

Kinetika dan Karakterisasi Amiloglukosidase Isolat *Aspergillus niger* Dari Limbah Ampas Sagu

Amiruddin¹⁾, Hermin Kombong¹⁾, Gayuh Agasyia¹⁾

1) Jurusan Kimia FMIPA Universitas Haluoleo Kendari 93231

Abstract

Study of characterization and kinetic amyloglucosidase from Aspergillusniger isolate using sago pith waste has been done. The aims of this research wereto know the optimum substrate concentration, metalions effect, and value of K_M and v_{maks} of amyoglucosidase. The result of researches were obtained the optimum activity of amyoglucosidaseat 2% (w/v) of starch concentration. The activator of amyoglucosidase were Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , and Co^{2+} , while the inhibitor were Sn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , and Ni^{2+} . The ions of Hg^{2+} and Ni^{2+} were founded stopped of the enzyme activity. The variables of kinetic of amyloglucosidase were obtained K_M and v_{maks} value were. 4,40 %, 0,49 mU, respectively.

Key Word: Amyloglucosidase, sago pith waste, Aspergillus niger, Kinetic and Characterization

Received : 3 July 2011

Accepted : 15 August 2011

Abstrak

Penelitian kinetika dan karakterisasi amiloglukosidase isolat *Aspergillus niger* dari limbah ampas sagu telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat optimum, pengaruh ion-ion logam, serta nilai K_M dan v_{maks} dari amiloglukosidase. Hasil penelitian diperoleh bahwa aktivitas optimum amiloglukosidase dicapai pada konsentrasi pati 2% (b/v). Beberapa ion logam yang digunakan untuk mengetahui aktivitas amiloglukosidase yang memiliki sifat aktivator meliputi Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , dan Co^{2+} , dan yang menunjukkan sifat inhibitor meliputi Sn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , dan Ni^{2+} . Ion-ion Hg^{2+} dan Ni^{2+} ditemukan mampu menghentikan aktivitas enzim. Variabel kinetika

amiloglukosidase menunjukkan nilai K_M dan v_{maks} masing-masing 4,40 % dan 0,49 mU.

Kata Kunci: Amiloglukosidase, Ampas Sagu, Aspergillus niger, Kinetika dan Karakterisasi

Diterima: 3 Juli 2011

Disetujui untuk dipublikasikan: 15 Agustus 2011

*Penulis Korespondensi/corresponding author: Telp.+62 401 3191929 Fax. +62 401 3190496

E-mail: amiruddin@yahoo.com

1. Pendahuluan

Amiloglukosidase merupakan salah satu jenis enzim yang paling banyak digunakan dalam industri karena kemampuannya dalam memecah pati menjadi glukosa (Futatsugi *et al.*, 1993). Penggunaan enzim amiloglukosidase sebagai katalisator reaksi-reaksi biologis dalam bidang pangan dan nonpangan telah memberikan manfaat dan keuntungan bagi manusia. Enzim amiloglukosidase banyak digunakan dalam industri gula cair dan bir (Frazier dan Westhoff, 1988).

Enzim amiloglukosidase umumnya diperoleh dari mikroorganisme (bakteri, kapang, dan khamir) yang memiliki aktivitas amilolitik. Diantara sumber mikroorganisme tersebut, kelompok kapang merupakan kelompok mikroba yang paling banyak diisolasi amiloglukosidasenya. Kelompok kapang *Aspergillus* merupakan kelompok yang paling dominan dalam menghidrolisis pati (Melliawati

et al., 2006). Borris (1987) melaporkan bahwa *A. niger* potensial dalam memproduksi amiloglukosidase pada media pati kentang sebagai induser. Beberapa penelitian yang telah dilakukan (Melliawati *et al.*, 1995) menggunakan bahan pati singkong dengan bantuan kapang *Aspergillus* sp. KT-11 untuk produksi enzim amiloglukosidase. Fogarty dan Benson (1983) telah berhasil memurnikan dan mengkarakterisasi amiloglukosidase dari *A. niger* termofilik yang difermentasi pada media pati jagung dengan aktivitas katalitik tinggi dan stabil pada suhu 50°C. Selain itu, penggunaan pati sagu juga telah banyak dilaporkan sebagai induser amiloglukosidase. Kombong (2003) telah memanfaatkan pati sagu untuk produksi amiloglukosidase dari *A. niger*, sedangkan Melliawati *et al.* (2006) menemukan 2 jenis kapang *Aspergillus* yaitu *A. fumigatus* dan *A. awamori* mensekresikan amiloglukosidase pada media pati

sagu. Selain jenis *Aspergillus*, mikroorganisme lainnya juga ditemukan potensial menghasilkan amiloglukosidase pada fermentasi pati sagu, seperti *Endomycopsis fibuligera* (Ahmad, 2003).

