

BIOTRANSFORMASI ADIPONITRIL OLEH *Bacillus licheniformis* BA2

Ahmad Thontowi, Eko W. Pamuji, dan Bambang Sunarko
 Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
 Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

ABSTRACT

Adipic acid represents one of the especial materials which used for the synthesis of nylon 6,6,- is a very important material results from polyamide industry. Adiponitrile biotransformation become adipic acid represent an alternative synthesis besides chemically. The purpose of this research was to determine optimum conditions for Bacillus licheniformis BA2 growth for adiponitrile degradation, and also know its pattern. The obtained information, to be expected can be used as reference for scaling up of adipic acid production. B. licheniformis BA2 was able to utilize acetonitrile and adiponitrile as the sole source of carbon and nitrogen. The growth on adiponitrile 120 mM mixture with acetonitrile 30 mM gave higher growth rate and biomass yield than growth on another substrates. B. licheniformis BA2 have lag phase during 68 hours, logarithmic phase passed by during 104 hours, while stasioner phase just reached by after 172 hours. High-performance liquid chromatography of adiponitrile degradation by crude bacterial revealed a decrease in adiponitrile with the sequential formation of adipamide and adipic acid. Ammonia was also detected by colorimetric procedures. As for adipic acid rendemen at 420 minutes equal to 19.35%.

Key words: biotransformation, adiponitrile, adipic acid, *Bacillus licheniformis* BA2

PENGANTAR

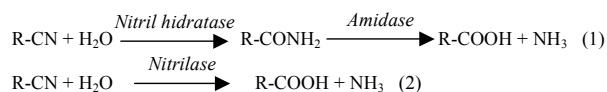
Asam adipat merupakan salah satu bahan utama yang digunakan untuk mensintesis nilon 6,6, suatu bahan yang sangat penting hasil dari industri poliamida. Nilon 6,6 banyak digunakan sebagai bahan kain, film, resin, dan monofilamen. Selain itu, heksametilendiamin yang digunakan sebagai bahan untuk mensintesis nilon 6,6 juga dapat disintesis dari asam adipat (Moreau *et al.*, 1993). Bersama dengan heksametilendiamin, asam adipat dapat membentuk nilon 6,6 dengan suatu reaksi polimerisasi kondensasi.

Sintesis asam adipat secara kimia dapat dilakukan dengan mengoksidasi sikloheksanol dengan rendemen 55% (Vogel, 1978). Sintesis suatu senyawa melalui reaksi kimiawi umumnya mempunyai beberapa kelemahan, antara lain kondisi optimum yang sulit dicapai, banyak tahapan reaksi, tingkat kemurnian produk rendah, dan banyak menimbulkan masalah lingkungan. Sintesis asam adipat sendiri memerlukan konsentrasi asam dan energi yang tinggi (Moreau *et al.*, 1993). Proses biotransformasi adiponitril menjadi asam adipat merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi hal tersebut.

Secara prinsip asam adipat dapat dihasilkan dari biotransformasi adiponitril dengan menggunakan mikroba. Hipotesis ini dilandasi oleh hasil riset tentang metabolisme berbagai senyawa nitril oleh berbagai mikroba. Misalnya produksi akrilamida dan asam akrilat dari akrilonitril oleh *Rhodococcus rhodochrous* JI dan *Corynebacterium* (Nagasawa *et al.*, 1993), nikotinamida dari 3-sianopiridin

oleh *Rhodococcus rhodochrous* JI dan *Corynebacterium* D5 (Nagasawa *et al.*, 1993), asam adipat dari adiponitril oleh *Rhodococcus rhodochrous* N.C.I.B. 11216, *Brevibacterium* sp., dan *Pseudomonas* sp. (S1) (Bengis-Garber & Gutman, 1989; Moreau *et al.*, 1993; Dhillon & Shivaraman, 1999), asam O-acetilmandelic dari O-acetylmandelonitrile oleh *Rhodococcus rhodochrous* (Layh *et al.*, 1992; Yokohama *et al.*, 1996), asam mononitrile-monocarboxylic dari dinitril oleh *Corynebacterium* sp. (Yamamoto *et al.*, 1992; Sunarko, 1998), dan asam benzoate dari benzonitril (Nawaz *et al.*, 1992).

