

ENZIM AMILASE PEMECAH PATI MENTAH DARI MIKROBA: KAJIAN PUSTAKA

Raw Starch Degrading Amylase Enzyme from Microbes: A Review

Debora Nangin^{1*}, Aji Sutrisno¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email: deboranangin@ymail.com

ABSTRAK

Enzim amilase merupakan enzim yang mampu mengkatalis proses hidrolisa pati untuk menghasilkan molekul lebih sederhana seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin. Proses hidrolisa pati tersebut dilakukan melalui tiga tahapan yaitu gelatinisasi, likuifikasi, dan sakarifikasi. Ketiga tahapan tersebut memerlukan energi yang relatif tinggi sehingga meningkatkan biaya produksi pada produk berbasis pati. Saat ini, sebagai salah satu upaya dalam penghematan energi, berbagai penelitian telah difokuskan mengenai enzim amilase pemecah pati mentah (APPM) yaitu enzim yang dapat bekerja langsung pada granula pati mentah tanpa melalui proses gelatinisasi. APPM dapat diproduksi dari berbagai sumber seperti tanaman, hewan, atau mikroba. Paper ini akan mengulas tentang perkembangan dari eksplorasi enzim APPM tersebut khususnya dari sumber mikroba. Ulasan diarahkan pada enzim APPM dari mikroba sebab amilase dari mikroba lebih diminati untuk nantinya diproduksi dalam skala industri.

Kata kunci: Amilase Pemecah Pati Mentah, Mikroba, Produksi Enzim

ABSTRACT

Amylase is a enzyme that catalyze the hydrolysis of glycosidic linkages in starch to produce low molecular weight products such as glucose, maltose, and dextrin. Conventionally, hydrolysis of starch requires three-step processes namely gelatinization, liquefaction, and saccharification. This process is energy-intensive thus increasing the production cost of starch-based products. With the view of reducing energy consumption, there is considerable research on raw starch degrading amylase (RSDA) currently. RSDA refers to amylase that can act directly on raw starch granules without gelatinization of starch. RSDA are ubiquitous and produced by plants, animals, and microbes. This paper reviews the recent development in the exploration of RSDA produced from microbes. Review is focused on microbial RSDA because it is the most preferred one for large production.

Keywords: Raw Starch Degrading Amylase, Microbes, Enzyme Production

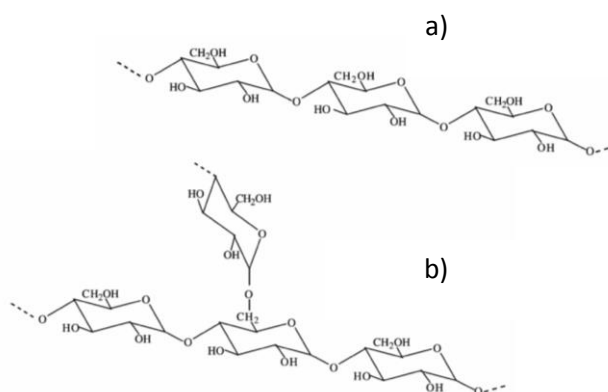
PENDAHULUAN

Proses hidrolisa merupakan proses pemecahan rantai molekul polimer menjadi molekul penyusunnya yang lebih sederhana. Saat ini proses hidrolisa polimer pati menjadi molekul yang lebih sederhana telah menjadi salah satu tahapan penting dalam dunia industri [1]. Hidrolisa pati tersebut dilakukan dengan dua cara yaitu dengan menggunakan asam atau enzim pemecah pati misalnya dari golongan amilase. Penggunaan enzim amilase lebih dimintai sebab ramah lingkungan, pemecahan yang terjadi lebih spesifik dan tidak menimbulkan rasa yang menyimpang pada produk akhir [2]. Proses hidrolisis pati menggunakan enzim amilase dapat mencapai derajat hidrolis pati hingga 42%-97% tergantung jenis substrat dan waktu inkubasi [3].

