

Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam menghasilkan enzim α -amilase

The ability *Bacillus licheniformis* to produce α -amylase enzyme

YATI SUDARYATI SOEKA

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta Bogor Km 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8762066. Fax: +62-21-8765062. ✉email: ceuceu_lipi@yahoo.com

Manuskrip diterima: 28 April 2015. Revisi disetujui: 9 Juni 2015.

Abstrak. Soeka YS. 2015. Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam menghasilkan enzim α -amilase. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1162-1166*. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus licheniformis* dalam memproduksi enzim α -amilase. Strain yang dapat menghasilkan enzim α -amilase, ditandai dengan zona bening di sekitar koloni pada medium mengandung 1% pati terlarut setelah penambahan larutan iodin. Aktivitas enzim α -amilase diperiksa terhadap pengaruh masa inkubasi, suhu, pH dan berbagai ion logam, yang diukur dengan spektrofotometer pada λ 540 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi tertinggi aktivitas α -amilase pada 1 hari inkubasi sebesar 17,48 U/mL, pada 50°C dan pH 8,5 masing-masing sebesar 11,48 U/mL dan 15,17 U/mL. Pengaruh ion logam dalam bentuk divalen dan kation monovalen pada konsentrasi 1 mM α -amilase *B. licheniformis* diaktifkan oleh ion Ca^{2+} dan ion Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} adalah inhibitor.

Kata kunci: *Bacillus licheniformis*, enzim α -amilase, spektrofotometer

Abstract. Soeka YS. 2015. The ability *Bacillus licheniformis* to produce α -amylase enzyme. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 1162-1166*. The aim of the research was to know the capability of *Bacillus licheniformis* bacteria to produce α -amylase enzyme. This isolate which produced α -amylase enzyme was signed by clear zone around colonies after addition of iodine solution in medium containing 1% starch soluble. The activity of the α -amylase enzyme was measured by spectrophotometer at λ 540 nm and optimized at different pH, temperature, incubation period as well as 1mM solution of various monovalent and divalent cations. The results showed that the highest production of α -amylase activity was found at one-day incubation, which was 17.48 U/mL, while at 50°C and pH 8.5 the activity was 11.48 U/mL and 15.17 U/mL respectively. Experimental result of influencing metal ions showed that Ca^{2+} ion acts as an enhancer, while Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} ions act as inhibitors of α -amylase enzyme activity.

Keywords: *Bacillus licheniformis* bacteria, α -amylase enzyme, spectrophotometer

PENDAHULUAN

Bioteknologi enzim yang bersumber dari mikroorganisme secara umum banyak diminati oleh industri (Ginting 2009; Alariya et al. 2013). Salah satunya adalah enzim α -amilase. Enzim α -amilase (EC.3.2.1.1) disebut juga dengan 1,4- α -D-glukan glukonohidrolase atau glukogenase adalah enzim yang mampu memecah molekul-molekul pati dan glikogen. α -amilase akan memotong ikatan glikosidik α -1,4 pada molekul pati (karbohidrat) sehingga terbentuk molekul-molekul karbohidrat yang lebih pendek (Janeček 2009).

Struktur molekuler dari enzim α -amilase (1,4- α -D-glukan glukonohidrolase) adalah α -1,4-glukanohidrolase (Hagihara et al. 2001). Sebagian besar enzim α -amilase merupakan kelompok metaloenzim (*calcium metallo-enzyme dependent*) yang tidak dapat bekerja sama sekali bila ion kalsium (Ca^{2+}) tidak ada (Hagihara et al. 2001, Panneerselvam dan Elavarasi 2015).

Aplikasi yang luas akan terus berlanjut ke masa depan. Proses industri pangan dan pertanian seperti pembuatan biskuit, fermentasi seperti minuman beralkohol dan pembuatan sirup glukosa, tekstil, kertas, aditif pada deterjen, *brewing*, industri farmasi, industri terapi dan analisis kimia (Pandey et al. 2000; Whitehurst dan Oort 2010; Gurung et al. 2013).

