

Mikrobia Amilolitik pada Nira dan Laru dari Pulau Timor, Nusa Tenggara Timur

Amylolytic microbes of nira and laru from Timor Island, East Nusa Tenggara

ELIDAR NAIOLA*

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong 19611.

Diterima: 8 April 2008. Disetujui: 24 Juni 2008.

ABSTRACT

Thirty nine isolates of microorganisms were isolated from the nira (palm sap from inflorescence stalk of *Corypha utan* Lamk. or *Borassus flabellifer* L.), laru (fermented palm sap) and their ability to produce amylase has been done. The result of screening showed that eight isolates were positive in the starch iodine test, but their amylolytic activities relatively lower. The amylolytic activities show that laru is not potential source of microbial amylases. In liquid media containing 2% soluble starch, three isolates of fungi (LG4, LMS1, and MI-1) produce amylase and reached a maximum activity at 3 days fermentation, with levels 56.31×10^2 , 46.78×10^2 and 41.49×10^2 U/mL (one unit activity is define as micromoles of glucose produce per mL per minute). Two yeast isolates which isolated from laru or kayu laru were showed their ability to ferment the gula aer and produce ethanol, CO₂ and some organic acids, it were identified as *Pichia anomala*. The other bacterial isolates were identified as *Bacillus licheniformis* BL43, *Chromobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Micrococcus roseus* (*Staphylococcus roseus*), and *Bacillus coagulans*, its show the lower amylase activities.

© 2008 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta.

Key words: palm sap (nira), fermented palm sap (laru), amylase, fermentation, East Nusa Tenggara.

PENDAHULUAN

Sebagai daerah tropis yang lembab Indonesia mempunyai diversitas mikrobia yang tinggi, tetapi informasi biodiversitas mikrobia lokal Indonesia masih sangat kurang. Masyarakat Indonesia sudah sejak lama memanfaatkan mikrobia untuk menghasilkan barang bernilai ekonomi, misalnya: fermentasi tempe, tape, terasi, kecap, taoco, dan ragi untuk minuman beralkohol (Steinkraus, 1983). Di Propinsi Nusa Tenggara Timur (NTT), terdapat sejenis minuman fermentasi lokal beralkohol, yaitu: *laru* dan *sopi*, minuman tersebut merupakan hasil fermentasi secara tradisional terhadap nira atau hasil sadapan perbungaan gawang (*Corypha utan* Lamk.) dan lontar (*Borassus flabellifer* L.). Di samping sebagai bahan dasar pembuatan *laru* dan *sopi*, nira juga digunakan untuk berbagai keperluan seperti gula cair (*gula aer*) dan cuka. Sebagai starter dalam pembuatan *laru* digunakan "mur" atau endapan dari minuman *laru* yang sudah terbentuk secara alami. *Sopi* merupakan minuman beralkohol hasil penyulingan langsung dari *laru* sehingga memiliki kadar alkohol lebih tinggi.

Produk makanan/minuman fermentasi tradisional merupakan salah satu sumber utama untuk mendapatkan mikrobia berpotensi. Mikrobia pada substrat atau pada beberapa tahapan proses fermentasi dapat diisolasi serta diskriming kemampuan enzimnya. Isolat-isolat terseleksi

dari proses tradisional perlu dimurnikan, dipelihara di suatu koleksi biakan (*culture collection*) yang profesional agar setiap waktu dapat dimanfaatkan dan sifat-sifat unggulnya tidak mengalami perubahan (Ganjar, 2007). Kemampuan enzimatik berbagai biakan dari produk fermentasi tradisional dalam merombak pati tergantung pada biaknya dan bukan pada jenisnya. Pada umumnya kapang memanfaatkan glukosa dan pati sebagai sumber karbon dalam pembentukan etanol dan biomasa, sedangkan untuk keperluan yang sama khamir dan bakteri lebih baik menggunakan glukosa dari pada pati (Saono, 1978).