Enzim amilase akan memecah substrat pati melalui tiga tahapan utama yaitu gelatinisasi, likuifikasi, dan sakarifikasi [4]. Ketiga proses tersebut merupakan proses dengan tingkat konsumsi energi yang tinggi sehingga meningkatkan biaya hidrolisis bahan berpati [5]. Solusi yang dapat diambil untuk menurunkan tingkat konsumsi energi tersebut adalah dengan menggunakan enzim amilase yang dapat memecah pati tanpa proses gelatinisasi (pati mentah). Penggunaan enzim amilase pemecah pati mentah (APPM) akan menurunkan tingkat konsumsi energi dalam proses hidrolisis sehingga akan menurunkan biaya produksi. Enzim APPM yang paling banyak dikembangkan yaitu enzim yang berasal dari mikroba [4]. Beberapa keunggulan dari enzim APPM dari mikroba adalah waktu produksi cepat, proses mudah dimodifikasi, dan tidak memerlukan tempat yang luas [3]. Paper ini akan mengulas tentang perkembangan dari enzim APPM yang berasal dari mikroba.

Pati

Pati adalah polimer glukosa dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. Pembentukan polimer pati diawali dengan terbentuknya ikatan glukosida yaitu ikatan antara molekul glukosa melalui oksigen pada atom karbon pertama. Pati dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu amilosa dan amilopektin. Amilosa merupakan polimer rantai lurus yang terdiri dari ribuan glukosa dengan ikatan α 1,4 glukosida. Jenis kedua yaitu amilopektin yang mengandung percabangan rantai akibat adanya ikatan α 1,6 glukosida di beberapa bagiannya [6]. Struktur amilosa dan amilopektin digambarkan pada gambar 1.



Gambar 1. a) Struktur Amilosa b) Struktur Amilopektin [3]

Karbohidrat golongan polisakarida ini banyak terdapat di alam, terutama pada sebagian besar tumbuhan. Pati dapat ditemukan pada umbi, daun, batang dan biji-bijian. Pati merupakan kelompok terbesar karbohidrat cadangan yang dimiliki oleh tumbuhan sesudah selulosa [7]. Tumbuhan melakukan sintesa pati ketika proses fotosintesis yaitu perubahan energi cahaya matahari menjadi energi kimia [6]. Butir-butir pati apabila diamati dengan mikroskop memiliki bentuk dan ukuran yang berbeda-beda tergantung dari tumbuhan apa pati tersebut diperoleh [8].

Pati berperan sebagai sumber makanan penghasil energi utama dari golongan karbohidrat. Selain itu pati berperan sebagai bahan aditif pada proses pengolahan makanan, misalnya sebagai penstabil dalam proses pembuatan puding [3]. Pada pembuatan sirup dan pemanis buatan seperti sakarin, pati juga digunakan sebagai bahan utama. Dalam bidang non makanan, pati digunakan untuk bahan baku dalam proses pembuatan kertas, pakaian dari katun, industri cat, maupun untuk produksi hidrogen [7].

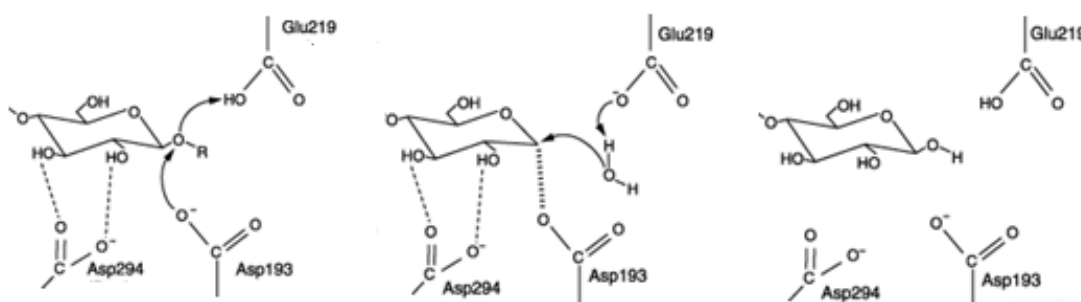
Proses hidrolisa pati merupakan pemutusan ikatan glikosidik pada rantai polimernya oleh suatu reaktan yang dibantu oleh air. Proses ini digunakan di industri untuk memproduksi molekul sederhana seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin [4]. Ikatan glikosidik pada pati cenderung stabil pada kondisi basa namun kurang stabil pada kondisi asam. Ikatan tersebut juga dapat putus oleh adanya enzim pemecah pati. Hasil pemecahan

