M., L.M. Sherwood, & C.J. Woolverton. 2008. Prescott, Harley & Klein's Microbiology. 7th Ed. McGrawHill. Boston. 695 – 696.

- Yakhlef, W & A. Darbouche. 2012, Metabolic Diversity of Thermophilic Bacteria from Hot Springs in Algeria. *J. Acad.* 2(1): 57-65
- Zhang, Y. 1986. Thermophilic Microorganisms in Hot springs of Tengchong Geothermal Area, Est Yunan, China. *Geothermics*, 15(3): 347-358
- Zuridah, H, H. Norazwin, M.N. Aisyah, M.N.A. Fakhruzzaman, and N.A. Zeenathul. 2011. Identification of lipase producing thermophilic bacteria from Malaysian hot springs . *Acad. J. Microbiol. Res.*, 5 (21): 3569-3573