

OPTIMASI FAKTOR ABIOTIK TERHADAP ISOLAT BAKTERI TERMOFILIK UNTUK PRODUKSI AMILASE

Denny Bendrianis^{1*}

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas,
Indonesia

Email Korespondensi: dennybendrianis2001@gmail.com

Abstract

Research on "Optimization of Abiotic Factors of Thermophilic Bacteria Isolates for Amylase Production" was carried out from December 2022 to February 2023 at the Andalas University Biotechnology Laboratory. This study aims to determine the optimum temperature, pH, agitation, and stability of the amylase enzyme from two thermophilic bacterial isolates, TUA-07. This study used a descriptive and an experimental method with a factorial completely randomized design (CRD) with two factors, namely temperature and pH, followed by gradual agitation. The results showed that the optimum temperature, pH, and agitation for isolate TUA-07 was 80°C at pH 6, with agitation of 125 rpm. Enzyme stability for isolate TUA-07 lasted up to 80% for 10 hours.

Keywords:

*Optimization, agitation, Stability,
Enzymes, Thermophilic Bacteria*

Pendahuluan

Amilase menjadi salah satu enzim yang banyak digunakan dalam teknologi bioproses (Irdawati & Fifendi, 2011) karena enzim amilase mampu menghidrolisis molekul pati jadi polimer yang terdiri dari unit glukosa (Reddy et al., 2003). Amilase bisa memecah jalinan α -1, 4- glikosidik dalam pati yang menuju ke pembuatan dekstrin dalam jumlah terbatas. Amilase dari sumber mikroba yang berbeda beragam pula bentuknya, sehingga cocok dengan aplikasinya yang khusus (Mehta & Tulasi, 2016).

Saat ini amilase menjadi salah satu enzim yang sangat diminati termasuk pada bidang bioteknologi. Meskipun enzim bisa berasal dari berbagai sumber, seperti tumbuhan, hewan serta mikroorganisme, enzim dari sumber mikroorganisme biasanya sangat kerapenuhi permintaan industri, khususnya tipe bakteri serta fungi (Souza & Magalhaes, 2010). Selain peranan enzim amilase pada bidang bioteknologi, amilase yang dihasilkan oleh mikroba berpotensi digunakan dalam industri farmasi serta kimia dan pemanfaatan amilase sudah meluas di bidang lainnya, seperti obat-obatan, kimia analitik, dan aplikasinya dalam sakarifikasi pati serta dalam industri tekstil, makanan, pembuatan bir serta penyulingan (Pandey et al., 2000).

Pemasaran industri enzim sudah diproyeksikan mencapai 6,2 miliar US dolar pada tahun 2020. Hal ini disebabkan peningkatan penjualan enzim mikroba secara global karena enzim yang berasal dari mikroorganisme memiliki termostabil dan aktivitas yang optimal pada suhu yang tinggi (Vielle & Zeikus, 2001). Pada tahun 2018 terjadi peningkatan penjualan enzim 9,2%, peningkatan penjualan enzim ini diprediksi akan terus meningkat hingga tahun 2023 (Anonymous, 2018). Salah satu jenis enzim yang telah diaplikasikan dalam bermacam bidang industri yakni amilase (Mehta & Tulasi, 2016).

Beberapa penelitian tentang bakteri termofil dan enzim termostabil sudah banyak dilakukan. Arzita & Agustien., (2013) mendapatkan kondisi optimum untuk produksi amilase pada suhu 60°C

dengan pH 7 dan agitasi 150 rpm. Desriningsih (2013) mendapatkan kondisi optimum produksi amilase pada suhu 50°C dan pH 8. Selain itu, Indriati et al., (2015) mendapatkan kondisi optimum pada suhu 60°C dan pH 8,5. Arfah et al., (2014) mendapatkan kondisi optimum pada suhu 55°C dengan pH 6 dan agitasi 200 rpm.