Metabolisme senyawa nitril secara mikrobiologis diketahui melalui dua alur reaksi. Alur pertama melibatkan enzim nitril hidratase yang menghidrolisis nitril menjadi amida, dan selanjutnya enzim amidase menghidrolisis amida menjadi asam karboksilat dan amonium (1). Alur kedua melibatkan enzim nitrilase yang menghidrolisis nitril menjadi asam karboksilat dan amonium (2)



Agar biotransformasi tersebut berlangsung secara efektif, diperlukan mikroba pendegradasi adiponitril yang mempunyai aktivitas dan spesifitas yang tinggi. Selain itu, diperlukan pula informasi tentang kondisi optimum untuk pertumbuhan mikroba serta pola biotransformasinya. Riset ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 dalam mendegradasi adiponitril, serta ingin mengetahui pola biotransformasinya.

Hasil yang diperoleh diharapkan dapat digunakan sebagai dasar produksi asam adipat dalam skala besar.

BAHAN DAN CARA KERJA

Mikroba dan Media Pertumbuhan

Mikroba yang digunakan ialah *B. licheniformis* BA2. Mikroba tersebut adalah koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. Komposisi medium mineral yang digunakan untuk menumbuhkan *B. licheniformis* BA2 ialah sebagai berikut: Na₂HPO₄·2H₂O (0,4475 g), KH₂PO₄ (0,1 g), MgSO₄·7H₂O (0,1 g), CaCl₂·2H₂O (0,01 g), FeSO₄·7H₂O (0,001 g), ekstrak khamir (0,01 g), yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades (Meyer & Schlegel, 1983), dan ditambah dengan 1 ml elemen mikro dengan komposisi sebagai berikut: ZnSO₄·7H₂O (0,1 g), MnCl₂·4H₂O (0,03 g), H₃BO₃ (0,3 g), CoCl₂·6H₂O (0,2 g), CuSO₄·5H₂O (0,015 g), NiCl₂·6H₂O (0,02 g), Na₂MO₄·2H₂O (0,9 g), Na₂SeO₃ (0,02 g) dalam akuades 1000 ml (Pfennig, 1974). Sebagai sumber energi, karbon dan nitrogen digunakan beberapa senyawa nitril.

Pengujian Kemampuan Tumbuh *B. licheniformis* BA2 dalam Berbagai Senyawa Nitril

Pengujian kemampuan tumbuh *B. licheniformis* BA2 dilakukan dengan cara menumbuhkannya dalam media mineral. Sebagai sumber karbon, nitrogen, dan energi digunakan beberapa senyawa nitril yaitu: asetonitril (Merck), benzonitril (Junsei Chemical), adiponitril (Aldrich), campuran asetonitril dan adiponitril, campuran asetonitril dan benzonitril, serta campuran benzonitril dan adiponitril. Konsentrasi masing-masing senyawa ialah 100 mM. Pertumbuhan dilakukan dengan memindahkan 5% (v/v) inokulum *B. licheniformis* BA2 dari media mineral yang mengandung asetonitril 100 mM ke dalam media pertumbuhan (media mineral dan senyawa nitril yang telah disebutkan di atas). Inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu kamar 28° C. Pertumbuhan mikroba diamati dengan menggunakan metode kerapatan optis (*Optical Density*) pada panjang gelombang 436 nm.

Penentuan Konsentrasi Optimum Senyawa Nitril untuk Pertumbuhan

Mikroba diuji pertumbuhannya dalam media mineral yang mengandung campuran adiponitril dan asetonitril yang memberikan pertumbuhan terbaik bagi *B. licheniformis* BA2. Perbandingan konsentrasi adiponitril dan asetonitril yang digunakan ialah 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, dan 0:100 mM. Inokulum diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang 28° C.