tersebut akan menghasilkan gugus aldehid yang dikenal sebagai gugus ujung reduksi. Banyaknya gugus ujung reduksi berbanding lurus dengan derajat hidrolisis pati [9].

Enzim Amilase

Amilase adalah enzim yang mempunyai kemampuan memecah ikatan glukosida pada polimer pati. Penggunaan amilase dilaporkan mengalami peningkatan setiap tahunnya. Permintaan akan enzim golongan amilase telah mencapai sekurang-kurangnya 25% dari keseluruhan pasar enzim [10]. Kelompok enzim ini memiliki banyak variasi dalam aktivitasnya, sangat spesifik, tergantung pada tempatnya bekerja [11]. Seiring dengan penemuan-penemuan baru mengenai enzim amilase, kelompok dari amilase semakin bertambah. Beberapa kelompok dari enzim amilase adalah α -amilase, β -amilase, dan γ -amilase.[12]

Secara molekuler, pemecahan amilase dibantu oleh residu asam amino pada sisi aktif enzim [13]. Pada enzim α -amilase yang berasal dari *Pseudomonas stutzeri*, pemecahan dibantu oleh tiga residu asam amino yaitu asam glutamat 219, asam aspartat 294, dan asam aspartat 193. Tahapan pertama merupakan pengikatan substrat oleh asam aspartat 294. Tahap selanjutnya yaitu asam glutamat 219 dalam bentuk asam akan mendonorkan proton ke oksigen pada ikatan glikosidik substrat. Produk dari reaksi tersebut adalah sebuah ion oksokarbonium pada keadaan transisi yang diikuti dengan pembentukan kovalen intermediet. Molekul H_2O kemudian menyerang ikatan kovalen antara oksigen dan residu asam aspartat 193. Asam glutamat kemudian menerima H dari molekul H_2O dan residu asam aspartat 193 membentuk gugus hidroksil baru pada molekul glukosa [13]. Ilustrasi ditampilkan dalam gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme Pemecahan Pati oleh α -amilase dari *Pseudomonas stutzeri* [13]

Salah satu amilase yang banyak dikembangkan saat ini adalah enzim amilase pemecah pati mentah (APPM) [14]. Enzim ini memiliki keunggulan mampu bekerja pada substrat yang tidak mengalami proses gelatinisasi (pati mentah). Penggunaan enzim ini dalam industri berbasis pati dilaporkan telah mengurangi biaya produksi secara signifikan jika dibandingkan dengan proses konvensional. Selain itu, penggunaan enzim tersebut juga menghemat waktu dan energi produksi karena tidak memerlukan proses gelatinisasi [14]. Enzim APPM dapat ditemukan dari berbagai jenis makhluk hidup seperti tanaman, hewan, manusia, hingga mikroba.

Enzim APPM yang berasal dari mikroba umumnya mempunyai spektrum yang lebih luas dalam industri sebab sifatnya lebih stabil jika dibandingkan dengan enzim APPM yang berasal dari tanaman dan hewan [3]. Enzim APPM diduga mempunyai daerah pengikatan pati yang lebih banyak dibandingkan amilase konvensional sehingga mampu berikatan dengan granula pati mentah. Daerah pengikatan pati tersebut mengandung sekitar 50-100 asam amino dengan susunan residu asam amino tertentu sehingga mampu berinteraksi kuat dengan residu glukosa pada amilosa dan amilopektin [15].

