

OPTIMASI ANALISIS AMILASE DAN GLUKANASE YANG DIEKSTRAK DARI MISELIUM *Pleurotus ostreatus* DENGAN ASAM 3,5 DINITROSALISILAT

Maman Rahmansyah dan I Made Sudiana

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor 16122
Tel. +62-251-324006. Fax +62-251-325854, E-mail: sudianai@yahoo.com

ABSTRACT

*Enzymatic activities of amylase (1.4- α -D-glucan glucano hydrolase) and glucanase (1.4- β -glucanase) that extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelium determined through the reducing sugar accumulation. The enzymes assayed in amorphous cellulose (carboxymethyl-cellulose = CMC) and starch substrate, respectively. Complexity reaction of the sugar to DNS (3.5-dinitrosalicylic acid) become sensitive caused of adding up oxidative agent of sodium sulfite and phenol. Variation in substrate concentration, combine with incubation period and its temperature was able to promote optimum activities of amylase enzymes. The best possible activity of amylase was turn out on 25° C temperature incubation along 20 minutes in 5% starch substrate assessment. Incubation period more then 60 minutes on amylase and cellulase caused those activities leaved to 40 and 70% down, correspondingly. Modified DNS fastened on reducing sugar twice effectively compared to unmodified one.*

Keywords: enzymatic activities, amylase, glucanase, *Pleurotus ostreatus*

PENGANTAR

Miselium jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) di alam dapat tumbuh dan berkembang secara saprofit pada substrat yang mengandung selulosa. Miselium tersebut dapat terinduksi menghasilkan enzim yang akan menghidrolisis substrat selulosa menjadi senyawa berbobot molekul lebih rendah yang digunakan untuk keperluan metabolismenya. Struktur dasar molekul selulosa adalah suatu polimer yang tersusun dari 8 sampai 12 ribu unit glukosa yang masing-masing diikat oleh β -1,4-glikosidik (Enari, 1983). Ikatan glikosidik tersebut pada serat selulosa dapat dipecah menjadi monomer glukosa. Proses pengubahannya dilakukan dengan cara hidrolisis asam atau secara biologis melalui aktivitas enzim selulase (Hardjo *et al.*, 1989). Enzim selulase dikelompokkan berdasarkan spesifisitas aktivitasnya terhadap substrat yaitu endoglukanase, selobiohidrolase, dan eksoglukohidrolase. Ketiga enzim tersebut bekerja sama dalam mengurai selulosa.

Bagian amorf selulosa dapat dihidrolisis dengan cepat, dan kecepatan hidrolisis ini akan menurun karena semakin banyaknya daerah kristal pengikat selulosa. Enzim endoglukanase (CMC-ase) bekerja pada bagian amorf selulosa yang sangat mudah mengalami hidrolisis (Fiechter, 1987). Kecepatan hidrolisis senyawa kompleks seperti selulosa oleh selulase, ditekankan kepada aktivitas glukukanase atau endoglukanase yang merupakan salah satu komponen utama dari enzim selulase dan mampu menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik secara acak (Enari, 1983). Enzim glukukanase tidak memutus ikatan selobiosa,

tetapi menghidrolisis selodekstrin. Glukanase juga menghidrolisis selulosa yang sebelumnya telah dihidrolisis ikatannya oleh asam fosfat menjadi ikatan selulosa yang mudah tersubstitusi, contohnya adalah *carboxymethyl-cellulose* (CMC) dan *hydroxyethyl-cellulose* (HEC).

Selain selulase, enzim amilase cukup berperan dalam proses awal metabolisme jamur tiram. Enzim amilase dapat menghidrolisis pati pada ikatan 1,4-glikosidik menjadi monosakarida dan disakarida (Fogarty, 1983). Monosakarida kemudian berlaku sebagai sumber karbon bagi metabolisme jamur tiram pada awal pertumbuhannya. Fenomena itu terbukti pada pertumbuhan dan kenaikan nilai efisiensi biologi jamur tiram yang dikultur pada media campuran ampas aren dengan serbuk kayu (Sudiana dan Rahmansyah, 2002). Substitusi ampas aren pada media serbuk kayu ternyata mampu menginduksi amilase pada awal pertumbuhan, sekalipun pada akhirnya enzim selulase yang lebih berperan.

