

Produksi Gula Reduksi oleh *Rhizopus oryzae* dari Substrat Bekatul

*Production of reducing sugar from rice brans substrate by
using Rhizopus oryzae*

CHANDRA DEWI, TJAHJADI PURWOKO♥,
ARTINI PANGASTUTI

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126

Diterima: 12 Agustus 2004. Disetujui: 1 Desember 2004.

ABSTRACT

Rice bran was produced from rice-hulling process. Rice bran was contain high starch, therefore it was used to saccharification process. The aim of this research was to study the optimum concentration of rice bran to produce reducing sugar on saccharification process by *Rhizopus oryzae*. The 100 mL-rice bran medium (5, 10, 15, 20, 25, and 30%) were sterilized at 121°C, for 15 minutes and inoculated with *R. oryzae* ($\pm 2 \times 10^6$ cfu) and incubated for 3 days. The concentration of reducing sugar, starch, pH value, and biomass were analyzed everyday. Concentration of starch was decreasing during saccharification process. However, the concentration of reducing sugar was maximum at first day saccharification. The optimum concentration of rice bran for saccharification process was showed by maximum production of reducing sugar (15,347 mg/mL); it was in 20% concentration of medium. The pH value was decreasing during saccharification process, and the biomass was reversed.

Keywords: rice brans, *Rhizopus oryzae*, saccharification, reducing sugar.

♥ Alamat korespondensi:
Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

PENDAHULUAN

Pengolahan hasil-hasil pertanian menghasilkan produk yang dikehendaki dan hasil samping berupa limbah. Proses penggilingan padi menghasilkan produk samping bekatul sampai 10%. Di Indonesia, jumlah bekatul diperkirakan mencapai 4-6 juta ton per tahun (BPS, 1997 dalam Hermanianto dan Widowati, 1999). Saat ini pemanfaatan bekatul sebagian besar untuk pakan ternak dan hewan lainnya. Bekatul dapat dikembalikan ke sawah sebagai pupuk, tetapi tidak dianjurkan karena kandungan NPKnya rendah. Di samping itu, bekatul dapat dipakai sebagai bahan bakar dan bahan baku industri farmasi. Dengan penemuan Lembaga Eijkman Indonesia, bekatul dapat diekstrak untuk sumber vitamin B. Asam fitat dalam bekatul dapat dipakai sebagai bahan pengkelat dalam berbagai

industri, baik sebagai antioksidan, anti pengkaratan, dan penjernihan air (Tangendjaja, 1991).

Pemanfaatan bekatul sebagai media pertumbuhan mikroorganisme didasarkan pada kandungan komponen-komponen nutrisi yang dibutuhkan mikroorganisme. Bekatul mengandung karbohidrat tinggi, protein, lemak, vitamin, dan serat kasar (Houston, 1972). Bekatul mempunyai sumber karbon dan nitrogen lebih kompleks dibanding media lain. Bekatul mempunyai kandungan karbohidrat dan vitamin B. Vitamin B tertentu yang terdapat dalam medium merupakan faktor penting untuk pertumbuhan jamur.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa bekatul dapat dimanfaatkan sebagai media untuk pertumbuhan jamur penghasil enzim, seperti *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., dan *Mucor* sp. Dengan kata lain, bekatul dapat digunakan

sebagai substrat untuk menghasilkan enzim. Jenis enzim yang dihasilkan tergantung pada media dan kondisi lingkungan (Satyawiharja, 1984). Kandungan karbohidrat yang tinggi dalam bekatul dapat dimanfaatkan untuk produksi gula reduksi. Karbohidrat dalam bekatul berbentuk polisakarida, terutama pati, sehingga diperlukan enzim amilase untuk menghidrolisis pati menjadi polimer pendek berupa dekstrin dan gula reduksi.