Enzim α -amilase terdapat pada bermacam-macam bakteri, jamur, tumbuhan, hewan dan memiliki peranan yang besar dalam penggunaan polisakarida (Ginting 2009). Enzim α -Amilase sebagai sinar harapan karena aktivitas hidrolisis patinya yang dapat menghasilkan sumber energi alternatif untuk produksi *biofuels* dengan pati sebagai bahan baku (Sundarram dan Murthy 2014). Beberapa dekade terakhir spesies dari *Bacillus* seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Bacillus licheniformis* telah dimanfaatkan pada skala industri (Alariya et al. 2013, Deb et al. 2013). *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* dan

Bacillus amyloliquefaciens diketahui dengan baik penghasil α -amilase termotabil dan telah banyak digunakan dalam berbagai aplikasi secara komersial (Prakash dan Jaiswal 2010).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim α -amilase dari *Bacillus licheniformis*.

BAHAN DAN METODE

Persiapan isolat

Bacillus licheniformis dipelihara dalam media Nutrient Agar (NA) miring berumur tiga hari.

Media α -amilase

Media untuk memelihara isolat bakteri digunakan nutrisi agar dengan komposisi: beef ekstrak 3 g, pepton 5 g, bakto agar 20 g dan dipersiapkan dalam satu liter akuades. Untuk isolasi dan media produksi enzim amilase digunakan media YPSs (Yeast Pepton Starch soluble) cair dan padat dengan komposisi: 0,2% ekstrak khamir, 0,5% pepton, 0,3 % KH_2PO_4 , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 20 g agar dan 2% pati terlarut sebagai sumber karbon (Naiola 2001).

Pengujian aktivitas amilase secara kualitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan *B. licheniformis* pada permukaan media agar YPSs. Satu ujung ose biakan yang berumur 3 hari ditumbuhkan pada permukaan media agar YPSs, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator selama dua hari. Adanya aktivitas amilase terlihat dengan munculnya zona bening di sekitar koloni setelah dituang dengan larutan iodin (Naiola 2001), dapat juga di masukkan ke dalam *refrigerator* beberapa saat tanpa penambahan larutan iodin.

Pengujian konsentrasi substrat pati terlarut

Pengaruh konsentrasi substrat pati terlarut dengan konsentrasi 0,5, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 dan 2,5 % terhadap enzim amilase diuji dengan cara mengukur aktivitasnya.

Pengujian aktifitas α -amilase

Sebanyak 0,5 ml larutan enzim ditambahkan ke dalam 0,5 ml substrat pati terlarut dengan konsentrasi yang tertinggi aktivitasnya dalam 0,05 M larutan bufer glisin-NaOH pH 8, kemudian diinkubasikan pada suhu 40°C selama 10 menit. Produk yang terbentuk berupa gula reduksi (glukosa) diukur dengan metoda Bernfeld (1995) menggunakan asam 3,5 dinitrosalisilat (DNS) dan konsentrasinya dikonversikan dengan standar glukosa (Kiran et al. 2005). Satu unit aktivitas α -amilase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan gula reduksi sebanyak 1 μmol per menit per ml larutan enzim pada kondisi pengujian yang dilakukan. Pengujian dilakukan 2 kali ulangan.

Pengujian kondisi optimum suhu dan pH

Pengaruh suhu terhadap enzim amilase diuji dengan cara mengukur aktivitasnya pada berbagai macam suhu 30, 35, 40, 50, 60, dan 70°C . Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim α -amilase, pengujian dilakukan dalam substrat pati

terlarut dengan bufer glisin NaOH 0,05 M pH 7; 8; 8,5; 9; 10; 11.