Pengukuran aktivitas amilase dan glukukanase dilakukan berdasar kepada kemampuan enzim tersebut dalam mengurai substrat (polisakarida) menjadi monosakarida dalam bentuk gula pereduksi, pada satuan waktu tertentu. Akurasi pengukuran dapat dicapai bila proses deteksi gula pereduksi berlangsung optimum. Oleh karena itu dalam menentukan aktivitas amilase dan glukukanase diperlukan reagen yang bisa menjaga kestabilan produk hidrolisisnya. Sedangkan aktivitas enzim dipengaruhi oleh faktor lingkungannya seperti tingkat keasaman, konsentrasi substrat, suhu dan oksigen terlarut (Mukataka *et al.*, 1988).

Untuk mempertegas peran reagen yang menjaga kestabilan hasil hidrolisis enzim, maka dalam pengamatan pengukuran aktivitas amilase dan glukukanase pada penelitian ini dilakukan modifikasi terhadap reagen DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat) yang digunakan untuk pereaksi terhadap jumlah gula pereduksi hasil hidrolisis. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan akurasi metode DNS melalui penyesuaian komponen reagen penyertanya, maupun pengoptimalan hasil aktivitas enzim melalui modifikasi faktor lingkungan sehingga diperoleh suatu cara pengukuran aktivitas enzim yang akurat.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penggunaan DNS untuk Mengukur Gula Reduksi

Reagen DNS yang digunakan dalam mengukur gula pereduksi terdiri dari asam dinitrosalisilat, garam Rochelle dan natrium hidroksida. Miller (1959) telah memodifikasi reagen dengan menambahkan komponen fenol dan natrium sulfat. Untuk melihat akurasi pengukuran aktivitas enzim maka kedua macam DNS tersebut digunakan dalam pengamatan awal. Reagen DNS yang hasilnya optimum digunakan dalam pengamatan selanjutnya.

Reagen DNS

Sebanyak 1 gram DNS dilarutkan dengan 50 ml akuades dalam labu takar 100-ml, ditambahkan 12,5 ml NaOH_2N , 30 g garam Rochelle ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dan ditera sampai tanda 100 ml dengan akuades.

Reagen DNS Modifikasi

Sebanyak 1 gram DNS dilarutkan dengan 50 ml akuades dalam labu takar 100 ml, ditambahkan 12,5 ml NaOH_2N , 10 ml NaSO_3 0,5%, 10 ml fenol 2% dan ditera. Sebanyak 1 ml garam Rochelle 4% ditambahkan setelah terbentuknya kompleks warna antara DNS dan gula pereduksi hasil hidrolisis.

Penentuan Kurva Standar

Larutan glukosa dibuat dengan konsentrasi 100, 200 sampai 1000 mg/l. Larutan standar diberi perlakuan pewarnaan dengan masing-masing kedua macam DNS seperti tersebut di atas, lalu diukur intensitasnya dengan spektrofotometer (Thermo Spectronic GENESYS 20) 540 nm.

Perbanyakkan Miselium Jamur dan Ekstraksi Enzim

Biakan miselium yang tumbuh pada permukaan agar padat (10 ml) miring di dalam tabung 50-ml, dilarutkan

dengan 30 ml akuades steril, kemudian sebanyak 5 ml dari suspensi biakan tersebut diinokulasikan pada media tumbuh steril berupa campuran serbuk kayu (400 g) dan ampas aren (400 g) yang diperkaya dengan 10% dedak, 1,5% kapur, 1% gipsum, dan 1% vitamin B-kompleks. Media kemudian diinkubasi pada suhu kamar sampai seluruh permukaan media ditumbuhi miselium (3 minggu). Untuk mendapatkan ekstrak enzim, sebanyak 20 gram miselium jamur tiram digerus, dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat (pH 5.5) dan disentrifusa (SORVALL RC-5C plus), $9800 \times g$, suhu 2°C , selama 20 menit. Supernatan kemudian digunakan sebagai ekstrak enzim, dan dapat disimpan pada suhu dingin sampai siap digunakan.

