



## Isolasi dan Karakterisasi Amilase Termotabil dari *Geobacillus dYTae-14*

Agustina Lulustyaningati Nurul Aminin<sup>1\*</sup>, Yulia Milarsih<sup>1</sup>, and Nies Suci Mulyani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang 50275

\*Corresponding author: [agustina.aminin@live.undip.ac.id](mailto:agustina.aminin@live.undip.ac.id)

Received: 11 November 2022 / Accepted: 30 November 2022

Available online: 30 November 2022

### Abstract

Enzim amilase termotabil merupakan salah satu enzim yang sangat potensial bagi industri, terutama industri makanan dan farmasi. Enzim termotabil memiliki beberapa keuntungan seperti reaksi berlangsung lebih cepat, menurunkan viskositas dan mencegah kontaminasi karena produksi berlangsung pada suhu tinggi. Penelitian ini mengeksplorasi potensi amilase termotabil dari isolat lokal *Geobacillus dYTae-14* yang tumbuh optimum pada suhu 55°C. Aktivitas spesifik amilase ditentukan berdasarkan produk glukosa yang diukur dengan metode DNS dan kadar protein ditentukan dengan metode Lowry. Tahapan penelitian ini meliputi pembuatan kurva pertumbuhan, isolasi enzim amilase termotabil, pemurnian parsial enzim, dialisis, penentuan aktifitas spesifik tiap fraksi, penentuan kandungan protein, penentuan temperatur dan pH optimum. Amilase termotabil dari *Geobacillus dYTae-14* berhasil diisolasi dan menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi kejenuhan ammonium sulfat 20-40%, sebesar 934,356 unit/mg protein. Temperatur optimum amilase termotabil dicapai pada 85°C dan pH optimum di pH 8; dengan aktivitas spesifik sebesar 2143,538 unit/mg protein.

**Kata Kunci:** amilase, termotabil, *Geobacillus sp.*

### 1. Pendahuluan

Kemajuan bioteknologi baru-baru ini telah mendorong studi isolasi berbagai enzim, dengan nilai industri dan ekonomi yang tinggi, sebagai katalis biologis makromolekul yang mempercepat laju reaksi kimia [1]. Di antara enzim yang penting untuk industri, amilase menempati 25-30% kebutuhan pasar enzim dunia [2], enzim ini mendapat lebih banyak perhatian karena aplikasi komersialnya dan manfaat ekonominya yang luas. Enzim ini berperan menghidrolisis pati untuk menghasilkan maltosa dan maltotriosa dari amilosa, sedangkan glukosa, maltosa dan dekstrin dari amilopektin [3]. Sayangnya, aplikasi reaksi yang dikatalisis amilase memiliki keterbatasan untuk proses industri yang dilakukan pada suhu tinggi, karena stabilitasnya yang buruk. Penemuan amilase termotabil tidak hanya memecahkan masalah stabilitas, tetapi juga mempercepat tingkat reaksi, mengurangi kemungkinan kontaminasi dan menurunkan viskositas medium, sehingga secara langsung menguntungkan industri pengolahan pati di bawah suhu tinggi dan mensupport *green chemistry* [4]. Menurut Aiyer [5], kelompok enzim amilase meliputi alfa-amilase, beta-amilase dan glucoamilase.

Enzim amilase termotabil dapat diperoleh dari berbagai jenis mikroba, termasuk

diantaranya jamur, ragi dan bakteri [6]. Jamur dan bakteri merupakan sumber enzim yang mendominasi aplikasi enzim di sektor-sektor industri [7]. Penelitian-penelitian tentang isolasi dan karakterisasi amilase termotabil sudah banyak dilakukan di berbagai belahan dunia. Isolasi  $\alpha$ -amilase di wilayah Himalaya bagian Uttarakhand, diketahui bahwa  $\alpha$ -amilase yang diisolasi dari *Geobacillus sp.* memiliki temperatur optimum sebesar 60°C, dengan aktivitas enzim sebesar 135 unit/mL [8]. Isolasi dan karakterisasi  $\alpha$ -amilase dari *Bacillus laterosporus* yang berasal dari India, dilaporkan memiliki temperatur optimum 60°C, dengan aktivitas 4,383 unit/mL [9].