Mikroba Penghasil Enzim APPM

Mikroba yang diisolasi dari sumber kaya pati umumnya mempunyai potensi menghasilkan enzim amilase yang lebih baik [10]. Hal ini disebabkan mikroba akan menghasilkan amilase untuk memecah pati yang ada supaya dapat dimanfaatkan nutrisinya. Sejauh ini enzim APPM masih dihasilkan oleh sejumlah kecil mikroba saja. Beberapa peneliti telah berupaya melakukan isolasi mikroba penghasil enzim APPM dari berbagai sumber. Beberapa contoh sumber mikroba yang pernah digunakan antara lain tanah sekitar penggilingan tepung [16], tanah dekat pembuangan sampah [10], maupun limbah singkong [17]. Tabel 1 menyajikan beberapa mikroba penghasil enzim APPM yang berhasil diketahui.

Tabel 1. Jenis Mikroba Penghasil Enzim APPM

Nama Isolat	Peneliti
<i>Aspergillus niger</i>	[18], [23]
<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> ABBD	[19]
<i>Streptomyces</i> sp.	[16]
<i>Bacillus aquamaris</i> MKSC 6.2	[15]
<i>Saccharomycopsis filbugera</i>	[20]
<i>Bacillus subtilis</i> 65.	[21]
<i>Penicilium</i> sp. X-1	[5]
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a	[22]
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	[5]
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	[5]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[23]

Produksi Enzim APPM

Produksi enzim APPM oleh mikroba dapat melalui sistem *submerged fermentation* (SmF) atau *solid-state fermentation* (SSF). Teknik SSF biasanya digunakan untuk produksi APPM dari golongan jamur, sebab teknik SSF dapat diatur sedemikian rupa sehingga lebih mendekati kondisi tumbuh alami dari jamur. Namun teknik SmF cenderung lebih disukai daripada SSF sebab pada SmF lebih mudah untuk memanipulasi lingkungan seperti pH dan suhu serta tahapan purifikasi enzim yang dihasilkan lebih sederhana [1]. Selain itu, proses fermentasi juga cenderung dilakukan secara *batch*. Proses fermentasi *batch* dipilih sebab proses *batch* akan meminimalkan adanya kontaminasi serta lebih mudah untuk dikontrol [5].

Selama proses produksi enzim, media disuplementasi dengan substrat pati untuk menginisiasi produksi enzim oleh mikroba. Lama fermentasi untuk menghasilkan amilase yang optimal biasanya ditentukan oleh fase pertumbuhan mikroba. Enzim amilase umumnya dihasilkan mulai fase adaptasi dan mencapai puncaknya pada saat fase eksponensial akhir mikroba [24]. Aktivitas amilase akan menurun setelah sel mencapai fase eksponensial akhir akibat pati dalam media yang mulai habis sehingga enzim tidak diproduksi lagi serta adanya toksik dari metabolit sel yang mulai terakumulasi. Faktor lain yang juga mempengaruhi aktivitas amilase adalah adanya aktivitas enzim lain seperti enzim protease yang berperan dalam proses pelisisan sel. Pembuatan kurva pertumbuhan mikroba dapat dilakukan untuk mengkonfirmasi tercapainya fase eksponensial mikroba [15].

Waktu fermentasi bagi produksi enzim APPM dari jamur umumnya lebih lambat dibandingkan mikroba dan yeast. Hal ini berkaitan dengan pertumbuhan jamur yang relatif lebih lambat dibanding spesies mikroba lain [5]. Isolat *Streptomyces* sp. memerlukan waktu fermentasi selama 5 hari [5], sedangkan *Aspergillus niger* memerlukan 72 jam [18]. Pada isolat *Bacillus aquamaris* MKSC 6.2, waktu fermentasi yang dibutuhkan yaitu 24 jam [15]. Isolat *Saccharomycopsis filbugera* juga dilaporkan memerlukan waktu fermentasi 24 jam [20].