Pengukuran Aktivitas Enzim

Substrat yang digunakan untuk mengukur aktivitas selulase ialah CMC 2%, dan substrat pati 5% untuk amilase (Khsatriya *et al.*, 1991). Sebanyak 2 ml ekstrak enzim direaksikan dengan masing-masing substratnya (1 ml) di dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 120 menit untuk pengamatan aktivitas glukukanase, dan suhu 25°C selama 30 menit untuk amilase. Sebanyak 1 ml hasil reaksi tadi dipipet, kemudian ditambahkan 2 ml DNS (untuk DNS modifikasi ditambahkan pula 1 ml garam Rochelle 4%), dipanaskan pada suhu 100°C selama 15 menit, didinginkan secara cepat pada air mengalir, kemudian diencerkan dengan 20 ml akuades. Larutan hasil pewarnaan dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol diperlakukan sama namun tanpa penambahan substrat. Jumlah gula pereduksi dibaca dengan mengacu kepada kurva standar glukosa.

Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Suhu Lingkungan terhadap Aktivitas Enzim

Substrat dibuat dengan konsentrasi 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, dan 3% CMC, serta 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7% pati. Masing-masing substrat kemudian diinkubasikan dengan ekstrak enzim pada suhu 37°C selama 120 menit untuk deteksi aktivitas glukukanase, dan suhu 25°C selama 30 menit untuk amilase. Produk gula pereduksi yang terbentuk diukur dengan metode DNS. Pengaruh suhu terhadap aktivitas amilase dilakukan pada suhu lingkungan 25, 37, dan 50°C . Pengukuran ini juga sekaligus dilaksanakan untuk mengetahui kestabilan reagen DNS modifikasi dalam mempertahankan keberadaan gula pereduksi yang terukur pada saat langsung pembacaan absorbansi, dan pada selang waktu 24 jam.

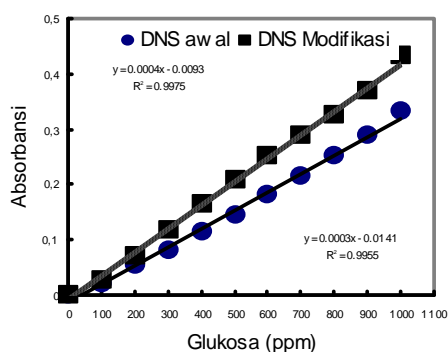
Pengukuran Kadar Protein

Kandungan protein pada ekstrak enzim merupakan gambaran kuantitas enzim yang terkandung, dan berfungsi untuk menentukan satuan aktivitas enzim. Protein terlarut ditetapkan berdasarkan kurva standar bovin serum albumin (BSA). Kurva standar dibuat dari 0,2 ml BSA (konsentrasi 0,1 sampai 1 mg) ditambah 5 ml larutan Bradford. Setelah dikocok, didiamkan selama 20 menit, kemudian absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Sampel diukur dengan cara yang sama dengan mengganti bovin serum albumin dengan sampel yang akan diukur. Kadar protein dapat diketahui berdasarkan kurva standar protein (Bradford, 1976).

HASIL

Modifikasi Reagen DNS Pengkompleks Gula Pereduksi

Reagen DNS modifikasi menghasilkan nilai absorbansi lebih tinggi dibandingkan dengan reagen DNS yang tanpa diberi sulfid dan fenol (Gambar 1). Semakin tinggi kadar glukosa pada larutan, semakin jelas perbedaan serapan absorbansinya. Perbedaannya semakin meningkat dan terlihat jelas pada serapan absorbansi pada larutan yang mengandung kadar gula pada larutan standar sampai konsentrasi 1000 ppm.