*Geobacillus dYTae-14* merupakan salah satu isolat termofilik lokal yang telah diisolasi dari Sumber Mata Air Panas Gedong Songo, Ungaran, Jawa Tengah dan diketahui memiliki potensi sebagai penghasil enzim termotabil [10]. Bakteri termofilik ini mampu menghasilkan beberapa enzim termotabil, diantaranya adalah xilanase, amilase, galaktosidase dan protease. Damayanti [11] telah mengkarakterisasi enzim  $\beta$ -galaktosidase termotabil dari bakteri tersebut. Isolasi dan karakter optimum untuk temperature dan pH enzim amilase dari *Geobacillus dYTae-14* ini, belum pernah dilaporkan sebelumnya. Oleh

Doi:

karena itu, dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan pemurnian parsial menggunakan fraksi kejenuhan ammonium sulfat bertingkat, yang dilanjutkan dengan penentuan aktifitas spesifik dan penentuan temperature dan pH optimum amilase termostabil dari isolat *Geobacillus dYTae14*.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1. Alat dan Bahan

**Alat:** seperangkat alat gelas, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1201).

**Bahan:** Stok isolat *Geobacillus dYTae-14* (koleksi grup riset Agustina LNA, Lab Biokimia, FSM- UNDIP). Bahan dan reagen berikut berasal dari Merck, meliputi: Bacto agar, Yeast extract, Tryptone, Amylum, Glucose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , HCl, NaOH,  $\text{BaCl}_2$ , EDTA, bufer fosfat, reagen 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS), reagen Lowry C, reagen Lowry D, membran selofan (tabung dialisis) (Carolina Biologia).

### 2.2. Cara Kerja

Isolasi dan karakterisasi amilase dari isolat *Geobacillus dYTae14* diawali dengan pembuatan kurva pertumbuhan untuk menentukan fase logaritmik, dimana produksi enzim tertinggi. Langkah selanjutnya adalah produksi enzim, kemudian isolasi dan pemurnian bertingkat. Fraksi dengan tingkat kemurnian tertinggi, kemudian ditentukan temperature dan pH optimumnya

#### 2.2.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Geobacillus dYTae-14* pada Media BSM

Sebanyak 1% starter bakteri diinokulasikan pada 500 mL media BSM cair yang mengandung amilum kemudian diinkubasi pada suhu 55°C. Pengukuran turbiditas sel dilakukan pada panjang gelombang 600 nm, setiap 2 jam hingga jam ke-26.

#### 2.2.2 Isolasi Amilase Termostabil

Isolasi amilase dilakukan pada fase logaritmik dari kurva pertumbuhan yang dilakukan sebelumnya (jam ke-18). Kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 2-4°C. Enzim amilase berada di filtrat (ekstrak kasar).

#### 2.2.3 Pemurnian Amilase secara Fraksinasi Ammonium Sulfat bertingkat

Filtrat (ekstrak kasar) yang diperoleh dari tahap sentrifugasi, ditambah ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan (0-20%) secara perlahan dan diaduk dalam keadaan dingin hingga larut dan disimpan selama semalam

dalam kulkas. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Tahap ini menghasilkan endapan protein fraksi 1 (0-20%). Filtrat yang diperoleh kemudian ditambahkan ammonium sulfat tingkat kejenuhan (20-40%), dilarutkan dan didiamkan semalam, kemudian disentrifus dan menghasilkan endapan yang merupakan fraksi 2 (20-40%). Filtrat berikutnya diberi perlakuan yang sama dengan tingkat kejenuhan berturut-turut (40-60%), (60-80%) dan (80-100%), sehingga diperoleh fraksi 3, 4 dan 5. Setiap fraksi yang diperoleh di-resuspensi dengan bufer fosfat pH 6 sebanyak 1 mL. Setiap fraksi kemudian didialisis menggunakan membran selofan (sebelumnya direbus dalam larutan EDTA). Membran yang berisi fraksi enzim direndam dalam bufer fosfat 0,0008 M pH 6, lalu diaduk dengan magnetic stirer dalam keadaan dingin. Penggantian larutan bufer dilakukan setiap 2 jam dengan dilakukan pengujian terlebih dahulu menggunakan larutan  $\text{BaCl}_2$  hingga tidak terbentuk endapan putih.