Purifikasi Enzim APPM

Enzim amilase yang dihasilkan dari bakteri amilolitik umumnya berupa enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang diproduksi di dalam sel kemudian dilepaskan keluar dari sel [25]. Sehingga untuk pemanenan enzim APPM sendiri dilakukan melalui proses sentrifugasi media setelah fermentasi. Proses sentrifugasi merupakan proses pemisahan partikel dari suatu larutan berdasarkan ukuran, bentuk, densitas, viskositas medium, dan kecepatan rotor. Pada tahap ini, sentrifugasi akan membantu pemisahan pengotor berupa pellet dari supernatan yang mengandung enzim APPM [26]. Enzim hasil pemisahan melalui sentrifugasi masih berupa enzim kasar yang mengandung pengotor sehingga perlu dipurifikasi lebih lanjut.

Salah satu tahap purifikasi awal yang umum dilakukan yaitu dengan penambahan amonium sulfat. Penambahan amonium sulfat akan menurunkan jumlah air bebas dalam supernatan sehingga kelarutan molekul-molekul protein menurun hingga terbentuk endapan [27]. Akibat proses *salting out* dengan amonium sulfat, protein yang terendapkan masih mengandung amonium sulfat dalam jumlah besar. Amonium sulfat yang tercampur dalam enzim bersifat tidak diinginkan dan harus dihilangkan. Penghilangan amonium sulfat dari enzim APPM dilakukan melalui tahapan dialisis menggunakan membran dialisis. Tahapan dialisis merupakan pemisahan pengotor berupa ion-ion garam maupun kontaminan dengan berat molekul rendah yang masih tercampur dalam enzim dengan prinsip difusi [27].

Metode pemurnian yang dilakukan akan sangat mempengaruhi tingkat kemurnian enzim yang dihasilkan. Pada enzim yang mengalami purifikasi dengan pengendapan amonium sulfat, tingkat kemurnian yang didapat berkisar antara 5-6 kali [27]. Metode purifikasi yang lain yaitu purifikasi menggunakan metode kromatografi seperti *gel-filtration chromatography* dan *ion-exchange chromatography* [17]. Purifikasi dengan kromatografi ini masih menjadi metode yang paling spesifik dan efektif untuk purifikasi enzim di mana tingkat kemurnian enzim yang didapat sangat tinggi [28]. Selain itu purifikasi dengan menggunakan teknik absorpsi-desorpsi pati dapat menjadi alternatif lain [5].

Karakteristik Enzim APPM

Karakteristik dari enzim APPM yang didapatkan berbeda-beda tergantung dari jenis isolatnya. Beberapa karakter enzim yang penting untuk diketahui antara lain berat molekul, pengaruh suhu, pengaruh pH, dan spesifitas substrat. Berat molekul enzim APPM yang dilaporkan sejauh ini bervariasi yaitu sekitar 32-150 kDa tergantung asal enzim diperoleh [22], Enzim APPM dari isolat *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a memiliki berat molekul 32 kDa [22], sedangkan enzim APPM yang berasal dari isolat *Streptomyces* sp. memiliki berat molekul 47 kDa [5]. Penelitian lain melaporkan bahwa enzim APPM dari *Bacillus* sp. memiliki berat molekul 68 kDa [21].

Suhu adalah faktor yang memberikan dampak besar pada aktivitas enzim amilase. Umumnya suatu enzim tidak memiliki aktivitas optimal pada suhu yang sangat rendah. Hal tersebut dikarenakan reaksi yang melibatkan enzim memerlukan suatu pemanasan terkontrol yang akan menyediakan energi aktivasi yang cukup untuk memulai reaksi. Kenaikan suhu pada reaksi enzimatik akan meningkatkan energi kinetik molekul yang bereaksi sehingga mempercepat tumbukan antar molekul. Namun, suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan protein pada enzim terdenaturasi dan kehilangan aktivitasnya. Pada suhu optimum enzim, tumbukan antar molekul terjadi sangat efektif namun tanpa terjadinya denaturasi protein [29].