Salah satu jamur yang mempunyai enzim amilase adalah *Rhizopus*. Dalam keadaan aerob, *Rhizopus* banyak menghasilkan enzim amilase ekstraselular (Crueger dan Crueger, 1984). Enzim tersebut dihasilkan untuk memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana, sehingga dapat diserap oleh sel dan dapat digunakan untuk pertumbuhan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, yaitu substrat, nilai pH, dan suhu. Adanya substrat tertentu di dalam medium produksi dapat memicu mikroorganisme untuk mengeluarkan metabolit selnya (Pujoyuwono *et al*, 1997). Proses pemecahan pati menjadi gula reduksi disebut sebagai proses sakarifikasi. Gula reduksi dapat dimanfaatkan untuk berbagai hal, misalnya produksi etanol dan asam laktat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar substrat bekatul yang paling efisien, untuk menghasilkan gula reduksi pada proses sakarifikasi oleh *Rhizopus oryzae*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September-Desember 2003, di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Cara kerja

Pembuatan inokulum *R. oryzae*

Isolat *R. oryzae* ditumbuhkan pada medium PDA miring pada suhu 30°C sampai bersporulasi penuh (± 5 hari). Spora disuspensi dalam 3 mL akuades steril. Suspensi spora (1 mL) diinokulasikan ke nasi steril, kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu kamar ($\pm 30^\circ\text{C}$). Setelah bersporulasi penuh, inokulum dikeringkan pada suhu 40°C selama 3 hari. Setelah kering, inokulum diblender kemudian disimpan dalam cawan petri steril pada suhu 4°C.

Pembuatan bubur bekatul

Bubur bekatul dibuat dengan mencampur bekatul dan akuades sampai volume mencapai 100 mL, sehingga diperoleh 6 kadar, yaitu 5, 10, 15, 20, 25, dan 30%. Bubur bekatul disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Tahap sakarifikasi

Bubur bekatul diinokulasi dengan inokulum *R. oryzae* ($\pm 2 \times 10^6$ cfu) dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Pengukuran dilakukan setiap 24 jam meliputi kadar gula reduksi, kadar pati, pH dan berat kering miselium.

Analisis gula reduksi

Analisis gula reduksi menggunakan metode Nelson-Somogyi (dalam Sudarmadji *et al.*, 1984). Sampel 1 mL ditambah akuades sampai volume akhir 10 mL. Campuran diambil 1 mL dan ditambah 9 mL akuades. Sampel diambil 1 mL dan dicampur 1 mL larutan Nelson (campuran Nelson A&B; 25:1 v/v), kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 20 menit. Sampel didinginkan sampai mencapai suhu kamar. Sampel ditambah 1 mL larutan arsenomolybdat dan 7 mL akuades kemudian digojok. Campuran tersebut dimasukkan kuvet dan diukur penyerapan cahaya tampak (*visible*) pada panjang gelombang 510 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dikurangi nilai absorbansi blanko sehingga diperoleh nilai absorbansi sampel. Nilai absorbansi sampel dikonversi ke kadar gula reduksi (mg/mL) berdasar persamaan regresi larutan standar.

Analisis kadar pati

Analisis kadar pati menurut Sudarmadji *et al.* (1984) sampel 1 mL, ditambah 100 mg enzim amilase (1739 unit Westmont Pharmaceuticals, Ltd. PT Medifarma Laboratories, Inc. Bogor) kemudian diencerkan sampai 10 mL dan didiamkan selama 6 jam. Sampel diukur gula reduksinya menggunakan metode Nelson-Somogyi seperti pada analisis gula reduksi. Kadar gula reduksi yang diperoleh dikurangi kadar gula reduksi sampel tanpa enzim amilase, kemudian dikali 0,9 merupakan berat pati.

Pengukuran berat kering miselium

Jamur diambil dari medium, lalu diletakkan pada kantong kertas yang telah diketahui berat keringnya kemudian dioven pada suhu 70°C selama 3 hari sampai mencapai berat konstan. Setelah itu ditimbang berat kering totalnya. Berat

total tersebut digunakan untuk mengukur berat kering sel, dengan rumus:

Berat kering sel = berat kering total - berat kering kantong kertas

Analisis data

Data hasil pengamatan dianalisis lebih lanjut dengan analisis varian (ANAVA). Bila perlakuan terdapat beda nyata, dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5% untuk mengetahui letak perbedaan pengaruh perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses sakarifikasi dilakukan selama 3 hari dengan menggunakan jamur *R. oryzae* sebanyak 2×10^6 cfu/100 mL sampel atau sekitar 2×10^4 cfu/mL sampel. Pada proses fermentasi tempe, jumlah inokulum yang digunakan sebanyak $\pm 4 \times 10^3$ cfu/g kedelai dan membutuhkan waktu fermentasi selama 5 hari (Siregar dan Pawiroharsono, 1997). Pada penelitian ini, proses sakarifikasi dilakukan selama 3 hari terkait dengan jumlah inokulum yang cukup banyak, sehingga waktu yang dibutuhkan lebih pendek. Wang *et al* (1975) menyebutkan bahwa jika jumlah koloni jamur dalam inokulum terlalu banyak, maka waktu fermentasi menjadi lebih cepat. Sebaliknya semakin sedikit jumlah inokulum, semakin lama waktu fermentasi.