#### 2.2.4 Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry melalui penambahan 9,8 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%; 0,1 mL K-Na-tatrat dan 0,1 mL  $\text{CuSO}_4$  (Lowry C) pada setiap fraksi protein, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu dilakukan penambahan 1 mL Lowry D (0,5 mL Folin-Ciocalteu + 0,5 mL aquades), dilanjutkan inkubasi kembali pada suhu kamar selama 10 menit. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  744 nm. Penentuan kadar protein digunakan standar BSA (Bovine Serum Albumin) yang ditentukan dengan cara yang sama menggunakan variasi konsentrasi (0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125; 0,015; 0,0175; 0,02; 0,0225; 0,025 mg/mL).

#### 2.2.5 Penentuan Aktivitas Enzim

Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry melalui penambahan 9,8 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%; 0,1 mL K-Na-tatrat dan 0,1 mL  $\text{CuSO}_4$  (Lowry C) pada setiap fraksi protein, kemudian dilakukan inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Setelah itu dilakukan penambahan 1 mL Lowry D (0,5 mL Folin-Ciocalteu + 0,5 mL aquades), dilanjutkan inkubasi kembali pada suhu kamar selama 10 menit. Pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda$  744 nm. Penentuan kadar protein digunakan standar BSA (Bovine Serum Albumin) yang ditentukan dengan cara yang sama menggunakan variasi konsentrasi (0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125; 0,015; 0,0175; 0,02; 0,0225; 0,025 mg/mL).

#### 2.2.6 Penentuan temperatur dan pH Optimum

Doi:

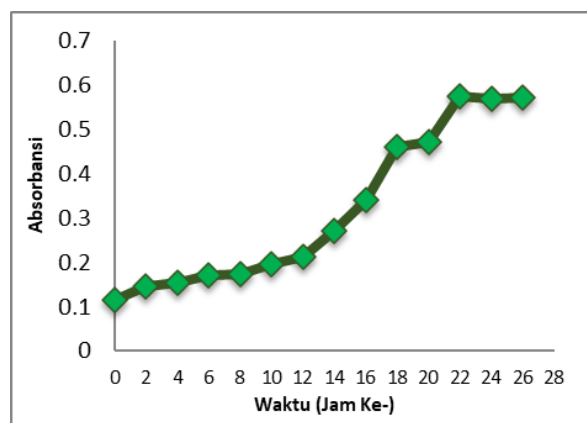
Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara yang sama dengan penentuan aktivitas enzim, dengan variasi suhu 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, dan 95°C. Sedangkan variasi pH dilakukan pada temperatur optimum, pada variasi pH: 6, 7, 8, 9 dan 10.

### 3. Hasil Dan Pembahasan

#### 3.1 Kurva Pertumbuhan *Geobacillus* dYTae-14

Kurva pertumbuhan dilakukan dengan tujuan menentukan fase yang tepat untuk mengisolasi enzim amilase, sehingga diperoleh protein enzim dengan kadar tertinggi. Profil pertumbuhan suatu bakteri dapat diketahui dengan membuat kurva perkembangbiakan sel yang diukur berdasarkan kekeruhan kultur sel (Abs) terhadap waktu.

**Gambar 1.** memperlihatkan profil pertumbuhan *Geobacillus* dYTae-14. Profil tersebut menunjukkan tiga fase pertumbuhan, dimulai dengan fase adaptasi (jam ke 1 sampai 8), fase logaritma (jam ke 10 hingga 20) dan fase stasioner (jam ke 22 sampai 26). Berdasarkan profil tersebut, maka isolasi enzim dilakukan pada fase logaritma, yaitu jam ke-18. Pada jam tersebut, diduga merupakan puncak produksi enzim sebelum pertumbuhan sel masuk fase stasioner.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *Geobacillus* dYTae-14 yang ditumbuhkan pada temperatur 55°C.

Produksi enzim dilakukan dengan menumbuhkan kultur *Geobacillus* dYTae-14 pada media pertumbuhan yang mengandung 1% amilum. Amilum berperan sebagai inducer yang akan merangsang bakteri mensintesis enzim amilase. Proses ini akan merangsang produksi enzim amilase ekstraseluler yang selanjutnya akan berada di bagian filtrat kultur. Pada **Gambar 1.**, fase adaptasi cukup panjang yaitu 8 jam, mengindikasikan bahwa bakteri lebih mengutamakan menggunakan substrat sederhana dari media BSM yang kadarnya kecil, sebelum kemudian menipis dan mulai memproduksi enzim amilase dan menggunakan substrat amilum untuk nutrisi pertumbuhannya.

