

PRODUKSI PEPTON DARI LIMBAH INDUSTRI BIR DENGAN PAPAIN UNTUK MEDIUM PERTUMBUHAN BAKTERI

[Production Of Peptone From Waste Beer Industry
Using Papain for Bacterial Growth Medium]

Rahman¹⁾, Dedi Fardiaz²⁾, dan Tami Idiyanti³⁾

¹⁾ Mahasiswa Program Studi Ilmu Pangan Sekolah Pascasarjana IPB.

²⁾ Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi-Fateta IPB

³⁾ Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong.

Diterima 29 Mei 2004 / Disetujui 11 Oktober 2004

ABSTRACT

An experiment was conducted to hydrolyze waste of beer industry using papain to produce peptone. Papain with activity of 691.5 units based on casein substrat was used in this experiment. Results showed that optimum conditions for hydrolysis processes were as follows : substrate concentration 3.2%, papain concentration 0.4%, temperature 60-70°C, pH 6.0, hydrolysis time 5 hours. With 5 liter fermentation jar as much as 3.8 liter of hydrolyzate could be produced with 19.23% of peptone. The resulting peptone had the following characteristics : solubility 90.7%, N-amino 3.25%, N-total 11.23%, protein 70.19%, water 5.5% and ash 7.9%. This peptone gave the same effectivity for bacterial growth as that from commercial Bacto peptone and Yeast extract to support the bacterial growth.

Key words : Peptone, waste of beer industry, papain, bacterial growth medium.

PENDAHULUAN

Untuk pertumbuhan mikro-organisme, nitrogen merupakan salah satu nutrien utama yang sangat diperlukan selain karbon, hidrogen, dan oksigen. Pepton sering digunakan dalam industri kesehatan, pangan, pakan dan mikrobiologi, (Hettiarchy et al., 1996; Netto dan Galeazzi, 1998). Di Indonesia saat ini pepton masih diimpor dengan harga tinggi menurut Laporan Biro Statistik (2001). Pepton merupakan hidrolisat protein yang diperoleh dengan cara penghancuran bahan berprotein tinggi melalui reaksi hidrolisis asam atau enzimatis. Pemutusan ikatan peptida oleh protease dapat terjadi pada asam amino serin, sulfhidril, dan asam amino asam. Kamir merupakan endapan limbah cair industri bir dengan kadar protein 55.6% (Atmaka, 1997), sementara Gopaul dan Price, (1999) melaporkan kadar protein limbah bir (*Phonix and Guinness*) masing-masing 7.0 dan 9.7%, kamir dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan baku produksi pepton yang nilai ekonominya lebih tinggi.

Papain adalah protease yang dapat diperoleh dari penyadapan getah buah pepaya. Netto & Galeazzi (1998) menyebutkan papain dapat digunakan untuk menghasilkan bahan berprotein tinggi atau hidrolisat protein. Atas dasar pemanfaatan limbah dan enzim yang diproduksi secara lokal, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknologi proses produksi pepton dari limbah industri bir dengan menggunakan papain. Pepton

yang dihasilkan digunakan sebagai medium pertumbuhan bakteri.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan baku utama yang digunakan adalah endapan limbah cair industri bir yang diperoleh dari industri pengolahan bir (PT. Delta Jakarta Tbk), sedangkan papain kasar diperoleh dari Pusat Penelitian Kimia LIPI. Bakteri uji yang digunakan yaitu : *B.subtilis*, *E.coli*, *P.aerogenosa*, dan *S.aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pusat Penelitian Kimia LIPI. Peralatan yang digunakan antara lain : *Shaker incubator* (Certomat WR B Braun Int), timbangan analitik (Scaltec), sentrifus (Beckman), spektrofotometer UV/Vis (Hitachi U-2000), pH meter (704 Metrohm), Ultrafilter stirred cell (Amicom), *Freeze-dryer* (Dura Dry MP Pharmacia Biotech) dan berbagai ukuran Finnipette.

