

Identifikasi molekuler bakteri *indigenous* penghasil enzim amilase dari pati sagu asal Poom Kepulauan Yapen

Molecular identification of indigenous bacteria that produce amylase enzyme from sago starch from Poom, Yapen Islands

Hesron¹⁾, Maria Massora^{1*)}, Rina Anita Moge¹⁾, Wanggai, I. M²⁾, Utami, P²⁾

¹⁾Program Studi Magister Biologi Program Pascasarjana Universitas Papua

²⁾Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Papua
Jl. Gunung Salju, Manokwari, Papua Barat 98314

*) Email: m.massora@unipa.ac.id

Disubmit: 16 Juli 2024, direvisi: 28 Juli 2025, diterima: 30 Juli 2025

Doi : 10.30862/cassowary.cs.v8.3.320

ABSTRACT: *This study aimed to identify indigenous bacterial isolates producing Amylase enzyme from sago starch from Poom, Yapen Islands, using the 16S rDNA sequence molecular method. The isolates identified were IA4 and IA8, which exhibited the highest values of amylase enzyme activity. Bacteria were identified based on DNA amplification using Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers 27F and 1492R. Based on the results of molecular identification, the similarity index of Isolate IA4 and Bacillus cereus D21 is 97.80%, while isolate IA8 had a similarity index of 99.79% with Alcaligenes faecalis Y5. Therefore, the amylolytic bacterial isolates were named Bacillus cereus strain IA4 and Alcaligenes faecalis strain IA8.*

Keywords: *Bacillus cereus strain IA4, Alcaligenes faecalis strain IA8, Sago Starch Poom Yapen, Amylolytic bacteria, Indigenous*

PENDAHULUAN

Pohon sagu (*Metroxylon* sp) adalah tanaman yang menghasilkan tepung dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan makanan maupun bahan baku industri. Tepung sagu bersifat multifungsi, pemanfaatannya banyak digunakan sebagai bahan baku industri kosmetik, kertas, bioetanol serta kelongsong kapsul dan film kemasan makanan yang *biodegradable* (Hasibuan, 2009). Pohon sagu tumbuh di pinggir sungai dan daerah rawa dan di Indonesia dan paling di daerah Sulawesi, Papua dan Maluku (Hariyanto, 2011).

Sagu mempunyai kemampuan beradaptasi yang luar biasa terhadap lingkungan, sehingga

tumbuhan ini dapat tumbuh mulai dari daerah berair hingga mencapai ketinggian 700 m dpl (Fridayani, 2006). Di wilayah Indonesia Timur, banyak penduduk memanfaatkan tepung sagu sebagai bahan makanan utama.

Tingginya kandungan pati dalam pohon sagu memungkinkannya untuk digunakan sebagai substrat yang baik bagi pertumbuhan berbagai macam bakteri, salah satunya bakteri amilolitik. Bakteri yang berpotensi menghasilkan amilase yang lebih baik diisolasi dari sumber kaya amilum. Bakteri amilolitik dapat memecah tepung dan mengubahnya menjadi sumber nutrisi untuk pertumbuhan

bakteri tersebut (Rahayu *et al.*, 2019 ; Vaseekaran *et al.* 2010).

Bakteri amilolitik merupakan jenis bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis pati atau amilum menjadi senyawa lebih sederhana dapat digunakan sebagai biokatalisator dalam hidrolisis pati (Nurmalinda *et al.* 2013; Türker dan Özcan 2015). Amilase merupakan enzim yang menghidrolisa molekul pati untuk menghasilkan produk bervariasi, salah satunya yaitu dekstrin (Chung *et al.* 1997).

Menurut Sandakila (2013), pada saat ini enzim banyak digunakan dalam dunia industri, kebanyakan enzim yang digunakan adalah kelompok enzim hidrolitik seperti *katalase*, *amilase*, *lipase*, dan *protease* yang biasanya diekstraksi dari berbagai jenis sel makhluk hidup namun sekarang lebih banyak diekstraksi dari mikroba, karena mikroba memiliki masa pertumbuhan yang pendek dan dapat dikontrol sesuai kebutuhan.