#### 3.2 Isolasi dan Pemurnian Amilase Termotabil

Proses isolasi enzim dilakukan secara sederhana dengan sentrifugasi untuk memisahkan pelet sel dengan supernatan, karena enzim yang diisolasi merupakan enzim ekstraseluler sehingga dihasilkan ekstrak kasar enzim yang ada di supernatan. Pemurnian enzim dilakukan menggunakan fraksinasi kejenuhan garam amonium sulfat bertingkat. Ekstrak kasar enzim pada dasarnya merupakan campuran antara protein enzim dan protein non enzim, sehingga perlu dilakukan pemisahan.

Fraksinasi menggunakan konsentrasi kejenuhan garam yang bertingkat juga akan memisahkan protein-protein enzim berdasarkan tingkat kelarutannya di air. Protein enzim dengan tingkat kelarutan paling rendah di air, akan mengendap pada konsentrasi kejenuhan garam terendah, sehingga akan didapatkan protein enzim secara bertingkat dengan tingkat kejenuhan berbeda-beda [12]. Langkah ini bertujuan untuk memisahkan protein enzim amilase dari protein lainnya. Prinsip dari fraksinasi menggunakan amonium sulfat adalah salting in dan salting out. Salting in merupakan kelarutan protein meningkat yang terjadi akibat garam berkonsentrasi rendah dalam larutan. Cara ini dilakukan berdasarkan pengaruh dari jumlah penambahan garam ammonium sulfat yang berbeda terhadap kelarutan protein. Pengendapan dengan garam ammonium sulfat terjadi karena adanya kompetisi antara ammonium sulfat dan protein dalam memperebutkan air. Amonium sulfat akan mengikat air, sehingga protein akan mengendap. Dalam hal ini terjadi penurunan kelarutan protein akibat naiknya konsentrasi garam ammonium sulfat dalam larutan, peristiwa ini disebut salting out [13].

Fraksi-fraksi enzim diperoleh dengan tingkat kejenuhan F1 (0-20%), F2 (20-40%), F3 (40-60%), F4 (60-80%) dan F5 (80-100%). Tiap fraksi enzim didialisis untuk menyingkirkan sisa garam yang terikut dalam endapan protein [14]. Masing-masing fraksi enzim yang telah bebas dari garam kemudian ditentukan aktivitas enzimnya berdasarkan kadar glukosa yang dihasilkan dari penguraian substrat amilum pada waktu inkubasi tertentu.

**Tabel 1.** Aktivitas enzim amilase pada tiap fraksi dalam Unit aktivitas

Fraksi	Unit Aktivitas (mg/ml)
EK1	4.239
F1	4.437
F2	4.569
F3	4.503
F4	4.992
F5	4.398

### 3.3 Penentuan Kadar Protein

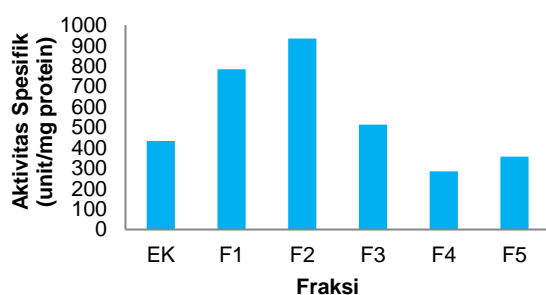
Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry yaitu analisa kuantitatif berdasarkan pembentukan kompleks warna biru hasil reaksi antara ion  $\text{Cu}^{2+}$  dengan nitrogen dari rantai peptida dalam suasana basa dan reduksi fosfomolibdat fosfotungstat pada reagen Folin-Ciocaltaeu oleh rantai samping asam amino. tirosin dan triptofan menjadi heteropolimolibdenum berwarna biru [14]. Warna biru yang dihasilkan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang optimum BSA (Bovine Serum Albumin) yaitu 744 nm. Absorbansi yang diperoleh kemudian diolah dengan kurva standar BSA, sehingga didapatkan kadar protein tiap-tiap fraksi.