Metode

Aktivitas papain

Pengujian aktivitas papain kasar diukur pada substrat kasein dengan cara membuat larutan segar papain dan kasein masing-masing 0.1%, 1% dan standar tirosin 5 mM, selanjutnya 0.6 ml substrat disiapkan dalam 6 tabung reaksi (untuk sampel dan blanko dengan 3 ulangan). Ke dalam blanko

ditambahkan 0.2 ml buffer fosfat pH 6.5 dan semua substrat diinkubasi pada water bath suhu 40°C selama 1 menit, kemudian 0.2 ml papain ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi sampel. Reaksi dibiarkan selama 5 menit, kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan 2 ml TCA 0.1M. Ke dalam tabung sampel ditambahkan 0.2 ml buffer fosfat pH 6.5 dan ke dalam tabung blanko ditambahkan 0.2 ml papain. Water bath dimatikan dan campuran diaduk (vorteks), selanjutnya disentrifus pada 3000 rpm selama 20 menit. Filtrat diambil masing-masing sebanyak 0.6 ml dan dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi yang berisi 2 ml NaOH 1M, selanjutnya semua tabung ditambahkan 0.4 ml larutan folin 1 : 2 (pengenceran dengan akuades), divorteks dan dibiarkan selama 20 menit. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 578 nm.

Produksi pepton dilakukan pada kondisi protein terlarut optimum. Untuk menginaktivkan papain dilakukan dengan penambahan TCA 1.0 M, kemudian disimpan pada suhu 4°C dan dilanjutkan dengan sentrifugasi dan pemisahan enzim dengan ultrafiltrasi (membran 10 kDa), selanjutnya permeal dikeringbekukan.

Protein terlarut

Untuk mengukur kadar protein terlarut dilakukan dengan metode Lowry, (1951) di dalam Apriantono, A; et al., (1989). Sampel larutan (filtrat hasil hidrolisis) diambil sebanyak 0.25 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan volume ditepatkan menjadi 5 ml dengan akuades. Dari masing-masing tabung reaksi diambil 0.25 ml dan ditambahkan 2.75 ml pereaksi Lowry C (50 ml Lowry A + 1 ml Lowry B), diaduk dan selanjutnya ditambahkan 0.25 ml pereaksi Lowry D, segera diaduk merata sesudah penambahan dan dibiarkan selama 30 menit sampai terbentuk warna biru yang stabil. Absorbansi diukur pada λ 560 nm.

Karakterisasi produk

Kelarutan

Kelarutan pepton dilakukan dengan melarutkan 1% pepton dalam akuades, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring yang telah diketahui bobotnya. Setelah penyaringan selesai kertas saring tersebut dikeringkan pada suhu 102°C selama 5 jam, kemudian ditimbang. Jumlah penambahan bobot kertas saring adalah jumlah zat tak terlarut. Jumlah zat terlarut adalah jumlah zat dikurangi dengan jumlah zat tak terlarut.

Tingkat hidrolisis

Kualitas produk hidrolisat ditentukan oleh konsentrasi material terlarut setelah hidrolisis dan tingkat hidrolisis protein dapat diketahui dari rasio nitrogen amino dan nitrogen total atau AN/TN total (Lahl & Braun, 1994, Silvestre, 1996). Sejumlah contoh (0.1 g dilarutkan dalam 10 ml akuades, disentrifus pada 3000 rpm, 4°C

selama 15 menit. Filtrat dipipet sebanyak 2.5 ml ke dalam labu takar 25 ml, ditambahkan 4 tetes timofltalin dan beberapa tetes NaOH 1N sampai berwarna biru muda, selanjutnya ditambahkan 15 ml suspensi Cu-fosfat, selanjutnya ditambahkan akuades sampai tanda batas. Endapan dipisahkan dengan cara sentrifus. Filtrat dipipet sebanyak 5ml ditambahkan 0.25ml asam asetat dan 0.5g KI. Larutan dititrasi dengan natrium tiosulfat sampai warna biru tepat hilang dengan amilum sebagai indikator.

Total nitrogen

Analisis N-total dilakukan dengan metode Kjeldahl (AOAC, 1984). di dalam Apriantono, A. et al; (1989) Sejumlah contoh (0.2-0.5g) dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl yang berisi batu didih, ditambahkan 0.15g K₂SO₄ dan 15mg HgO serta 10ml H₂SO₄ pekat. Larutan dididihkan sampai berwarna jernih. Setelah dingin ditambahkan 50ml akuades dan dipindahkan ke alat destilasi. Ke dalam alat destilasi ditambahkan 8 – 10ml larutan NaOH-Na₂S₂O₃, kemudian lakukan destilasi sampai tertampung destilat kira-kira 15ml dalam erlenmeyer yang berisi 15ml larutan H₂BO₃ dan 2-4 tetes indikator (campuran 2 bagian metil merah 0.2% dan 1 bagian metilen biru 0.2%). Isi erlenmeyer diencerkan sampai kira-kira 50ml kemudian dititrasi dengan HCl 0.02N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu.

