

KARAKTERISASI ENZIM AMILASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK *BACILLUS SUBSTILIS*

Seniwati Dali¹, Rugaiyah Arfah¹, Abdul Karim¹, Abd. Rauf Patong¹

Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Tamalanrea, Makassar Sulawesi Selatan, Indonesia 90245
email:seniwatid@gmail.com

Abstrak

Dalam penelitian ini digunakan isolat bakteri termofilik yang diisolasi dari sumber air panas Makula Tana Toraja. Isolasi enzim dilakukan setelah bakteri tersebut diaktifkan dan dikultur dalam medium yang mengandung pati pada suhu 50°C, pH 7 selama 72 jam. Enzim amilase ekstraseluler yang diperoleh memiliki keaktifan optimum pada suhu 35°C dan pH 6,4. Enzim ini merupakan enzim amilase logam karena keaktifan katalitiknya dapat ditingkatkan oleh ion logam, seperti Co^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , and Ca^{2+} sehingga bersifat aktivator untuk ion Zn^{2+} menurunkan aktivitas enzim dan bersifat inhibitor. Ekstrak kasar enzim amilase hasil isolasi dapat menghidrolisis masing-masing substrat yaitu pati sagu, pati singkong dan pati jagung sebesar 92,36 %, 83,15 % dan 61,57 %. Aktivitas spesifik enzim amilase pada kondisi optimum diperoleh 0.00142 U/mg protein.

Kata kunci: *Bacillus subtilis*, enzim amilase, karakteristik, substrat, termofilik

CHARACTERIZATION OF AMYLASE ENZYME FROM ISOLATE OF THERMOPHILIC BACTERIA *BACILLUS SUBSTILIS*

Abstract

In this research, the thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* isolates were isolated from a hot spring Makula Tana Toraja. Enzyme isolation performed after the bacteria activated and cultured in medium containing starch at a temperature of 50°C, pH 7,0 for 72 hours. Extracellular amylase enzyme obtained has optimum activity at a temperature of 35°C and pH 6,4. This enzyme is an metal amylase because of the catalytic activity can be enhanced by ions Co^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , and Ca^{2+} so these metal ions are activators and inhibited by Zn^{2+} and metal ions are inhibitors. Crude extract of the isolated amilase enzyme could hydrolyze each substrates that sago starch, cassava starch and corn starch are respectively 92.36%, 83.15% and 61.57%. The specific activity at the optimum condition obtained 0.00142 U/mg protein.

Keywords : *Bacillus subtilis*, amylase enzyme, characteristic, subsrate, thermophilic

PENDAHULUAN

Mikroba lokal asal Indonesia baru sebagian kecil yang diketahui dapat memproduksi bahan-bahan yang bernilai ekonomis, dilain pihak sumber daya alam Indonesia khususnya Sulawesi Selatan potensial untuk dikembangkan karena mempunyai beberapa sumber air panas misalnya Sulilie Kabupaten Pinrang, Makula Kabupaten Tana Toraja, Lejja Kabupaten Soppeng dan Kaloling Kabupaten Sinjai yang belum dimanfaatkan secara optimal. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi enzim golongan hidrolitik seperti amilolitik yang diisolasi dari mikroba lokal yang bersumber dari air panas di Sulawesi Selatan. Mikroba yang bersumber dari lokasi air panas umumnya dapat menghasilkan enzim-enzim termostabil (stabil pada suhu tinggi) dan banyak diminati oleh industri berbasis enzim.

Salah satu enzim golongan hidrolitik yang memiliki aplikasi yang luas dalam berbagai bidang industri seperti pangan, kesehatan, dan lingkungan adalah enzim amilase. Dalam industri pangan, enzim amilase merupakan salah satu enzim ekstraseluler komersial karena berfungsi menyediakan gula hidrolisis, sehingga dapat dimanfaatkan untuk produksi sirup glukosa atau sirup fruktosa yang mempunyai tingkat kemanisan tinggi. Amilase ini banyak digunakan dalam menghidrolisis molekul pati menjadi maltosa ataupun glukosa dan amilase juga berfungsi pada pembuatan roti dan makanan bayi (Sebayang, 2005). Oleh karena enzim golongan tersebut memiliki nilai ekonomi tinggi, maka perlu mendapat perhatian khusus terutama karena enzim ini sangat berpotensi diaplikasikan dalam bidang pangan.

