

AKTIVITAS ENZIM HIDROLITIK KAPANG *RHIZOPUS SP* PADA PROSES FERMENTASI TEMPE

Oleh : Mien Karmini; Djoko Sutopo dan Hermanu

ABSTRAK

Fermentasi merupakan tahap terpenting dalam proses pembuatan tempe. Menurut hasil penelitian pada tahap fermentasi terjadi penguraian karbohidrat, lemak, protein dan senyawa-senyawa lain dalam kedelai menjadi molekul-molekul yang lebih kecil sehingga mudah dimanfaatkan tubuh. Pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe terjadi aktivitas enzim amilolitik, lipolitik dan proteolitik, yang diproduksi oleh kapang *Rhizopus Sp.* Pada proses pembuatan tempe, sedikitnya terdapat empat genus *Rhizopus* yang dapat digunakan. *Rhizopus oligosporus* merupakan genus utama, kemudian *Rhizopus oryzae* merupakan genus lainnya yang digunakan pada pembuatan tempe di Indonesia. Produsen tempe di Indonesia tidak menggunakan inokulum berupa biakan murni kapang *Rhizopus Sp.*, namun menggunakan inokulum dalam bentuk bubuk yang disebut laru atau inokulum biakan kapang pada daun waru yang disebut usar. Pada penelitian ini dipelajari aktivitas enzim-enzim α -amilase, lipase dan protease pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe menggunakan biakan murni *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* dan laru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim α -amilase, lipase dan protease dari ketiga inokulum tersebut berbeda secara sangat bermakna. Hasil penelitian menunjukkan pula bahwa aktivitas enzim dipengaruhi oleh jenis inokulum dan waktu fermentasi. Juga terdapat interaksi antara waktu fermentasi dan jenis inokulum terhadap aktivitas enzim-enzim amilolitik, lipolitik dan proteolitik.

Pendahuluan

Fermentasi merupakan tahap terpenting pada proses pembuatan tempe. Selama proses fermentasi terjadi perubahan kimia pada kedelai (1). Perubahan tersebut terjadi karena substrat kedelai (protein, lemak, karbohidrat dan senyawa-senyawa lainnya) didekomposisi menjadi molekul-molekul yang lebih kecil oleh enzim-enzim yang dihasilkan kapang.

Menurut Arbianto dkk (2) pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe, secara keseluruhan terjadi penurunan karbohidrat, yaitu 32.1% pada kedelai menjadi 21.54% pada tempe. Selama fermentasi asam lemak bebas pada kedelai meningkat. Total asam lemak bebas pada kedelai rebus yang hanya 0.26% meningkat menjadi 4.77% setelah 30 jam dan menjadi 8.19% setelah 69 jam fermentasi (3).

Selama fermentasi terjadi peningkatan jumlah nitrogen dan padatan larut-air (4). Peningkatan nitrogen larut-air ini disebabkan oleh adanya aktivitas enzim protease yang menguraikan protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih mudah larut-air. Nitrogen larut air bertambah dari 0.5% menjadi 28% setelah fermentasi kedelai selama 72 jam (1). Peningkatan jumlah padatan dan nitrogen larut-air disebabkan oleh peningkatan jumlah asam amino bebas selama fermentasi kedelai (5).

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut di atas pada fermentasi kedelai menjadi tempe terjadi aktivitas enzim-enzim amilolitik, lipolitik dan proteolitik yang diproduksi oleh kapang *Rhizopus* sp. Kapang *Rhizopus* Sp. merupakan mikroorganisme yang memproduksi enzim α -amilase. Enzim α -amilase dari kapang *rhizopus* Sp masih stabil pada suhu 50-60°C, stabil pada pH 5.4-7.0, tetapi pH optimumnya adalah 3.6 (6). Menurut Aunstrup, 1979. *Rhizopus* Sp merupakan mikro organisme yang mampu memproduksi enzim lipase. Lipase yang diproduksi oleh *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar* dan *Rhizopus japonicus* adalah kelompok lipase spesifik yang memisahkan asam lemak dari trigliserida pada posisi 1 dan 3. *Rhizopus* Sp juga merupakan mikroorganisme yang mampu memproduksi enzim protease *Rhizopus oligosporus* yang ditumbuhkan pada media Potato Dextrose Agar, pada suhu 28°C memproduksi protease yang dapat menghidrolisis kasein dengan aktivitas maksimum pada pH 3.0 dan 5.5, dan suhu 50-55° C dan waktu fermentasi 72-96 jam (7).