Pertumbuhan mikroba diamati dengan menggunakan metode kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm. Selanjutnya mikroba ditumbuhkan dalam media mineral yang mengandung adiponitril dan asetonitril dengan perbandingan 4:1 (hasil uji pertumbuhan mikroba dalam berbagai perbandingan kedua senyawa nitril tersebut) pada berbagai konsentrasi (20:5, 40:10, 60:15, 80:20, 100:25, 120:30, 140:35, 160:40, 180:45, 200:50, 220:55, dan 240:60 mM). Inokulum diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang 28° C. Pertumbuhan mikroba diamati dengan menggunakan metode kerapatan optis pada panjang gelombang 436 nm.

Pola Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2

Pertumbuhan dilakukan dengan menginokulasikan 5% (v/v) inokulum *B. licheniformis* BA2 yang telah ditumbuhkan dalam media mineral yang mengandung adiponitril dan asetonitril (120:30 mM) ke dalam fermentor *air lift* BIostat®B dengan volume kerja 2000 ml. Media pertumbuhannya ialah media mineral yang mengandung adiponitril dan asetonitril (120:30 mM). Mikroba diinkubasi pada kondisi aerasi 1 vvm dan suhu ruang 28° C. Pengamatan terhadap pertumbuhan sel, pH, dan konsentrasi amonium dilakukan setiap 4 jam. Pertumbuhan sel diamati secara kolorimetris, sedangkan penentuan konsentrasi amonium dilakukan dengan metode Nessler (Stringfellow *et al.*, 2003).

Penentuan Berat Sel Kering Mikroba

Sebanyak 5 ml kultur *B. licheniformis* BA2 pada OD₄₃₆ = 0,1–1,0 diambil sebagai contoh untuk penentuan berat sel kering. Setelah disaring dengan menggunakan filter millipore (Ø=0,45 mm), biomasa yang diperoleh dikeringkan dalam inkubator pada suhu 60° C (Precisa 310 M) hingga beratnya stabil. Berat sel kering ditentukan dengan membuat kurva kalibrasi, hingga diketahui 0,34 mg berat sel kering/ml setara dengan OD₄₃₆ = 1,0.

Pola Degradasi Adiponitril oleh Sel *B. licheniformis* BA2

Penentuan pola degradasi adiponitril oleh sel *B. licheniformis* BA2 dilakukan dengan cara menambahkan 2 g sel basah ke dalam 200 ml 0,1M larutan bufer fosfat pH 7,2 yang mengandung adiponitril 50 mM. Inkubasi dilakukan dalam erlenmeyer 250 ml selama 7 jam yang terus diaduk dengan bantuan pengaduk magnet. Analisis konsentrasi adiponitril dan asam adipat dilakukan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), sedangkan penentuan konsentrasi amonium dilakukan dengan metode Nessler.

Penentuan Konsentrasi Amonium

Konsentrasi amonium ditentukan dengan menggunakan metode Nessler. Supernatan sampel (0,1 ml) ditambahkan ke dalam 9,9 ml 0,1 N NaOH. Kemudian ke dalam larutan tersebut ditambahkan 0,2 ml pereaksi Nessler yang dihomogenkan dan diinkubasi selama 20 menit. Selanjutnya campuran diukur pada panjang gelombang 400 nm. Konsentrasi amonium dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar.

Penentuan Konsentrasi Senyawa Nitril dan Produk-produk Degradasinya

Konsentrasi senyawa nitril, amida, dan asam adipat ditentukan dengan menggunakan KCKT model 150 *pump*, injektor U6K, detektor ultraviolet model 450, integrator model 740, dengan kolom fase terbalik model LiCrosorb C₁₈ (125 × 4 mm; ukuran patikel 5 mm). Kondisi yang digunakan untuk analisis ialah fase mobil H₃PO₄ yang mengandung 1,1% metanol (pH 2.0); laju eluen 1 ml menit⁻¹; pada panjang gelombang 200 nm. Volume sampel yang disuntikkan sebesar 5 ml dengan volume *loop* sebesar 2 ml (Moreau *et al.*, 1991). Konsentrasi nitril, amida, dan asam adipat dihitung berdasarkan larutan standar. Persen rendemen asam adipat sebagai hasil konversi adiponitril dihitung berdasarkan perbandingan konsentrasi adiponitril di awal dengan konsentrasi asam adipat di akhir proses.