Pada proses industri, reaksi suhu tinggi sangat diminati karena dapat

meminimalkan resiko kontaminasi, meningkatkan laju transfer massa, dan dapat menggeser kesetimbangan kearah pembentukan produk (Setiasih, dkk.2006). Saat ini amilase yang bersumber dari mikroorganisme yang bersifat termofil semakin berpeluang penggunaannya khusus di berbagai jenis aplikasi industri, terutama industri yang menggunakan suhu tinggi dalam prosesnya (Haki dan Rakshit, 2003), sebab proses termofilik lebih stabil, cepat, murah, serta memudahkan aktivitas reaktan karena memiliki termostabilitas dan aktivitas yang tetap optimal pada suhu yang tinggi (Rasooli dkk., 2008).

Mikroorganisme termofil mampu hidup secara optimal di atas suhu 40 °C, dengan struktur protein penyusun enzim yang tetap stabil atau tidak terdenaturasi oleh panas. Mikroorganisme ini sendiri tidak hanya bersifat toleran terhadap suhu lingkungannya yang bersifat ekstrim tetapi juga mampu untuk bertahan hidup dan berkembangbiak pada kondisi suhu yang ekstrim tersebut (Akhdiya, 2003).

Beberapa penelitian telah dilakukan dalam upaya isolasi enzim amilase dari sumber air panas diantaranya isolasi enzim amilase ekstrak kasar termofilik dari sumber air panas Semangat Gunung Karo memiliki aktivitas pada suhu dan pH optimum yaitu 60 °C dan 5,0 - 7,0 (Ginting, 2009), dan isolasi enzim α -amilase pada bakteri termofilik dari sumber air panas Sonai Konawe, Sulawesi Tenggara memiliki aktivitas optimum pada suhu 70 °C dan pH 4,5 (Raharjo dkk, 2010). Dengan demikian dalam penelitian ini akan dilakukan eksplorasi enzim amilase dari mikroba termofil yang bersumber dari lokasi air panas di Sulawesi Selatan.

METODE PENELITIAN

Pemilihan Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Bacillus*

substillis yang diisolasi dari sumber air panas Makula Tana Toraja Sulawesi Selatan. Biakan dipelihara serta diperbanyak pada media agar.

Media

Media agar yang digunakan adalah yeast ekstrak 0,05%, NaCl 0,1%, bakto agar 1,5%, amonium sulfat 0,7%, CaCl₂ 0,01% K₂HPO₄ 0,01% MgSO₄7H₂O 0,01% dan amilum 2%. Komposisi media produksi terdiri dari amonium sulfat 0,7%, yeast ekstrak 0,05%, bakto tripton 0,01%, NaCl 0,1%, CaCl₂ 0,01% K₂HPO₄ 0,01% MgSO₄7H₂O 0,01% dan amilum 0,5%.

Fermentasi

Inokulum yang telah disiapkan dimasukkan secara aseptik ke dalam media fermentasi lalu diinkubasi selama 20 – 100 jam pada suhu 50 °C menggunakan *shaker inkubator* dengan kecepatan 180 rpm (untuk mengetahui waktu produksi optimum amilase). Cairan fermentasi yang mengandung enzim amilase dipisahkan dari selnya dengan sentrifuse pada kecepatan 3500 rpm selama 30 menit. Filtrat enzim yang didapat diuji aktivitasnya.