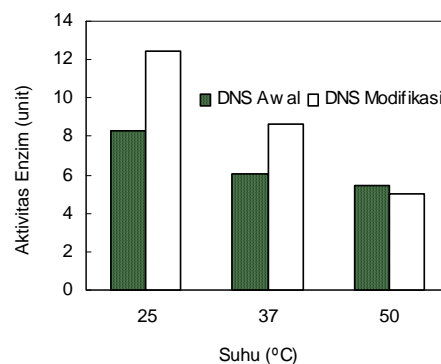


Gambar 1. Kurva standar untuk pengukuran gula pereduksi

Pengukuran aktivitas amilase yang ditera dengan DNS modifikasi menunjukkan hasil lebih tinggi dari DNS biasa, pada kondisi suhu 25° C. Reagen DNS modifikasi juga dapat mempertahankan stabilitas intensitas kompleks warna sekalipun dilakukan penundaan pengukuran absorbansi pada spektrofotometer setelah selang waktu 24 jam (Tabel 1). Penggunaan DNS biasa menghasilkan intensitas absorbansi yang meningkat pada pengukuran dengan selang waktu 24 jam, hal tersebut mengindikasikan bahwa DNS tanpa penambahan fenol dan sulfid tidak mampu menjaga kestabilan warna.

Pengaruh Suhu

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu lingkungannya. Suhu optimum aktivitas amilase adalah 25° C, kemudian aktivitas cenderung menurun pada suhu 37 dan 50° C (Gambar 2). Suhu yang optimal bagi aktivitas amilase diikuti dengan semakin efisiennya pengikatan gula pereduksi oleh DNS modifikasi. Pengukuran aktivitas amilase pada suhu 37° C dengan reagen DNS biasa memang stabil sekalipun pengukuran absorbansi ditunda 24 jam, namun aktivitas enzim pada suhu tersebut tidak optimal. Hal yang sama juga terjadi pada aktivitas amilase pada suhu 50° C yang diukur dengan menggunakan reagen DNS modifikasi (Tabel 1).



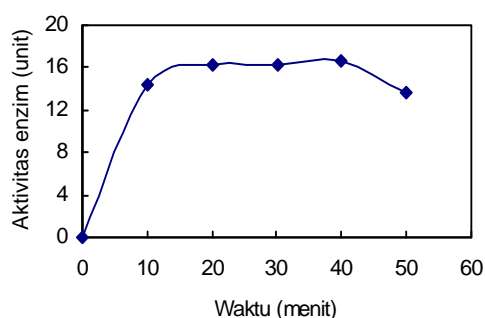
Gambar 2. Aktivitas amilase yang diukur menggunakan 2 macam reagen DNS

Tabel 1. Absorbansi (nm) hasil pengukuran langsung dan penundaan 24 jam pada reaksi gula pereduksi dengan 2 macam reagen DNS, akibat aktivitas amilase (*nilai rata-rata dengan tanda yang sama menunjukkan harkat yang sama pada nilai LSD 5%)

	Reagen DNS					Reagen DNS Modifikasi						
	Awal		Setelah 24 jam			Awal		Setelah 24 jam				
	25° C	37° C	50° C	25° C	37° C	50° C	25° C	37° C	50° C	25° C	37° C	50° C
	0.195	0.142	0.119	0.512	0.147	0.293	0.274	0.164	0.105	0.288	0.225	0.090
	0.199	0.143	0.132	0.408	0.151	0.250	0.285	0.198	0.120	0.292	0.172	0.194
	0.207	0.142	0.132	0.561	0.150	0.209	0.351	0.260	0.125	0.244	0.143	0.093
	*0.200	0.142	0.128	0.494	0.149	0.251	0.303	0.207	0.117	0.275	0.180	0.126
	ef	gh	h	a	gh	cd	b	def	h	bc	fg	h