Pengujian pengaruh ion logam

Ion logam yang digunakan adalah Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} dalam bentuk garam dari masing-masing NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ sebagai aktivator atau inhibitor terhadap aktivitas α -amilase dengan cara mereaksikan larutan enzim dengan substrat pati terlarut dengan 1 mM ion logam tersebut dan dibandingkan dengan enzim tanpa penambahan logam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

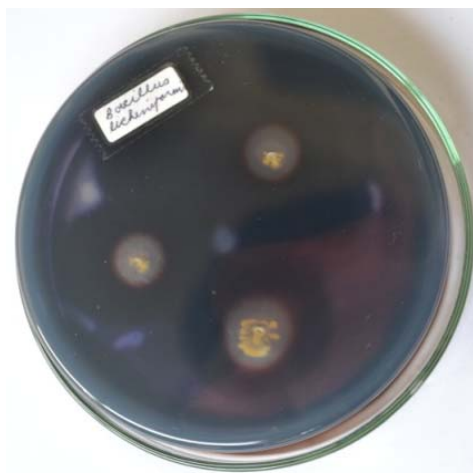
Zona bening di sekitar *B. licheniformis* (Gambar 1), menunjukkan bahwa *B. licheniformis* dapat mendegradasi pati terlarut di dalam media seleksi setelah dituangi dengan larutan Yod.

Pada Gambar 2 *B. licheniformis* diinkubasi selama 8 hari. Hasil pengujian dengan nilai optimum terhadap aktivitas α -amilase dihasilkan dengan waktu inkubasi satu hari sebesar 17,48 U/mL. Pengaruh konsentrasi substrat pati terlarut terhadap aktivitas α -amilase, didapat aktivitas optimum pada konsentrasi 1,75% sebesar 16,56 U/mL. Pada konsentrasi 2% ada penurunan sedikit menjadi 16,36 U/mL (Gambar 3).

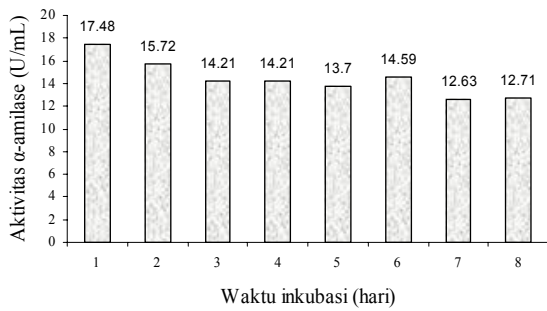
Aktivitas enzim optimum pada pH 8,5 sebesar 15,17 U/mL dengan kestabilan di dalam substrat pati terlarut pH 8,5 aktivitasnya sebesar 10,58 U/mL (Gambar 4).

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dengan pH 8,5 dalam menghidrolisis pati meningkat mulai suhu 30°C sampai 50°C . Suhu optimum aktivitas enzim α -amilase pada penelitian adalah 50°C sebesar 11,48 U/mL setelah diinkubasi selama 30 menit aktivitasnya menjadi 1,91 U/mL (Gambar 5).

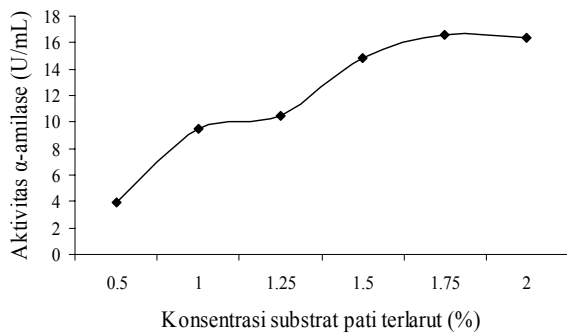
Pada Tabel 1 ion logam Ca^{2+} sebagai aktivator, dapat menaikkan aktivitas enzim. Sedangkan ion logam Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} sebagai penghambat enzim aktivitasnya lebih kecil dari aktivitas tanpa penambahan ion logam.