Berbagai penelitian terus dilakukan untuk mencari enzim amiloglukosidase dengan aktivitas katalitik tinggi, baik dari segi sumber mikroorganismenya maupun sumber patinya. Salah satu teknik yang paling efektif adalah dengan cara mengisolasi langsung mikroorganismenya dalam limbah berpati, seperti yang dilakukan oleh Adeniran dan Abiose (2009) dengan mengisolasi kapang amilolitik dari limbah-limbah pertanian yang mengandung pati dan menemukan 5 jenis kapang dengan aktivitas amilolitik tinggi, yaitu *Helminthosporium oxysporium*, *Penicillium frequestantis*, *A. flavus*, *A. fumigates*, dan *A. niger*. Selain penelitian di atas, pemberdayaan potensi lokal juga telah dilakukan oleh Natalia (2009) yang berhasil

mengisolasi *A. niger* dengan aktivitas amiloglukosidase dari limbah ampas sagu dan Ekawaty (2009) isolat lokal tersebut difermentasikan ke dalam media yang mengandung pati sagu, dimurnikan dan dikarakterisasi amiloglukosidasenya.

Amiloglukosidase dari *A. niger* lokal tersebut memiliki pH optimum 6,4 dan suhu optimum 45°C (Ekawaty, 2009). Karakterisasi secara menyeluruh terhadap amiloglukosidase tersebut perlu dikaji lebih lanjut untuk mengetahui kinetika, aktivitas serta daya hidrolitiknya. Pada penelitian ini yang dikaji adalah aspek kinetika enzimatis amiloglukosidase hasil isolat *A. niger* lokal serta pengaruh kaion-kation logam terhadap aktivitasnya.

2. Bahan Dan Metode

2.1 Uji Aktivitas Amiloglukosidase

Aktivitas enzim diukur dengan mencampur 1 mL enzim, 1 mL substrat pati, dan 1 mL buffer pH 6,4 lalu diinkubasi selama 60 menit pada suhu 45°C. Inkubasi dihentikan

dengan penambahan 2 mL DNS yang dibuat dan kemudian dikocok dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5 menit. Selanjutnya didinginkan dalam air es dan ditambahkan akuades sampai volumenya menjadi 10 mL. Setelah itu diukur absorbansinya pada λ 540 nm. Blanko mendapat perlakuan yang sama dengan sampel, namun penambahan enzim dilakukan pada saat campuran dipanaskan.

Penentuan kadar glukosa didasarkan pada kurva larutan standar glukosa. Larutan standar glukosa dibuat pada kisaran konsentrasi 0,1 – 1,0 mg/mL dengan selang 0,2 mg/mL dan diukur berdasarkan metode DNS (Haq *et al.*, 2002).

2.1.1 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Amiloglukosidase

Pengaruh konsentrasi substrat dilakukan dengan menggunakan substrat pati pada konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0 % (b/v).

2.1.2 Pengaruh Ion-Ion Logam terhadap Aktivitas Amiloglukosidase

Pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim dengan kadanya ion-ion Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , dan Sn^{2+} dari garam-garam kloridanya pada konsentrasi 5 mM.

2.2 Penentuan K_M dan v_{maks}

Penentuan K_M dan v_{maks} dilakukan dengan menginkubasi 1 mL enzim dalam 2 mL substrat pati dengan variasi konsentrasi 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; dan 2,00 % (b/v), dan 2 tetes indikator Lugol iodin. Larutan diinkubasi pada pH 6,4 dan suhu 45 °C. Kemudian diukur waktu yang dibutuhkan dari awal inkubasi hingga hilangnya warna biru kompleks iod-pati (Shoemaker *et al.* 1996).