Uji Aktivitas Amilase (Sudarmadji, 1984)

Perinsip uji aktivitas enzim amilase didasarkan pada perhitungan gula pereduksi dari hasil hidrolisis pati dengan metode Nelson-Somogy. Sebanyak 1 mL larutan pati 2% dan 1 mL buffer fosfat pH 7,0 , ditambahkan 1 mL larutan ekstrak enzim amilase, dinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit, setelah itu dinonaktifkan pada suhu 100°C selama 5-10 menit. Dinginkan, selanjutnya ditentukan kadar glukosanya dengan metode Nelson-Somogy yakni ke dalam tabung reaksi dimasukkan 1 mL campuran enzim tersebut kemudian ditambahkan 1 mL reagen Nelson-somogy. Kemudian dipanaskan kembali dalam

penangas air pada suhu 100°C selama 20 menit. Selanjutnya didinginkan dalam air es hingga suhu larutan sama dengan suhu kamar. Setelah dingin ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat dan 5 mL air suling lalu dikocok hingga bercampur rata. Diamkan pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ_{max} (660 nm). Sebagai kontrol 1 mL ekstrak enzim amilase dipanaskan sampai mendidih lalu ditambahkan 1 mL pati 2% dan 1 mL larutan buffer fosfat pH 7,0 dan selanjutnya pengerjaan sama dengan pengujian aktivitas enzim.

Untuk mengetahui kadar glukosa hasil hidrolisis pati oleh enzim dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar glukosa pada berbagai konsentrasi 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 μ mol/ml. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan dengan mensubstitusikan absorbansi larutan yang diperoleh pada pengujian aktivitas enzim ke dalam persamaan regresi kurva kalibrasi larutan standar glukosa. Aktivitas enzim yang diperoleh dinyatakan dalam unit/mL, dimana 1 unit adalah aktivitas enzim yang menghasilkan 1 μ mol glukosa perjam pada kondisi percobaan.

Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry(1951).

Komposisi reagen Lowry B adalah Na₂CO₃ 2% dalam NaOH 0,1 N : CuSO₄ 1% : Natrium-kalium-Tartrat (100 : 1 :1) dan reagen Lowry A adalah larutan asam phospho-tungstic-phospho-molybdic (folin) : aquades (1 : 1). Kadar protein diukur dengan menggunakan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum. Sebanyak 1 mL enzim amilase ditambah 2,5 mL larutan Lowry B, diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,25 mL Lowry A dan diinkubasi kembali

pada 25⁰C selama 30 menit dengan sesekali dikocok, kemudian absorbansi diukur pada λ maksimum BSA (630 nm) yang telah ditentukan dengan spektrofotometer *UV-Vis*.

1. Karakterisasi enzim amilase

a. Penentuan suhu optimum enzim

Enzim, substrat dan bufer fosfat 0.1 M pH 7,0 dicampur dan diinkubasi selama 60 menit pada kisaran suhu 20⁰C, 25⁰C, 30⁰C, 35⁰C, 40⁰C, dan 45⁰C kemudian dilakukan pengujian aktivitas amilase pada setiap perubahan suhu sehingga diperoleh aktivitas amilase optimum pada suhu tertentu.

b. Penentuan pH optimum enzim

Enzim, substrat dan bufer sitrat 0.1 M dan bufer fosfat 0.1 M pada berbagai kisaran pH 5,8; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 6,6 dan 7,0 dicampur dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu optimum (yang telah dicapai pada perlakuan a diatas) kemudian dilakukan pengujian aktivitas amilase pada setiap perubahan pH sehingga diperoleh aktivitas amilase optimum pada pH tertentu.

c. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim

Untuk mengetahui jenis logam yang berperan sebagai aktivator atau inhibitor, maka campuran enzim, substrat, dan bufernya ditambahkan berbagai jenis logam seperti: MgCl₂; CaCl₂; CoCl₂; NiCl₂; dan ZnCl₂ pada konsentrasi 1.0 mM dan 10 mM. Kemudian diinkubasi selama 60 menit (seperti pada penentuan suhu dan pH optimum). Selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas enzim amilase.