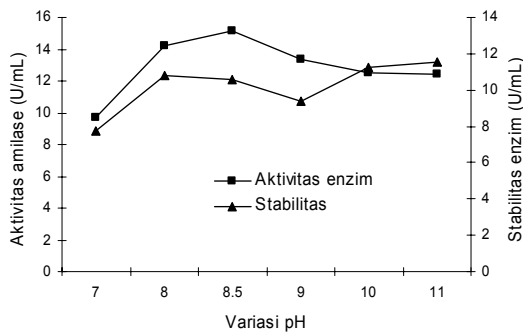
Gambar 1. Zona bening di sekitar koloni *B. licheniformis*



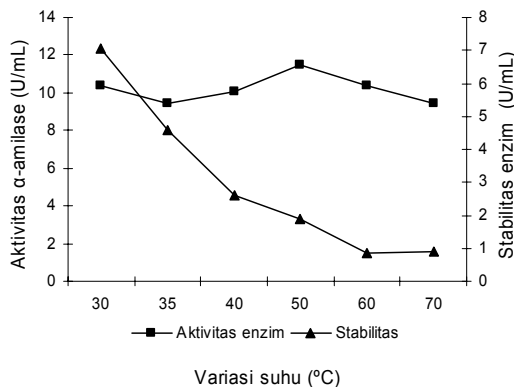
Gambar 2. Aktivitas enzim α-amilase terhadap waktu inkubasi



Gambar 3. Pengaruh konsentrasi substrat pati terlarut terhadap aktivitas enzim



Gambar 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas dan stabilitas α-amilase pada suhu 40°C



Gambar 5. Pengaruh suhu terhadap aktivitas dan stabilitas enzim α-amilase pada pH 8,5

Tabel 1. Pengaruh ion logam terhadap aktivitas α-amilase

Ion logam	Aktivitas (%)
Tanpa logam	100
Na ⁺	62,25
K ⁺	77,26
Ca ²⁺	127,56
Zn ²⁺	59,40
Co ²⁺	97

Pembahasan

Pengujian secara kualitatif koloni bakteri yang digoreskan pada media agar yang mengandung substrat pati terlarut, jika menghasilkan enzim α-amilase akan menghidrolisa pati menjadi yang lebih sederhana yang ditunjukkan dengan zona bening di sekitar koloni bakteri (Sjofjan dan Ardyati 2011). Penentuan tersebut hanya merupakan deteksi kualitatif. Penapisan kuantitatif merupakan suatu konfirmasi dan hasilnya belum tentu tepat sama dengan penapisan daerah bening (kualitatif). Sebelum pengujian setiap isolat disiapkan stok kulturnya pada media agar miring, hal ini perlu dilakukan karena uji iodin membuat isolat bakteri mati karena larutan iodin yang bersifat desinfektan (Herrmann dan Wagner 2003). Aktivitas α-amilase ekstraselular diproduksi oleh isolat, pati dihidrolisis sedangkan media yang berwarna biru kehitaman menandakan pati di tempat itu belum terhidrolisis masih mengandung amilosa yang berikatan dengan iodin membentuk kompleks heliks (Thontowi et al. 2001, Alariya et al. 2013, Moradi et al. 2014).

Pada proses produksi selain bahan baku, perlu diperhatikan adalah mikroba yang dipakai dan faktor lingkungan. Beberapa dekade terakhir spesies dari *Bacillus* seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Bacillus licheniformis* digunakan untuk produksi berbagai macam enzim serta biokimia (Deb et al. 2013). *Bacillus licheniformis* α-amilase adalah enzim termostabil yang banyak digunakan dalam proses bioteknologi (Vengadaramana et al. 2013). Awal fermentasi mikroba akan memecah sumber karbon gula sederhana seperti glukosa, setelah gula sederhana habis barulah mikroba memecah substrat yang kompleks yaitu pati yang berguna dalam aktivitas metabolisme sel mikroba (Lestari et al. 2001).