Studi tentang produk minuman beralkohol (*laru* putih, *laru* merah, dan *sopi*) yang berasal beberapa lokasi di NTT oleh Rahmansyah (1999) menunjukkan bahwa produk turunan nira lontar antara lain *laru* dan *sopi* mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi produk lanjut berskala industri kecil hingga menengah. Biakan khamir yang terdapat pada *laru* memiliki potensi untuk dikembangkan dalam menghasilkan bahan kimia seperti etanol dan asam asetat. Biakan mikrobia lokal terpilih memiliki beberapa keunggulan karena mikrobia tersebut menjadi sumber enzim yang bermanfaat untuk mengkatalisis reaksi-reaksi enzimatik yang dapat dikondisikan di lokasi-lokasi tempat pembuatannya (sumber dari biakan). Sumberdaya lokal yang diperoleh, diharapkan dapat bermanfaat dalam menunjang industri pangan maupun farmasi terutama pada daerah asalnya. Menurut Steinkraus (1983) biakan bakteri, khamir dan kapang terlibat dalam fermentasi *laru*, baik sebagai mikrobia utama maupun penyerta, di antara biakan tersebut khamir merupakan mikrobia yang dominan dan berperan dalam merombak sukrosa menjadi etanol.

Amilase merupakan enzim yang mampu memecah molekul-molekul pati dan glikogen, sehingga banyak digunakan dalam berbagai industri, seperti industri tekstil,

* Alamat korespondensi:

Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46 Cibinong. 16911
Tel: +62-21-8765066. Fax: +62-21-8765062.
E-mail: .campolong2003@yahoo.com.

deterjen dan gula cair non tebu. Hingga saat ini kebutuhan akan enzim amilase di Indonesia belum dapat dipenuhi sehingga masih harus diimpor. Padahal, mikrobia lokal terseleksi dapat digunakan sebagai penghasil enzim. Beberapa jenis mikrobia dari kelompok bakteri, kapang dan khamir dilaporkan sebagai penghasil amilase, di antaranya kapang *Aspergillus* spp., serta khamir *Endomyces* sp. dan *Saccharomycopsis fibuligera* (Hattori, 1961; Fogarty dan Kelly, 1980; Futatsugi *et al.*, 1980). Bakteri potensial yang akhir-akhir ini banyak digunakan untuk memproduksi enzim amilase pada skala industri, antara lain: *Bacillus licheniformis* dan *B. Stearothermophilus*. Penggunaan *B. stearothermophilus* lebih disukai karena mampu menghasilkan enzim yang bersifat termostabil sehingga menekan biaya produksi (Lestari *et al.*, 2001). Hingga saat ini kebutuhan akan enzim amilase di Indonesia belum dapat dipenuhi, sehingga masih harus diimpor. Oleh karena itu, dilakukan penelitian ini untuk mendapatkan mikrobia lokal yang potensial sebagai penghasil amilase.

BAHAN DAN METODE

Sumber mikrobia

Sampel yang digunakan adalah nira, gula aer, laru, sopi, "mur" (endapan laru yang terbentuk secara alami yang biasa dipakai sebagai starter) serta kayu laru (sejenis kayu dari tanaman *Alstonia acuminata* Miq. (Heyne, 1987) yang biasa ditambahkan pada proses pembuatan laru. Nira yang digunakan untuk pembuatan laru berasal dari tanaman gewang (*Corypha utan* Lamk.) dan lontar (*Borassus flabellifer* L.) dari pulau Timor, Nusa Tenggara Timur (NTT). Identifikasi isolat dilakukan di Balai Penelitian Ternak, Bogor berdasarkan sifat morfologi dan fisiologinya, disamping itu juga menggunakan 16 S rDNA *partial sequencing*. Analisis kandungan kimia produk-produk nira, gula aer, laru, dan sopi dilakukan di Laboratorium Pascapanen, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor

Media

Media yang digunakan untuk isolasi adalah, YPSs padat dan cair dengan komposisi: 0,2% ekstrak khamir, 0,5% pepton, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% MgSO₄.7H₂O, 0,01% CaCl₂.2H₂O, 20 g agar dan 2% pati terlarut sebagai sumber C (Mangunwardoyo, 1982), Rose Bengal Agar dan PDA diperoleh dari Difco. Ltd. serta YM agar (3 g ekstrak khamir, 3 g ekstrak malt, 5 g pepton, 10 g glukosa, dan 20 g bacto agar dalam 1 L akuades). Produksi enzim amilase dilakukan dalam media YPSs cair. Isolat terseleksi dipelihara dalam PDA dan Nutrien Agar dengan komposisi 3 g ekstrak daging, 5 g pepton dan 20 g bacto agar per liter akuades.

Isolasi dan seleksi mikrobia

Isolasi dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah tertentu masing-masing contoh permukaan media padat PDA, YPSs, YM agar dan Rose Bengal. Inkubasikan pada suhu kamar sekitar 2 hari, koloni tunggal masing-masing isolat yang tumbuh dimurnikan pada media yang sesuai. Di samping itu isolasi juga dilakukan dengan cara menumbuhkan satu tetes sampel pada media cair selektif, inkubasikan pada suhu kamar selama 2-3 hari. Setelah terlihat adanya pertumbuhan mikrobia baru dilakukan isolasi. Mikrobia yang terdapat pada kayu laru diisolasi dengan memasukkan 1-3 potong kayu laru ke dalam media cair yang mengandung gula sukrosa, diinkubasikan selama 2-5 hari pada suhu kamar sampai terlihat adanya tanda-

tanda terjadi proses fermentasi (ditandai dengan timbulnya aroma khas alkohol dan terbentuk gelembung gas CO₂), selanjutnya mikrobia yang ada diisolasi dengan cara menumbuhkan pada permukaan media padat yang sesuai.

Pengujian aktivitas amilase

Pengujian aktivitas amilase secara kualitatif dan semi kuantitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan satu ose biakan khamir berumur 2-3 hari pada permukaan media agar YPSs dalam cawan petri. Inkubasikan selama 3 hari pada suhu kamar. Aktifitas amilase diuji dengan cara meneteskan larutan iodium pada media disekitar koloni. Hasil bagi antara diameter zona bening dan diameter koloni dinyatakan sebagai kekuatan enzim secara nisbi.

Untuk pegujian aktifitas amilase secara kuantitatif, enzim kasar dipersiapkan dengan menumbuhkan isolat-isolat terseleksi pada media YPSs cair. Sebanyak 2,5% suspensi kapang berumur 3 hari (OD 630 = 0,5) diinokulasikan ke dalam media produksi dan selanjutnya diinkubasikan pada suhu kamar selama 5 hari. Enzim amilase kasar diekstraksi dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit.

Aktifitas amilase dari enzim kasar ditentukan dengan cara mengukur jumlah gula pereduksi yang dihasilkan oleh aktivitas hidrolisis enzim terhadap substrat pati. Caranya: 0,5 mL larutan enzim ditambahkan ke dalam 0,5 mL substrat (2% pati terlarut dalam 0,05 M larutan buffer fosfat, pH 7), kemudian diinkubasikan pada suhu 40°C selama 10 menit. Produk yang terbentuk berupa gula produksi (glukosa) diukur dengan metoda Bernfeld (1955). Satu unit aktivitas amilase adalah banyaknya enzim yang dapat menghasilkan 1 µg glukosa per menit per mL larutan enzim pada kondisi pengujian yang dilakukan (Khinoshita *et al.*, 1982 dan Gangrong *et al.*, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis kimia terhadap nira, produk nira (laru dan sopi) maupun *gula aer*, diketahui bahwa produk tersebut mempunyai kandungan gula terdiri dari sakarosa, fruktosa dan glukosa (Tabel 1). Nira dan *gula aer* merupakan sumber gula bagi industri setempat, yaitu: *laru* dan *sopi* yang merupakan minuman lokal beralkohol hasil fermentasi secara tradisional. Analisis kandungan gula pada sampel, terutama pada nira, dilakukan segera setelah pengambilan sampel, supaya hasil yang diperoleh lebih akurat. Keterlambatan analisis mengakibatkan sebagian besar komponen kimia sampel sudah menguap atau terurai menjadi senyawa lainnya. Berdasarkan data pada Tabel 1. diketahui bahwa substrat yang dijadikan sebagai sumber mikrobia, terutama nira gewang mengandung gula sederhana glukosa sebesar 3,5% dan gula disakarida, fruktosa dan sakarosa, masing-masing sebesar 4,05% dan 3,6%. Nira gewang juga mengandung sejumlah asam organik dan asam amino.