Pada proses pembuatan tempe, sedikitnya terdapat empat jenis kapang *Rhizopus* yang dapat digunakan. *Rhizopus oligosporus* merupakan genus utama yang digunakan dalam proses pembuatan tempe di Indonesia, genus yang lainnya adalah *Rhizopus oryzae*. Tempe yang dibuat dengan usar tradisional sering mengandung mikroorganisme lain selain *Rhizopus* Sp. Saono dkk (1976) menemukan 69 jenis kapang, 78 jenis bakteri dan 150 jenis khamir terdapat pada tempe dari berbagai daerah di Jawa Barat.

Pada penelitian ini dipelajari aktivitas enzim-enzim ekstra selular α -amilase, lipase dan protease pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe dengan menggunakan biakan murni kapang *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* dan biakan campuran berupa laru bubuk.

Bahan dan Cara

Biakan murni kapang *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Jurusan teknologi Pangan dan Gizi, FATETA-IPB. Laru yang digunakan sebagai inokulum campuran dibuat di Laboratorium Mikrobiologi Puslitbang Gizi, Bogor. Laru dibuat dengan cara menumbuhkan dan membiakkan spora dari tempe yang dibeli di pasar pada substrat nasi sampai spora menjadi hitam, kemudian dikeringkan, digiling, diuji kemampuannya dalam pembuatan tempe. Kedelai kuning diperoleh dari Pasar Bogor.

Fermentasi kedelai dilakukan selama 72 jam pada suhu 30° C, pengamatan dilakukan setiap 12 jam. Suhu inkubasi ditentukan 30° C karena pada umumnya perajin tempe melakukan fermentasi pada suhu ruang. Tempe yang diamati pada penelitian ini dibuat melalui proses perebusan, perendaman, pengupasan kulit dan pencucian; tempe yang dibuat dengan biakan murni sebelum diinokulasi kedelai disterilkan pada suhu 121° C selama 15 menit, kemudian didinginkan dan diinokulasi dengan suspensi kapang sebanyak 4% (V/W), secara aseptik dikemas pada cawan petri. Tempe yang dibuat dengan laru kedelai tidak melalui proses sterilisasi tetapi setelah dicuci dan dikupas, dikukus selama 30 menit, didinginkan dan diinokulasi dengan laru sebanyak 0.025.

Ekstraksi enzim dilakukan sebagai berikut : setiap petri tempe yang berasal dari 100 gram kedelai rebus, dihancurkan dalam erlenmeyer 250 ml, ditambah 200 ml 0.1%

Tween 80. dikocok selama satu jam, disaring menggunakan glass wool. filtrat disentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 2000 rpm. supernatan dipindahkan pada erlenmeyer 100 ml steril untuk diuji aktivitasnya. Ekstrak enzim yang diuji selalu segar dan diusahakan pada suhu dingin. Kadar protein filtrat enzim ditentukan secara spektrofotometri berdasarkan metode Lowry (8). Konsentrasi protein ekstrak enzim ditentukan pada kurva BSA.

Aktivitas enzim α -amilase ditetapkan menggunakan metode Bernfeld (9) yang menggunakan pati larut air sebagai substrat. Pengujian aktivitas enzim menggunakan prinsip bahwa degradasi pati larut air oleh enzim α -amilase akan menghasilkan peningkatan gula maltosa, yang dapat diukur serapannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540nm, hasil pengukuran diplotkan pada kurva kalibrasi untuk mendapatkan konsentrasi maltosa. Aktivitas α -amilase dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas } \alpha\text{-amilase} = C \times \frac{1}{T} \times \frac{1 \text{ unit}}{1 \text{ mikromol}}$$

C : konsentrasi maltosa per ml ekstrak enzim (mikromol)

T : waktu inkubasi (menit)

1 unit enzim α -amilase : besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 mikromol maltosa per menit per ml ekstrak enzim

Penentuan aktivitas enzim lipase menggunakan metode titrimetri menurut Bier (1955). Cara penetapan ini menggunakan prinsip bahwa asam lemak yang dibebaskan dari ester asam lemak rantai panjang (C_{10} - C_{18}) yang dikatalisis oleh lipase dapat diukur jumlahnya berdasarkan jumlah titrat yang digunakan.