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri koleksi Laboratorium Bioteknologi UPT Sumber Daya Hayati yang diisolasi dari tiga sumber air panas Solok Selatan yaitu Sapan Aia Angek, Sapan Maluluang dan Balun pada tahun 2021. Koleksi isolat tersebut berjumlah 31 isolat, 6 diantaranya berpotensi penghasil enzim protease, 4 isolat berpotensi penghasil enzim amilase dan 21 isolat penghasil keduanya. Isolat berpotensi penghasil enzim amilase dengan indeks amilolitik tertinggi yang digunakan yaitu (Termofilik Universitas Andalas) TUA-07. Untuk aplikasinya perlu dilakukan optimasi produksi enzim terhadap isolat tersebut dengan menguji beberapa faktor abiotik diantaranya suhu, pH dan agitasi. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai "Optimasi Faktor Abiotik Terhadap Isolat Bakteri Termofilik Untuk Produksi Amilase"

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2022 hingga Februari 2023 di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Andalas, Padang. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktor dan 3 ulangan. Selanjutnya dilakukan bertahap untuk agitasi dan uji stabilitas amilase terhadap isolat bakteri termofilik untuk produksi amilase.

Kurva Pertumbuhan

Diinkubasi pada suhu 500C (inokulum), agitasi 150 rpm selama 24 jam. Setelah itu dipipetkan 5 ml inokulum ke dalam 95 ml media produksi amilase pada Erlenmeyer 250 ml. Disampling 1 ml dari kultur bakteri, kemudian diukur kekeruhan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Setiap interval 1 jam dilakukan pencuplikan pada kultur bakteri seperti langkah sebelumnya. Cuplikan dihentikan setelah terjadi penurunan pertumbuhan isolat bakteri.

Uji Aktivitas Amilase Metode Iodium

Disiapkan 2 buah tabung reaksi dan diberi label kontrol dan uji. Masing – masing tabung ditambahkan 1 ml substrat dan diinkubasi pada suhu 500C selama 5 menit. Selanjutnya tambahkan 0,5 ml aquades pada tabung kontrol dan 0,5 ml enzim pada tabung uji, lalu diinkubasi pada suhu 500C selama 30 menit, selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 1250C selama 30 menit untuk menghentikan reaksi enzim. Setelah 5 menit kedua tabung didinginkan dan masing – masing tabung ditambahkan iodium sebanyak 1 ml dan 8 ml aquades lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. (Sylvia & Silvera, 2018).

Penentuan suhu dan pH optimum

Variasi pH medium 6 ; 7 ; 8 sebagai faktor A dan diinkubasi pada masing suhu 500C, 600C, 700C, dan 800C sebagai faktor B. lalu, diagitasi 150 rpm selama waktu tertentu (idiofase) dari masing – masing isolat bakteri. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim.

Penentuan Agitasi Optimum

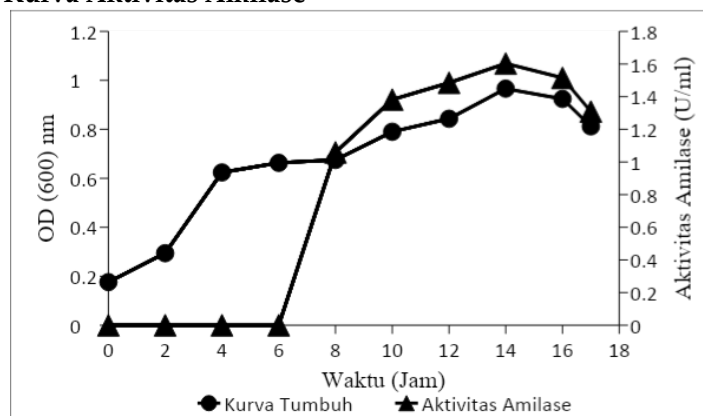
Divariasikan pada agitasi 100 rpm ; 125 rpm ; 150 rpm ; 175 rpm ; 200 rpm dengan kondisi medium sesuai dengan hasil perlakuan optimum suhu dan pH. Kemudian, dicuplik selama waktu tertentu (idiofase) dari masing – masing isolat bakteri. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim.

Pengujian Stabilitas Amilase

Pengujian stabilitas enzim dilakukan dengan menginkubasi ekstrak kasar enzim yang diperoleh dari kondisi optimum perlakuan pada suhu 60°C. Selanjutnya disampling interval satu jam hingga aktivitas amilase turun.