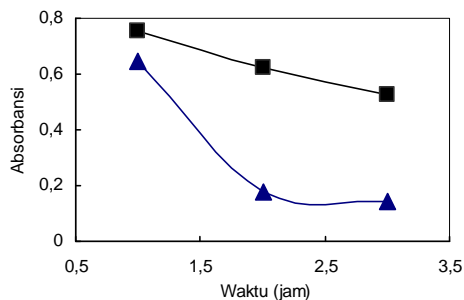
Pengaruh Masa Inkubasi

Pengaruh masa inkubasi terhadap aktivitas amilase dapat dilihat pada Gambar 3. Aktivitas enzim meningkat tajam sampai masa inkubasi 15 menit. Produk aktivitas enzim amilase mencapai stabil dan optimal pada waktu inkubasi mulai 15 sampai dengan 40 menit, dan pada proses inkubasi selanjutnya mengalami penurunan.



Gambar 3. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim amilase

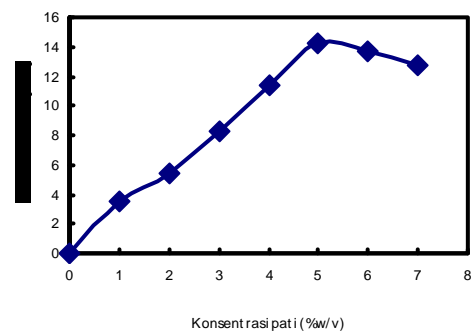
Perlakuan inkubasi dilakukan pula dalam skala jam. Hasil pengukuran produk aktivitas selama 1 sampai 3 jam baik pada aktivitas amilase maupun glukukanase menunjukkan penurunan aktivitas yang sangat nyata. Pada masa inkubasi 3 jam, tingkat absorbansi mengalami penurunan masing-masing sampai 40 dan 70% pada aktivitas amilase dan glukukanase (Gambar 4), sekalipun yang digunakan dalam mengukur gula pereduksi adalah DNS modifikasi.



Gambar 4. Pengaruh lama inkubasi terhadap stabilitas absorbansi akibat aktivitas enzim amilase (□) dan glukukanase (△)

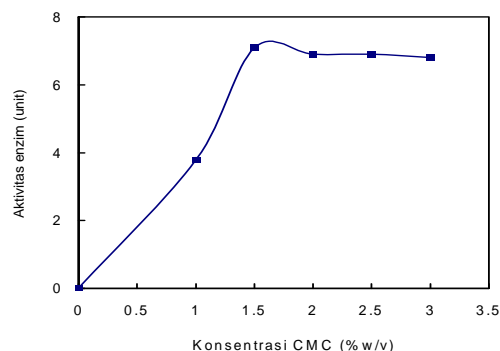
Pengaruh Konsentrasi Substrat

Pengaruh konsentrasi substrat pati dan CMC terhadap aktivitas amilase dan selulase dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6. Larutan pati yang menghasilkan aktivitas maksimal terjadi pada konsentrasi 5%, sedangkan glukukanase optimal pada konsentrasi 1,5%. Aktivitas enzim pada pemberian substrat yang konsentrasinya lebih dari nilai-nilai tersebut di atas, tidak bisa meningkatkan lagi hasil hidrolisis, bahkan dapat mengalami penurunan.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim amilase

Pemberian substrat pati dari 1 sampai 5% dapat merangsang aktivitas enzim sejalan dengan kenaikan konsentrasi substratnya; demikian pula halnya yang terjadi pada penambahan substrat CMC sampai 1,5% yang dapat meningkatkan aktivitas glukukanase mencapai optimal. Hasil ini mempertegas estimasi pemberian besaran konsentrasi substrat yang optimum pada keperluan pengujian aktivitas enzim amilase dan glukukanase selanjutnya. Khususnya dalam mengukur aktivitas kedua macam enzim tadi baik yang diekstrak langsung dari mikroba ataupun berupa ekstrak enzim hasil aktivitas mikroba tanah total yang diekstrak dari tanah. Besaran konsentrasi substrat dapat saja ditingkatkan apabila jumlah molekul enzim dalam suatu larutan terdapat dalam jumlah konsentrasi yang tinggi.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim glukukanase