Menurut Suri (2019), terdapat beberapa jenis bakteri yang dapat menghasilkan enzim amilolitik seperti *Bacillus amyloliquifaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aquamaris*, dan *Bacillus licheniformis*. Bakteri *indigenous* adalah bakteri yang hidup secara alami di alam dan bermanfaat bagi manusia (Batubara *et al.*, 2015). Beberapa peranan Bakteri *Indigenous* adalah sebagai agen bioremediasi limbah (Diswanto dan Kardenia, 2010), penghasil antibiotik (Panagan, 2011), pelarut fosfat (Marista *et al.*, 2013), pengendali hayati tanaman (Salaki, 2011), dan menghasilkan enzim yang berpotensi di bidang industri dan lainnya (Dewi, 2007). Berdasarkan uraian di atas terkait pentingnya peranan enzim amilase maka pada penelitian ini dilakukan identifikasi Isolat bakteri *Indigenous* penghasil Enzim Amilase dari Pati Sagu asal Poom Kepulauan Yapen.

METODE PENELITIAN

Tempat Penelitian

Isolat yang digunakan adalah isolat IA4 dan Isolat IA8 yang merupakan isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi hasil penelitian Wanggai, I.M (2022) dan Utami, P (2023). Peremajaan isolat bakteri dilakukan pada Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNIPA dan untuk Identifikasi molekuler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu tabung reaksi, erlenmeyer, gelas ukur, beaker glass, pipet tetes, ose, batang pengaduk, Laminar Air Flow (LAF), cawan petri, timbangan analitik, *hote plate*, vortex, PCR thermo cycler, UV transiluminator, dan elektroforesis, Inkubator, sentrifuge, vortex, alat PCR, nanodrop, dan cetakan agarosa.

Bahan-bahan yang digunakan adalah Aquades, etanol NaCl, Medium Nutrient Agar (NA), Medium Nutrient Broth (NB), mikrotube, *Nucleic Lysis Buffer*, *Protein Precipitation Solution*, *RNase A Solution*, *DNA rehydration solution*, Isopropanol, ddH₂O, *Go Taq Green Master Mix*, *forward primer*, *reserve primer*, gel agarosa, *TAE buffer* 1x, *DNA ladder*. Bahan fisik berupa kertas cakram, *es batu*, dan *tissu*.

Prosedur penelitian

Persiapan

Sterilisasi

Alat yang digunakan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit, suhu 121°C. Hal yang sama dilakukan untuk mensterilkan medium yang telah dibuat. Alat lain seperti ose disterilkan dengan pemijarkan api bunsen.

Peremajaan Isolat

Dua isolat bakteri (IA4 dan IA8), diinokulasikan pada medium NA (*Nutrient Agar*) mirroring dengan sebanyak 1 ose diambil, selanjutnya inokulasikan dengan teknik gores dan diinkubasi pada suhu 30°C selama kurang lebih 48 jam.

Identifikasi secara Molekuler Berdasarkan 16S rDNA

Sampel murni bakteri amilolitik dikirim ke Universitas Brawijaya untuk dilakukan identifikasi spesies secara molekuler menggunakan gen 16S rDNA dengan urutan metode sebagai berikut:

Isolasi DNA Genom Isolat Bakteri

Identifikasi molekuler dilakukan melalui sekuens gen 16S rDNA. DNA bakteri

diekstraksi menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) sesuai protokol pabrik. Sebanyak 200 µl sampel dimasukkan ke dalam mikrotube, ditambahkan 600 µl Nucleic Lysis Buffer, dan divortex selama 10 detik. Sampel diinkubasi pada 65°C selama 15 menit, kemudian ditambahkan 3 µl RNase A dan diinkubasi kembali pada 37°C selama 15 menit.

Selanjutnya, ditambahkan 200 µl Protein Precipitation Solution, divortex, lalu didinginkan dalam es selama 10 menit untuk pengendapan protein. Sampel disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 4 menit, supernatan dipindahkan, kemudian ditambahkan 600 µl isopropanol dan dicampur perlahan. Setelah sentrifugasi lanjutan, DNA dalam bentuk pelet dicuci dengan etanol 70% dan dikeringkan sebelum digunakan dalam tahap PCR.