Kadar pati dan gula reduksi

Kadar pati dalam bekatul sekitar 10% (Tabel 1). Jika kadar karbohidrat dalam bekatul sekitar 40%, maka kandungan pati adalah $\pm 25\%$ dari total karbohidrat dalam bekatul. Selama 3 hari sakarifikasi kadar pati mengalami penurunan. Hal itu karena pati mengalami hidrolisis oleh enzim amilase yang dihasilkan *Rhizopus oryzae*.

Hasil hidrolisis pati oleh enzim amilase adalah gula reduksi, yaitu maltosa dan glukosa.

Angka penurunan kadar pati diperoleh dari kadar pati hari ke-0 dikurangi kadar pati hari pertama. Angka penurunan kadar pati terbesar terjadi pada pertama sakarifikasi pada medium bubur bekatul 30%, kemudian berturut-turut 25, 20, 15, 10, dan 5%. Hal itu karena pada medium 30% *R. oryzae* melakukan aktivitas pertumbuhan tertinggi yang ditunjukkan dengan berat kering miselium tertinggi diperoleh dari medium 30%.

Pada hari ke-2 dan ke-3 sakarifikasi aktivitas enzim amilase menurun, sehingga pati yang terhidrolisis mengalami penurunan dibandingkan hari pertama sakarifikasi (Tabel 1). Hal itu karena nilai pH medium menjadi semakin asam, sehingga aktivitas enzim amilase mengalami penurunan. Semakin asam nilai pH maka semakin banyak enzim yang mengalami denaturasi. Enzim amilase merupakan enzim ekstraseluler, maka aktivitas enzimatik dipengaruhi oleh nilai pH medium. Pada saat itu, nilai pH medium adalah 5,31-6,00 (Tabel 2). Nilai pH tersebut merupakan nilai pH optimum bagi aktivitas enzim amilase.

Pengaruh lama proses sakarifikasi terhadap kadar pati masing-masing medium bubur bekatul 5, 10, 15, 20, 25 dan 30% berbeda nyata. Kadar pati pada hari ke-0 berbeda nyata dengan hari pertama sampai hari ke-3. Pada hari ke-0 kadar pati masih tinggi, tetapi pada hari pertama sampai hari ke-3 kadar pati sangat rendah. Pada hari pertama sampai hari ke-3, kadar pati tidak berbeda nyata. Hal itu menunjukkan bahwa aktivitas enzim amilase pada hari ke-2 dan ke-3 sangat rendah sehingga tidak mampu menurunkan kadar pati secara signifikan (nyata).

Pada hari pertama sakarifikasi, kadar gula reduksi mencapai maksimum (Tabel 1). Hal itu karena pati terhidrolisis menjadi gula reduksi

Tabel 1. Kadar pati dan gula reduksi (mg/ml bubur bekatul) selama 3 hari proses sakarifikasi.

Waktu sakarifikasi (hari)	Kadar bekatul												Rerata	
	5%		10%		15%		20%		25%		30%			
	Pati	Gula reduksi	Pati	Gula reduksi	Pati	Gula reduksi	Pati	Gula reduksi	Pati	Gula reduksi	Pati	Gula reduksi		
0	4,579	0,646	9,492	1,222	15,592	3,942	19,893	5,59	22,304	5,136	29,163	4,848	16,837 ^a	3,564 ^c
1	2,392	2,603	3,356	5,734	6,229	10,41	3,986	20,937	5,136	18,526	7,286	18,382	4,731 ^b	12,765
2	2,299	0,769	3,207	2,191	3,022	5,445	3,838	9,504	5,006	5,425	7,045	6,022	4,069 ^b	4,893 ^c
3	2,058	0,131	2,058	2,026	2,911	3,921	3,541	7,238	4,987	4,127	6,396	3,447	3,658 ^b	3,482 ^c
Rerata	2,832 ^{p1}	1,037 ^t	4,528 ^{p4}	2,793 ^t	6,938 ^{qr}	5,929 ^u	7,814 ^{qr}	10,817 ^v	9,358 ^{rs}	8,303 ^{uv}	12,47 ^s	8,175 ^{uv}		

Keterangan: a-d: berbeda nyata jika huruf berbeda pada kolom yang sama (α : 0,05); p-r: berbeda nyata jika huruf berbeda pada baris yang sama (α : 0,05).