Setiap langkah dalam proses enzimatik memerlukan substrat untuk menerima dan melakukan suatu reaksi untuk menghasilkan enzim, jadi masing-masing molekul enzim membutuhkan sejumlah waktu untuk memproduksi satu unit produk (Souza dan Magalhães 2010). Tingkat hidrolisis pati oleh α-amilase tergantung pada beberapa kondisi seperti konsentrasi substrat, pH, suhu, aktivator dan inhibitor (Divakaran et al. 2011). Mekanisme kerja enzim juga ditentukan oleh konsentrasi substrat yang tersedia. Jika konsentrasi substratnya sedikit, kecepatan kerja enzim juga rendah. Sebaliknya, jika konsentrasi substrat yang tersedia banyak, kerja enzim juga cepat. Pada keadaan substrat berlebih, kerja enzim tidak sampai menurun tetapi konstan (Pujawati 2012).

Enzim membutuhkan pH tertentu untuk menjalankan aktivitasnya. Setiap enzim membutuhkan pH yang berbeda-beda. pH lingkungan berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi (Pujawati 2012, Fattah et al. 2013). Hasil penelitian Hmidet et al. 2008 enzim kalau pH terlalu alkali (pH 10) mengakibatkan denaturasi protein dan hilangnya secara total aktifitas enzim α -amilase dari *B. licheniformis* NH1. Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa jamur diperlukan pH sedikit asam sedangkan bakteri pH netral untuk pertumbuhan optimalnya (Sivaramakrishnan et al. 2006). Seluruh enzim peka terhadap perubahan derajat keasaman (pH), namun banyak dari enzim dengan pengujian khusus dapat menyimpang jauh dari kondisi yang direkomendasikan (Bisswanger 2014). Enzim menjadi nonaktif bila diperlakukan pada asam basa yang sangat kuat. Hasil penelitian Hagihara et al. 2001 enzim memiliki pH optimal 8,0-9,5 yang bersifat alkalifilik (basa) dan aktivitas katalitik maksimum pada suhu 55-60°C.

Hasil dari penelitian ini *B. licheniformis* mempunyai aktivitas enzim optimum pada pH 8,5 kondisi ini baik untuk digunakan sebagai bahan aditif biodeterjen. Enzim dari sumber jamur dan bakteri telah mendominasi aplikasi dalam sektor industri terutama industri biodeterjen (Souza dan Magalhães 2010). Penambahan enzim akan meningkatkan kemampuan biodeterjen untuk membersihkan noda yang sulit hilang (Souza dan Magalhães 2010). Enzim α -amilase dari *Bacillus licheniformis* yang disebut "Termamyl," digunakan di beberapa deterjen sebagai pencuci (Gurung et al 2013). Penggunaan enzim di dalam biodeterjen dapat mengurangi konsentrasi fosfat dan dapat menurunkan suhu air untuk mencuci pakaian, sehingga dapat menghemat energi dan mengurangi pencemaran lingkungan (Scheidgen. 2011). Penggunaan biodeterjen memiliki kaitan yang erat dengan ekosistem, perairan terganggu akibat busa yang ditimbulkan tidak dapat diuraikan. Limbah buangan deterjen sebagian besar mengandung senyawa fosfat yang dapat menyuburkan tumbuhan tanaman air dan fitoplankton penyebab pengkayaan unsur hara, karena fosfat merupakan salah satu nutrisi yang dibutuhkan oleh makhluk hidup (Timur et al. 2009).