Hasil dan Pembahasan

Kurva Tumbuh dan Kurva Aktivitas Amilase



Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan aktivitas amilase isolat TUA-07

Kurva pertumbuhan pada isolat bakteri TUA-07 menunjukkan fase lag yang sangat singkat. Hal ini disebabkan karena medium yang digunakan untuk inokulum sama dengan medium produksi sehingga bakteri tidak memerlukan waktu lama untuk beradaptasi. Menurut Waluyo (2007) salah satu faktor yang mempengaruhi lamanya fase adaptasi adalah medium, bakteri yang ditempatkan pada medium yang sama dengan medium sebelumnya memerlukan waktu adaptasi yang singkat.

Selanjutnya fase eksponensial dimana sel pada mikroorganisme dalam keadaan stabil dan mampu membelah diri secara berganda. Pada grafik terlihat fase eksponensial yang signifikan terjadi dari jam ke-1 hingga ke-14. Setelahnya bakteri mulai memasuki fase kematian pada gambar 3 dapat dilihat setelah jam ke-14 jumlah sel bakteri mulai menurun, hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri yang mati meningkat disebabkan karena zat makanan atau nutrisi yang dibutuhkan dibutuhkan bakteri untuk hidup sudah berkurang (Fardiaz, 1992).

Gambar 3 juga menunjukkan aktivitas amilase tertinggi pada jam ke-14 yaitu 1,603 U/ml, hal ini menunjukkan bahwa waktu panen enzim dapat dilakukan pada jam ke-14. Penelitian yang dilakukan oleh Arzita & Agustien (2013), bakteri *Bacillus* sp. PA-05 aktivitas optimalnya pada 14 jam. Waktu inkubasi dengan aktivitas amilase paling tinggi tersebut digunakan sebagai waktu inkubasi optimum untuk produksi amilase (Irena, 2010).

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa setelah mencapai aktivitas optimum pada jam ke-14 enzim mulai mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena setelah mencapai aktivitas optimum kadar glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis pati menjadi glukosa oleh enzim sudah mencukupi kebutuhan bakteri sehingga bakteri tidak perlu menghasilkan enzim dengan menghidrolisis pati (Desriningsih, 2011). Penentuan suhu dan pH untuk produksi amilase. Hasil pengujian optimasi suhu inkubasi dan pH medium terhadap isolat bakteri TUA-07 dan TUA-09 secara statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata terhadap beberapa perlakuan.

Tabel 1. Rata-rata produksi amilase pada suhu inkubasi dan pH medium yang berbeda pada isolat bakteri TUA-07

Suhu	pH			Rata-rata (Suhu)
	pH 6	pH 7	pH 8	
50°C	1,459 e	1,793 c	2,008 ab	1,754 B
60°C	1,767 cd	1,787 c	1,941 b	1,831 A
70°C	1,363 f	1,375 f	1,351 f	1,363 C
80°C	2,049 a	1,692 d	1,495 e	1,745 B

Keterangan : Angka-angka pada setiap baris dan kolom yang diikuti oleh huruf besar dan huruf kecil yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata terhadap masing-masing faktor tunggal dan faktor interaksi pada uji DNMRT taraf 5%. Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan terhadap faktor suhu menunjukkan hasil terbaik pada suhu 600C, pada pH semua perlakuan tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Sedangkan untuk keseluruhan kombinasi perlakuan pada isolat bakteri TUA-07 rata-rata produksi amilase paling tinggi yaitu 2,049 U/ml pada suhu 800C dan pH 6.