Amplifikasi Gen 16S rDNA

Amplifikasi dilakukan dengan mengacu pada protokol dari *Go Taq Green Master Mix* 2x. Siapkan mikrotube PCR yang berukuran 0,2 ml, kemudian masukkan ddH₂O sebanyak 3,5 µl, masukkan *Go Taq Green Master Mix* sebanyak 12,5 µl dan masukkan *forward primer* 27f (5'- AGA GTT TGA TCA CTG GCT CAG -3') dan *reverse primer* 1492r (5'- TAC GGC TTA CCT TGT TAC GA -3') seperti yang dilakukan Massora *et al*, 2017.. *Forward primer* dan *reverse primer* masing-masing 2,5 µl, terakhir masukkan DNA hasil ekstraksi. Hidupkanlah alat PCR, buka tutupnya dan masukkan mikrotube yang berisi sampel. Atur suhu dan waktu menjadi: a) *Initial denaturation* dilakukan pada suhu 95 °C selama 5 menit; b) *Denaturasi* dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 95 °C selama 1 menit; c) *Annealing* dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 55 °C selama 1 menit; d) *Ekstensi* dilakukan sebanyak 30 siklus pada suhu 72 °C selama 1 menit; e) *Ekstensi akhir* dilakukan pada suhu 72 °C selama 10 menit. Setelah suhu diatur, pilihlah menu start dan tunggu hingga selesai. Setelah selesai, mikrotube dikeluarkan dari PCR.

Elektroforesis Gel

Timbang gel agarosa 1% sebanyak 0,5 gr, tambahkan 50 ml TAE *buffer* 1x. Selanjutnya campuran gel agarosa dipanaskan sampai mendidih. Jika sudah cukup dingin, gel agarosa dimasukkan ke dalam cetakan, kemudian

dipasang sisir. Setelah gel agarosa membeku, angkatlah sisir dan pindahkan gel ke dalam alat elektroforesis yang telah diisi TAE *buffer* 1x, gel agarosa dimasukkan hingga tergenang. DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur gel, dan tambahkan DNA *ladder* 1 kb, lalu tutuplah alat elektroforesis. Elektroda positif akan berwarna hitam, sedangkan elektroda negatif berwarna merah. Tahap selanjutnya alat elektroforesis dinyalakan dengan tegangan 50 volt selama 45 menit. Proses elektroforesis akan berakhir ketika warna sudah bergerak setengah atau $\frac{2}{3}$ gel. Hasil elektroforesis diamati menggunakan UV *transiluminator*.

Analisis Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing gen 16S rDNA dianalisis menggunakan program *BioEdit* 7.2. Hasil yang didapatkan akan dibandingkan dengan data *GenBank* menggunakan program BLAST melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Setelah itu dilakukan karakterisasi dengan cara penyejajaran sekuens *query* dengan dua belas sekuens gen 16S rDNA bakteri lain yang ada di *database* dan dianggap memiliki kemiripan dengan menggunakan program MEGA X. Setelah dikarakterisasi, data sekuens diidentifikasi dengan cara mendesain pohon filogenetik menggunakan aplikasi MEGA X, metode Maximum Likelihood Trees Kimura-2, model parameter dan nilai bootstrap 1000 kali.

Analisis Data

Penelitian identifikasi molekuler bakteri *indigenous* penghasil enzim amilase dari pati sagu asal pulau kepulauan yapen merupakan penelitian kualitatif deskriptif. Identifikasi molekuler menggunakan *gen 16 SRDNA*. Seluruh data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif.

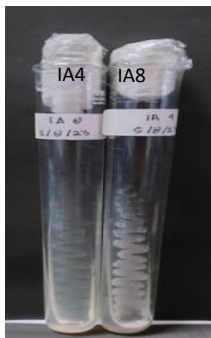
HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan Isolat Bakteri IA4 dan IA8

Proses peremajaan dilakukan untuk memastikan bahwa isolat bakteri berada dalam kondisi fisiologis yang aktif dan optimal saat digunakan pada tahap selanjutnya. Peremajaan dilakukan dengan menumbuhkan kembali isolat IA4 dan IA8 pada media Nutrient Agar miring dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Pada waktu tersebut, bakteri diperkirakan berada dalam fase log (pertumbuhan

eksponensial), yang ditandai dengan pembelahan sel yang konstan dan peningkatan jumlah sel (Handayani et al., 2016).

Hasil peremajaan menunjukkan bahwa isolat IA4 dan IA8 membentuk koloni yang lebih padat dan homogen dibandingkan kondisi awal, yang mengindikasikan bahwa sel berada dalam kondisi aktif. Proses ini penting untuk memastikan keberhasilan tahap identifikasi molekuler dan pengujian enzim.. Isolat bakteri yang diremajakan adalah isolat IA 4 dan IA 8 (Gambar 1).