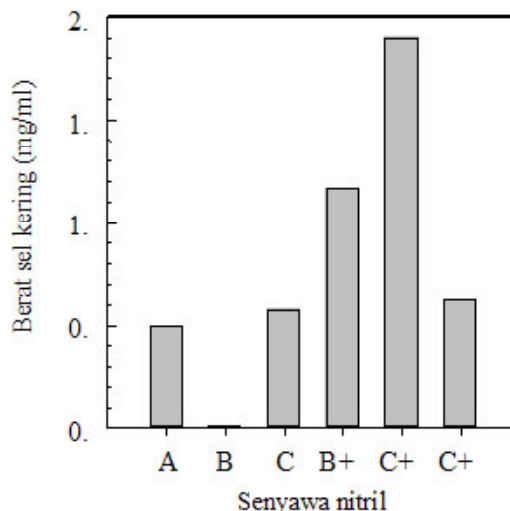
HASIL

Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 dalam Berbagai Senyawa Nitril

Hasil uji kemampuan tumbuh *B. licheniformis* BA2 dalam beberapa senyawa nitril menunjukkan bahwa hanya pada benzonitril 100 mM isolat ini tidak tumbuh, sedangkan pada senyawa lainnya tumbuh (Gambar 1). Pertumbuhan tertinggi ialah pada media mineral yang mengandung campuran adiponitril 100 mM dan asetonitril 100 mM.

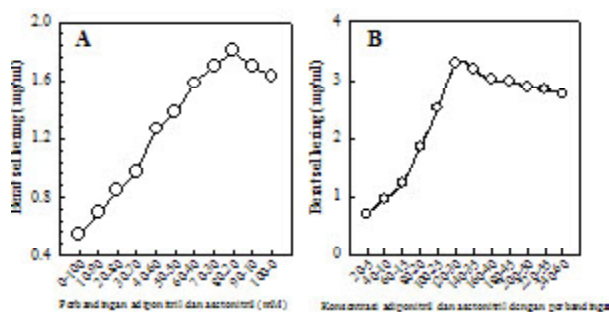
Penentuan Konsentrasi Optimum Senyawa Adiponitril dan Asetonitril untuk Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2

Hasil pengujian pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 pada berbagai perbandingan konsentrasi adiponitril dan asetonitril menunjukkan bahwa konsentrasi optimum masing-masing senyawa ialah 80:20 mM atau 4:1 (Gambar 2A).



Gambar 1. Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 pada (A) asetonitril 100 mM, (B) benzonitril 100 mM, (C) adiponitril 100 mM, (B + A) benzonitril + asetonitril (100:100 mM), (C + A) adiponitril + asetonitril (100:100 mM), dan (C + B) adiponitril + benzonitril (100:100 mM). Inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu kamar 28° C.

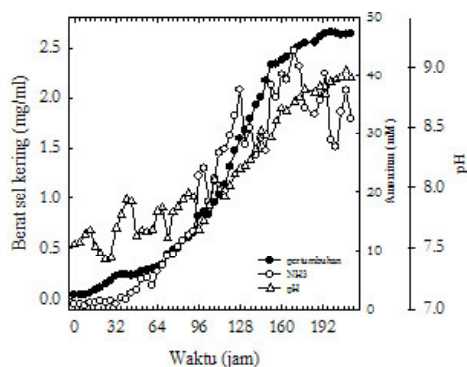
Konsentrasi optimum senyawa nitril ditentukan dengan menumbuhkan *B. licheniformis* BA2 dalam media mineral yang mengandung campuran adiponitril dan asetonitril pada berbagai konsentrasi dengan perbandingan 4:1. Gambar 2B menunjukkan *B. licheniformis* BA2 mampu tumbuh baik hingga konsentrasi campuran adiponitril dengan asetonitril sebesar 140:35 mM. Pertumbuhan akan turun drastis ketika konsentrasi campuran adiponitril dengan asetonitril melebihi 140:35 mM. Pertumbuhan optimum bakteri ini dicapai pada konsentrasi campuran adiponitril dengan asetonitril sebesar 120:30 mM.