PEMBAHASAN

Reagen Modifikasi

Reagen DNS modifikasi dapat berfungsi secara efektif dalam mengikat gula pereduksi sebagai indikator terjadinya aktivitas enzim. Hasil ini seperti yang disimpulkan oleh Miller (1959), bahwa sulfat dapat menanggulangi kelarutan oksigen yang dapat mengoksidasi gula pereduksi, sedangkan penambahan fenol berfungsi menstabilkan

warna. Oleh karena itu maka glukosa yang terukur oleh DNS modifikasi terukur lebih tinggi dari hasil DNS biasa.

Glukosa atau gula pereduksi yang terbentuk hasil aktivitas enzim dapat teroksidasi oleh oksigen terlarut menjadi asam-asam uronat. Proses oksidasi tersebut dapat dicegah dengan penambahan sulfit. Namun, sulfit tidak dapat berfungsi maksimal jika dalam larutan terdapat garam Rochelle. Oleh sebab itu, penambahan garam Rochelle pada DNS modifikasi dilakukan pada akhir proses pewarnaan supaya peran sulfit yang dapat menangkap oksigen bebas pada larutan tidak mengganggu proses pengikatan gula pereduksi oleh dinitrosalisilat. Miller (1959) juga menyarankan, agar proses reduksi DNS terhadap gula pereduksi berjalan cepat dan sempurna diperlukan pemanasan 100° C selama 15 menit, sehingga diperoleh pembentukan warna yang lebih intensif.

Penambahan fenol pada DNS modifikasi memberikan kestabilan terhadap kompleks warna yang akan diukur. Sensitifitas reagen modifikasi lebih terlihat nyata pada pengamatan sampel bila dibandingkan dengan kurva standar. Kurva standar merupakan hasil pengukuran terhadap larutan yang hanya mengandung glukosa. Sedangkan pada pengukuran ekstrak enzim dari miselium, di dalamnya terdapat berbagai senyawa yang dapat menghambat pembentukan kompleks warna, namun komponen-komponen reagen dalam DNS modifikasi dapat mengatasi penghambatan tersebut dan menyebabkan pengukuran lebih seksama.

Hasil Optimasi

Suhu lingkungan berpengaruh pada aktifitas amilase, suhu lebih tinggi dari 25° C menyebabkan aktivitas terhambat. Fenomena pengaruh suhu tinggi terhadap amilase dijelaskan oleh Goyal *et al.* (1991), yang menyatakan bahwa bagian protein enzim dari miselium jamur dalam menghidrolisis pati ialah sisi afinitasnya (sisi aktif). Penurunan aktivitas pada suhu tinggi terjadi karena struktur molekul enzim tersebut mengalami denaturasi. Akibatnya sisi aktif enzim tidak sesuai lagi dengan substratnya. Selain itu, struktur molekul dari substrat pun dapat mengalami perubahan konformasi, sehingga mengalami hambatan untuk mencapai lokasi aktif enzim (Lehninger, 1993). Hal lain yang menyebabkan penurunan aktivitas diduga karena ekskresi enzim protease yang dapat menyebabkan autolisis protein enzim, sehingga afinitasnya terhadap substrat mengalami penurunan dan mungkin pada akhirnya hilang.

Masa inkubasi yang terlalu lama dapat menurunkan perolehan gula pereduksi hasil aktivitas enzim. Penyebabnya dapat diakibatkan oleh pengaruh lingkungan

yang mengganggu proses enzimatik maupun produknya berupa gula pereduksi. Oleh sebab itu pengukuran aktivitas enzim harus dilakukan dalam rentang waktu paling awal pada masa inkubasi optimum. Fenomena tersebut dapat mempertegas pendapat Miller (1959) tentang pengaruh dari oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi gula pereduksi. Akibat dari masa inkubasi yang terlalu lama maka sebagian gula pereduksi tersebut berubah menjadi senyawa asam dan tidak dapat terdeteksi sebagai gula pereduksi lagi. Akibatnya hasil hidrolisis enzim yang terbentuk tidak dapat terukur dengan jelas.