**Tabel 2.** Kadar protein setiap fraksi

Fraksi	Absorbansi	Kadar Protein (mg protein)
EK1	0,239	0,00978
F1	0,186	0,00566
F2	0,176	0,00489
F3	0,226	0,00877
F4	0,339	0,01753
F5	0,272	0,01234

### 3.4 Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim

Aktivitas spesifik amilase pada suatu fraksi bergantung pada jumlah enzim yang berinteraksi dengan substrat yang spesifik. Sedangkan besar kadar proteinnya merupakan jumlah protein total pada fraksi tersebut. Aktivitas spesifik enzim dari setiap fraksi dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu besarnya aktivitas enzim dan kadar protein total pada fraksi tersebut. Hasil penentuan aktivitas disajikan pada **Gambar 2**.



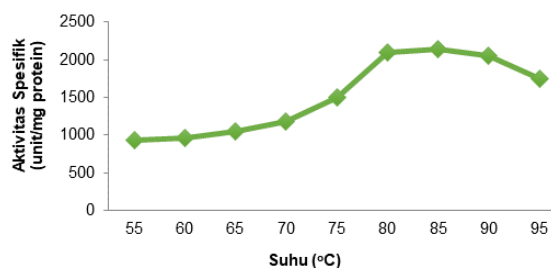
**Gambar 2.** Aktivitas spesifik enzim amilase termostabil di setiap fraksi

Berdasarkan **Gambar 2**, maka fraksi dua (F2) merupakan fraksi dengan nilai aktivitas spesifik tertinggi sebesar 934,356 unit/mg protein. Hal ini mengindikasikan bahwa pada fraksi tersebut, memiliki tingkat keberadaan amilase termostabil paling banyak dibandingkan dengan fraksi lain, sehingga fraksi ini dapat dikatakan sebagai fraksi yang memiliki kemurnian tertinggi.

Aktivitas spesifik enzim amilase di setiap fraksi berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh dua faktor yaitu, unit aktivitas dan kadar protein. Suatu fraksi dengan unit aktivitas besar belum tentu memiliki aktivitas spesifik besar karena tergantung pada kadar proteinnya. Enzim merupakan protein sehingga dengan mengetahui kadar protein keseluruhan maka dapat diketahui besarnya protein yang berfungsi sebagai enzim melalui kemampuannya dalam mengubah substrat menjadi produk yang diinginkan. Oleh karena itu aktivitas spesifik dapat ditentukan melalui perbandingan unit aktivitas terhadap kadar proteinnya.

### 3.5 Penentuan Suhu dan pH Optimum

Enzim termostabil merupakan biokatalisator yang tahan terhadap suhu tinggi, namun seperti karakter protein lazimnya, kerja optimum enzim bergantung pada konformasi protein yang akan berada pada konformasi terbaiknya di suhu dan pH optimumnya. Sehingga penentuan temperatur dan pH optimum sangat penting untuk mendapatkan kondisi aktivitas enzim paling efisien. F2 sebagai fraksi dengan aktivitas spesifik tertinggi digunakan untuk penentuan suhu optimum kerja enzim dengan menguji aktivitasnya pada berbagai suhu. Hasil dari penentuan tahap ini tersaji pada **Gambar 3**.



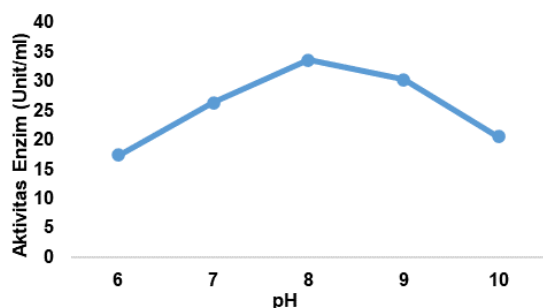
**Gambar 3.** Aktivitas enzim fraksi 2 (F2) pada berbagai temperatur