Suhu sangat berpengaruh terhadap kerja enzim, karena enzim terdiri atas protein. Suhu optimum untuk setiap organisme berbeda-beda (Pujawati 2012). Pengaruh suhu pada reaksi enzimatik sangat menentukan aktivitas enzim pada waktu mengkatalisis suatu reaksi. Seluruh enzim memerlukan jumlah panas tertentu untuk dapat aktif. Pada umumnya semakin tinggi suhu, laju reaksi kimia baik yang dikatalisis maupun tidak dikatalisis oleh enzim akan semakin meningkat hingga mencapai kondisi optimum (Deb et al. 2013). Enzim α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri lebih tahan panas daripada enzim α -amilase yang berasal dari kapang (Vengadaramana et al. 2013). Kenaikan suhu di atas suhu optimum dapat mengakibatkan peningkatan atau penurunan aktivitas enzim α -amilase (Hmidet et al. 2008). Akibat kenaikan suhu dalam batas tidak wajar, terjadi perubahan struktur enzim (denaturasi), karakteristik enzim kasar mengungkapkan bahwa aktivitas optimum pada pH 7 dan 37°C (Divakaran et al. 2011).

Hasil penelitian Setiasih et al. (2006) dengan menggunakan isolat bakteri termofil SW2, dari Pusat Pengolahan Kompos α -amilase ekstrak mempunyai aktivitas optimum pada suhu 70°C dan pH 6,0. Hasil penelitian dari Vengadaramana et al. (2013) aktivitas *crude* enzim α -amilase dari *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 pada suhu dan pH optimum masing-masing 85°C dan pH 7. Aktivitas enzim α -amilase dari *Bacillus licheniformis* SKB4 menunjukkan suhu optimum pada 90°C (Samanta et al. 2014). Aktivitas enzim α -amilase dari *Bacillus licheniformis* suhu optimum untuk pertumbuhannya pada 45-46°C (Sundarram, Murthy 2014). Enzim α -amilase pada umumnya aktif bekerja pada kisaran suhu 25-95°C (Vasekaran et al. 2010).

