



Karakterisasi Isolat JS-1, Bakteri Alkalofilik Penghasil Siklodekstrin Glikosiltransferase (CGTase) dari Sumedang, Jawa Barat

(Characterization of JS-1 Isolate, an Alkalophylic Bacteria as Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) Producer from Sumedang, West Java)

NUR MIFTAHURROHMAH*, MOORDIANI

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah,
Jagakarsa, Jakarta Selatan, 12640.

Diterima 4 April 2014, Disetujui 21 Agustus 2014

Abstrak: Enzim siklodekstrin glikosiltransferase (CGTase) adalah suatu enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh beberapa bakteri dan *archae*, yang mengkonversi pati menjadi siklodekstrin (CD). Enzim ini memiliki nilai komersial tinggi karena senyawa yang dihasilkannya (CD) dimanfaatkan dalam berbagai industri, seperti farmasi, kimia, kosmetik, makanan, tekstil, maupun pelestarian lingkungan. Di Indonesia, bakteri penghasil CGTase belum banyak ditemukan dan diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat bakteri penghasil CGTase dari tanah perkebunan jagung di daerah Sumedang, Jawa Barat dan mengkarakterisasi isolat tersebut dalam produksi CGTase. Proses skrining dilakukan menggunakan media agar Horikoshi. Dari proses ini berhasil diperoleh satu bakteri alkalofilik penghasil CGTase yang diberi nama isolat JS-1. Isolat ini dikarakterisasi berdasarkan pewarnaan Gram, kebutuhan oksigen, motilitas dan uji katalase. Dari hasil karakterisasi tersebut, diketahui bahwa JS-1 merupakan bakteri Gram positif berbentuk basil, anaerob fakultatif, motil dan positif dalam uji katalase. Isolat JS-1 juga dikarakterisasi lebih lanjut untuk mengetahui periode inkubasi dan suhu optimum yang diperlukan untuk menghasilkan CGTase yang maksimal. Hasil analisis menunjukkan bahwa isolat JS-1 menghasilkan CGTase yang maksimal jika diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Kata kunci: siklodekstrin glikosiltransferase (CGTase), siklodekstrin (CD), karakterisasi, bakteri alkalofilik, isolat JS-1.

Abstract: Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) is an extracellular enzyme which is produced by some bacteria and archae that converts starch into cyclodextrin (CD). This enzyme has a high commercial value because of its product (CD) is widely used in several industries, such as pharmaceutical, chemistry, cosmetic, food, textile and also for environment protection. In Indonesia, there are still a few bacteria as CGTase producer were discovered and observed. The aim of this research was to find bacteria as CGTase producer from soil of corn farm land in Sumedang, West Java, and further characterized the isolate in produce CGTase. Horikoshi agar media was used as screening media. An alkalophylic bacteria as CGTase producer, JS-1 was successfully gained from this process. This isolate was characterized in the term of Gram staining, oxygen demand, motility and catalase test. The characterization results showed that JS-1 is a bacillus, Gram positive, facultative anaerob, motil and catalase positive. JS-1 isolate was also further characterized in order to determine optimum incubation period and temperature for CGTase production. The results were showed that JS-1 isolate was produced CGTase in maximum level if incubated for 48h at 37 °C.

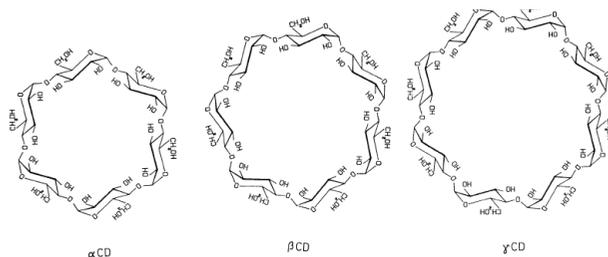
Keywords: cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase), cyclodextrin (CD), characterization, alkalophylic bacteria, JS-1 isolate.