Gambar 2. Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 setelah 7 hari inkubasi pada suhu kamar 28° C. (A) pertumbuhan dalam media mineral yang mengandung campuran adiponitril+asetonitril dengan berbagai perbandingan Konsentrasi, (B) pertumbuhan dalam berbagai konsentrasi dengan perbandingan adiponitril+asetonitril (4:1)

Pola Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2

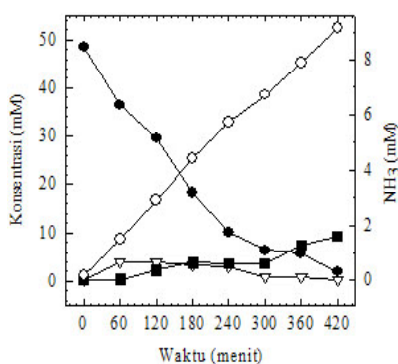
Kurva pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 pada campuran adiponitril dan asetonitril 120:30 mM yang diinkubasi pada suhu ruang 28° C ditunjukkan pada Gambar 3. *B. licheniformis* BA2 mempunyai fase lag selama 68 jam, pada fase ini mikroba mengalami proses adaptasi dengan lingkungannya. Fase logaritmik dilalui selama 104 jam, sedangkan fase stasioner baru tercapai setelah 172 jam.



Gambar 3. Pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 pada campuran adiponitril 120 mM dan asetonitril 30 mM.

Pola degradasi adiponitril oleh sel *B. licheniformis* BA2

Hasil degradasi adiponitril disajikan pada Gambar 4 yang memperlihatkan penurunan konsentrasi adiponitril dan terbentuknya beberapa senyawa hasil konversi adiponitril yang berhasil teridentifikasi. Dengan bertambahnya waktu, jumlah adiponitril dalam larutan mengalami penurunan dari 48,42 mM pada awal inkubasi hingga mencapai 1,88 mM pada akhir inkubasi menit ke-420. Penurunan tersebut disertai dengan terbentuknya adipamida dan asam adipat. Jumlah asam adipat yang dihasilkan pada menit ke-420 sebesar 9,3714 mM. Dengan demikian rendemen dari biokonversi adiponitril menjadi asam adipat pada menit ke- 420 sebesar 19,35%.



Gambar 4. Pola biotransformasi adiponitril oleh sel *B. licheniformis* BA2 dan pembentukan produk degradasinya. (●) adiponitril, (□) adipamida, (■) asam adipat, dan (○) amonium

PEMBAHASAN

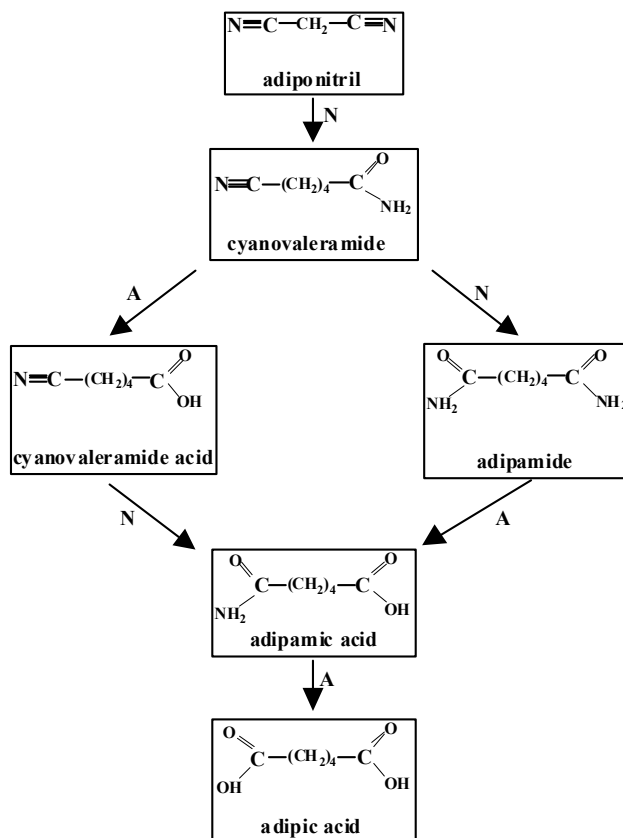
Campuran adiponitril dan asetonitril merupakan campuran senyawa nitril yang paling sesuai digunakan untuk pertumbuhan oleh bakteri *B. licheniformis* BA2. Hal ini ditunjukkan dengan lebih tingginya nilai OD pada campuran senyawa nitril tersebut jika dibandingkan dengan adiponitril murni maupun campuran adiponitril dan benzonitril.