Penentuan aktivitas enzim lipase dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas lipase : ml NaOH} \times \frac{N.\text{NaOH}}{0.02 \text{ N}} \times \frac{100 \text{ unit}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1}{T}$$

T : Waktu inkubasi (menit)

100 unit aktivitas enzim lipase : besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan asam lemak dari ester asam lemak rantai panjang yang setara dengan 1 ml NaOH 0.02N yang dikonsumsi.

Penetapan aktivitas enzim protease menggunakan metode Kunitz, seperti yang dilakukan oleh Wang dan Hesseltine (7). Prinsip penentuan ini adalah, pembebasan asam amino fenilalanin, tirosin dan triptofan dari substrat yang dikatalisis oleh enzim protease, dapat diukur absorbansinya. Sebagai substrat digunakan larutan 1% kasein dalam buffer sitrat-fosfat. Kurva kalibrasi dibuat menggunakan larutan l-tirosin dalam buffer sitrat fosfat. Pengukuran absorbansinya dilakukan pada panjang gelombang 280 nm. Aktivitas enzim protease dihitung dengan rumus :

$$\text{Aktivitas protease : } C \times \frac{1}{T} \times \frac{1 \text{ unit}}{1 \text{ mikromol}}$$

1 unit aktivitas enzim protease = besarnya aktivitas enzim yang dibutuhkan untuk membebaskan 1 mikromol tirosin per menit per ml ekstrak enzim

Hasil dan Bahasan

Suspensi kapang *Rhizopus* Sp sebagai inokulum murni yang dihasilkan pada penelitian, setiap 4 ml mengandung 1×10^6 sampai 1.5×10^6 untuk suspensi *Rhizopus oligosporus*. sedangkan suspensi kapang *Rhizopus oryzae* setiap 4 ml mengandung 2×10^5 sampai 3×10^5 spora. Menurut Wang dan Hesseltine (1982), untuk menghasilkan tempe yang baik diperlukan 1×10^6 spora *Rhizopus oligosporus* per 100 gram kedelai.

Pada penelitian ini penggunaan suspensi spora *Rhizopus oryzae* hanya $2-3 \times 10^5$ per 100 gram kedelai, karena apabila digunakan spora yang lebih banyak tempe yang dihasilkan sudah membusuk pada fermentasi 48 jam.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ketiga jenis tempe yang dihasilkan yaitu tempe dengan inokulum *Rhizopus oligosporus* (T.oli), dengan inokulum *Rhizopus oryzae* (T.ory), dengan inokulum laru (T.lar), telah tertutup secara merata oleh inokulum kapang pada 24 jam fermentasi dan masih tetap baik dengan penampilan yang menarik pada 60 jam fermentasi. Setelah 60 jam fermentasi tempe menunjukkan tanda-tanda kerusakan yaitu mulai rusaknya miselium kapang dan tercium aroma amoniak terutama pada T.ory.