* Penulis korespondensi, Hp. 085220086002
e-mail: fz28306@yahoo.com



PENDAHULUAN

SIKLODEKSTRIN glikosiltransferase (CGTase, EC No. 2. 1. 4. 19) adalah salah satu enzim industrial penting yang dihasilkan secara ekstraseluler oleh beberapa bakteri dan *archaea*, umumnya dari genus *Bacillus*. Enzim ini mengkonversi pati menjadi siklodekstrin (CD) melalui reaksi transglukosilasi dan hidrolisis pati. CD adalah senyawa oligosakarida siklik yang terdiri dari residu-residu glukosa yang terikat dengan ikatan α -1,4 glikosidik. Terdapat tiga jenis siklodekstrin (Gambar 1) sesuai dengan jumlah unit glukosa yang menyusunnya, yaitu CD- α , - β , dan - γ yang masing-masing tersusun dari 6, 7 dan 8 unit glukosa. Berdasarkan jenis CD dominan yang dihasilkannya, terdapat tiga jenis CGTase, yaitu CGTase- α , - β , dan - γ ⁽¹⁾.



Gambar 1. Struktur siklodekstrin (CD)- α , β , γ ⁽¹⁾.

CD memiliki bentuk molekul yang unik. Bagian luar CD bersifat hidrofil dan bagian dalamnya bersifat hidrofob. Sifat yang unik ini menjadikan CD mampu membentuk kompleks inklusi dengan senyawa-senyawa asing yang bersifat hidrofob dan mengubah sifat fisikokimianya. Oleh karena itu, CD banyak digunakan di beberapa industri, seperti farmasi, kimia, kosmetik, makanan dan pelestarian lingkungan. Di bidang farmasi, CD banyak digunakan untuk memperbaiki kelarutan, stabilitas, ketersediaan hayati senyawa-senyawa obat yang sukar larut, memperbaiki bau dan rasa yang kurang baik, melindungi senyawa yang mudah teroksidasi serta mengurangi volatilitas zat-zat yang mudah menguap⁽¹⁾.

Nilai manfaat CD yang tinggi menjadi pemicu bagi banyak peneliti untuk memperoleh isolat-isolat mikroba baru penghasil CGTase yang potensial untuk dikembangkan sebagai bahan baku dalam produksi CD. Eksplorasi bakteri penghasil CGTase dari berbagai sampel lingkungan telah banyak dilakukan di berbagai negara. CGTase pertama kali ditemukan dari *Bacillus macerans*⁽¹⁾. Penelitian CGTase di Indonesia diinisiasi oleh Wayuntari dkk (1994) mengenai Studi Produksi CGTase dan Pemanfaatannya dalam Produksi Siklodekstrin. Penelitian ini merupakan Riset Unggulan Terpadu yang belum dipublikasikan⁽²⁾.

Beberapa isolat bakteri lokal Indonesia penghasil CGTase yang telah dilaporkan, baik melalui publikasi di jurnal ilmiah maupun dalam bentuk skripsi/ thesis, adalah *Bacillus* sp. BK-1⁽²⁾, *Bacillus* sp. BGG-1⁽³⁾, *Bacillus* sp.⁽⁴⁾, serta *Bacillus* sp. LT1B dan PT2B⁽⁵⁾.