Kadar air

Kadar air dilakukan dengan metode pengeringan oven (AOAC, 1984). Sampel dikeringkan dalam oven suhu 102°C, kemudian didinginkan dalam eksikator dan ditimbang. Ini dilakukan sampai didapat bobot tetap.

Kadar abu

Kadar abu dilakukan dengan metode pengabuan (AOAC, 1984). Sampel diabukan dalam alat tanur suhu 550°C selama 6 jam, pendinginan dalam eksikator, lalu ditimbang.

Efektivitas produk terhadap pertumbuhan bakteri

Untuk menguji pertumbuhan bakteri, media dibuat dengan melarutkan 0.5% pepton dan 0.3% beef extract dalam akuades dan sterilisasi medium dilakukan pada suhu 121°C selama 20 menit. Ke dalam media dimasukkan 0.5ml biakan bakteri secara aseptis, kemudian diinkubasi pada shaker reciprocal 120 rpm, 30°C selama 24 jam. Pengamatan kekeruhan (Absorbansi) diamati setiap jam pada λ 540 nm. uji dilakukan dengan mengamati nilai absorbansi medium pertumbuhan selama 24 jam. Hasil pertumbuhan tersebut dilanjutkan dengan angka lempeng total (ALT) pada medium Nutrien Agar (NA) dengan masa inkubasi 24 jam. Karakterisasi dan efektivitas pepton produk hidrolisis limbah industri bir dibandingkan dengan *Bacto pepton* (Difco) dan *Yeast extract* (Difco) standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas enzim papain

Aktivitas proteolitik papain terhadap substrat kasein 1%, pH 6,5 dan suhu 40°C serta inkubasi selama 5 menit memberikan nilai 691.5 unit. Unit dalam hal ini didefinisikan sebagai jumlah μmol produk (tirosin) yang terbentuk per gram papain tiap menit dari substrat kasein pada kondisi uji

Pemilihan kondisi reaksi hidrolisis

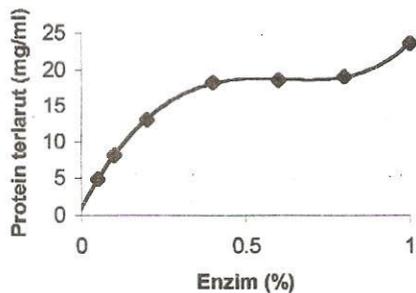
Proses hidrolisis dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, pH dan waktu hidrolisis (Muchtadi et al., 1992)

Konsentrasi substrat.

Kebutuhan jumlah substrat limbah industri bir terhadap papain ditentukan dengan beberapa variasi konsentrasi yaitu antara 0.5-10% (b/v). Sebelum hidrolisis dilakukan terlebih dahulu substrat dipanaskan pada suhu 70°C selama 9 jam untuk melarutkan komponen autolisat. Hidrolisis dilakukan pada konsentrasi enzim papain 1% pada suhu 70°C selama 9 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi substrat limbah industri bir 3.2% sudah cukup untuk dijadikan dasar dalam produksi pepton selanjutnya.

Konsentrasi enzim

Pada penentuan konsentrasi papain dilakukan dengan beberapa variasi konsentrasi yaitu antara 0.05 – 1.0%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju reaksi optimum pada proses hidrolisis limbah bir dibutuhkan papain dengan konsentrasi 0.4% dan menghasilkan kenaikan protein terlarut sebesar 18.30 mg/ml. Fachraniah et al., (2002) melaporkan rasio enzim papain / substrat bungkil kedelai adalah 1 : 20, dan rasio enzim papain /substrat limbah bir adalah 1 : 30, sementara Netto dan Galeazzi (1998) melaporkan rasio enzim/substrat untuk hidrolisis isolat protein kedelai dengan p ankreatin adalah 1 : 35.



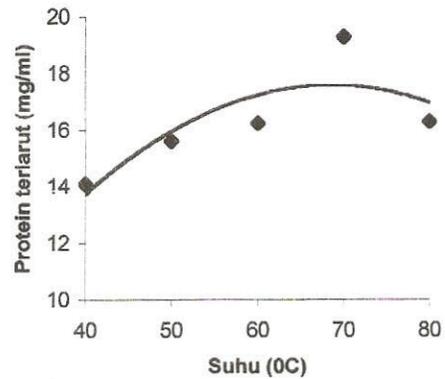
Gambar 1. Pengaruh konsentrasi enzim pada hidrolisis limbah industri bir.

Suhu hidrolisis.