Konsentrasi protein dalam filtrat enzim yang dihasilkan dari setiap jenis tempe terlihat meningkat selama proses fermentasi, makin lama masa fermentasi, makin tinggi konsentrasi protein. Peningkatan konsentrasi protein tersebut menunjukkan adanya peningkatan produksi enzim. Hasil pengukuran konsentrasi protein ekstrak enzim disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi protein ekstrak enzim

Waktu Fermentasi (jam)	Konsentrasi Protein Dalam Ekstrak Enzim Dari Tempe (mg/ml)		
	T. oli	T.ory	T.lar
12	7.95	11.00	12.00
24	14.40	11.45	15.10
36	16.00	14.30	15.85
48	17.00	15.75	16.05
60	18.30	17.45	17.10
72	19.40	18.00	17.30

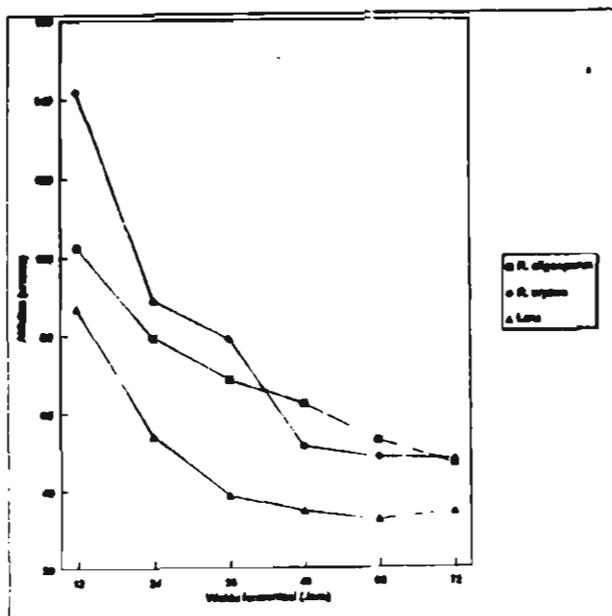
Pada Tabel 1 di atas, dapat dilihat bahwa konsentrasi enzim yang meningkat sejalan dengan waktu fermentasi, jelas pada tempe dengan inokulum *Rhizopus oligosporus*, terutama peningkatan hampir dua kali lipat dari 12 jam ke 24 jam fermentasi, tidak demikian halnya dengan *Rhizopus oryzae*, kenaikan pada priode tersebut sangat kecil. Pengaruh inokulum larutpada kenaikan konsentrasi enzim hampir tidak tergantung pada fermentasi. Hal ini mungkin dikarenakan adanya mikroorganisme

lain yang menghentikan perkembangan kapang *Rhizopus Sp.* keadaan ini yang menyebabkan tempe Malang yang menggunakan inokulum tradisional usar lebih awet.

Hasil pengukuran aktivitas enzim pada setiap masa fermentasi memperlihatkan bahwa aktivitas amilolitik dari enzim α -amilase paling tinggi terjadi pada fermentasi 12 jam, kemudian menurun sesuai dengan kenaikan waktu fermentasi. Rata-rata nilai aktivitas enzim amilase pada setiap tahap fermentasi disajikan pada Tabel 2 dan karakteristik aktivitas enzim amilase dari setiap inokulum disajikan pada gambar 1.

Tabel 2. Aktivitas enzim α -amilase inokulum tempe pada suhu 20°C

Waktu Fermentasi (jam)	Aktivitas Enzim α -amilase Inokulum (unit per ml ekstrak enzim)		
	<i>R. oligosporus</i>	<i>R. oryzae</i>	Laru
12	102.3	141.9	89.9
24	79.3	88.8	54.1
36	68.4	79.0	38.8
48	62.2	51.2	34.7
60	52.8	48.5	32.4
72	46.7	47.9	34.4



Gambar 1. Karakteristik aktivitas enzim amilolitik inokulum tempe

Hasil analisis sidik ragam dwifaktor terhadap nilai aktivitas amilase menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0.01$) baik pada perbedaan waktu fermentasi maupun pada perbedaan jenis inokulum.

Berdasarkan hasil analisis tersebut dapat disimpulkan bahwa waktu fermentasi yang berbeda menghasilkan aktivitas enzim amilase yang berbeda, demikian pula bahwa setiap jenis inokulum mempunyai kemampuan menghasilkan enzim amilase dengan aktivitas yang berbeda. Dapat disimpulkan pula bahwa terdapat interaksi antara waktu fermentasi dan jenis inokulum dalam aktivitas enzim amilase.