Dari sebagian besar penelitian yang telah dipublikasikan, mikroba penghasil CGTase umumnya diisolasi dari tanah dan ada juga yang diisolasi dari rizosfer tanaman penghasil pati. *Bacillus* sp. TS1-1, NR1 s.d. NR11UPM merupakan isolat-isolat mikroba penghasil CGTase yang diisolasi dari tanah lokal Malaysia^(6,7). *Paenibacillus graminis* diisolasi dari rizosfer jagung dan akar gandum di ladang pertanian di Prancis dan Australia⁽⁸⁾. *B. clarkii* 7364 diisolasi dari tanah lokal Jepang⁽⁹⁾. Beberapa isolat penghasil CGTase juga diisolasi dari tanah lahan pertanian sagu di Johor serta lahan pertanian sayuran di Sarawak dan Selangor, Malaysia⁽¹⁰⁾. Isolat Indonesia penghasil CGTase yaitu *Bacillus* sp. dan *Bacillus* sp. BGG-1 berhasil diisolasi dari tanah di taman rumput UNPAD, Jatinangor^(3,4).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi isolat bakteri tanah penghasil CGTase dari tanah perkebunan jagung di daerah Tanjungsari, Sumedang, Jawa Barat. Penelitian ini merupakan tahap awal dari penelitian berkelanjutan untuk memperoleh isolat-isolat mikroba lokal Indonesia penghasil CGTase yang potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai bahan baku untuk produksi CD.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Sampel tanah dari perkebunan jagung di Tanjungsari, Sumedang, Jawa Barat, media Horikoshi {1% (b/v) *soluble starch* (Merck), 0,5% (b/v) pepton, 0,5% (b/v) *yeast extract*, 0,02% (b/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% (b/v) K_2HPO_4 , 1% (b/v) Na_2CO_3 , fenolftalein 0,03% (b/v), metil jingga 0,01% (b/v) dan agar bakteriologi 1% (b/v)}⁽¹¹⁾, pewarna-pewarna untuk pewarnaan Gram dan endospora, H_2O_2 3% (v/v), etanol, air suling, basa Tris, HCl, NaOH, siklodekstrin beta (Nacalai Tesque).

Alat. Inkubator (Mettler), *laminar air flow cabinet* (Gelman-Science Clean Bench), autoklaf (Hirayama), mikroskop binokuler (Olympus CX-21), mikropipet (Bio Rad), sentrifuga, vortex (Thermolyne), spektrofotometer UV-vis.

METODE. Skrining dan Isolasi Mikrob Tanah Penghasil CGTase. Mikrob tanah penghasil CGTase diskriminasi dan diisolasi dengan kombinasi teknik pengenceran berseri dan cara tuang pada media agar Horikoshi. Semua cawan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Koloni-koloni tunggal dengan zona



halo kuning di sekelilingnya kemudian diisolasi, dibuat kultur murninya dan diberi kode/nama. Dari skrining dan isolasi yang telah dilakukan, diperoleh mikroba penghasil CGTase yang diberi nama isolat JS-1.

Karakterisasi Isolat. Isolat JS-1 dikarakterisasi yang meliputi penampakan makroskopik berupa morfologi koloni pada media agar lempeng, penampakan mikroskopik berupa morfologi dan klasifikasi sel dengan pewarnaan Gram, motilitas, kebutuhan oksigen, dan uji katalase⁽¹²⁾.

Karakterisasi Isolat dalam Produksi CD- β . Isolat JS-1 diinokulasikan ke dalam media Horikoshi cair selama 48 jam pada suhu 37 °C. Setelah 48 jam, kultur diukur *optical density* (OD)-nya pada λ 600 nm, lalu disentrifugasi selama 2x10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Fraksi supernatan yang mengandung enzim CGTase (*crude enzyme*) diambil dan digunakan untuk pengujian aktivitas enzim.