Tabel 1. Analisis kandungan kimia produk-produk gewang.

Jenis analisis	Nira	Gula aer	Laru	Sopi
Fruktosa (%)	4,0	4,5	-	-
Glukosa (%)	3,5	4,6	-	-
Sakarosa (%)	3,6	8,9	-	-
Air (%)	85,2	80,1	-	-
Alkohol (%)	-	-	6,4	7,0
Malat (ppm)	-	-	11,5	-
Sitrat (ppm)	-	-	4,6	-
Glutamat (ppm)	-	-	7,9	-
Tannat (ppm)	-	-	8,4	-

Tabel 2. Aktivitas amilase secara kualitatif dan semi-kuantitatif isolat-isolat dari produk nira dan laru dari NTT.

Sumber isolat	Isolat	Hasil uji kualitatif	Nilai nisbi amilase	Hasil identifikasi
Nira gawang Kab. Belu	LG1	-		
	LG2	-		
	LG3	-		
	LG4	++	1,40	
"Mur" atau starter Kab. Kupang	MI-1	++	1,50	
	MI-2	-		
	MI-3	-		
	MI-4	-		
	MI-5	-		
	MII-1	-		
	MII-2	-		
Laru putih, Kab. Kupang	LPLI-1	-		
	LPLI-2	-		
	LPLII-1	-		
	LPLII-2	-		
	Lp1	++	1,20	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Lp2.1	++	1,15	<i>Chromobacterium. sp</i>
	Lp2.2	-		<i>Lactobacillu.s sp</i>
	Lp3	-		
	Lp4	-		
	Lp5	++	1,20	<i>Micrococcus roseus</i>
	Lp6	-		
Lp7	++	1,20		
Lp8	-			
Lp9	-			
Lp10	-			
Laru merah, Kab. Kupang	LB1	-		
	LB2	+/-	≤ 1	
	LB3	-		
	LB4	+	1,15	
	LMS1	++	1,50	
	LMS2	-		
LMS3	-			
Kayu laru, Kab. Kupang	LK1	-		
	LK2	-		
	LK3	-		
	Ferm.1	+/-	≤ 1	<i>Pichia anomala</i>
	Ferm.2	+/-	1.05	<i>Pichia anomala</i>
	XI	+/-	≤ 1	<i>Bacillus coagulans</i>

Keterangan : ++ aktivitas amilase cukup baik; + aktivitas amilase rendah; +/- aktivitas amilase sangat rendah (hampir tidak ada); - aktivitas amilase tidak ada.

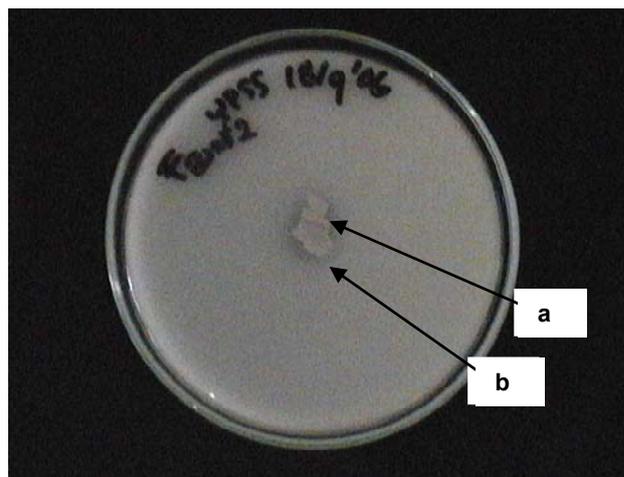
Tabel 3. Analisis kandungan etanol (alkohol) dan asam asetat produk fermentasi nira lontar (Rahmansyah, 1998).