2. Penggunaan ekstrak kasar amilase hasil isolasi dalam menghidrolisis masing-masing substratnya.

Masing-masing substrat yaitu tepung tapioka, tepung sagu dan tepung jagung ditimbang 1 gram kemudian dilarutkan

dengan akuades sampai volume 100 mL, dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya didinginkan, larutan ini digunakan sebagai substrat.

a. Hidrolisis substrat oleh enzim amilase

Di dalam tabung reaksi dimasukkan 1 mL larutan enzim amilase, ditambahkan 0,25 mL larutan CoCl₂ sehingga konsentrasi ion logam Co²⁺ di dalam campuran adalah 10 mM, kemudian dikocok. Ditambahkan 0,75 mL buffer fosfat pH 6,4 dan 0,5 mL larutan substrat (masing-masing dikerjakan untuk tepung tapioka 1%, tepung sagu 1%, tepung jagung 1% dan sebagai kontrol digunakan pati standar 1%). Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35⁰C selama 60 menit, kemudian dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 10 menit untuk inaktivasi. Setelah itu didinginkan dan diukur kadar glukosanya.

b. Pengukuran glukosa hasil hidrolisis

Pengukuran kadar glukosa hasil hidrolisis menggunakan metode Nelson Somogyi, sama dengan penentuan aktivitas enzim amilase.

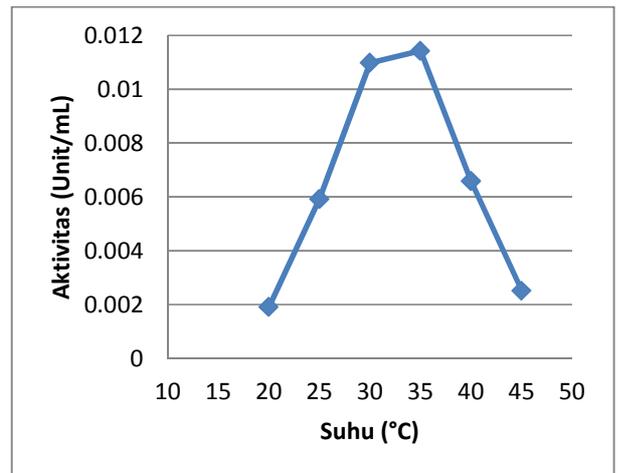
HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Enzim. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, kondisi optimum proses fermentasi dilakukan pada suhu 50⁰ C, di *shaker* di dalam *shaker incubator* yang berkecepatan 180 rpm selama 72 jam. Cairan fermentasi yang diperoleh dipisahkan dari selnya dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm, suhu 4⁰C selama 30 menit, sehingga diperoleh ekstrak enzim kasar.

Karakterisasi enzim amilase

a. Penentuan suhu optimum enzim

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase mengalami peningkatan sampai pada suhu 35^oC (suhu optimum) dengan aktivitas 0,0114U/mL. Setelah melewati suhu optimum, terjadi penurunan aktivitas enzim pada suhu 40^oC dengan aktivitas 0,0066U/mL dan pada suhu 45^oC aktivitas enzim amilase 0,002 U/mL. Kenaikan aktivitas enzim disebabkan karena kenaikan energi kinetika molekul-molekul yang bereaksi. Akan tetapi apabila suhu tetap dinaikkan terus, energi kinetika molekul-molekul enzim menjadi besar sehingga memecahkan ikatan-ikatan sekunder yang mempertahankan enzim dalam bentuk aslinya, akibatnya struktur sekunder dan tersier hilang sehingga aktivitas enzim menurun. Adanya perubahan suhu juga akan mempengaruhi ikatan hidrogen atau interaksi hidrofobik yang berperan dalam menjaga konformasi molekul enzim. Perubahan konformasi akan mempengaruhi sisi aktif dari enzim, kondisi panas tertentu menyebabkan ikatan hidrogen tersebut akan putus. Putusnya satu ikatan hidrogen akan menyebabkan mudahnya pemutusan ikatan hidrogen selanjutnya dalam rantai polipeptida tersebut, sehingga protein enzim mengalami denaturasi (Whitaker, 1972).). Penelitian yang dilakukan Asad dkk (2011) berhasil mengisolasi bakteri penghasil amilase dari sumber air panas berbeda dan memperoleh suhu optimum pada suhu 50 °C. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim yang sama mempunyai suhu optimum yang berbeda.