Beberapa enzim memerlukan aktivator dalam reaksi katalisnya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat menaikkan kecepatan reaksi enzimatik mencegah adanya inhibitor, inhibitor adalah senyawa atau ion yang dapat menghambat aktivitas enzim (Pujawati 2012). Aktivitas α -amilase sebagai kontrol tidak diberi ion logam dinyatakan sebagai 100% (Fossi dan Tavea 2013). Hasil penelitian ini ion logam Ca^{2+} sebagai aktivator, dapat menaikkan aktivitas enzim. Sedangkan ion logam Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} sebagai inhibitor. Hasil penelitian Morris (2011) penambahan ion kalsium dan klorida dapat meningkatkan aktivitas kerja dan menjaga kestabilan enzim ini. Sedangkan hasil penelitian dari Aygan et al. (2008) aktivitas dari *Bacillus* sp AB 68 tidak meningkat dengan adanya Ca^{2+} dan Zn^{2+} juga sebagai inhibitor. Pada umumnya α -amilase adalah metaloenzim yang membutuhkan ion kalsium (Ca^{2+}) untuk aktivitas, integritas struktur dan stabilitasnya (Panneerselvam dan Elavarasi 2015). Hasil penelitian Rosmimik et al. (2001) α -amilase *B. stearothermophilus* T11₁₂ dengan adanya ion kalsium lebih stabil setelah penyimpanan 9 bulan dengan kondisi *freeze dried* sampai mencapai 79,5%. Hasil penelitian Lestari et al. (2011a) stabilitas α -amilase dari *Bacillus licheniformis* TVII.6 dengan penambahan ion Ca^{2+} (5 mM CaCl_2) tetap stabil 100% selama 48 jam inkubasi. Ion Ca^{2+} bertindak sebagai aktivator α -amilase dari *Bacillus stearothermophilus* TII-12 dengan konsentrasi optimum 5 mM dan mampu mempertahankan aktivitas sisa α -amilase sampai 97,1% pada suhu 90°C setelah 1 jam dan tanpa ion Ca^{2+} aktivitas α -amilase hanya sebesar 71% setelah 15 menit inkubasi begitu juga ion Na^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Co^{2+} 1mM, Mn^{2+} 1 mM sedangkan ion Co^{2+} 5mM, Mn^{2+} 5 mM sebagai inhibitor (Lestari et al. 2011b). Komponen kimia yang membentuk aktifitas enzim disebut juga kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion anorganik seperti Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} dan Mg^{2+} atau dapat pula sebagai molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Aehle 2004).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jakarta. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ninu Setianingrum atas asistensinya di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Aehle W. 2004. Enzyme in Industry: Production and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.
- Alariya SS, Sethi S, Gupta, Gupta BL. 2013. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. Arch Appl Sci Res 5 (1):15-24.
- Aygan A, Arikani B, Korkmaz H, Dinçer S, Çolak Ö. 2008. Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. Braz J Microbiol. DOI:10.1590/S1517-83822008000300027.
- Bernfeld P. Amylases α & β . In: Colowick SP, Kaplan NO (eds). Methods in Enzymology and Related of Biochemistry 1. Academic Press, New York, 1995.
- Bisswanger H. 2014. Enzyme assays. Perspectives in Science. DOI:10.1016/j.pisc.2014.02.005
- Deb P, Talukdar SA, Mohsina K, Sarker PK, Sayem SMA. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. Springerplus. DOI: 10.1186/2193-1801-2-154
- Divakaran D, Chandran A, Chandran RP. 2011. Comparative study on production of α -amylase from *Bacillus licheniformis* strains. Braz J Microbiol. DOI: 10.1590/S1517-838220110004000022
- Fattah YRA, Soliman NA, Toukhy ENM, Gendi HE and Ahmed RS. 2013. Production, Purification, and Characterization of Thermostable α -Amylase Produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. Journal of Chemistry. DOI:10.1155/2013/673173
- Fossi BT, Tavea F. 2013. Application of amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 in fermentation for simultaneous production of thermostable α -amylase and lactic acid. Chapter 27. R & D for Food, Health and Livestock Purposes. DOI: 10.5772/50456
- Ginting J. 2009. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara [Tesis]. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. Biomed Res Intl. DOI:10.1155/2013/329121
- Hagihara H, Igarashi K, Hayashi Y, Endo K, Kitayama KI, Ozaki K, Kawai S, Ito S. 2001. Novel α -amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM-K38. Appl Environ Microbiol. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1744-1750.2001
- Herrmann M, Wagner BO. 2003. Emission Scenario Document on Drinking Water Disinfectants. The EU project "Development of environmental emission scenarios for active substances used in biocidal products" (EUBEES2), EU, Brussel.