Gambar 1. Isolat IA4 dan IA8 yang telah diremajakan

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA bakteri IA4 dan IA8 menggunakan protokol *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Saat ekstraksi DNA, terjadi proses lisis yaitu proses merusak dinding sel dari bakteri yang dilakukan menggunakan *Nucleic Lysis Buffer*. Isolasi DNA genom menggunakan enzim lysozyme. Proses isolasi DNA memiliki prinsip perlakuan melisis sel dengan enzim lysozyme yang akan menyebabkan sel DNA pecah dan DNA genom keluar dari sel (Pananjung et al., 2014). DNA genom isolat bakteri IA 4 dan IA 8 yang didapatkan berukuran 13500 bp.

DNA isolat IA4 dan IA8 selanjutnya diisolasi dengan menggunakan protokol *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Hasil kemurnian DNA pada isolat bakteri amilolitik menggunakan nanodrop, untuk Isolat IA4 diperoleh nilai konsentrasi DNA sebesar 73 ng/ μ L dengan kemurnian DNA A260/A280 yaitu sebesar 1,872. Dan untuk isolat IA8 diperoleh nilai konsentrasi DNA sebesar 112,6 ng/ μ L dengan kemurnian DNA A260/A280 yaitu sebesar 1,858 (Tabel 1). Nanodrop bertujuan untuk mengukur konsentrasi dan

kemurnian DNA. Berdasarkan hasil pengujian Nanodrop dapat dikatakan memiliki kualitas yang baik. Fatchiyah et al. (2011) menyatakan bahwa hasil uji nanodrop berupa nilai kemurnian DNA pada A260/A280 dan nilai konsentrasi DNA. DNA yang berkualitas baik berdasarkan uji nanodrop memiliki kemurnian 1,8-2,0. Kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung perbandingan nilai absorbansi 260 nm terhadap nilai absorbansi 280 nm.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif DNA Isolat IA4 dan IA8 menggunakan nanodrop

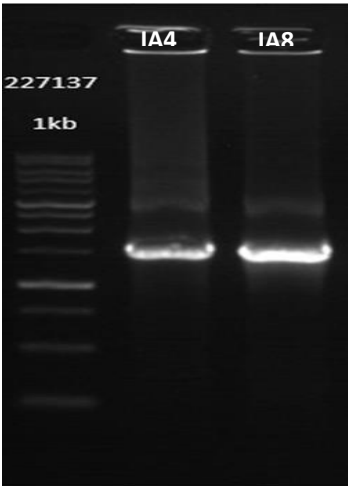
Sampel	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)	Kemurnian DNA (A260/280)
IA4	73	1,872
IA8	112,6	1,858

Amplifikasi DNA Genom Dengan PCR

Setelah DNA diekstraksi, hasilnya kemudian diamplifikasi menggunakan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan *forward primer* 27f (5'- AGA GTT TGA TCA CTG GCT CAG -3') dan *reverse primer* 1492r (5'- TAC GGC TTA CCT TGT TAC GA -3') untuk gen 16S rDNA yang mampu mengamplifikasi gen sepanjang 1.500 bp (Elavazhagan et al., 2009). Proses amplifikasi menyebabkan terjadinya perbanyakan DNA pada daerah tertentu yang dibatasi oleh primer. Hasil dari proses amplifikasi digunakan dalam tahap sekuensing DNA (Nugroho & Rahayu, 2015). Hasil amplifikasi menunjukkan pita DNA terlihat jelas dan tidak ada pita DNA yang tercampur (*mixing bands*). Produk PCR kemudian dielektroforesis.

Elektroforesis

Proses elektroforesis menggunakan TAE buffer 1x, hasilnya kemudian diamanati menggunakan UV transilator. Dari hasil elektroforesis diketahui terdapat fragmen DNA yang berukuran 1415 bp yang terseparasi dibandingkan dengan marka DNA yang merupakan fragmen DNA standar yang digunakan. Setelah dielektroforesis, sampel kemudian disekuensing Gen 16S rDNA (Gambar 2).