Penelitian Arzita & Anthoni (2013) mendapatkan kondisi optimum untuk produksi amilase pada suhu 60°C dengan pH 7 dan agitasi 150 rpm. Indriati et al., (2015) mendapatkan kondisi optimum pada suhu 60°C dan pH 8,5. Arfah et al., (2014) mendapatkan kondisi optimum pada suhu 55°C dengan pH 6. Setiap enzim memiliki pH optimum dimana pada pH tersebut struktur tiga dimensinya paling kondusif untuk mengikat substrat. Menurut Palmer (1981), aktivitas enzim yang menurun karena perubahan pH disebabkan oleh berubahnya keadaan ion substrat dan enzim. Perubahan tersebut dapat terjadi pada residu asam amino yang berfungsi untuk mempertahankan struktur tersier dan kuaterner enzim aktif. Perubahan suhu dan pH menyebabkan bertambahnya efek terhadap pertumbuhan mikroorganisme dan produksi amilase (Anyangwa et al., 1993). pH sangat berpengaruh terhadap reaksi enzimatis karena dapat mempengaruhi gugus-gugus ionik enzim, sehingga mempengaruhi sisi aktif enzim dan konformasi enzim (Lehninger, 1982). Penentuan agitasi optimum untuk produksi amilase. Hasil pengujian optimasi agitasi terhadap isolat bakteri TUA-07 dan TUA-09 disajikan dalam tabel berikut.

Tabel 3. Rata-rata produksi amilase suhu inkubasi 80°C pada pH 6

Agitasi	TUA 07
100 rpm	1,146
125 rpm	2,789
150 rpm	2,049
175 rpm	2,542
200 rpm	1,181

Tabel 3 menunjukkan bahwa aktivitas amilase tertinggi dihasilkan pada agitasi 125 rpm. Hal ini menunjukkan bahwa agitasi memberikan efek terhadap produksi enzim, agitasi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda juga terhadap bakteri dalam produksi enzimnya. Agitasi membantu proses transfer oksigen, sistem agitasi menyebabkan gelembung udara menjadi lebih kecil sehingga luar permukaan dimana terjadinya transfer oksigen menjadi lebih besar dan waktu tinggal gelembung udara di medium lebih lama (Muhakim et al., 2015).

Tabel 2 juga menunjukkan agitasi yang memiliki nilai aktivitas yang rendah itu adalah agitasi pada 200 rpm, hal ini disebabkan karena pengocokan yang sangat cepat akan membentuk buih pada medium yang dapat memberi efek terhadap bakteri dalam produksi enzim hingga produksi enzim menjadi rendah

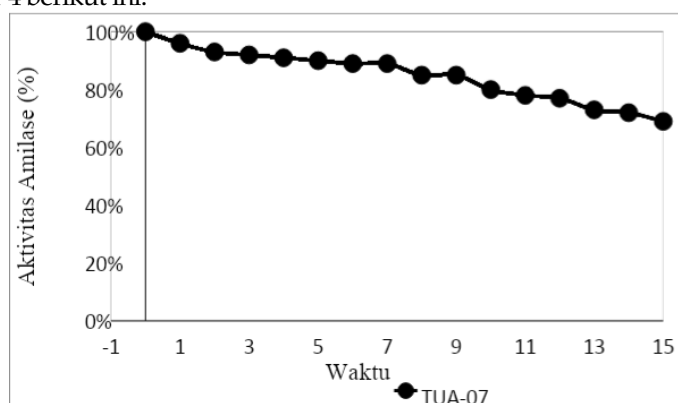
(Desriningsih, 2013). Kondisi aktivitas amilase sebelum dan sesudah optimasi. Hasil pengamatan kondisi aktivitas amilase sebelum dan sesudah optimasi disajikan dalam tabel berikut.

Tabel 4. Kondisi aktivitas amilase sebelum dan sesudah optimasi

ISOLAT	AKTIVITAS AMILASE (U/ML)		PENINGKATAN AKTIVITAS AMILASI (%)
	Sebelum	Sesudah	
TUA - 07	1,603	2,789	73,98

Tabel 4 menunjukkan optimasi terhadap bakteri memberikan efek terhadap aktivitas amilase. Isolat bakteri TUA-07 menunjukkan peningkatan aktivitas amilase hingga 73,98% dari aktivitas awal enzimnya. Hal ini membuktikan bahwa faktor abiotik seperti suhu, pH dan agitasi memberikan pengaruh terhadap bakteri dalam produksi enzim sesuai dengan pernyataan Sumantha, Laroche, and Pandey., (2006) bahwa peningkatan produksi enzim bisa dilakukan dengan rekayasa pada komposisi medium, pH medium, suhu, sumber karbon dan sumber nitrogen.