Uji Aktivitas Siklisasi- β ⁽¹⁴⁾. Kuantifikasi aktivitas siklisasi- β CGTase yang dimurnikan secara parsial dianalisis menggunakan modifikasi dari metode fenolftalein untuk mengukur kadar CD- β seperti yang dilakukan oleh Goel dan Nene (1994)⁽¹⁴⁾. Kadar CD- β dianalisis berdasarkan persen penurunan serapan zat warna fenolftalin pada panjang gelombang 550 nm. Sebanyak 500 μ L fraksi supernatan isolat JS-1 diinkubasi bersama dengan *soluble starch* 10% (b/v) dalam 2,5 mL Tris-Cl 50 mM pH 7,0 pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan 250 μ L HCl 1,2 N. Tabung kemudian divortex untuk membuat larutan yang homogen dan disentrifugasi untuk mengendapkan pati. Sesaat sebelum pengukuran, reaksi dinetralkan dengan penambahan 250 μ L NaOH 1,2 N. Sebanyak 500 μ L supernatan campuran reaksi diambil dan ditambahkan ke dalam 2 mL larutan fenolftalein yang dibuat segar dengan mencampurkan 1 mL fenolftalin 4 mM (dalam etanol 96%), 4 mL etanol 96% dan 100 mL Na₂CO₃ 125 mM. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer VIS pada panjang gelombang 550 nm. Persen penurunan serapan fenolftalein dihitung terhadap larutan kontrol (500 μ L Tris-CL 50 mM pH 7,0 yang ditambahkan ke dalam 2 mL larutan fenolftalin). Kadar CD- β yang dihasilkan dihitung dengan mengekstrapolasi persen penurunan serapan fenolftalein terhadap kurva standard CD- β .

Penetapan Waktu Inkubasi Optimum untuk Produksi CGTase. Sebanyak 20 μ L kultur isolat JS-1 berumur 24 jam (OD₆₀₀ = 0,3) diinokulasikan ke dalam 15 tabung yang masing-masing berisi 5 mL media Horikoshi cair tanpa indikator warna, dan diinkubasi pada suhu 37 °C. OD₆₀₀ dan aktivitas enzim diukur pada jam ke-24, 48, 72 dan 96, masing-masing

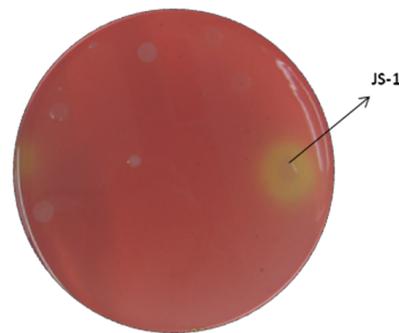
sebanyak tiga ulangan (triplo). Pengukuran aktivitas enzim seperti pada prosedur uji aktivitas siklisasi- β di atas. Dari data yang diperoleh, dibuat kurva pertumbuhan isolat (nilai OD₆₀₀) vs waktu inkubasi dan kurva produksi CD- β vs waktu inkubasi.

Penetapan Suhu Inkubasi Optimum untuk Produksi CGTase. Sebanyak 20 μ L kultur isolat JS-1 berumur 24 jam (OD₆₀₀ = 0,3) diinokulasikan ke dalam 15 tabung yang masing-masing berisi 5 mL media Horikoshi cair tanpa indikator warna, dan diinkubasi pada beberapa suhu, yaitu 18, 30, 37, 50 dan 60 °C selama 48 jam. Setelah 48 jam, OD₆₀₀ dan aktivitas enzim diukur seperti pada prosedur uji aktivitas siklisasi- β . Dari data yang diperoleh, kurva produksi CD- β vs suhu inkubasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining dan Isolasi Mikroba Tanah Penghasil CGTase. Salah satu metode skrining yang efektif untuk memperoleh isolat penghasil CGTase adalah menggunakan modifikasi media Horikoshi agar seperti yang dipublikasikan oleh Park *et al*⁽¹¹⁾. Media ini secara selektif menyeleksi isolat-isolat yang menghasilkan enzim CGTase- β/γ . Dasar dari proses skrining ini adalah bahwa fenolftalein dapat diubah menjadi suatu dianion yang tidak berwarna ketika terperangkap membentuk kompleks inklusi di dalam rongga CD- β . Oleh karenanya, aktivitas CGTase diamati berdasarkan reduksi intensitas warna fenolftalein pada kondisi basa⁽¹¹⁾.