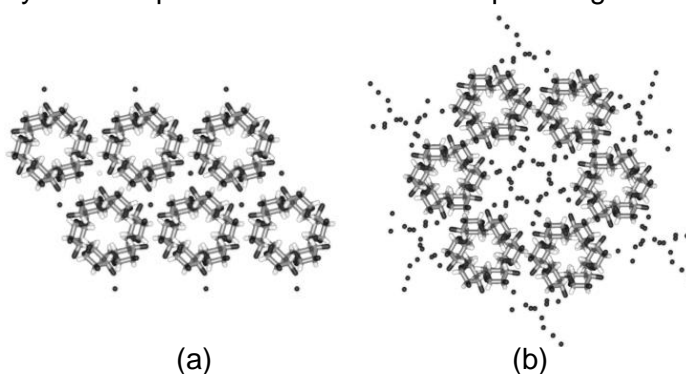
Enzim APPM yang dihasilkan oleh isolat *Streptomyces* sp. E-2248 dilaporkan memiliki suhu optimum 50 °C dan relatif stabil setelah pemanasan pada suhu 30-50 °C selama 30 menit [5]. Sedangkan isolat *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a dilaporkan memiliki enzim termofilik dengan suhu optimum 90 °C [22]. Enzim tersebut juga dilaporkan masih memiliki aktivitas residu sebesar 96% setelah pemanasan pada suhu 100 °C selama 30 menit [22]. Perbedaan suhu optimum maupun kestabilan enzim APPM yang dihasilkan oleh beberapa isolat diduga dipengaruhi oleh karakteristik isolat penghasilnya di mana

umumnya mikroba yang bersifat mesofil akan menghasilkan enzim yang juga bersifat mesofil [5].

Karakteristik penting lain yang harus diketahui yaitu pH optimum enzim. Setiap enzim memiliki pH optimum yaitu pH yang dapat menghasilkan aktivitas tertinggi dalam mengkatalis suatu reaksi. pH akan mempengaruhi sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. pH yang terlalu rendah atau tinggi akan mempengaruhi konformasi enzim sehingga enzim tidak dapat membentuk kompleks dengan substrat [28]. Umumnya enzim APPM memiliki aktivitas optimal pada pH cenderung netral yaitu 6-7. Enzim APPM dari isolat *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a memiliki aktivitas tertinggi pada pH 6,5 [22]. Sedangkan hasil penelitian lain melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. E-2248 menghasilkan enzim APPM dengan pH optimal pada pH 6 dan memiliki kestabilan yang baik pada pH 5-6 [5].

Jenis substrat pati juga berpengaruh pada aktivitas enzim. Spesifitas substrat merupakan salah satu karakteristik yang penting untuk diketahui. Informasi mengenai spesifitas substrat sebuah enzim akan membantu dalam aplikasi enzim nantinya [3]. Enzim yang mampu bekerja pada berbagai macam pati secara ekonomis lebih disukai sebab meningkatkan peluang untuk penggunaan jenis pati yang berbeda. Sebagian besar APPM yang telah dikarakterisasi cenderung lebih cepat memecah pati dari serealida dibandingkan pati dari umbi-umbian [22].

Enzim amilase dari *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a dan *Aspergillus niger* AM07 dilaporkan cenderung lebih cepat memecah pati serealida dibanding pati umbi-umbian [22, 18]. Penelitian lain melaporkan bahwa enzim APPM dari *Streptomyces* sp. memiliki aktivitas tertinggi pada substrat pati gandum dan pati beras [5]. Perbedaan tersebut diduga dipengaruhi oleh bentuk kristalin granula pati. Umumnya umbi-umbian seperti kentang dan singkong memiliki struktur kristalin B sedangkan pada serealida seperti beras dan jagung memiliki struktur kristalin A. Gambar 3 menampilkan perbedaan struktur kristalin A dan B di mana kristalin B memiliki kandungan air lebih tinggi dan rantai amilopektin yang relatif panjang yang menyebabkan pati lebih resisten terhadap serangan enzim [15].