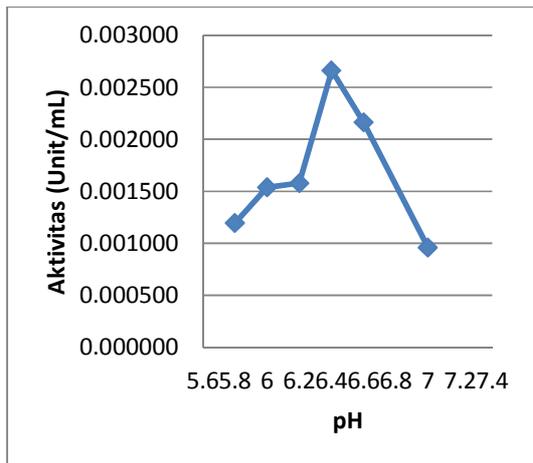


Gambar 1. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim amilase dari *Bacillus subtilis* yang diisolasi dari sumber air panas Makula

b. Penentuan pH Optimum

Variasi pH dilakukan pada suhu optimum. Kondisi pH berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase mengalami peningkatan sampai pada pH 6,4 (pH optimum) dengan aktivitas 0,002662 U/mL, kemudian mulai menurun pada pH 6,6 dengan aktivitas 0,002162 U/mL dan menurun lagi pada pH 7,0 dengan aktivitas enzim 0,0009 U/mL. Perubahan muatan pada molekul enzim dapat mempengaruhi aktivitas, baik dengan perubahan struktur maupun dengan perubahan muatan pada residu asam amino yang berfungsi mengikat substrat. Misalkan suatu enzim bermuatan negatif bereaksi dengan suatu substrat bermuatan positif membentuk kompleks enzim-substrat, kemudian pada nilai pH rendah enzim akan diprotonasi dan kehilangan muatan negatifnya. Hal yang sama pada pH tinggi substrat akan terionisasi dan kehilangan muatan positifnya (Murray dkk., 2009). Perubahan ion H⁺ yang ada dalam larutan enzim memberikan efek pada bagian katalitik dan konformasi enzim. Kondisi pH terlalu rendah atau terlalu tinggi menyebabkan terjadinya perubahan

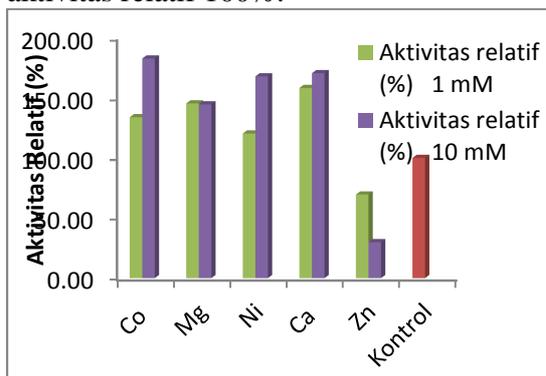
konformasi enzim, sehingga aktivitas enzim menurun. pH optimum yang diperoleh hampir sama dengan pH optimum yang diperoleh (Sutiamiharja, 2009) dari bakteri yang diisolasi pada sumber air panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara yaitu pH optimum adalah pada pH 6.



Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas amilase dari *B. subtilis* yang diisolasi dari sumber air panas Makula

c. Pengaruh Ion-ion Logam

Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa enzim amilase tanpa adanya penambahan logam merupakan kontrol yang memiliki aktivitas relatif 100%.