- Hmidet N, Bayouh A, Berrin JG, Kanoun S, Juge N, Nasri M. 2008. Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1Cloning, nucleotide sequence and expression of amyNgene in *Escherichia coli*. Proc Biochem 43: 499-510
- Janeček Š. 2009. Amylolytic enzymes-focus on the Alpha-amylases from archaea and plants. Nova Biotechnologica 9 (1): 5-25.
- Kiran O, Comlekloglu U, Arikani B. 2005. Effects of carbon sources and various chemicals on the production of a novel amylase from thermophilic *Bacillus* sp. K-12. Turk J Biol 29: 99-103.
- Lestari P, Darwis AA, Syamsu K, Richana N, Damardjati, DS. 2001. Analisis Gula Reduksi Hasil Hidrolisis Enzimatik Pati Ubi Kayu oleh α -Amilase Termostabil dan *Bacillus stearothermophilus* T11₁₂. Jurnal Mikrobiologi Indonesia 6(1):23-26.
- Lestari P, Richana N, Darwis AA, Syamsu K, Murdiyato U. 2011(b). Purifikasi dan Karakterisasi α -amilase Termostabil dari *Bacillus stearothermophilus* T11-12. Jurnal AgroBiogen 7(1):56-62
- Lestari P, Richana N, Rosmimik. 2011(a). Karakterisasi dan studi stabilisasi α -amilase *Bacillus licheniformis* TVII.6 menggunakan bahan aditif. J. Berita Biologi 10 (5): 581-588.
- Moradi M, Shariati P, Tabandeh F, Yakhchali B., Khaniki GB. 2014. Screening and isolation of powerful amylolytic bacterial strains. Int J Curr Microbiol App Sci 3 (2): 758-768.
- Morris C. 2011. Impact of calcium on salivary α -amylase activity, starch paste apparent viscosity and thickness perception. Chemosensory Perception 3: 112-116.
- Naiola E. 2001. Karakterisasi amilase dari isolat bakteri yang berasal dari Bali dan Lombok. Jurnal Biologi Indonesia 3 (1): 32-42.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem 31:135-152.
- Panneerselvam T, Elavarasi S. 2015. Isolation of α -amylase producing *Bacillus subtilis* from soil. Int J Curr Microbiol App Sci 4 (2): 543-552.
- Prakash O, Jaiswal N. 2010. Alpha-Amylase: an ideal representative of Pujawati S. 2012 Seleksi, Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi Sebagai Penghasil Enzim Amilase [Skripsi]. Program Studi Biologi. Jurusan Pendidikan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Yogyakarta.
- Rosmimik, Richana N, Lestari P, Damardjati DS. 2001. Studi penambahan ion kalsium terhadap aktivitas dan stabilitas α -amilase *Bacillus stearothermophilus* T II₁₂. Jurnal Mikrobiologi Indonesia 6 (1): 12-14.
- Samanta S, Das A, Halder SK., Jana A, Kar S, Mohapatra PKD, Pati BR, Mondal KC. 2014. Thermodynamic and kinetic characteristics of an α -amylase from *Bacillus licheniformis* SKB4. Acta Biologica Szegediensis 58 (2): 147-156.
- Scheidgen A. 2011. The ideal sustainable detergent: The challenges to make it-and to sell it. The Copenhagen Household Care Sustainability Summit Henkel AG & Co. KgaA Dusseldorf, Germany.
- Setiasih S, Wahyuntari B, Trismilah dan Apriliani D. 2006. Karakterisasi enzim α -amilase ekstrasel dari isolat bakteri termofil SW2. Jurnal Kimia Indonesia 1 (1): 22-27.
- Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A. 2006. α -Amylases from microbial sources-An overview on recent developments. Food Technol Biotechnol 44 (2): 173-184
- Sjoftan O, Ardyati T. 2011. Extracellular amylase activity of amylolytic bacteria isolated from quail's (*Coturnix japonica*) intestinal tract in corn flour medium. Intl J Poultry Sci DOI: 10.3923/ijps.2011.411.415
- Souza PM, Magalhães PO. 2010. Application of microbial α -amylase in industry-A review. Braz J Microbiol. DOI:10.1590/S1517-83822010000400004
- Sundarram A, Murthy TPK. 2014. α -Amylase production and applications: A review. J Appl Environ Microbiol. DOI: 10.12691/jaem-2-4-10
- thermostable enzymes. Appl Biochem Biotechnol. DOI: 10.1007/s12010-009-8735-4
- Thontowi A, Marni YF, Richana N. 2001. Pemurnian Parsial α -amilase *Bacillus stearothermophilus* T11-12 dengan Sistem dua fase Polietilena Glikol-Garam Fosfat. Jurnal Mikrobiologi Indonesia 6(2):31-35.
- Timurti BC, Fauziah IN, Kristin M. 2009. Aplikasi Enzim Protease dalam Formulasi Deterjen Cair Berbasis Metil Ester Sulfonat (MES) yang Ramah Lingkungan. Program Kreativitas Mahasiswa. Jurusan Teknologi Industri Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Vaseekaran S, Balakumar S, Arasaratnam V. 2010. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -amylase. Trop Agric Res 22 (1): 1-11.
- Vengadaramana A, Balakumar S, Arasaratnam V. 2013. Characteristic analysis of crude and purified α -amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 and comparison with commercial enzyme. Scholars Acad J Pharm 2 (2): 31-35.
- Whitehurst RJ and Oort M. 2010. Enzymes In Food Technology. 2nd ed. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.