Karakteristik aktivitas enzim amilase pada produk tempe dengan berbagai jenis inokulum menunjukkan bahwa pemecahan karbohidrat banyak terjadi pada periode 12-24 jam fermentasi dan berakhir pada masa 48 jam fermentasi. Pada waktu fermentasi mencapai 48 jam lebih aktivitas amilase mendarat pada dua jenis inokulum, kecuali aktivitas *Rhizopus oligosporus* masih menurun sedikit. Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim amilase terdapat dalam jumlah yang cukup besar pada tempe dengan masa fermentasi antara 24-36 jam, seperti pada umumnya pengrajin tempe melakukan fermentasi.

Nilai-nilai aktivitas lipolitik kapang tempe dari ketiga jenis inokulum pada setiap masa fermentasi disajikan pada Tabel 3, dan karakteristik aktivitas enzim lipase dari ketiga jenis inokulum tersebut disajikan pada gambar 2

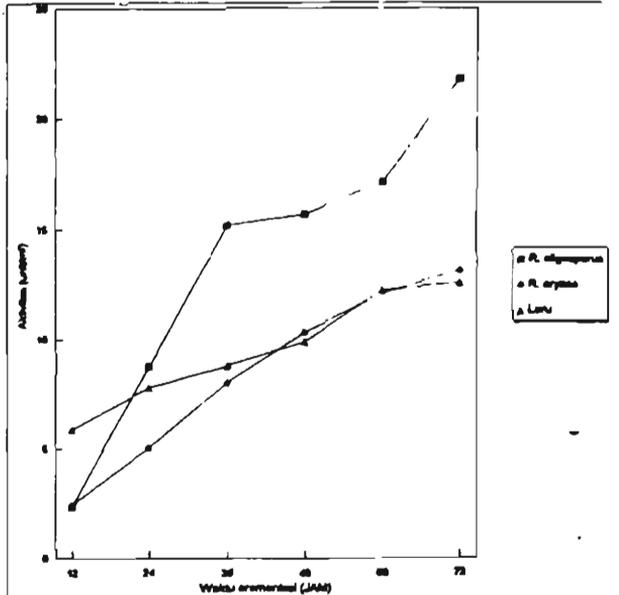
Tabel 3. Aktivitas enzim lipase inokulum tempe pada suhu 20° C

Waktu Fermentasi (jam)	Aktivitas Enzim Lipase Inokulum (unit per ml ekstrak enzim)		
	<i>R. oligosporus</i>	<i>R. oryzae</i>	Laru
12	2.36	2.46	5.88
24	8.74	5.04	7.80
36	15.20	8.06	8.82
48	15.70	10.34	9.90
60	17.14	12.0	12.25
72	21.79	13.14	12.57

Kenaikan aktivitas enzim lipase dari inokulum *Rhizopus oligosporus* lebih tinggi daripada kenaikan aktivitas enzim dari inokulum *Rhizopus oryzae* dan laru, terutama pada masa fermentasi 12-24 jam. Kenaikan aktivitas enzim lipase pada periode fermentasi 12-24 jam 265% pada inokulum *Rhizopus oligosporus*, 100% pada inokulum *Rhizopus oryzae*, dan 32% pada inokulum laru.

Perbedaan kenaikan aktivitas enzim lipase mungkin berhubungan dengan perbedaan kenaikan konsentrasi protein dalam ekstrak enzim dan penurunan aktivitas amilolitik, seperti terlihat dalam Tabel 1 dan Tabel 2. Kenaikan konsentrasi protein dalam ekstrak enzim dari tempe yang difermentasikan dengan *R. oligosporus* pada masa fermentasi 12-

24 jam sebanyak 81%. sedangkan bila digunakan *R.oryzac* dan laru masing-masing hanya 4% dan 25.8%. Penurunan aktivitas amilolitik dari masing-masing ekstrak enzim berturut-turut 25% untuk *Rhizopus oligosporus*, 37% untuk *Rhizopus oryzae* dan 37.7% untuk laru.