Gambar 3. Pengaruh logam terhadap aktivitas amilase dari *B. subtilis* yang diisolasi dari sumber air panas Makula

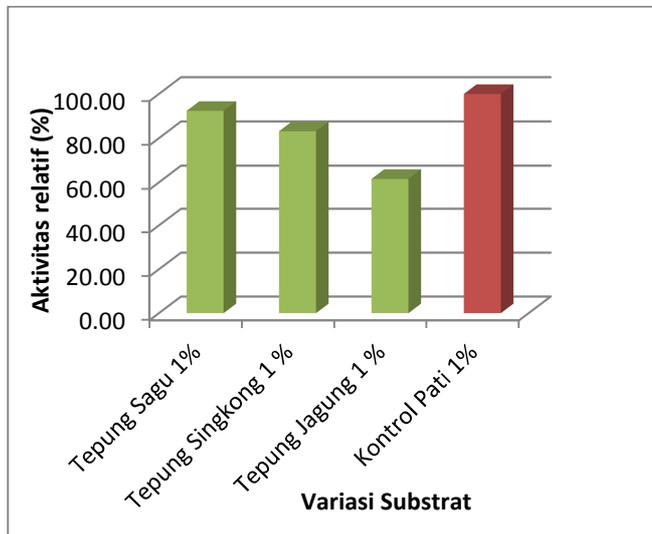
Penambahan logam CoCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 , dan CaCl_2 , baik pada konsentrasi 1 mM maupun pada konsentrasi 10 mM dapat meningkatkan aktivitas enzim amilase, sehingga bersifat aktivator. Untuk konsentrasi 1 mM penambahan logam CoCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 , dan CaCl_2 berturut-turut dapat meningkatkan aktivitas amilase masing-masing 33,88 %; 45,38 %; 20,33 % dan 58,21%, sedangkan untuk konsentrasi 10 mM berturut-turut 82,75 % ;44,56 % ;67,86 %; dan 70,53 %. Untuk logam ZnCl_2 baik pada konsentrasi 1 mM maupun pada konsentrasi 10 mM menurunkan aktivitas enzim, sehingga bersifat inhibitor. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Setiasih dkk,2006) memperoleh bahwa penambahan logam CaCl_2 pada enzim amilase yang diisolasi dari bakteri termofilik SW2 dapat meningkatkan aktivitas enzim α -amilase dan penambahan logam ZnCl_2 menurunkan aktivitas enzim amilase.

Sebagian besar enzim memerlukan senyawa lain yang bukan protein dalam bioaktivitasnya. Salah satu zat yang dapat berfungsi sebagai aktivator atau inhibitor dalam proses katalisis enzim adalah ion logam. Pada konsentrasi tertentu ion logam dapat meningkatkan aktivitas enzim (aktivator) dan dapat pula menurunkan aktivitas enzim (inhibitor). Ion logam tersebut dapat berfungsi sebagai kofaktor bagi enzim karena dapat berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat untuk menstabilkan konformasi aktif enzim (Palmer, 1991).

2. Penggunaan enzim ekstrak kasar (*crude enzyme*) amilase dalam menghidrolisis masing-masing substratnya.

Hasil penggunaan enzim ekstrak kasar amilase dalam menghidrolisis masing-masing substrat yang digunakan yaitu pati

singkong, pati jagung dan pati sugu dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil hidrolisis enzim amilase pada berbagai substrat

Dari Gambar 4 menunjukkan bahwa enzim amilase hasil isolasi dapat menghidrolisis tiga jenis substrat yang digunakan, yaitu pati sugu terhidrolisis 92,36 %, pati singkong terhidrolisis 83,15 % dan pati jagung terhidrolisis 61,57 %. Adanya perbedaan hasil hidrolisis oleh enzim amilase hasil isolasi terhadap tiga jenis substrat yang digunakan disebabkan oleh karena kandungan pati dari masing-masing substrat berbeda. Kandungan pati jagung sekitar 71,33 % (Suarni dan Widowati); pati singkong sekitar 83,49 % (Rachma,L., 2007) dan pati sugu sekitar 87,09 % (Saraswati dkk, 2004).