**Gambar 3** menunjukkan profil yang sigmoid, dimana mula-mula aktivitas enzim mengalami kenaikan dengan meningkatnya temperatur, hingga setelah mencapai kondisi optimumnya mulai menunjukkan penurunan. Pada suhu 55-85°C, aktivitas spesifik enzim meningkat dengan kenaikan suhu, dimana aktivitas tertinggi tercapai pada suhu 85°C, dan kemudian mulai menunjukkan penurunan pada suhu 90 dan 95°C. Jika diamati lebih cermat, kenaikan aktivitas di awal cukup landai, namun kenaikan tajam mulai tampak menginjak suhu 70°C menuju 75°C yang meningkat sekitar 30% dan naik lagi 40% menuju 80°C. Aktivitas tertinggi di 85°C namun relative stabil di kisaran 80-85°C. Penurunan di temperature 90°C relatif kecil dan kemudian cukup signifikan di 95°C. Kondisi ini menunjukkan bahwa amilase dari isolate lokal *Geobacillus* dYTae-14 ini tergolong hyper termostabil. Meskipun bakteri tersebut diisolasi dari lingkungan sumber air panas di suhu 55°C, namun menyimpan potensi enzim ekstraseluler dengan termostabilitas yang sangat tinggi. Hasil

Doi:

yang mirip yaitu diperolehnya enzim dengan termostabilitas tinggi dari bakteri termofilik yang diisolasi pada temperature tidak terlalu ekstrim juga telah banyak dilaporkan [15] [16].

Penentuan pH optimum selanjutnya dilakukan menggunakan variasi pH 6-10. Hasil penentuan tampak pada **Gambar 4**.



**Gambar 4.** Aktivitas enzim fraksi 2 (F2) pada berbagai variasi pH

Pengaruh pH yang berbeda terhadap aktivitas dan stabilitas amilase ditunjukkan pada **Gambar 4.**, menunjukkan aktivitas amilase tertinggi (33,6 U/ml) pada pH basa 8,0. Aktivitasnya cukup berkurang di luar dan di atas pH optimumnya. Hal ini mungkin disebabkan oleh perubahan struktur tersier enzim, yang disebabkan oleh perubahan muatan listrik rantai samping pada sisi aktif, sehingga mempengaruhi aktivitas enzim. PH 8,0 telah dilaporkan sebagai optimum untuk aktivitas amilase oleh *Bacillus subtilis* JS-2004 [17]. Aktivitas enzim cenderung ke arah kisaran pH basa, menunjukkan sifat alkalifilik dari enzim. Banyak dari amilase yang dilaporkan adalah termostabil atau aktif basa, tetapi amilase dari *Geobacillus* ini bersifat termostabil dan alkalifilik, yang signifikan secara industri.

Dari pengamatan, terbukti bahwa bahkan pada suhu yang lebih tinggi enzim kasar aktif, membangun sifat termostabilnya. Termostabilitas enzim yang paling penting untuk ekonomi aplikasi industri, terutama industri gula cair membutuhkan -amilase termostabil untuk mempertahankan aktivitasnya lebih lama pada suhu yang lebih tinggi [18]. Hidrofobisitas inti yang lebih tinggi, loop panjang yang lebih pendek, peningkatan kerapatan pengepakan, peningkatan pembentukan ikatan hidrogen, ikatan disulfida dan sejumlah besar interaksi ionik merupakan faktor penentu termostabilitas enzim [19] [20].

### Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Tim Peneliti dan Laboratorium Biokimia Undip untuk fasilitas, saran, dan diskusinya.

### Kesimpulan

Amilase termostabil telah berhasil diisolasi dari bakteri *Geobacillus* dYTae-14, menggunakan media BSM dengan inducer amilum. Isolasi enzim dilakukan pada fase logaritmik di jam ke-18. Fraksi kejenuhan

ammonium sulfat 20-40% (F2) merupakan fraksi yang memiliki tingkat kemurnian tertinggi. Suhu optimum amilase termostabil yang diisolasi dari bakteri *Geobacillus* dYTae-14 adalah 85°C dan pH optimum 8.