Gambar 3. (a) Struktur Kristalin Pati A (b) Struktur Kristalin Pati B
Keterangan: titik kecil menggambarkan molekul air [30]

SIMPULAN

Enzim APPM dapat diisolasi dari berbagai jenis mikroba. Berat molekul enzim APPM berkisar antara 32-150 kDa Karakteristik enzim APPM yang telah dilaporkan dapat berbeda-beda tergantung sumbernya. Umumnya enzim yang diperoleh dari mikroba mesofil akan menghasilkan enzim yang mesofil sedangkan mikroba termofili menghasilkan enzim termofil. Enzim APPM cenderung bekerja dengan baik pada pH netral dan substrat pati serealida. Peluang penggunaan enzim APPM untuk keperluan industri sangat terbuka luas sebagai upaya penurunan energi proses.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Oyeleke, S.B. and Oduwole, A.A. 2009. Production of Amylase by Bacteria Isolated from a Cassava Waste Dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research* 3: 4, 143-146.
- 2) Zainab, A., Modu, S., Falmata, A.S., and Maisaratu. Laboratory Scale Production of Glucose Syrup by the Enzymatic Hydrolysis of Starch Made from Maize, Millet, and Sorghum. *Biokemistri* 23: 1, 1-8.
- 3) Souza, P.M. and Magalhães, P.O. 2010. Application of Microbial α -Amylase in Industry – A Review. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 850-861.
- 4) Kaneko, T., Ohno, T., and Ohisa, A. 2005. Purification and Characterization of a Thermostable Raw Starch Digesting Amylase from a *Streptomyces* sp. Isolated In a Milling Factory. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 69: 6, 1073-1081.
- 5) Sun, H., Ge, X., Wang, L., Zhao, P., and Peng, M. 2008. Microbial Production of Raw Starch Digesting Enzymes. *African Journal of Biotechnology* 8: 9, 1734-1739.
- 6) Maarel, M.J.E.C., Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and Applications of Starch-converting Enzymes of the α -amylase Family. *Journal of Biotechnology* 94: 137-155.
- 7) Liu, Q. 2005. Understanding Starch and Their Role in Foods. Taylor & Francis Group, LLC.
- 8) Poedjiadi, A. 1994. Dasar – dasar Biokimia. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- 9) Hii, S.L., Tan, J.S., Ling, T.C., and Ariff, A.B. 2012. Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*. doi:10.1155/2012/921362
- 10) Vaseekaran, S., Balakumar, S., and Arasaratnam, V. 2010. Isolation and Identification of a Bacterial Strain Producing Thermostable α -Amylase. *Tropical Agricultural Research* 22: 1, 1-11.
- 11) Sianturi, D.C. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Amilase Termofil Kasar dari Sumber Air Panas Penen Sibirubiru Sumatera Utara. Thesis. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- 12) Aiyer, P.V. 2005. Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology* 4: 125–135.
- 13) Matsuura, Y. 1999. Structure and Catalytic Mechanism of Alpha-amylase Family Enzymes. <http://www.glycoforum.gr.jp/Science/World/saccharide/SA-B02E.html> Tanggal akses 28/08/2014.
- 14) Abu, E.A., Ado, S.A., and James, D.B.. 2005. Raw Starch Degrading Amylase Production by Mixed Culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Sorghum Pomace. *African Journal of Biotechnology* 4: 8, 785-790,
- 15) Puspitasari, F., Nurachman, Z., Noer, A.S., Radjasa, O.K., Maarel, M., Natalia, D. 2011. Characteristics of Raw Starch Degrading Amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 Associated with Soft Coral *Sinularia* sp. *Starch* 63: 461-467.
- 16) Kaneko, T., Ohno, T., and Ohisa, A. 2005. Purification and Characterization of a Thermostable Raw Starch Digesting Amylase from a *Streptomyces* sp. Isolated In a Milling Factory. *Bioscience Biotechnology. Biochemistry* 69: 6, 1073-1081.
- 17) Adeyanju, M.M., Adetoro, A.O., Adeshakin, A.O., Kasumu, T., Mowoe, O., Famakinwa, O.A., and Oluwatuminiu, L. 2012. Characterization of a Thermostable *Bacillus subtilis* Amylase Isolated from Decomposing Peels of Cassava (*Manihot esculenta*). *International Journal of The Nigerian Society for Experimental Biology* 24: 1, 23-30.
- 18) Omemu, A.M., Akpan, I., Bankole, M.O., and Teniola, O.D. 2005. Hydrolysis of Raw Tuber Starches by Amylase of *Aspergillus niger* AM07 Isolated from The Soil. *African Journal of Biotechnology* 4: 1, 19-25.
- 19) Nurachman, Z., Alfredo, K., Radjasa, O.K., and Natalia, D. 2010. Identification of Novel Raw-Starch Degrading Amylase from a Tropical Marine Bacterium. *American Journal of Biochemistry And Biotechnology* 6: 4, 300-306.