2.3 Analisis Data

2.3.1 Penentuan Aktivitas Amiloglukosidase (Bertolin et al., 2003)

Aktivitas enzim dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai mikromol glukosa yang dihasilkan per mL filtrat enzim dengan menggunakan rumus:

$$A = \frac{[\text{Glukosa}] \times 1000}{\text{BM. Glukosa} \times t}$$

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepas 1 μmol glukosa.

2.3.2 Penentuan K_M dan v_{maks} (Shoemaker et al. 1996).

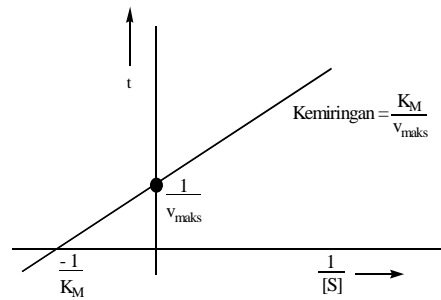
Penentuan K_M dan v_{maks} dilakukan dengan menganalisis data yang diperoleh dengan rumus berikut.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\text{maks}}} + \frac{K_M}{v_{\text{maks}}} \frac{1}{[S]}$$

karena $\frac{1}{v} \approx t$,

maka: $t = \frac{1}{v_{\text{maks}}} + \frac{K_M}{v_{\text{maks}}} \frac{1}{[S]}$

Setelah itu, dibuat grafik antara waktu (t) dengan $1/[S]$ untuk mencari persamaan garis lurusnya.



Nilai *intersept* digunakan untuk menghitung v_{maks} dan nilai *slope* digunakan untuk menghitung K_M .

3. Hasil dan Pembahasan

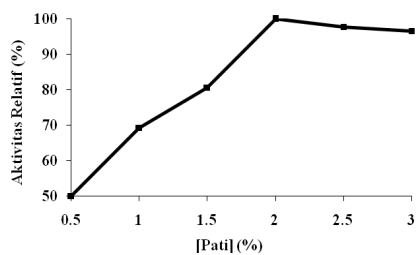
3.1. Karakterisasi Amiloglukosidase

3.1.1 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Amiloglukosidase

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat yang akan dikatalisisnya. Pada konsentrasi substrat yang rendah, laju aktivitas enzim tidak begitu tinggi karena tumbukan partikel substrat dengan enzim kurang efisien sehingga tidak semua enzim diubah menjadi kompleks enzim-substrat yang

merupakan reaksi perantara terbentuknya produk hasil hidrolisis. Peningkatan konsentrasi substrat menyebabkan tumbukan antara partikel substrat dengan enzim semakin sering terjadi, sehingga semua enzim dapat diubah menjadi kompleks enzim-substrat. Tetapi setelah melewati konsentrasi substrat yang optimum, aktivitas enzim tidak akan meningkat lagi melainkan menjadi konstan akibat enzim telah jenuh oleh substrat.

Tampak pada Gambar 5 terlihat grafik pengaruh konsentrasi substrat pati terhadap aktivitas amiloglukosidase



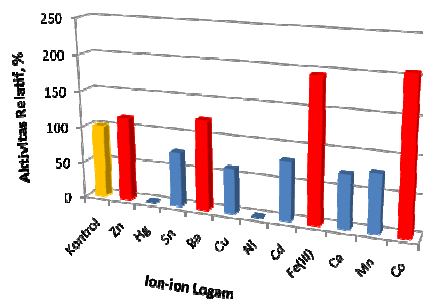
Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat pati terhadap aktivitas amiloglukosidase

Selain pengaruh suhu dan pH yang telah dilaporkan oleh Ekawaty (2008), dimana amiloglukosidase yang diisolasi memiliki suhu untuk

aktivitas optimum pada 45 °C dan pH optimum 6,4, pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim juga diamati. Gambar 4 memperlihatkan bahwa dengan bertambahnya konsentrasi substrat pati dapat meningkatkan aktivitas amiloglukosidase hingga mencapai optimumnya pada konsentrasi pati 2% (b/v). Di atas konsentrasi pati 2% (b/v), aktivitas enzim tidak bertambah lagi, pada grafik menunjukkan pola penurunan hingga konsentrasi pati konstan. Hal ini disebabkan enzim telah jenuh dengan substrat.