Jenis analisis	Laru putih	Laru merah	Sopi
Etanol (%)	4,8-5,8	5,8-7,7	19,5-20,6
Asam asetat (%)	0,4-0,5	0,35-0,4	0,03-0,3

Karakter beberapa isolat terseleksi

Isolat Ferm.1 dan Ferm.2 yang diisolasi dengan cara memasukkan potongan kayu laru ke dalam media yang mengandung sukrosa memiliki aktivitas amilase sangat lemah (Gambar 1). Hasil identifikasi terhadap kedua isolat tersebut menunjukkan bahwa kedua isolat ini termasuk kelompok khamir yang diidentifikasi sebagai *Pichia anomala*. Identifikasi dilakukan berdasarkan penilaian tingkat kesamaan dalam pola penggunaan nutrisi (motode yang dikembangkan oleh Barnett, 1990).

Menurut Dato *et al.* (2005), *P. anomala* merupakan biak khamir yang umum dijumpai pada produk makanan/minuman fermentasi, terutama pada produk



Gambar 1. Aktivitas amilase secara nisbi isolat Ferm. 2 pada media padat YPSs. a) diameter koloni; b) diameter zona bening.

minuman beralkohol seperti anggur, bir, dan tape. Pada beberapa minuman beralkohol tinggi diantaranya "cacaqa" yaitu sejenis minuman beralkohol tinggi yang populer di Brazil yang dibuat dari gula tebu dilaporkan terdapat beberapa jenis khamir yang menghasilkan metabolit sekunder, salah satunya *P. anomala*. Biakan ini berperan atau memberikan kontribusi yang besar pada cita rasa serta aroma produk tersebut. Produk yang dihasilkan mempunyai kualitas baik dengan kandungan alkohol tinggi atau mempunyai keseimbangan yang tepat antara cita rasa dan aroma. Dilaporkan juga bahwa *P. anomala* mempunyai aktivitas β-glukosidase dan arabinosidase yang merupakan agen penting pada pembentukan aroma anggur yang bekerja efektif pada kondisi yang sesuai dengan kondisi produk. Dari hasil penelitian ini terdapat kecenderungan bahwa meskipun biakan *P. anomala* mempunyai aktivitas amilase yang lemah, namun mempunyai kemampuan tinggi dalam menghasilkan alkohol pada proses fermentasi laru. Menurut Kuriyama (1996) beberapa isolat khamir yang diisolasi dari berbagai makanan fermentasi di Indonesia mempunyai kemampuan yang tinggi dalam menghasilkan alkohol, salah satunya *P. anomala*.

Isolat Lp2.1, Lp2.2, Lp6 dan XI masing-masing diidentifikasi sebagai *Chromobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Micrococcus roseus* (*Staphylococcus roseus*), dan *Bacillus coagulans* (identifikasi dilakukan di Balai Penelitian Ternak, Bogor). Isolat Lp1 diidentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* BL43 (99%) atau *Bacillus sp.* EGU 724 (100%), identifikasi dilakukan dengan menggunakan 16 S rDNA partial sequencing).