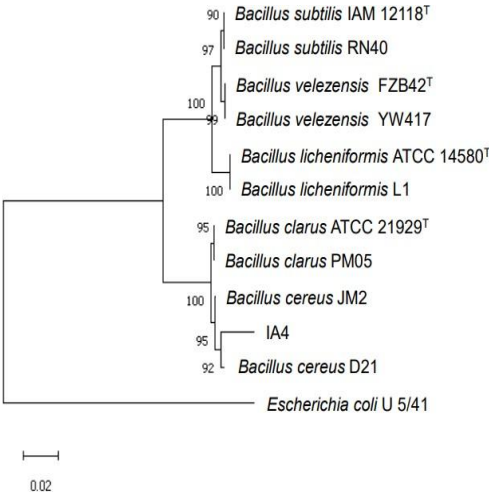
Gambar 2. Hasil elektroforesis amplikon 16S rDNA isolat IA4 dan IA8

Analisis Hasil Sekuensing Gen 16S rDNA

Hasil sekuensing isolat bakteri indigenous penghasil enzim amilase kemudian dianalisis dengan membandingkan menggunakan program BLAST dengan data yang ada pada Genbank melalui *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Analisis pohon filogenetik menggunakan aplikasi MEGA 11 dengan metode *Maximum Likelihood*, model Kimura 2-parameter, dan 1000 kali ulangan pohon konsensus bootstrap untuk mewakili sejarah evolusi taksa yang dianalisis (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2021). Isolat bakteri IA4 dan IA8 diidentifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rDNA. Urutan nukleotida dipakai untuk

analisis identifikasi berdasarkan GenBank dan konstruksi pohon filogenetik. Gen 16S rDNA diamplifikasi menggunakan primer universal (27F dan 1492R) dengan produk PCR dengan ukuran yang sama untuk IA4 dan IA 8 iaitu 1415 bp. Pohon filogenetik menunjukkan jarak evolusioner antara bakteri amilolitik berdasarkan urutan gen 16S rRNA (Gambar 3).

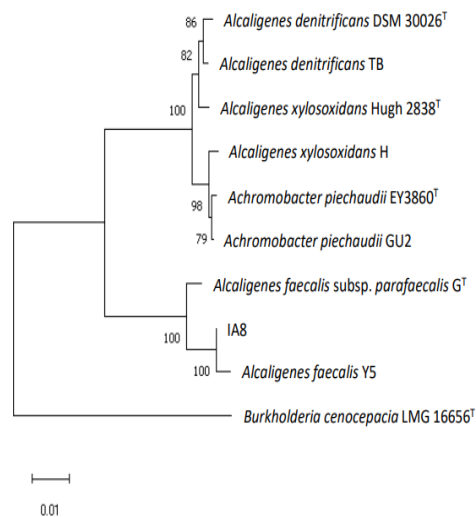
Pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat IA4 membentuk klade dengan strain *Bacillus cereus* D21 dengan dukungan *bootstrap* 92%, dan dukungan bootstrap yang kuat 100% dengan strain *Bacillus cereus* JM2 *Bacillus clarus* PM05 dan *Bacillus clarus* ATCC 21929^T.



Gambar 3. Pohon filogeni isolat IA4 dengan spesies acuan berdasarkan similaritas sekuen 16S rDNA menggunakan algoritma *Neighbor-Joining* dan metode Tamura-Nei (*bootstrap* 1000x) Angka pada setiap percabangan menunjukkan nilai *bootstrap* percabangan.

Tabel 2. Nilai similaritas isolat bakteri IA4 dengan spesies pembanding

No.	Spesies	Strain	Acession Number	% Similaritas
1.	<i>Bacillus cereus</i>	D21	KC441762.1	97,80
2.	<i>Bacillus cereus</i>	JM2	MT605291.1	97,65
3.	<i>Bacillus subtilis</i>	IAM12118 ^T	NR_112116.2	91,05
4.	<i>Bacillus subtilis</i>	RN40	KC990823.1	91,04
5.	<i>Bacillus clarus</i>	ATCC 21929 ^T	NR_180213.1	97,2
6.	<i>Bacillus clarus</i>	PM05	OR461810.1	97,27
7.	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580 ^T	NR_074923.1	90,79
8.	<i>Bacillus licheniformis</i>	L1	MZ675664.1	90,88
9.	<i>Bacillus velezensis</i>	FZB42 ^T	NR_075005.2	90,96
10.	<i>Bacillus velezensis</i>	YW417	LC666720.1	91,04
11.	<i>Escherichia coli</i>	U5/41	NR_024570.1	71,49



Gambar 4. Pohon filogeni isolat IA8 dengan spesies acuan berdasarkan similaritas sekuen 16S rDNA menggunakan algoritma *Neighbor-Joining* dan metode Tamura-Nei (*bootstrap* 1000x) Angka pada setiap percabangan menunjukkan nilai *bootstrap* percabangan.