3.1.2 Pengaruh Ion-ion Logam terhadap Aktivitas Amiloglukosidase

Tampak pada Gambar 6 dibawah ini, pengaruh ion-ion logam terhadap aktivitas amiloglukosidase



Ket:

-  = Kontrol
-  = Aktivator
-  = Inhibitor

Gambar 6. Pengaruh ion-ion logam terhadap aktivitas amiloglukosidase

Dimana pengaruh ion-ion logam terhadap aktivitas amiloglukosidase (Gambar 6) menunjukkan hanya beberapa ion logam saja merupakan aktivator yang mampu meningkatkan aktivitas amiloglukosidase, ion logam ini terdiri atas Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , dan Co^{2+} . Dua ion logam terakhir, Fe^{3+} dan Co^{2+} , memberikan peningkatan aktivitas yang cukup tinggi hingga dua kali dari aktivitas normal. Hasil ini berbeda dengan amiloglukosidase yang diisolasi dari *A. niger* IMDCC 1203 (Fogarty dan Benson, 1983) dan *Chaetomium thermophilum* (Chen et al., 2005), dimana ion Fe dan Co justru menurunkan aktivitas enzim. Sedangkan ion-ion logam lainnya

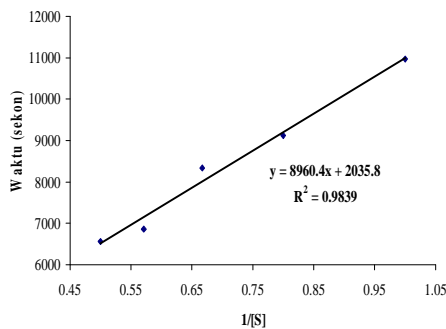
bertindak sebagai inhibitor yang menghambat aktivitas α -amilase, meliputi Sn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , dan Ni^{2+} , dua ion logam terakhir ini bahkan mampu menghentikan kerja enzim.

3.2. Nilai K_M dan v_{maks} Amiloglukosidase terhadap Substrat Pati

Persamaan Michaelis-Menten merupakan dasar bagi semua aspek kinetika kerja enzim. Jika diketahui K_M dan v_{maks} , maka dapat dihitung kecepatan reaksi suatu enzim pada setiap konsentrasi substrat. Pengukuran kinetika enzim ini didasarkan atas reaksi hidrolisis pati oleh amiloglukosidase yang ditandai oleh perubahan warna biru menjadi tidak berwarna. Waktu yang diperlukan untuk perubahan warna tersebut digunakan sebagai indikator kecepatan reaksi enzimatik. Hasil pengukuran waktu hidrolisis pati oleh amiloglukosidase disajikan pada tabel berikut.

Tabel 3. Waktu hidrolisis pati oleh amiloglukosidase

Pati (%)	Waktu Hidrolisis (detik)
1,00	10973
1,25	9124
1,50	8347
1,75	6868
2,00	6570



Gambar 7. Profil kinetika amiloglukosidase

Data pada Tabel 3 di atas menunjukkan bahwa kecepatan hidrolisis enzim bergantung pada konsentrasi substrat uji. Semakin besar konsentrasi substrat pati, maka waktu hidrolisis yang dibutuhkan semakin singkat. Data waktu hidrolisis tersebut digunakan untuk menentukan nilai K_M dan v_{maks} dari amiloglukosidase. Gambar 7 di atas merupakan bentuk transformasi persamaan Michaelis-Menten yang digambarkan dalam bentuk

persamaan garis Lineweaver-Burk. Persamaan ini digunakan untuk menentukan nilai K_M dan v_{maks} berdasarkan persamaan garis lurus $\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{maks}} + \frac{K_M}{v_{maks}} \frac{1}{[S]}$ yang dihasilkan dari plot waktu hidrolisis (t , sekon) terhadap konsentrasi substrat uji ($1/[S]$). Nilai *intersept* digunakan untuk menghitung v_{maks} dan nilai *slope* digunakan untuk menghitung K_M .

Berdasarkan Gambar 7 diperoleh persamaan garis $y = 8960,4x + 2035,8$, masing-masing nilai *intersept* dan *slope* ditransformasi hingga diperoleh nilai V_{maks} dan K_M berturut-turut 0,49 mU dan 4,40% (Lampiran 3). Hasil ini sangat berbeda yang dilaporkan oleh Kyriakides *et al* (2001) nilai V_{maks} *A* dan K_M *niger* yang dihasilkan berturut-turut adalah 2,83 mg/mL.menit dan 0,51 gram/mL, ini disebabkan karena pati yang digunakan berbeda serta nilai K_M ini merupakan sifat khas bagi setiap enzim dengan substrat spesifik pada

kondisi pH dan suhu tertentu (Lehninger, 1982). Selain itu, menurut Stryer (1975) nilai K_M suatu enzim juga tergantung pada kekuatan ionik antara partikel substrat dan enzim.