Bacillus coagulans merupakan bakteri yang sering terdapat pada probiotik atau produk-produk minuman untuk kesehatan. Walaupun tidak termasuk kelompok bakteri asam laktat, namun dalam probiotik bakteri-bakteri *Bacillus* spp. sering dianggap sama dengan *Lactobacillus sporogenes*. Dalam penelitian ini *B. coagulans* disolasi dari laru putih dan memiliki aktivitas amilase yang sangat lemah. *Bacillus licheniformis* BL43 yang disolasi dari laru putih, mempunyai aktivitas amilase yang cukup baik dengan nilai relatif 1,20. Menurut Riany (2007) dan Richana (2000), *B. licheniformis* memiliki aktivitas α-amilase yang dapat menghidrolisis ikatan α-1,4-glikosida polisakarida dengan menghasilkan oligosakarida, dekstrin, dan glukosa. Enzim ini bersifat termostabil sehingga banyak dimanfaatkan pada tahap likuifikasi pada industri pengolahan pati. Isolat bakteri ini diduga ikut terlibat menghasilkan komponen-komponen

kimia yang memberikan cita rasa serta aroma khas pada produk minuman laru.

Pengukuran aktivitas amilase secara kuantitatif dilakukan terhadap isolat LG4, LMS1, dan MI-1, yaitu: isolat yang berdasarkan pengamatan secara morfologi termasuk kelompok kapang. Diduga isolat-isolat kapang tersebut bukan merupakan mikrobia utama pada produk minuman laru, melainkan sebagai mikrobia kontaminan yang terdapat pada produk tersebut. Hasil uji aktivitas amilase kasar terhadap ketiga isolat kapang yang ditumbuhkan dalam media produksi yang mengandung pati terlarut sebagai sumber C (inkubasi dilakukan di atas alat pengocok dengan kecepatan 100 rpm pada suhu kamar selama 3 hari) ditunjukkan pada Tabel 4. Aktivitas amilase tertinggi yang dihasilkan isolat LG4 (diisolasi dari laru gewang) adalah $56,31 \times 10^2$ U/mL yang dicapai pada hari ke-2 setelah inkubasi. Aktivitas amilase tertinggi yang dihasilkan isolat LMS1 (diisolasi dari laru merah) adalah $41,49 \times 10^2$ U/mL, yang dicapai pada hari ke-3 setelah inkubasi. Isolat MI-1 merupakan isolat yang diisolasi dari "mur" menghasilkan aktivitas amilase tertinggi sebesar $46,78 \times 10^2$ U/mL, aktivitas amilase tertinggi dicapai pada hari ke 3 setelah inkubasi.

Tabel 4. Aktivitas amilase dari beberapa isolat kapang.

Isolat	Hari ke	Aktivitas amilase ($\times 10^2$ U/mL)
LG4	1	49,34
	2	56,31
	3	44,72
LMS1	1	31,16
	2	35,81
	3	41,49
MI-1	1	45,88
	2	46,52
	3	46,78

KESIMPULAN

Delapan dari 39 isolat yang diisolasi dari beberapa sampel nira dan laru yang berasal pulau Timor, nusa Tenggara Timur memiliki aktivitas amilase dengan nilai relatif $>1,15 < 1,50$. Dua isolat yang termasuk kelompok khamir, yaitu: Ferm.1 dan Ferm.2 memiliki aktivitas amilase sangat lemah, namun keduanya mempunyai kemampuan yang luar biasa dalam memfermentasi gula aer ditandai dengan timbulnya aroma alkohol khas yang kuat dan terbentuk gelembung gas CO_2 . Dalam media yang mengandung pati terlarut sebagai sumber C, aktivitas amilase kasar tertinggi yang dihasilkan isolat LG4, LMS1, dan MI-1 masing-masing sebesar $56,31 \times 10^2$, $41,49 \times 10^2$ U/mL, dan $46,78 \times 10^2$ U/mL. Hasil identifikasi menunjukkan