Penghambatan hidrolisis dapat juga terjadi karena adanya akumulasi produk. Kasus tersebut pernah dilaporkan oleh Enari (1983) pada proses perombakan selulosa oleh jamur *Trichoderma reesei* dan *Phanerochaeta chrysosporium*. Aktivitas enzim selobiohidrolase dan endoglukanase jamur tersebut mengalami penghambatan karena adanya akumulasi selobiosa dan glukosa. Hal ini dapat diterangkan dengan hipotesis kompleks enzim substrat oleh Michaelis-Menten (Dixon and Webb, 1958). Kompleks enzim substrat mengalami kesesuaian bila sisi afinitas enzim sesuai dengan jumlah molekul substrat pada bagian aktifnya. Jika konsentrasi substrat terus diperbesar maka akan terjadi penambahan aktivitas. Ketika penambahan substrat melebihi titik optimal maka terjadi kompetisi antara bagian aktif substrat dalam memperebutkan sisi afinitas enzim, dan akibatnya terjadi penghambatan pada proses penggabungan enzim-substrat. Bila terjadi demikian maka aktivitas enzim yang terukur menjadi rendah karena proses pengikatan enzim-substrat tidak lagi berlangsung efisien. Oleh karena itu, penambahan substrat secara menerus menyebabkan aktivitas enzim akan menaik, kemudian mencapai konstan, namun akhirnya aktivitas mengalami penurunan.

Dengan memperhatikan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa komposisi reagen DNS modifikasi terbukti lebih sensitif dan mampu mempertahankan stabilitas kompleks warna lebih lama. Sedangkan hasil pengujian aktivitas enzim amilase optimum pada substrat 5% pati, suhu optimum 25° C, dan masa inkubasi selama 20 menit; sedangkan glukukanase optimum pada konsentrasi substrat CMC 1,5%.

KEPUSTAKAAN

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J. Anal. Chem.* 72: 248-254.
- Dixon M and Webb EC, 1958. *Enzymes*. London-Cambridge: Longmans.

- Enari TM, 1983. Microbial Cellulase. Di dalam: Fogarty MW. (ed). *Microbial Enzymes and biotechnology*. Appl.Sci. Interscience Publisher, New York.
- Fiechter A, 1987. Biodegradation of Ligno-cellulosic Material. Di dalam: Taguchi H (ed). *Microbial Utilization of Renewable Resources*. International Center of Cooperative research in biotechnology, Japan. hlm. 283-290.
- Fogarty WM, 1983. Microbial Amylases. Di dalam: Fogarty MW (ed). *Microbial Enzymes and biotechnology*. Appl. Sci. Interscience Publisher, New York.
- Goyal A, Gosh B and Eveleigh, 1991. Characteristic of fungal cellulase. *J. Bio. Tech.* 36: 37-50.
- Hardjo S, Indrasti NS and Bantacut T, 1989. Biokonversi Pemanfaatan Limbah Pertanian. PAU. Pangan dan Gizi. IPB, Bogor.
- Kshattriya S, Sharma GD and Mishra RR, 1991. Enzyme activities related to litter decomposition in forests of different age and altitude in North East India. *J. Soil. Biol. Biochem.* 3: 265-270.
- Lehninger AL, 1993. Dasar-Dasar Biokimia. Ed. ke-3. Terjemahan. Maggy Thenawidjaja. Erlangga, Jakarta.
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Mukataka SN, Kobayashi, Sato S and Takashi J, 1988. Variation in cellulose constituting componen from *Tricoderma reesei* with agitation intensity. *J. Biotech. Bioeng.* 32: 760-763.
- Sudiana IM dan Rahmansyah M, 2002. Aktivitas amilase dan selulase jamur tiram putih yang ditumbuhkan pada media ampas aren dan serbuk gergaji kayu. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 7: 7-10.

Editor: **Alfiah Hayati**

Reviewer: **Dr. Ir.Tini Surtiningsih, DEA**