Nilai K_M ini merupakan tetapan disosiasi kompleks enzim-substrat atau dapat pula diartikan sebagai konsentrasi substrat yang dibutuhkan untuk mencapai $\frac{1}{2} v_{maks}$. K_M merupakan salah satu ciri tetap suatu enzim, dimana harga K_M suatu enzim tidak bergantung pada konsentrasi substrat, maupun konsentrasi enzim yang bereaksi, melainkan tetap untuk keadaan reaksi yang tertentu (pH dan suhu tertentu). Jika K_M merupakan ciri tetap suatu enzim, maka kecepatan reaksi maksimum bukanlah merupakan sifat yang tetap dari enzim. Kecepatan reaksi maksimum sangat bergantung pada pH dan suhu tertentu, serta tingkat kemurnian enzim.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan sebagai berikut.

1. Aktivitas optimum amiloglukosidase diperoleh pada konsentrasi pati 2,0% (b/v).
2. Aktivator amiloglukosidase meliputi Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{3+} , dan Co^{2+} , sedangkan inhibitor meliputi Sn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , dan Ni^{2+} .
3. Hasil studi kinetika amiloglukosidase diperoleh nilai K_M dan v_{maks} masing-masing 4,40% dan 0,49 mU.

5. Pustaka

- [1] Adeniran, A.H. and Abiose, S.H., 2009, Amylolytic Potentiality of Fungi Isolated from Some Nigerian Agricultural Wastes, *AJB.*, **8(4)**, 667-672.
- [2] Ahmad, A., 2003, Purification and Characterization of Amyloglucosidase Enzyme from *Endomycopsis fibuligera*, *ISTECS Journal.*, **IV**, 47-55.

- [3] Bhatti, H.N., Zia, A., Nawaz, R., Sheikh, M.A., Rashid, M.H., and Khalid, A.M., 2005, Effect of Copper Ions on Thermal Stability of Glucoamylase from *Fusarium* sp., *Inter. J. of Agriculture & Biol.*, **7(4)**, 585-587.
- [4] Borris, R., 1987, Biological role of enzymes. In: Rehm, H.J. and G. Reed (eds.). *Biotechnology*. Volume VIIa. Berlin: UCH Germany.
- [5] Chen, J., Li, D.C., Zhang, Y.Q., and Zhou, Q.X., 2005, Purification and Characterization of a Thermostable Glucoamylase from *Chaetomium thermophilum*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**, 175-181.
- [6] Ekawaty, 2009, Skripsi: *Isolasi dan Karakterisasi Amiloglukosidase dari Aspergillus niger dengan Media Fermentasi Limbah Ampas Sagu*, FMIPA Universitas Haluoleo, Kendari.
- [7] Fogarty, W.M. and Benson, C.P., 1983, Purification and Properties of a Thermophilic Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 271-278.
- [8] Frazier, W.C. and Westhoff, D.C., 1988, *Food Microbiology*, Mc. Graw Hill Publishing Co. Ltd. New York
- [9] Futatsugi, M.T., Ogawa, dan Fukuda, H., 1993, Purification and Properties From of Glucoamylase from *Saccharomycopsis*. *J. Ferment. Bioen.*, **76 (6)**, 521-523.
- [11] Giraud, E., Gosselin, L., Marin, J.L., Parada, dan Raimbault, M. 1993. 'Purification and Characterization of an Extracellular Amylase From *Lactobacillus plantarum* Strain A6', *Journal of Applied Bacteriology*.