Pada penelitian ini, digunakan modifikasi media agar Horikoshi pH 10,0 untuk mengisolasi bakteri penghasil CGTase dari tanah perkebunan jagung di Sumedang, Jawa Barat. Dari proses yang dilakukan, diperoleh satu isolat yang menghasilkan zona halo kuning setelah dua tahap isolasi dengan kombinasi metode pengenceran berseri dan cara tuang pada media agar Horikoshi. Isolat ini dinamakan JS-1. Koloni isolat JS-1 pada media agar Horikoshi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Isolat bakteri alkalofilik penghasil CGTase (JS-1) pada media agar Horikoshi pH 10.



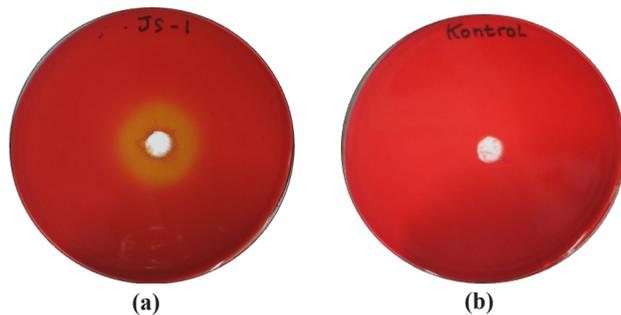


Metode skrining menggunakan modifikasi media agar Horikoshi juga dapat membedakan aktivitas enzim amilase dan glukoamilase yang mungkin dihasilkan juga oleh bakteri. Amilase dan glukoamilase hanya menunjukkan zona bening di sekitar koloni jika dideteksi dengan larutan iodin. Hanya CGTase saja yang mampu menghasilkan zona halo kuning di sekitar koloni. Kemungkinan adanya bakteri penghasil asam yang juga dapat mengubah warna fenolftalein diantisipasi dengan adanya indikator jingga metil pada media. Warna jingga metil akan berubah dari jingga menjadi merah akibat asam yang dihasilkan bakteri. Oleh karenanya, aktivitas bakteri penghasil asam dapat dibedakan dari aktivitas CGTase⁽¹¹⁾.

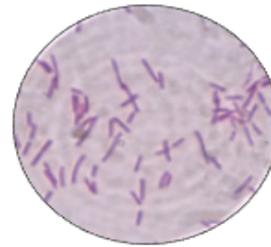
Enzim CGTase merupakan enzim ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri penghasilnya. Jika bakteri dikultur dalam media cair, maka enzim akan disekresikan ke lingkungan ekstraseluler yang berupa cairan media. Untuk membutuhkan hal tersebut, maka isolat JS-1 yang telah ditumbuhkan pada media Horikoshi cair disentrifugasi untuk mengendapkan selnya. Fraksi supernatan yang diduga mengandung enzim CGTase diteteskan pada media agar Horikoshi

dan diinkubasi selama 24 jam pada 37 °C. Setelah diinkubasi, ternyata terbentuk zona halo kuning di sekitar daerah penetesan supernatan kultur. Sementara pada media agar yang ditetesi kontrol negatif (supernatan media tanpa isolat), zona halo kuning tidak teramati (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa enzim CGTase adalah benar disekresikan oleh isolat JS-1 ke lingkungan ekstraseluler/ media tumbuhnya.

Karakterisasi Isolat. Isolat JS-1 dikarakterisasi yang meliputi penampakan makroskopik berupa morfologi koloni pada media agar lempeng, penampakan mikroskopik berupa morfologi dan klasifikasi sel dengan pewarnaan Gram, motilitas, kebutuhan oksigen, dan uji katalase (Tabel 1 dan Gambar 4).



Gambar 3. Aktivitas enzim ekstraseluler CGTase yang disekresikan oleh isolat JS-1 pada media agar Horikoshi, ditunjukkan dengan terbentuknya zona halo kuning di sekitar daerah penetesan (a) kontrol negatif tidak menunjukkan zona halo kuning (b).