Beberapa penelitian yang juga mengalami peningkatan aktivitas amilase setelah optimasi diantaranya Han et al., (2014) hasil penelitiannya menunjukkan bahwa aktivitas amilase meningkat sebesar 31,1% setelah dilakukan optimasi pada suhu 55°C, pH 7,0. Verma et al., (2015) menunjukkan bahwa aktivitas amilase meningkat sebesar 85,5% pada suhu 60°C, pH 7,5 dan Ali et al., (2018) menunjukkan bahwa aktivitas amilase meningkat sebesar 45,5% pada suhu 55°C, pH 7,0 Uji stabilitas amilase. Pengamatan uji stabilitas amilase disajikan pada Gambar 4 berikut ini.



Gambar 5. Grafik hasil uji stabilitas amilase

Hasil uji stabilitas terhadap isolat TUA-07 menunjukkan bahwa aktivitas enzim pada jam ke-10 sudah mulai menurun hingga 80% dari aktivitas awal sampai pada jam ke-15 yaitu 69% dari aktivitas awal. Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan memiliki kestabilan yang cukup tinggi. Menurut Adeyanju et al., (2007), nilai tinggi dari mikroorganisme yang menghasilkan enzim ekstraseluler terletak pada sifat termostabilitas ekstrim dimana termostabilitas dari amilase yang digunakan dalam bioproses pati.

Gupta., (2005) menyatakan bahwa penurunan aktivitas enzim sebesar 20-30% dari nilai awal dianggap sebagai batas minimal penurunan aktivitas enzim yang dapat dikatakan stabil dan dapat diterima dalam banyak aplikasi industri atau biologi. Menurut Pramiadi et al., (2014), termostabilitas yang dimiliki oleh enzim yang berasal dari mikroorganisme termofil itu berkaitan dengan adanya asosiasi senyawa protein enzim dengan molekul lainnya seperti lipid, polisakarida maupun protein lainnya yang menyebabkan terbentuknya suatu senyawa yang memiliki mekanisme yang memungkinkan untuk tetap stabil, selain itu, adanya peningkatan

ikatan hidrogen dan salt bridge pada protein dari enzim termofil dan perbedaan jenis serta komposisi asam amino penyusun protein enzim termofil dibandingkan dengan protein enzim mesofilik.

Stabilitas merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim dalam aplikasinya sebagai biokatalis. Stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai kestabilan aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim tersebut, serta kestabilan terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut tertentu (asam, basa) dan oleh pengaruh temperatur dan pH ekstrim. Terdapat dua prinsip utama untuk memperoleh enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrim alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil (Saktiwansyah, 2001).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa suhu, pH dan agitasi optimum untuk isolat TUA-07 adalah suhu 80°C pada pH 6 dan agitasi 125 rpm dan stabilitas enzim untuk isolat TUA-07 bertahan hingga 80% selama 10 jam.