Gambar 2. Karakteristik aktivitas enzim lipolitik inokulum tempe

Gambar 2 memperlihatkan karakteristik aktivitas enzim lipase masing-masing inokulum

Karakteristik aktivitas enzim lipase dari inokulum *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae* sama pada periode 12-36 jam, yaitu memperlihatkan kenaikan kurva yang curam, sedangkan aktivitas enzim lipase dari inokulum laru, memperlihatkan karakteristik yang berbeda. Pada kedua inokulum murni, aktivitas lipolitik optimum terjadi saat fermentasi 36 jam sementara pada inokulum laru terjadi saat fermentasi 24 jam.

Pada gambar 2 dapat dilihat bahwa sampai masa fermentasi 36 jam, yaitu masa fermentasi yang dilakukan oleh perajin tempe pada umumnya, aktivitas enzim lipolitik pada inokulum *Rhizopus oryzae* lebih rendah daripada aktivitas enzim lipolitik pada inokulum *Rhizopus oligosporus* atau inokulum laru. Hal tersebut menunjukkan bahwa nilai gizi lemak tempe yang dibuat dengan inokulum *Rhizopus oryzae* lebih rendah daripada nilai gizi lemak tempe yang dibuat dengan *Rhizopus oligosporus* atau laru, karena aktivitas enzim lipolitik berkaitan dengan hidrolisis lemak menjadi asam lemak bebas.

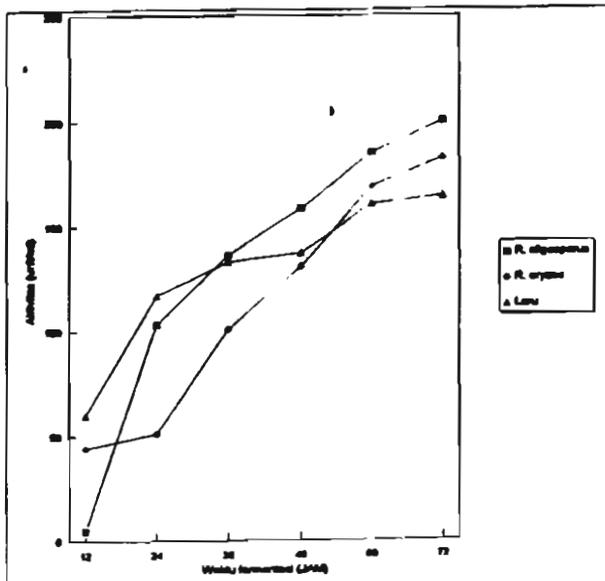
Analisis sidik ragam dwifaktor menunjukkan bahwa perbedaan nilai aktivitas lipase sangat nyata ($p < 0.01$) dipengaruhi oleh jenis inokulum dan waktu fermentasi

Berdasarkan analisis tersebut juga disimpulkan bahwa terdapat interaksi antara waktu fermentasi dan jenis inokulum

Aktivitas proteolitik enzim protease baik dari *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* maupun *Laru*, terlihat mempunyai nilai yang makin besar selama fermentasi. Karakteristik aktivitas proteolitik disajikan pada gambar 3, dan nilai rata-rata aktivitas enzim protease dari ketiga inokulum tersebut dapat dilihat dalam Tabel 4.

Tabel 4. Aktivitas enzim protease inokulum tempe pada setiap masa inkubasi dan suhu 20° C

Waktu Fermentasi (jam)	Aktivitas Enzim Lipase Inokulum (unit per ml ekstrak enzim)		
	<i>R. oligosporus</i>	<i>R. oryzae</i>	<i>Laru</i>
12	4.6	44.0	59.9
24	103.2	51.1	117.1
36	136.2	100.9	132.9
48	158.8	130.7	137.2
60	185.5	169.4	160.9
72	200.1	182.5	164.3



Gambar 3. Karakteristik aktivitas enzim proteolitik inokulum tempe

Karakteristik aktivitas proteolitik dari inokulum *Rhizopus oligosporus* dan inokulum laru sama pada masa fermentasi 12-36 jam yaitu naik cepat pada periode 12-24 jam fermentasi kemudian sedikit berkurang, terlihat pada garis kurva yang tajam, dan keduanya berbeda dari karakteristik inokulum *Rhizopus oryzae*, yang cenderung datar pada masa 12-24 jam fermentasi. Sebaliknya pada masa fermentasi 24 - 72 jam karakteristik enzim protease dari inokulum *Rhizopus oligosporus* sama dengan karakteristik enzim dari inokulum *Rhizopus oryzae* dan keduanya berbeda dengan karakteristik aktivitas enzim protease dari inokulum laru.