JS-1

Gambar 4. Hasil pewarnaan Gram isolat JS-1 (basil reguler, Gram positif).

Berdasarkan hasil karakterisasi isolat JS-1, dapat diketahui bahwa JS-1 merupakan *Bacillus* Gram positif. Beberapa karakter utama dari genus *Bacillus* sesuai determinasi Bergey's adalah Gram positif, katalase positif dan motil⁽¹⁵⁾. Karakter-karakter tersebut dimiliki oleh isolat JS-1 (Tabel 1). Namun demikian, identitas isolat yang lebih jelas hingga tingkat spesies baru dapat diketahui jika isolat diidentifikasi dengan teknik molekuler.

Tabel 1. Karakterisasi isolat bakteri alkalofilik penghasil CGTase, JS-1.

Karakter	Hasil pengamatan
Morfologi koloni (makroskopik)	Koloni berwarna putih keabuan. Dengan teknik agar tuang, koloni berbentuk bulat dengan tepian tidak beraturan, tampak basah, permukaan datar. Dengan teknik gores, koloni tunggal tampak berbentuk tidak beraturan, <i>lobatus</i> , permukaan datar dan basah.
Morfologi sel (mikroskopik)	Basil reguler, tersebar.
Klasifikasi Gram	Gram positif
Kemampuan membentuk endospora pada kondisi ekstrem	-
Kebutuhan oksigen	Mikroaerofilik/ anaerob fakultatif
Motilitas	Motil
Aktivitas katalase	Positif



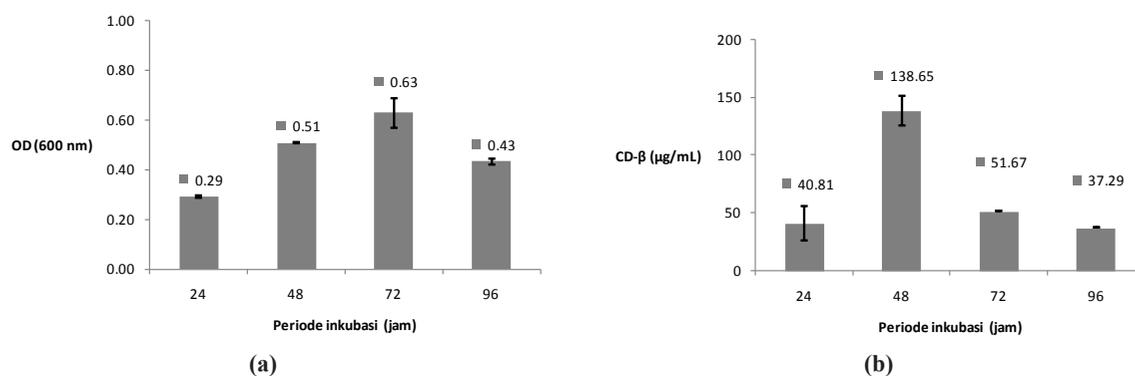
Sebagaimana dilaporkan oleh Qi dan Zimmerman (2005), sebagian besar bakteri penghasil CGTase berasal dari genus *Bacillus*⁽¹⁶⁾. Selain *Bacillus*, CGTase juga dihasilkan oleh beberapa bakteri lainnya dan *archaea*, seperti *Paenibacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Xanthomonas* sp., *Vibrio* sp., *Thermococcus* sp., *Thermonaerobacterium* sp., dan juga *Actinomycetes*^(16,17). Beberapa isolat bakteri lokal Indonesia yang pernah dilaporkan, juga berasal dari genus *Bacillus*, seperti *Bacillus* sp. BK-1⁽²⁾, *Bacillus* sp. BGG-1⁽³⁾, *Bacillus* sp.(4), serta *Bacillus* sp. LT1B dan PT2B⁽⁵⁾.