Tabel 2. Nilai pH medium bubur bekatul selama proses sakarifikasi.

Waktu sakarifikasi (hari)	Kadar bekatul						Rerata
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	
0	6,04	6,11	6,17	6,19	6,07	6,10	6,11 ^d
1	5,31	5,36	5,44	5,81	5,99	6,00	5,65 ^c
2	4,76	4,55	4,28	4,68	5,35	5,69	4,88 ^b
3	3,84	3,73	3,94	4,34	4,91	5,61	4,39 ^a
Rerata	4,98 ^p	4,93 ^p	4,96 ^p	5,30 ^{qr}	5,58 ^{qr}	5,85 ^r	

Keterangan: a-d: berbeda nyata jika huruf berbeda pada kolom yang sama (α : 0,05); p-r: berbeda nyata jika huruf berbeda pada baris yang sama (α : 0,05).

Tabel 3. Berat kering miselium (mg) selama 3 hari proses sakarifikasi.

Waktu sakarifikasi (hari)	Kadar bekatul						Rerata
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ^a
1	151,40	291,10	325,10	316,30	430,90	345,90	310,12 ^b
2	330,00	455,00	653,00	511,50	693,50	885,40	588,07 ^c
3	408,90	676,30	718,40	845,90	873,80	933,30	742,77 ^d
Rerata	222,58 ^p	355,60 ^q	424,13 ^{qr}	418,43 ^{qr}	499,55 ^{rs}	541,15 ^s	

Keterangan: a-d: berbeda nyata jika huruf berbeda pada kolom yang sama (α : 0,05); p-r: berbeda nyata jika huruf berbeda pada baris yang sama (α : 0,05).

tertinggi pada hari pertama sakarifikasi. Pada hari pertama sakarifikasi produksi gula reduksi lebih tinggi daripada konsumsi gula reduksi sehingga terdapat peningkatan kadar gula reduksi dibandingkan hari ke-0 sakarifikasi. Pada hari ke-2 sakarifikasi kadar gula reduksi menurun banyak. Keadaan ini disebabkan pada saat itu konsumsi gula reduksi sangat tinggi dan produksi gula reduksi rendah sehingga terjadi penurunan kadar gula reduksi. Pada hari ke-3 sakarifikasi kadar gula reduksi tidak berbeda nyata dengan hari ke-2. Hal ini disebabkan pada hari ke-3 sakarifikasi, konsumsi dan produksi gula reduksi relatif sama sehingga kadar gula reduksi relatif sama. Hal itu juga karena *Rhizopus oryzae* telah mengalami sporulasi penuh, sehingga aktivitas metabolisme menurun.

Produksi gula reduksi diperoleh dari kadar gula reduksi pada hari pertama dikurangi kadar gula reduksi awal, yaitu pada hari ke-0. Produksi gula reduksi tertinggi pada kadar bekatul 20%, yaitu sebesar 15,347 mg/mL, sedangkan gula reduksi pada kadar bekatul 30 dan 25% tidak begitu berbeda, yaitu sebesar 13,534 mg/mL dan 13,390 mg/mL. Namun hasil statistik menunjukkan bahwa kadar gula reduksi yang dihasilkan medium bubur bekatul 20, 25, dan 30% tidak berbeda nyata. Hal itu karena pada umumnya jamur tumbuh baik pada medium

semipadat. Kondisi semipadat dapat dipenuhi oleh medium bubur bekatul 20-30%.

Produksi gula reduksi mencapai maksimum pada hari pertama sakarifikasi, sedangkan pada hari ke-2 dan ke-3 sakarifikasi tidak berbeda nyata. Hal itu menunjukkan bahwa pada hari pertama sakarifikasi telah terjadi aktivitas hidrolisis pati maksimum. Pada hari ke-2 sakarifikasi konsumsi gula reduksi semakin meningkat karena *R. oryzae* mulai bersporulasi sehingga konsumsi gula reduksi dipakai untuk proses sporulasi. Proses sporulasi berhenti pada hari ke-3 sakarifikasi. Hal itu ditunjukkan dengan kadar gula reduksi pada hari ke-3 sakarifikasi tidak berbeda nyata dengan hari ke-2

sakarifikasi.