Kesimpulan

Karakterisasi terhadap ekstrak enzim kasar amylase hasil isolasi dari bakteri *Bacillus subtilis* termofil telah berhasil dilakukan. Diketahui bahwa enzim ini merupakan enzim ekstrasel dengan suhu dan tingkat

keasaman optimum berturut-turut pada 35 °C dan pH 6,4. Sebagai tambahan, penelitian ini berhasil mengidentifikasi pengaruh ion-ion logam yang bersifat aktivator yaitu: CoCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 , dan CaCl_2 dan yang bersifat inhibitor ZnCl_2 . Enzim ekstrak kasar hasil isolasi dapat menghidrolisis masing-masing substrat yaitu pati sugu, pati singkong dan pati jagung.

DAFTAR PUSTAKA

- Sebayang F., 2005. Isolasi dan Pengujian aktivitas enzim α -amilase dari *Aspergillus niger* dengan menggunakan Media Campuran Onggok dan Dedak. *Jurnal komunikasi Penelitian* 17(5): 81-86.
- Setiasih S., Wahyuntari B., Trimillah, Aprilliani D. 2006. Karakterisasi Enzim α -Amilase Ekstrasel dari Isolat Bakteri Termofili SW2. *Jurnal Kimia Indonesia*. 1(1):22-27
- Haki, G. D., dan Rakshit, S. K., 2003. Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes a Review, *Journal Biosourche Technology*, 39, 17-34.
- Rasooli, I., Astaneh, S.D.A., Borna, H., Barchini, K.A. 2008. A Thermostable α -amylase Producing Natural Variant of *Bacillus* sp. Isolated from Soil in Iran. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3 (3), 591-596.
- Akhdiya, A., 2003, Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termostabil, *Procceding of ITB Engineering Science*, 9(2), 129– 159.

- Ginting, J., 2009, *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air panas Semangat Gunung Karo Sumatera Utara*, (online), (<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/5795/1/09E00799.pdf>, Diakses tanggal 20 Desember 2011).
- Raharjo, S., Noor, A. K. S., dan Ramadhan, L. M., 2010, *Isolasi Enzim α -amilase, Termotabil Dari Hasil Skrining Bakteri Termofilik Di Sumber Air Panas Sonai Sulawesi Selatan*, (online), (<http://www.unhalu.ac.id/new/wall.php?uh=detil-ki&id=295>, Diakses tanggal 7 Februari 2012).
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi, 1996, *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberty Yogyakarta Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Lowry, O.H., Rossbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Whitaker, R.J. 1972. *Principle of Enzymology for the Food Sciences*, Mergel Dekker inc, New York. 561-570.
- Asad, W., Asif, M., dan Ajaz, S., 2011, *Extracellular Enzyme Production By Indigenous Thermophilic Bacteria: Partial Purification And Characterizati on of A-Amylase By Bacillus sp. WA2*, *Pak. J. Bot.*, 43 (2),1045-1052.
- Murray, R.K., Granner, D.K., and Victor, R.W. 2009. *Biokimia Harper*. EGC Penerbit Buku Kedokteran Jakarta. 68-69.
- Sutiamiharja, N., 2009, *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Amilase dari Gurukinayan Karo Sumatera Utara*, (online), (<http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/5795/1/09E00798.pdf>, diakses tanggal 8 Januari 2012).
- Palmer, T, 1991. *Understanding enzymes*. Ellis harwood. Chichester, west Sussex. England.
- Suarni dan S.Widowati, 2010, *Struktur, Komposisi dan Nutrisi Jagung*, (online), (<http://balitsereal.litbang.dep tan.go.id/ind/images/stories/tigonal.pdf>, diakses 17 Nopember 2013).
- Rachma, L., 2007, *Modifikasi Pati Alami dan Pati Hasil Pemoangan Ranyai cabang dengan Kombinasi Perlakuan Fisik/Kimia untuk Meningkatkan Kadar Pati Resisten pada Pati Ubi Kayu (Manihot esculenta)*, Skripsi Jurusan THP, UB, Malang.
- Saraswati, Rosidah I., Hapsari D, Y., 2004. *Pembuatan Glukosa Secara Enzimatik dari Bahan Baku Pati Sagu*. *Jurnal Teknik Kimia Indonesia*. 3(1):56-63.