Pada saat fermentasi 36 jam aktivitas enzim protease inokulum *Rhizopus oligosporus* sama dengan aktivitas proteolitik inokulum laru, sedangkan aktivitas inokulum *Rhizopus oryzae* lebih rendah dari keduanya. Keadaan ini memberi petunjuk bahwa mutu protein tempe yang dibuat dengan inokulum *Rhizopus oryzae* lebih rendah dari pada mutu protein tempe yang dibuat dengan inokulum *Rhizopus oligosporus* atau inokulum laru. Tempe yang dibuat dengan inokulum laru pada fermentasi 36 jam akan mempunyai mutu protein yang sama dengan mutu protein tempe dengan inokulum *Rhizopus oligosporus*. Inokulum laru adalah inokulum yang pada umumnya digunakan perajin tempe.

Aktivitas enzim protease berkaitan dengan hidrolisis protein menjadi asam amino bebas, namun bila terus berlanjut pada suatu saat substrat protein habis, maka terjadi pembentukan amoniak sehingga terjadi aroma yang sangat tajam. Berdasarkan nilai dalam Tabel 4, ternyata aktivitas enzim protease naik terus sejalan dengan masa fermentasi, hal ini yang menyebabkan jika makin lama tempe dibiarkan aroma amoniak makin tajam. Berdasarkan aktivitas enzim protease, tempe yang dibuat dengan inokulum *Rhizopus oligosporus* akan lebih cepat memberikan aroma amoniak dibandingkan tempe dengan *Rhizopus oryzae* dan tempe dengan inokulum laru.

Simpulan

Hasil analisis sidik ragam dwifaktor memberikan kesimpulan bahwa jenis inokulum dan waktu fermentasi mempengaruhi aktivitas enzim protease secara sangat bermakna ($p < 0.01$). Disimpulkan pula bahwa terdapat interaksi antara waktu fermentasi dengan jenis inokulum dalam produksi enzim protease.

Rujukan

1. Steinkraus, K.H. Handbook of indigenous fermented food. Merceel Dekker, Inc. New York. 1983.
2. Arbiyanto, P.; I., Sastramihardja dan U., Suriawiria. A study towards the rationale of the soy fermentation processes. Di dalam International Symposium on Microbiological Aspects of Food Storage, Processing and Fermentation in Tropical Asia. Food Technology Development Centre, Bogor Agricultural University 1979
3. Wagenknecht, A.C.; L.R., Mattick; L.M., Lewin; D.B., Hand and K.H., Steinkraus. Change in soybean lipids during tempeh fermentation. *J Food Sci* 1961 26:272

4. Steinkraus, K.H.; J.P., Van Buren; L.R., Hackler and D.B., Hand. A pilot plan process for the production of dehydrated tempeh. *Food Technol.*, 1965,19:63
5. Murata, K.; H., Ikehata; and T., Miyamoto. *Studies on the nutritional value of tempeh*. *J. Food Sci.* 1967,32:580.
6. Berk, Z. *Introduction to the biochemistry of foods*. Elsevier Scientific Publishing C. Amsterdam Windish, W.W. and N.S. Mhatre. *Microbiol amylases*. *Appl. Microbial* 1976,7:273.
7. Wang, H.L. and C.W., Hesseltine. *Studies on the extracellular proteolytic enzymes of Rhizopus oligosporus*. *Can.J.Microbiol* 1965,11:727.
8. Lowry, O.H.; N.J., Rosebrough; A.L., Farr and R.J. Randall. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J.Biol.Chem.* 1951,193:265.
9. Bernfeld, P. *Amylases*. Di dalam Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan (eds.) *Method in enzymology*. New York : Academic Press 1955.