Tabel 3. Nilai similaritas isolat bakteri IA8 dengan spesies pembandingan

No.	Spesies	Strain	Acession Number	% Similaritas
1.	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Y5	KF925435.1	99,79
2.	<i>Alcaligenes faecalis subsp parafaecalis</i>	G ^T	NR_025357.1	98,85
3.	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	DSM 30026 ^T	NR_042021.1	94,03
4.	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	TB	JQ044686.1	94,11
5.	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Hugh 2838 ^T	NR_044925.1	94,33
6.	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	H	AJ491846.1	94,27
7.	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	EY3860 ^T	NR_027186.1	94,4
8.	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	GU2	OQ874309.1	94,55
9.	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	LMG 16656 ^T	NR_025013.1	88,83

Berdasarkan nilai similaritas isolat bakteri IA4 dengan spesies pembandingan yang disajikan pada Tabel 2, menunjukkan bahwa isolat IA4

memiliki indeks similaritas paling tinggi dengan *Bacillus cereus* D21 yaitu 97,80%.

Pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat IA8 (Gambar 4) membentuk klade dengan strain *Alcaligenes faecalis* Y5 dengan dukungan *bootstrap* 100%.

Berdasarkan nilai similaritas isolat bakteri IA8 dengan spesies pembanding yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa isolat IA8 memiliki indeks similaritas paling tinggi dengan *Alcaligenes faecalis* Y5 yaitu 99, 79%.

Berdasarkan teori Genomic species dua strain digolongkan dalam satu spesies bila mempunyai nilai DNA relatedness $\geq 70\%$ dengan $\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$ (Goodfellow, 2000), maka Isolat IA4 dan *Bacillus cereus* D21 dapat digolongkan dalam satu spesies karena hasil

analisis menunjukkan indeks similaritas adalah 97,80%. Dan untuk isolat IA8 dan *Alcaligenes faecalis* Y5 dapat digolongkan dalam satu spesies karena hasil analisis menunjukkan indeks similaritas sebesar 99, 79%.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, indeks similaritas Isolat IA4 dan *Bacillus cereus* D21 adalah indeks similaritas 97,80%. Untuk isolat IA8 memiliki indeks similaritas 99, 79%. dengan *Alcaligenes faecalis* Y5. Oleh karena itu isolat bakteri amilolitik yang diidentifikasi adalah *Bacillus cereus* strain IA4 dan isolat IA8 adalah *Alcaligenes faecalis* strain IA8.

DAFTAR PUSTAKA

- Asmuruf, F., Wanma J F., Rumatora A. 2018. Budidaya Pemanfaatan Sagu (*Metroxylon* sp.) Oleh Sub-Etnis Ayamaru di Kampung Sembaro Distrik Ayamaru Selatan. *Jurnal Kehutanan Papuasiasia*, 4 (2): 114-127.
- Cappucinno, J. G., Sherman N. 2014. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Tenth Edition. Pearson Education Limited. London.
- Devi, L. S., Khaund P., Joshi S. R. 2010. Thermostable α -amilase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalayan range. *African Journal of Microbiology Research*, 2(4): 573-579.
- Dewi, R. K. 2015. Karakterisasi Berbagai Aksesori Sagu (*Metroxylon* spp.) Di Kabupaten Sorong Selatan Papua Barat. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor.
- Edi Hanzen, W., Sri Hastuti, U., Putera Makkadafi, S., Al Asna, P. M., & Sarwendah Asri Nugraheni, F. (n.d.). 2017. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Amilolitik Dari Tanah Yang Tercampur Limbah Kulit Ubi Kayu Di Bondowoso, Jawa Timur.
- Fatchiyah, E.L., Arumingtyas S., Widyarti, & Rahayu, S. 2011. Biologi molekuler prinsip dasar analisis. Jakarta: Penerbit Erlangga
- Goodfellow, M. 2000. Microbial Systematics: Background and uses In Applied Microbial Systematics (F.G. Priest & M. Goodfellow), eds.) Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. Netherlands.
- Gurung, N, R Sumanta., Sutapa B., Vivek R. 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *Biomed Research International*.
- Hariyanto, B. 2011. Manfaat Tanaman Sagu (*Metroxylon* sp.) Dalam Penyediaan Pangan dan Dalam Pengendalian Kualitas Lingkungan. *Jurnal Teknik Lingkungan*, 12(2): 143-152.
- Hanzen, F.W., Hastuti, S.U., Makkadafi, P.S., Nugraheni, A.S.F., 2017. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Amilolitik Dari Tanah Yang Tercampur Limbah Kulit Ubi Kayu Di Bondowoso, Jawa Timur.
- Holt, J. G., Krieg N. R., Peter H. A. S., James T. S., Stanley T. W. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition*. Williams and Wilkins. United States of America.
- Jacobs, H., J A. Delcour. 1998. Hydrothermal Modifications of Granular Starch with Retensulasi of Granular Structure. *Food Chem*, 46(8): 2895-2905.
- Kusbandari, A. 2015. Analisis Kualitatif Kandungan Sakarida Dalam Tepung dan