Waktu Inkubasi Optimum untuk Produksi CGTase. Untuk memproduksi enzim CGTase dari isolat JS-1 dalam jumlah yang maksimal, maka perlu ditetapkan beberapa parameter untuk mendapatkan kondisi inkubasi optimum. Dalam penelitian ini, ditetapkan dua parameter kondisi inkubasi, yaitu waktu dan suhu inkubasi optimum. Produksi enzim CGTase dari isolat JS-1 dianalisis pada beberapa waktu inkubasi, yaitu 24, 48, 72 dan 96 jam. Analisis dilakukan dengan mengukur produk konversi enzim berupa CD- β menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 550 nm. Profil pertumbuhan isolat dan produksi CD- β yang dihasilkan oleh enzim CGTase dari isolat JS-1 dapat dilihat pada Gambar 5.

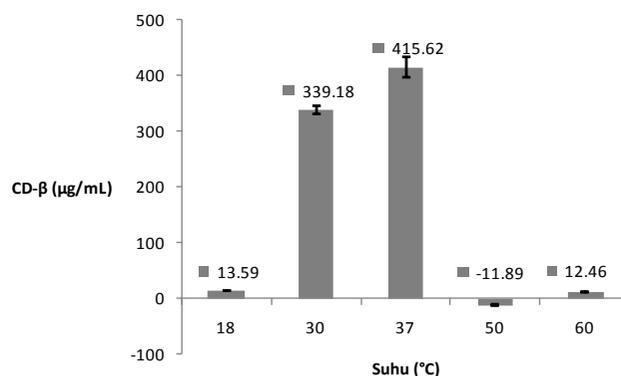
Berdasarkan data pada Gambar 5, dapat diketahui bahwa enzim CGTase dari isolat JS-1 paling banyak disekresikan setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Hal ini dapat dilihat dari jumlah CD- β hasil reaksi enzimatik CGTase yang mencapai level tertinggi pada 48 jam.

Penetapan Suhu Inkubasi Optimum untuk Produksi CGTase. Untuk mengetahui suhu inkubasi optimum yang diperlukan oleh isolat JS-1 dalam memproduksi CGTase, kultur diinkubasi pada beberapa titik suhu, yaitu 18, 30, 37, 50 dan 60 °C, selama 48 jam. Dari hasil yang diperoleh, dapat diketahui bahwa suhu inkubasi optimum bagi isolat JS-1 adalah 37 °C dengan periode inkubasi 48 jam (Gambar 6). Dari grafik tersebut, dapat diketahui pula bahwa CD- β hanya dihasilkan oleh CGTase isolat JS-1 pada suhu 30 dan 37 °C. Profil seperti ini kemungkinan berkaitan erat karakter mikroba penghasilnya, yang merupakan bakteri mesofilik.

Bakteri-bakteri penghasil CGTase yang pernah dilaporkan, terutama yang berasal dari genus *Bacillus*, umumnya merupakan bakteri mesofilik. *Bacillus* sp. TS1-1 diinkubasi pada 37 °C selama 48 jam untuk menghasilkan CGTase yang maksimal⁽⁶⁾, demikian juga isolat lokal Indonesia penghasil CGTase, seperti *Bacillus* sp. LT1B dan PT2B⁽⁵⁾.



Gambar 5. Profil pertumbuhan isolat (a) dan produksi CD- β oleh enzim CGTase isolat JS-1 (b) pada beberapa waktu inkubasi.



Gambar 6. Profil produksi CD- β oleh enzim CGTase isolat JS-1 pada beberapa suhu inkubasi.

SIMPULAN

Dari penelitian ini berhasil diperoleh satu bakteri alkalofilik penghasil CGTase dari tanah perkebunan jagung di Sumedang, Jawa Barat, yang diberi nama isolat JS-1. Isolat ini merupakan bakteri Gram positif berbentuk basil, anaerob fakultatif, motil dan positif dalam uji katalase. Isolat JS-1 menghasilkan CGTase yang maksimal jika diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Penelitian ini menambah koleksi bakteri penghasil CGTase asli Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut dalam produksi CD-β.