Bila dibandingkan dengan percobaan Dhillon *et al.* (1999) terhadap bakteri *Pseudomonas* sp. (SI) yang ditumbuhkan dalam campuran asetonitril dan adiponitril, maka kemampuan tumbuh *B. licheniformis* BA2 lebih rendah. Hal ini ditunjukkan dengan waktu adaptasi yang lebih lama yaitu sekitar 68 jam, sedangkan bakteri *Pseudomonas* sp. (SI) tidak mempunyai waktu adaptasi. Akan tetapi konsentrasi adiponitril yang digunakan hanya sebesar 9,25 mM, sedangkan dalam penelitian ini sebesar 120 mM. Diduga dengan konsentrasi adiponitril yang relatif lebih tinggi tersebut, dibutuhkan waktu adaptasi yang lebih lama. Walaupun mempunyai waktu adaptasi yang cukup lama, bakteri ini tetap mampu memanfaatkan campuran adiponitril dan asetonitril sebagai satu-satunya sumber karbon, nitrogen, dan energi untuk pertumbuhannya.

Adanya ion amonium yang dihasilkan menjadi indikasi bahwa senyawa nitril tersebut telah mengalami degradasi menjadi senyawa amida, ataupun asam karboksilat (Digeronimo & Antonie, 1976). Jumlah amonium yang dihasilkan selama pertumbuhan *B. licheniformis* BA2 mengalami fluktuasi (Gambar 3). Hal ini mungkin disebabkan ion amonium yang dihasilkan digunakan kembali oleh bakteri sebagai sumber nitrogen untuk proses pertumbuhannya. Tetapi secara umum, jumlah amonium yang dihasilkan mempunyai kecenderungan untuk naik.

Nilai pH yang cenderung meningkat selama pertumbuhan yaitu dari 7,5 pada awal pertumbuhan hingga mencapai 8,9 pada akhir pertumbuhan disebabkan karena adanya ion amonium sebagai produk dari degradasi senyawa nitril. Hal ini dapat ditunjukkan dengan adanya korelasi yang positif antara amonium yang dilepaskan dengan nilai pH. Fenomena yang sama juga terjadi pada *Corynebacterium* D5 yang ditumbuhkan dalam akrilonitril maupun dalam 3-sianopiridin (Purnomo, 1999; Hanafia, 2000).

Jumlah amonium yang dihasilkan pada jam ke-7 masih mengalami kenaikan. Hal ini menunjukkan bahwa proses degradasi adiponitril masih berlangsung, sedangkan jumlah adipamida yang dihasilkan ternyata berfluktuasi. Hal ini dapat dipahami karena adipamida merupakan senyawa produk antara. Ketika adipamida terbentuk, maka senyawa tersebut akan dikonversi oleh enzim amidase membentuk asam adipat dengan melepaskan amonium. Adanya ketidaksetaraan antara jumlah adiponitril yang terdegradasi



Gambar 5. Alur degradasi adiponitril oleh enzim nitril hidratase (N) dan amidase (A). (Moreau *et al.*, 1993)

dengan jumlah adipamida yang terbentuk disebabkan adiponitril dapat terdegradasi membentuk senyawa antara yang lainnya. Hal ini dapat dilihat dari adanya puncak-puncak kromatogram yang tak teridentifikasi dari hasil analisis KCKT (data tidak ditampilkan). Gambar 5 memperlihatkan beberapa kemungkinan degradasi adiponitril menjadi asam adipat oleh aktivitas enzim nitril hidratase dan amidase. Alur degradasi oleh *B. licheniformis* BA2 diduga mengikuti alur biotransformasi dinitril alifatik seperti yang dikemukakan oleh Bengis-Garber & Gutman (1989).