bahwa isolat Ferm.1 dan Ferm.2 termasuk kelompok khamir yang diidentifikasi sebagai *Pichia anomala*. Isolat-isolat bakteri lainnya yang memiliki aktivitas amilase diidentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* BL43, *Chromobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Micrococcus roseus* (*Staphylococcus roseus*), dan *Bacillus coagulans*.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnett, J.A. 1990. *Yeast Characteristic and Identification*. London: Cambridge University Press.
- Bernfeld, O. 1955. Amylases. In: Colowick, S.P. and N.O. Kaplan (eds.). *Methods in Enzymology* 1. New York: Academic Press.
- Dato, M.C.F., J.P.M. Junior, and M.J.R. Mutton. 2005. Analysis of secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cahaqa". *Brazilian Journal of Microbiology* 36 (1): 70-74.
- Fogarty, W.M and T. Kelly. 1980. Amylases, amyloglucosidases and related gluconases in economy microbiology: microbial enzymes and *bioconversions* vol. 5. Ed. By. A. H. Rose. Academic Press, London.
- Futatsugi, M., T. Ogawa, and H. Fukuda. 1980. Scale-up of glukamilase production by *Saccharomycopsis fibuligera*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 76: 419-422.
- Ganjar, I. 2007. *Pengelolaan Plasma Nutrah Mikroorganisme sebagai Aset Pemenuhan Kebutuhan Manusia*. Jakarta: Komisi Nasional Sumber Daya Genetik (KNSDG).
- Gangrong, X., S. Lee, M. Takagi, M. Morikawa and T. Inagaki. 1990. Cloning in *Bacillus subtilis* of thermostable and alkalophilic amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Annual report of IC. Biotech*, Osaka University, Osaka. Japan: 121-128.
- Hattori, Y. 1961. Studies of amylolytic enzyme produced by *Endomyces* sp. 1. Production of extracellular amylase by *Endomyces* sp. *Agricultural Biological Chemistry* 25: 737-743.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia III*. Balitbang Departemen Kehutanan RI. Jakarta, 1625.
- Kinoshita, S., V. Sangpituk, D. Rodpaya, N. Nilubol, and H. Taguchi. 1982. Hydrolysis of starch by immobilized cells and by enzymes of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus* sp. *Annual reports of ICME* 5: 253-259.
- Kuriyama, H., D.D. Sastraatmadja, Y. Igosaki, K. Watanabe, A. Kanti, and T. Fukatsu. 1997. Identification and Characterization of yeast isolated from Indonesian fermented food. *Mycoscience* 38: 441-445.
- Lestari, P., N. Richana, D.S. Damardjati, A.A. Darwis, K. Syamsu. 2001. Analisis gula reduksi hasil hidrolisis enzimatik pati ubi kayu oleh amilase termostabil dari *Bacillus stearotherophilus* TII12. *Jurnal Mikrobiologi* 6(1): 23-26.
- Mangunwardoyo, W., M. Takano, and I. Shibasaki. 1982. Preservation and utilization of a concentrated seed culture for bacterial amylase production. *Annual reports of ICME* 5: 163-171.
- Rahmansyah, M dan A. Kanti. 1999. Isolasi-isolat khamir dari minuman tradisional laru di NTT. *Berita Biologi* 4 (5): 255-63.
- Riany, A. 2007. Kloning gen pengkode alpha-amilase termostabil *Bacillus licheniformis* sith cloning of gene encoding thermostable alpha-amylase of *Bacillus licheniformis* sith). *Undergraduate theses from JBPTITBPPP/2007-10-05*. ITB, Bandung, Indonesia
- Richana, N. 2000. Prospek dan Produksi Enzim Alfa-amilase dari Mikroorganisme Buletin *AgroBio, Jurnal Tinjauan Ilmiah Riset Biologi dan Bioteknologi Pertanian* 3(2): 51-58.
- Saono, S dan T. Basuki. 1978. The amylolytic, lipolytic and proteolytic activities of yeast and micelial molds from ragi and some Indonesia foods. *Annales Bogoriensis*. VI: 207-209.
- Steinkraus, K.H. 1983 (ed.). *Handbook of Indonesian Fermented Foods*, pp 381- 388. Marcel Dekker Inc, New York.