SARAN

Pada penelitian lanjutan akan dilakukan identifikasi molekuler isolat JS-1 serta produksi dan karakterisasi CGTase yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Program Insentif Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila tahun 2013-2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Szejtli J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*. 2004. 76(10): 1825-45.
- Yunianto P, Rahayu K, Wahyuntari B. Pengaruh pH dan suhu terhadap produksi β-siklodekstrin glikosiltransferase (β-CGTase) oleh *Bacillus* sp. BK-1. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 2000. 2: 27-31.
- Pribadi AF. Karakterisasi enzim CGTase dari isolat *Bacillus* sp. BGG-1 yang diisolasi dari taman rumput UNPAD berdasarkan parameter suhu dan pH [skripsi]. Bandung: Universitas Padjadjaran; 2001. Diambil dari pustaka.unpad.ac.id/archives/124079, diakses tanggal 6 Maret 2013.
- Sahar LF. Karakterisasi enzim CGTase dari isolat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari taman rumput UNPAD berdasarkan parameter suhu dan pH [skripsi]. Bandung: Universitas Padjadjaran; 2001. Diambil dari pustaka.unpad.ac.id/archives/124079, diakses tanggal 6 Maret 2013.
- Sagita D. Isolat Indonesia LT1B dan PT2B penghasil siklodekstrin glukano transferase (CGTase): Karakterisasi spesies, urutan gen cgtase dan profil enzim [tesis]. Bandung: Sekolah Farmasi ITB; 2011.
- Rahman K, Illias RM, Hassan O, Mahmood NAN, Rashid NAA. Molecular cloning of a cyclodextrin glucanotransferase gene for alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1 and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006. 39: 74-84.
- Ramli N, Suraini AA, Hassan MA, Alitheen NB, Kamaruddin K, Ibrahim Z. Molecular cloning and extracellular expression of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus* sp. NR5UPM. *African Journal of Microbiology Research*. 2011. 5(21): 3475-82.
- Berge O, Guinebretiere MH, Achouak W, Normand P, Heulin T. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002. 52:607-16.
- Takada M, Nakagawa Y, Yamamoto M. Biochemical and genetic analyses of a novel γ-cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus clarki* 7364. *Journal of Biochemistry*. 2003. 133: 317-24.
- Suraini AA, Sauvaphap AN, Osman H, Mohammed IAK, Norjahan BA, Kamarulzaman K, Rosli MI. A rapid screening method for CGTase-producing bacteria using different starches as carbon source. *Malays Appl Biol*. 2007. 36(2):1-5.
- Park CS, Kwan HP, Seung HK. A rapid screening method for alkaline β-cyclodextrin glucanotransferase using phenolftalein-methyl orange containing-solid medium. *Agricultural Biology and Chemistry*. 1989. 53: 1167-9.
- Cappucino JG, Sherman N. *Microbiology a laboratory manual*. 8th Ed. New York: Pearson Benjamin Cummings; 2008. 65-8, 79-81, 85-6, 147-70.
- Pakzad SR, Ajdary SN, Moazami, Haghghi S. A novel method to detect β-cyclodextrin glucosyl transferase (β-CGTase) activity on polyacrylamide gels. *Iranian Biomedicine Journal*. 2004. 9: 87-90.
- Goel A, Nene SN. Modifications in the phenolphthalein method for spectro-photometric estimation of beta cyclodextrin. *Starch*. 1995. 47: 399-400.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1994. 559-60.
- Qi Q, Zimmerman W. Cyclodextrin glucanotransferase: from gene to applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005. 66: 475-85.
- More SS, Niraja R, Chris E, Akshata MB, Shetha V, Shubhrabarani DM. Isolation, purification and biochemical characterization of CGTase from *Bacillus halodurans*. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 2012. 7(1-2): 90-7.