Nilai pH

Aktivitas optimum enzim berkisar pada nilai pH pertumbuhan mikroorganisme penghasil enzim tersebut. Enzim amilase umumnya stabil pada kisaran nilai pH 5,5-7,0. Aktivitas optimum umumnya terjadi pada nilai pH 4,8 -6,5. Tetapi nilai pH optimum aktivitas enzim berbeda-beda tergantung organisme penghasil enzimnya (Pujoyuwono *et al.*, 1997).

Rhizopus oryzae mempunyai kisaran nilai pH pertumbuhan 4-7 sehingga spora *R. oryzae* dapat tumbuh pada semua medium bubur bekatul karena pada saat inokulasi, nilai pH medium bubur bekatul 5, 10, 15, 20, 25 dan 30% pada hari ke-0 antara 6,04-6,19 (Tabel 2). Menurut Lilly dan Barnett (1951) medium fermentasi yang memiliki nilai pH antara 5 dan 6 pada saat inokulasi sangat cocok untuk pertumbuhan jamur (

Tabel 2 menunjukkan bahwa semua medium bubur bekatul mengalami penurunan nilai pH mulai hari pertama sampai hari ke-3. Selama proses sakarifikasi, terjadi hidrolisis pati yang menghasilkan glukosa yang akhirnya diubah menjadi asam organik sehingga dapat menurunkan nilai pH medium. Karbohidrat merupakan sumber karbon dan energi yang

paling banyak digunakan dalam proses fermentasi. Sebagai sumber energi karbohidrat dimetabolisme melalui 2 cara, yaitu respiratif dan fermentatif (Mirdamadi *et al*, 2002). *Rhizopus oryzae* merupakan mikroorganisme yang mampu memecah karbohidrat baik secara respiratif maupun fermentatif. Pada metabolisme respiratif, terjadi pemecahan glukosa yang menghasilkan air, karbondioksida dan sejumlah besar energi (ATP) yang digunakan untuk aktivitas metabolisme pertumbuhan. Metabolisme non-respiratif (fermentasi) menghasilkan sejumlah kecil energi, karbondioksida, air, dan produk akhir metabolik organik seperti asam laktat, asam asetat, dan sejumlah asam organik lainnya (Buckle *et al*, 1985).

Pengaruh lama proses sakarifikasi terhadap nilai pH masing-masing variasi medium bubur bekatul 5, 10, 15, 20, 25 dan 30% berbeda nyata. Proses sakarifikasi menyebabkan terjadinya penurunan nilai pH. Pada hari ke-0 rata-rata nilai pH medium masih tinggi tetapi nilai pH terus menurun sampai hari ke-3. Nilai pH terendah didapatkan pada hari ke-3, karena akumulasi asam-asam organik.

Berat kering miselium

Pertumbuhan jamur diukur berdasarkan berat kering miselium. Pertumbuhan jamur dimulai dari inokulum yang berupa spora. Spora mulai bertunas dan berkembang membentuk miselium dan miselium mengalami pemanjangan dan percabangan sehingga menambah massa dan berat miselium. Selama pertumbuhan jamur, berat miselium bertambah. Hasil pengukuran berat kering miselium dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa pada semua perlakuan kadar bekatul pada hari pertama inkubasi, jamur sudah tumbuh cukup banyak. Jumlah sel *R. oryzae* mengalami kenaikan dilihat dari berat kering miselium yang diukur setiap 24 jam. Jumlah sel meliputi sel hidup dan sel mati. Berat miselium terus bertambah sampai hari ke-3. Pengamatan berat kering miselium tersebut mengindikasikan bahwa *R. oryzae* mampu menghidrolisis pati menjadi glukosa. Sebagai sumber karbon, glukosa diubah menjadi biomassa oleh *R. oryzae*. Gula reduksi terkonsumsi rata-rata pada medium bubur bekatul 10, 15, 20, 25, dan 30% lebih besar dari miselium yang terbentuk kecuali medium bubur bekatul 5%. Hal itu menunjukkan bahwa gula reduksi dapat diubah menjadi biomassa selain menjadi energi dan asam-asam organik. Namun terdapat sumber lain yaitu protein dan lemak.