- Tepung Umbi Gayong (*Canna edulis* Ker.). *Jurnal Pharmacia*, 5 (1): 35-42.
- Limbongan, J. 2007. Morfologi Beberapa Jenis Sagu Potensial di Provinsi Papua. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan*, 26 (1): 16-24.
- Massora, M., Martani, E., Sugiharto, E., Sarwom, R, and Sinaga, T. 2017. Biofilm formaton analysis and molecular identficaton of copper-resistant bacteria isolated from PT Freeport Indonesia's tailings. *Indonesian Journal of Biotechnology* 22(1), 2017, 6–12.
- Palmer, T., Bonner P. L. 2007. *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*.second Edition. Woodhead Publishing. United Kingdom.
- Purba, E. 2009. Comparison of hydrolisis of cassava starch (*Manihot esculenta*) and sweet potato starch (*Ipomoea batatas*) with cold process using enzyme Acid-fungal Amylase and Glucoamylase. *Journal of Science Engineering and Technology*, 2 (2): 7-11.
- Puwarni, E.Y., T Purwadaria., M T. Suhartono. 2012. Fermentation RS3 derived from sago and rice starch with *Clostridium butyricum* BCC B2571 or *Eubacterium rectale* DSM 7629. *Jurnal Anaerob*, 18(1): 55-61.
- Rahayu, M. A., Sulistyaningtyas A.R., Darmawati S. 2019. Isolasi Bakteri Hidrofilik Penghasil Enzim Amilase dari Limbah Industri Tapioka. *Seminar Nasional Unimus*. 147-155. (Prosiding).
- Risnoyatiningsih, S. 2011. Hidrolisis tepung ubi jalar kuning menjadi glukosa secara enzimatis. *Jurnal Teknik Kimia*, 5(2): 417-424.
- Soeka, Y. S., Rahmansyah M., Sulistiani. 2015. Optimasi Enzim α -Amilase dari *Bacillus amyloliquefaciens* O₁ yang Diinduksi Substrat Dedak Tepung dan Karboksimetilselulosa. *Jurnal Biologi Indonesia*, 11 (2): 259-266.
- Sundari, A. S., Purwani N. N., Kurniati A. 2019. Isolasi dan Penentuan Indeks Amilolitik Bakteri Dari Sediment Mangrove Di Wonorejo Surabaya. *Jurnal Inovasi Pendidikan Sains*, 10 (1): 38-44.
- Widjono, A., Mokay Y., Amisnaipa., Lakuy H., Rouw A., Wihiyawari P. 2000. *Jenis-jenis Sagu Beberapa Daerah Papua*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Sosial Ekonomi. Bogor.
- Wulandari, D., Purwaningsih, D. 2019. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Amilolitik pada Umbi *Colocasia esculenta* L. Secara Morfologi, Biokimia, dan Molekuler. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 10 (1): 38-44.
- Yuniarti, L. I., G S. Hutomo., A Rahim. 2014. Sintesis dan Karakterisasi Bioplastik Berbasis Tepung Sagu (*Metroxylon* sp.). *Jurnal Agrotekbis*, 2 (1): 38-46.