- 20) Yalcin, H.T. and Corbaci, C. 2013. Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. *Turkish Journal of Biochemistry* 38: 1, 101-108.
- 21) Hayashida, S., Teramoto, Y., and Inoue, T. 1988. Production and Characteristics of Raw-Potato-Starch-Digesting Amylase from *Bacillus subtilis* 65. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 6, 1516-1622.
- 22) Bozic, N., Jordi, R., Lopez-Santin, J., and Vujeie, Z. 2010. Production and Properties of the Highly Efficient Raw Starch Digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*. doi: 10.1016/j.bej.2010.10.014.
- 23) Abu, E.A., Ado, S.A., and James, D.B.. 2005. Raw Starch Degrading Amylase Production by Mixed Culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* Grown on Sorghum Pomace. *African Journal of Biotechnology* 4: 8, 785-790,
- 24) Sjojfan, O. and Ardyati, T. 2011. Extracellular Amylase Activity of Amyolytic Bacteria Isolated from Quail's (*Coturnix japonica*) Intestinal Tract in Corn Flour Medium. *International Journal of Poultry Science*. 10 (5): 411-415.
- 25) Spilatro, S.R. 2010. Bacterial Metabolism. <http://www.marietta.edu/~spilatr/bio/labexercises/5-Metabolism.pdf>. Tanggal akses 14/07/2014.
- 26) Koolman. 2007. Centrifugation. http://www.phys.sinica.edu.tw/TIGP_NANO/Course/2007_Spring/Class%20Notes/AC_Chapter%203%20Centrifugation%200321.pd. Tanggal akses 02/07/2014.
- 27) Wang, N.S. 2010. Enzyme Purification By Ammonium Sulfate Precipitation. <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab6a.htm>. Tanggal akses 22/04/2014.
- 28) Machaiah, J.P. and Vakil, U.K. 1984. Isolation and Partial Characterization of α -amylase Components Evolved During Early Wheat Germination. *Journal Bioscience* 6: 1, 47-59.
- 29) Bahri, S., Mizan, M., dan Hasan, M. 2012. Karakterisasi Enzim Amilase dari Kecambah Biji Jagung Ketan (*Zea mays ceratina* L.). *Jurnal Natural Science* 1: 1, 132-143.
- 30) Damager, I. Engelsen S.B., Blennow, A., Moller, B.L., Motawia, M.S. 2010. First Principles Insight Into the α -glucan Structure of Starch: Their Synthesis, Conformation, and Hydration. *Chem Rev* 110: 4, 2049-2080.