- [12] Goncalves, A.Z.L., Carvalho, A.F.A., da Silva, R., and Gomes, E., 2008, Localization and Partial Characterization of Thermostable Glucoamylase Produced by Newly Isolated *Thermomyces lanuginosus* TO3 in Submerged Fermentation, *Braz. Archives of Biol. & Technol. J.*, **51(4)**, 857-865.
- [13] Haq, I.U., Ashraf, H., Omar, S., and Qadeer, M.A., 2002, Biosynthesis of Amyloglucosidase by *Aspergillus niger* Using Wheat Bran as Substrate, *Pakistan J. Of Biol. Sci.*, **5(9)**, 962-964.
- [15] Hovathova, Viera., Stefan Janecek dan Ernest Sturdik., 2000, *Amylolitic Enymes; Their Specificities, Origins and Properties*, Bratislava, **55/6**: 605-615.
- [16] Kombong, H., 2003, Evaluasi Daya Hidrolitik Enzim Glukoamilase dari Filtrat Kultur *Aspergillus niger*, *Jurnal Ilmu Dasar.*, **5(1)**, 16-20.
- [17] Kyriakides, M.L., Karakatsanis, A., Stamatoudis, M., and Psomas, S., 2001, Synergistic Hydrolysis of Crude Corn Starch by α -Amylases and Glucoamylases of Various Origins, *Cereal Chem.*, **Vol. 78(5)**, 603-608.
- [18] Lehninger, A.L., 1982, *Dasar-Dasar Biokimia*, Erlangga, Jakarta.
- [19] Manera, A.P., Kamimura, E.S., Brites, L.M., and Kalil, S.J., 2008, Adsorption of Amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 Using Ion Exchange Resin, *Braz. Archives of Biol. & Technol. J.*, **51(5)**, 1015-1024.
- [20] Manjunath, P. and Rao, M.R.R., 1981, Studies on Carbohydrat Moities of *Aspergillus niger* Glucoamylase II: Isolation, Purification and

- Characterization of Glycopeptides, *J. Biosci.*, **3(4)**, 333-342.
- [21] Melliawati, R., Rohmatussolihat, dan Octavina, F., 2006, Seleksi Mikroorganisme Potensial untuk Fermentasi Pati Sagu, *BIODIVERSITAS*, **7(2)**, 101-104.
- [22] Melliawati, R dan E. Sukara, 1989, Isolasi dan karakterisasi isolat-isolat mikroba yang mempunyai potensi amilolitik, *Kongres Nasional V Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*, Yogyakarta, 4-5 Desember 1989.
- [23] Melliawati, R., A.M Fuad., J. Rachmat, dan N.R. Prayitno. 1995. 'Penggandaan skala produksi enzim amiloglukosidase oleh *Aspergillus* sp. KT-11 pada media ubi kayu parut segar', *Prosiding Seminar dan Pameran Ilmiah; Peranan MIPA dalam Menunjang Pengembangan Industri dan Pengelolaan Lingkungan*. Bogor, 5-6 Desember 1995.
- [25] Melliawati, R., N. Rosalinda, dan E. Sukara, 1993, Pengaruh magnesium sulfat dan kalium dihidrogen fosfat terhadap produksi enzim amiloglukosidase dari pati singkong oleh *Aspergillus* sp. KT-11, *Kongres Nasional VI Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*, Surabaya, 24 Desember 1993.
- [26] Muchtadi, D., N.S. Palupi, dan Astawan, M., 1992, *Enzim dalam Industri Pangan*. PAU-IPB. Bogor.
- [27] Mulyono HAM, 2005, *Membuat Reagen Kimia di Laboratorium*, Bumi Aksara, Bandung.
- [28] Natalia., 2009, Skripsi: *Isolasi dan Uji Amilolitik Aspergillus niger dari Ampas Sagu*, FMIPA Universitas Haluoleo, Kendari.

- [29] Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid II*. UI Press. Jakarta.
- [30] Shenoy, B.C., Katwa, L.C., Rao, A.G., and Rao, M.R.R., 1985, Fungal Glucoamylases, *J. Biosci.*, **7(3&4)**, 399-419.
- [31] Reyed, R.M. 2007. 'Biosynthesis and Properties of Extracellular Amylase by Encapsulation *Bifidobatrium bifidum* in Batch Culture', *Australian J. of Basic and Appl. Sci*
- [32] Shoemaker, D.P., Garland, C.W., dan Nibler, J.W., 1996, *Experiments in Physical Chemistry. 6 th ed.*, New York.
- [33] Suhartono, M.T., 1989, *Enzim dan Bioteknologi*, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [35] Wirahadikusumah, M., 1989, *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*, ITB, Bandung.