References

- Adeyanju and M.F. Ishiyaku, (2007). Genetic Study of Earliness in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Under Screen House Condition. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 1(1): 34-37.
- Ali, S., Gul, A., Jan, T., Ullah, S., Naz, I., Zahoor, A. F., & Hameed, A. (2018). Optimization of alpha-amylase production from thermophilic *Bacillus* sp. by using response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 77-86.
- Anyangwa EM, Mapsev C, Musanage P, Elemva M (1993) The effectand removal of starch in the sugar refining industry. *J. Int. Sugar*, 95:210-213.
- Anonymous, BBC Research. (2018). Global Markets For Enzymes in Industrial Applications. BCC Research Report Overview. 1-13
- Arfah, AR, Patong R., Ahmad A., Djide N., (2014), Isolation and Identification of Amylase-Producing Thermophilic Bacteria from Lejja Hot Springs, South Sulawesi, *Al-kimia Research Journal of Chemical Science*, 2 (2): 36 -46.
- Arzita and A. Agustien. (2013). Potensi *Bacillus* sp. PA-05 termofilik. *Prosiding Semirata BKS-PTN B, Universitas Lampung*. Lampung.
- Desriningsih. (2011). Efek suhu inkubasi dan pH medium dalam produksi amylase dari isolat bakteri TPT 20 termo-alkalifilik. Skripsi Sarjana Biologi. Universitas Andalas, Padang (Unpublished).
- Fardiaz, S. (1993). Analisis Mikrobiologi Pangan. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Gupta, M. N. (2003). Enzyme functionality, stability and covalent structure: a few correlations. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(1), 23-29.
- Han, Y., Zhang, X., Chen, K., & Wu, M. (2014). Optimization of alpha-amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp. using a hybrid experimental design. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(8), 1173-1182.
- Irena, Amelinda. (2010). Isolasi dan Optimasi Protease Bakteri Termofilik Dari Sumber Air Panas Tangkuban Perahu Bandung [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Lehninger. (1982). Terjemahan Dasar-Dasar Biokimia Jilid I. Jakarta: Erlangga. Martoharsono, S. (1982). Biokimia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Muhakim, Ali, Muhammad Amri, Yulianti dan Nini Astuti Alwi. (2015). Substrat, Aerasi, Agitasi Dan Pertumbuhan Sel Mikroba Dalam Proses Fermentasi. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwel VW. (2003). Biokimia Harper. Hartono A, penerjemah; Jakarta: EGC. Terjemahan dari: Harper's Biochemistry.
- Palmer, T. 1985. Understanding Enzyme. Elishorwood Publisher.
- Pelezar, M. J. dan Chan, E. C. S., (2005). Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Alih bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S. dan Angka, S. L., UI Press, Jakarta.
- Pramiadi, Drajat., Evy Yulianti dan Anna Rakhmawati.(2020) Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Lipase Termotabil Dari Bakteri Termofilik Pasca Erupsi Merapi. Universitas Negeri Yogyakarta. Yogyakarta.
- Saktiwansyah, E. (2001). Karakterisasi Enzim Lipase Intraseluler Dengan Aktivitas Esterifikasi Dari Kapang *Rhizopus Oryzae* TR 32 [Tesis]. Program Pascasarjana, IPB, Bogor.
- Sumantha, A., Larroche, C. and Pandey, A. (2006) Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 211-220.
- Sutandi C. 2003. Analisis potensi enzim protease lokal [skripsi]. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Irdawati dan Mades Fifendy. (2011), Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas
- Rimbo Panti Pasaman. Laporan Penelitian. Universitas Negeri Padang.
- Mehta, D. and Tulasi, S. (2016). Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Front. Microbiol*, 7 (1129) : 1-21.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R.(2000). Advances in Microbial Amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31 (2) :135-152.
- Reddy NS, Nimmagadda A & Rao KR. (2003). An overview of themicrobial α - Amylase family. *African Journal of Biotechnology*. 2: 645–648.
- Souza, Paula M., and Oliveira M. (2010). Application of microbial α -amylase in industry. *Braz J Microbiol*. 41 (4): 850-861.
- Sylvia, Elmerillia H,A,Z., dan Silvera D. (2018). Analisis Tiga Metode Penentuan Aktivitas Enzim Amilase. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Verma, M. L., Shukla, P., & Soni, R. (2015). Optimization of alpha-amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp. using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 334-342.
- Vidyalakshmi, R, R. Parathanan and J. Indhumathi. (2009).Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal Of Chemistry*, 4(1): 89-91.
- Waluyo, Lud., (2007), Mikrobiologi Umum, Malang : UPT Penerbitan Universitas Muhammadiyah Malang.
- Wijayanti, Titik (2012) Optimasi produksi , fraksinasi dan karakterisasi amilase termotabil dari bakteri termofilik isolat sumber air panas Cagar Jawa Timur / Titik Wijayanti. Thesis, Universitas Negeri Malang.
- Yuliana, E.N., dan Nuniek. H. (2008). Screening Bakteri Termofilik Penghasil Enzim Amilase Dari Sumber Air Panas Singgahan Tuban, Jawa Timur. *UNESA Journal of Chemistry*, 3(3):190.