### Daftar Pustaka

- [1] Verma, AMBIKA, MONIKA Gupta, POONAM Shirkot, Isolation and characterization of thermophilic bacteria in natural hot water springs of Himachal Pradesh (India), *The Bioscan*, 9, 3, (2014), 947-952
- [2] Singh, SURENDRA, VINNI Sharma, ML Soni, SHIPRA Das, Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 1, (2011), 486-496
- [3] Sharma, Parul, Sonika Gupta, Anuradha Sourirajan, Kamal Dev, Characterization of extracellular thermophilic amylase from *Geobacillus* sp. isolated from Tattapani Hot Spring of Himachal Pradesh, India, *Current Biotechnology*, 4, 2, (2015), 202-209
- [4] Homaei, Ahmad, Mehri Ghanbarzadeh, Ferial Monsef, Biochemical features and kinetic properties of  $\alpha$ -amylases from marine organisms, *International journal of biological macromolecules*, 83, (2016), 306-314 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.080>
- [5] Aiyer, Prasanna V, Amylases and their applications, *African journal of biotechnology*, 4, 13, (2005),
- [6] Gupta, Rani, Pareshe Gigras, Harapriya Mohapatra, Vineet Kumar Goswami, Bhavna Chauhan, Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective, *Process biochemistry*, 38, 11, (2003), 1599-1616 [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- [7] Sarjono, Purbowatiningrum Ria, Ismiyanto Ismiyanto, Nor Basid Adiwibawa Prasetya, Bakteri Endofit F4 dari Daun Pepaya (*Carica papaya* L): Potensinya sebagai Penghasil Enzim Ekstraseluler, *Greensphere: Journal of Environmental Chemistry*, 2, 1, (2022), 1-7 <https://doi.org/10.14710/giec.2022.14794>
- [8] Dheeran, Pratibha, Sachin Kumar, Yogesh K Jaiswal, Dilip K Adhikari, Characterization of hyperthermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. IPTN, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 6, (2010), 1857-1866 <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2430-9>
- [9] Kumar, N Manoj, S Karthikeyan, G Jayaraman, Thermostable alpha-amylase enzyme production from *Bacillus laterosporus*: Statistical optimization, purification and characterization, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, 1, (2013), 38-44 <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.10.005>
- [10] Aminin, Agustina LN, F Madayanti, P Aditiawati, Akhmaloka, Isolation of

## Doi:

- Thermophiles From Gedongsongo Hot Spring Using A Simple Enrichment Medium, *International Seminar Advance in Biological Science*, 2007
- [11] Damayanti, Ken Ima, Nies Suci Mulyani, Agustina LN Aminin, Freeze-thaw system for thermostable  $\beta$ -Galactosidase isolation from Gedong Songo *Geobacillus* sp. isolate, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 23, 11, (2020), 383-389  
<https://doi.org/10.14710/jksa.23.11.383-389>
- [12] Dennison, Clive, *A guide to protein isolation*, Springer Science & Business Media, 2003,
- [13] Lehninger, Albert L, Maggy THENAWIDJAJA, Dasar-dasar Biokimia, Jilid 3, (1994),
- [14] Clark, John M, *Experimental biochemistry*, 1964
- [15] Reddy, NS, Annapoorna Nimmagadda, KRS Sambasiva Rao, An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family, *African journal of biotechnology*, 2, 12, (2003), 645-648  
<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1119>
- [16] D'Auria, Sabato, Roberto Nucci, Ignacy Gryczynski, Zgymunt Gryczynski, Joseph R Lakowicz, The  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 C, *Biophysical chemistry*, 81, 1, (1999), 23-31  
[https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00086-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00086-1)
- [17] Asgher, M, M Javaid Asad, SU Rahman, RL Legge, A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing, *Journal of food engineering*, 79, 3, (2007), 950-955  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.053>
- [18] Crabb, W Douglas, Colin Mitchinson, Enzymes involved in the processing of starch to sugars, *Trends in Biotechnology*, 15, 9, (1997), 349-352  
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01082-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01082-2)
- [19] Gromiha, M Michael, Motohisa Oobatake, Akinori Sarai, Important amino acid properties for enhanced thermostability from mesophilic to thermophilic proteins, *Biophysical chemistry*, 82, 1, (1999), 51-67  
[https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(99\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(99)00103-9)
- [20] Zhang, Shan, Yongzhi He, Haiying Yu, Zhiyang Dong, Seven N-terminal residues of a thermophilic xylanase are sufficient to confer hyperthermostability on its mesophilic counterpart, *PLoS One*, 9, 1, (2014),  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087632>