Konsumsi gula reduksi tertinggi didapatkan pada kadar bekatul 30% yaitu sebesar 26,698 mg/mL; kemudian berturut-turut pada kadar bekatul 25% sebesar 20,250 mg/mL; 20% sebesar 16,521 mg/mL; 15% sebesar 14,111 mg/mL; 10% sebesar 7,456 mg/mL; dan pada kadar bekatul 5% sebesar 3,316 mg/mL. Hal itu sebanding dengan miselium yang terbentuk tertinggi pada kadar bekatul 30%. Semakin tinggi biomassa total mikroba, maka semakin tinggi aktivitas hidrolisis pati, semakin tinggi juga konsumsi gula reduksi.

Kadar medium bubur bekatul 5, 10, 15, 20, 25, dan 30% menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap berat kering miselium *R. oryzae*. Berat kering miselium *R. oryzae* tertinggi diperoleh dari medium bubur bekatul 30% dan terendah pada medium bubur bekatul 5%. *Rhizopus oryzae* mampu memanfaatkan pati sebagai sumber karbon sehingga berat kering miselium tertinggi dihasilkan dari medium bubur bekatul 30% (Tabel 3). Pengaruh lama proses sakarifikasi terhadap berat kering miselium *R. oryzae* masing-masing variasi medium bubur bekatul 5, 10, 15, 20, 25, dan 30% berbeda nyata. Jamur sudah mengalami pertumbuhan pada hari pertama dan terus berlanjut sampai hari ke-3.

KESIMPULAN

Rhizopus oryzae mampu menghasilkan gula reduksi melalui proses sakarifikasi pada substrat bekatul. Gula reduksi tertinggi diperoleh dari medium bubur bekatul 20% pada hari pertama sakarifikasi, yaitu sebesar 15,347 mg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, K.A., R.A. Edwards, G.H. Fleet, and M. Wootton 1985. *Ilmu Pangan*. Penerjemah: Purnomo, H. dan Adiono). Jakarta: UI Press
- Crueger, W., and A. Crueger. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. Madison: Sinauer Tech, Inc.
- Hermanianto, J. dan S. Widowati. 1999. Karakteristik mutu fisikokimia dan organoleptik produk sereal sarapan dengan teknologi ekstruksi ulir tunggal dari hasil samping penggilingan padi (menir & bekatul). *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan*. Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia bekerja sama dengan Kantor Menteri Negara dan Hortikultura. 12-13 Oktober 1999, Jakarta
- Houston, D.F. 1972. *Rice: Chemistry & Technology*. St.Paul, MN: The American Association of Cereal Chemist Inc.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia*. Penerjemah: Thenawidjaja, M. Jakarta: Erlangga
- Lilly, V.G. and H.L. Barnett. 1951. *Physiology of the Fungi*. New York: Mc Graw Hill Book Company Inc.

- Mirdamadi, S., H. Sadeghi, N. Sharafi, M. Fallahpour, F. Mohseni, and M.R. Bakhtiari. 2002. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial starins. *Iran Biomedic Journal* 6 (2&3): 69-75.
- Pujoyuwono, M.D., N. Trinovia, D.S. Richana, Damardjati dan U. Murdiyanto. 1997. Karakterisasi enzim amilase dari beberapa strain bakteri indegenous Indonesia. *Prosiding Seminar Teknologi Pangan*. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi Pangan.
- Satyawiharja, B. 1984. *Fermentasi Media Padat dan Manfaatnya*. Jakarta: Depdikbud.
- Siregar, E. and S. Pawiroharsono. 1997. *Inocula Formulation and Its Role for Biotransformation of Isoflavonoid Compunds*. In Sudarmadji, S., Suparmo, and S. Raharjo, (eds). *Reinventing the Hidden Miracle of Tempe. Proceedings International Tempe Symposium*. 13-15 Juli 1997. Bali
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi. 1984. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty
- Tangendjaja, B. 1991. *Padi: Pemanfaatan Limbah Padi untuk Pakan*. Buku 3. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan
- Wang, H.L., E.W. Swain, and C.W. Hesseltine. 1975. Mass production of **Rhizopus oligosporus** and their application in tempeh fermentation. *Journal of Food Science* 40: 1-5.