KEPUSTAKAAN

- Bengis-Garber C and Gutman AL, 1989. Selective hydrolysis of dinitriles into cyano-carboxylic acids by *Rhodococcus rhodochrous* N.C.I.B. 11216. *Appl. Microbiol Biotechnol* 32: 11–16.
- Dhillon J, Chhatre S, Shanker R, and Shivaraman N, 1999. Transformation of aliphatic and aromatic nitriles by a nitrilase from *Pseudomonas* sp. *Can. J. Microbiol* 45: 811–5.
- Dhillon JK and Shivaraman N, 1999. Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). *Can. J. Microbiol* 45: 201–8.
- DiGeronimo MJ and Antonie AD, 1976. Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *Appl. Env. Microbiol* 31: 900–6.
- Hanafia F, 2000. Biokonversi 3-sianopiridin oleh enzim nitril hidratase dan amidase dari *Corynebacterium* D5. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Layh N, Stolz A, Forster S, Effenberger F, and Knackmuss H, 1992. Enantioselective hydrolysis of O-acetyl-mandelonitrile to O-acetylmandelic acid by bacterial nitrilases. *Arch. Microbiol* 158: 405–11.
- Meyer O and Schlegel HG, 1983. Biology of aerobic carbon monoxide oxidizing bacteria. *Ann. Rev. Microbiol* 37: 227–310.
- Moreau JL, Azza S, Arnauld A, and Glazy P, 1993. Purification and characterization of an adipamidase from a mutant strain of *Brevibacterium* sp. involved in dinitrile degradation. *Biosci. Biotech. Biochem* 57: 294–296.
- Moreau JL, Azza S, and Galzy, P., 1991. Application of high-performance liquid chromatography to study of the biological transformation of adiponitrile by nitrile hydratase and amidase. *Analyst (London)* 116: 1381–83.

- Nagasawa T, Shimizu H, and Yamada H, 1993. The superiority of the third generation catalyst, *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrile hydratase, for industrial production of acrilamide. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 189–95.
- Nawaz M, TM Heinze and CE Cerniglia., 1992. Metabolism of benzonitrile and butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Env. Microbiol* 58: 27–31.
- Pfennig N, 1974. *Rhodopseudomonas globiformis* sp., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch. Microbiol* 100: 197–206.
- Purnomo D, 1999. Biokonversi akrilonitril menjadi akrilamida dan asam akrilat oleh sel *Corynebacterium* D5. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sunarko B, 1998. Degradasi asetonitril dengan sel imobil *Corynebacterium* UBT 9. *J.Biol Indonesia* 2: 73–82.
- Vogel, 1978. Text Book of Practical Organic Chemistry Including Quantitative Organic Analysis. Longman Group, London.
- Stringfellow WT, Komada T, and Li-Yang Chang, 2003. Feasibility of Using Biological Degradation For The On-Site Treatment Of Mixed Wastes in: V.S. Magar, and M.E. Kelley (Eds.) *In Situ and On-Site Bioremediation*. Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, Orlando, FL, June 2003. 7477-139-6.
- Yamamoto K, Ueno Y, Otsubo K, Yamane H, Komatsu KI, and Tani Y, 1992. Efficient conversion of dinitrile to mononitrile-monocarboxylic acid by *Corynebacterium* sp. C5 cells during tranexamic acid synthesis. *J of Fer & Bioeng* 73(2): 125–9.
- Yokohama M, Nakatsuka Y, Sugai T, and Ohta H, 1996. Action of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564 on derivatives of 2,5-anhydro-d-allononitrile. *Bioschi.Biotech.Biochem* 60(9): 1540–2.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**