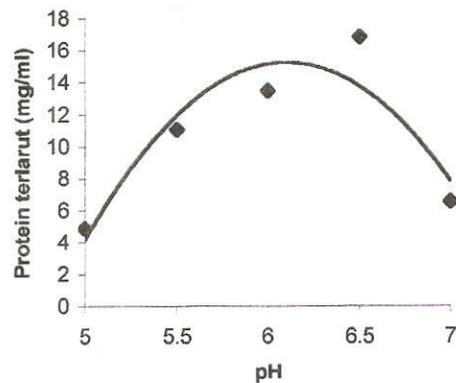
Perlakuan terhadap suhu hidrolisis divariasikan antara 40-80°C (gambar 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju reaksi optimum pada suhu 60-70°C. Papain termasuk jenis protease yang tahan terhadap suhu tinggi dibandingkan dengan jenis protease lainnya. Keaktifannya hanya menurun 20% pada pemanasan 70°C (Winarno, 1986). Fachraniah et al., (2002) melaporkan bahwa hidrolisis substrat bungkil kedelai dan limbah bir masing-masing 70°C dan 60-70°C.

pH hidrolisis

Pengaruh pH awal pada proses hidrolisis limbah industri bir divariasikan antara 5.0-7.0 (Gambar 3). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa laju reaksi optimum pada hidrolisis limbah bir adalah pada pH 6.0-6.5



Gambar 2. Pengaruh suhu pada hidrolisis limbah industri bir.

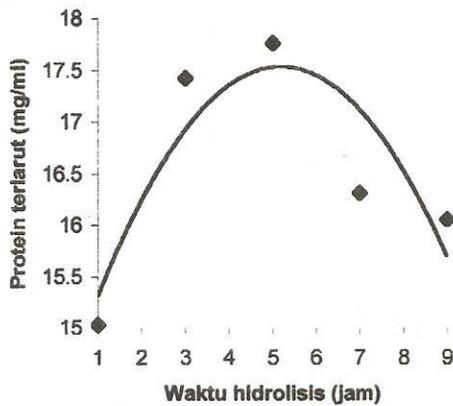


Gambar 3. Pengaruh pH awal pada proses hidrolisis limbah industri bir.

Cowan (1983) melaporkan bahwa papain relatif stabil pada pH netral dan diamati hidrolisis protein kedelai, laju reaksi optimum berada pada pH 5 - 8, sedangkan Belitz dan Grosch (1999) menjelaskan bahwa papain memiliki selang pH dengan stabilitas optimum pada pH 4,5 - 7.

Waktu hidrolisis.

Waktu yang digunakan pada proses hidrolisis limbah industri bir dengan menggunakan papain divariasikan antara 1-9 jam (Gambar 4). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu yang dibutuhkan untuk laju reaksi optimum adalah 5 jam, dimana terlihat kurva hidrolisis menghasilkan kenaikan protein terlarut yang tajam pada awal hidrolisis sampai 5 jam, selanjutnya mulai menurun. Fachraniah et al., (2002) melaporkan bahwa waktu hidrolisis limbah bir adalah 5 jam.



Gambar 4. Pengaruh waktu pada proses hidrolisis limbah industri bir.

Produksi pepton skala 5 liter

Produksi pepton dilakukan berdasarkan kondisi hidrolisis yang diperoleh sebelumnya yaitu konsentrasi substrat limbah industri bir adalah 3.2%, konsentrasi papain adalah 0.4%, suhu 60-70°C, pH 6.0 dan waktu hidrolisis adalah 5 jam. Rendemen produk yang dihasilkan adalah 19.23%. Fachraniah et al., (2002) melaporkan bahwa untuk membuat pepton dari substrat xungkil kedelai dengan skala Erlenmeyer menghasilkan endemen sebesar 12.1%, sedangkan untuk substrat imbah bir sebesar 18.8%. Kamir pada umumnya memiliki berbagai protease endogenous dengan pH dan emperatur yang berbeda-beda (Kelly, 1983), sehingga apain diduga berperan membantu meningkatkan hasil akhir. Untuk produksi dengan skala besar disamping aktor-faktor kondisi hidrolisis, juga dilakukan engadukan secara terus menerus selama proses idrolisis, disamping itu kondisi suhu dan pH harus tetap ijaga kestabilannya untuk menghasilkan produk yang ptimal, untuk itu proses hidrolisis dilakukan dalam eactor/fermentator.

Karakterisasi produk

Untuk mendapatkan produk hidrolisat yang ikehendaki maka hidrolisat hasil penelitian dipisahkan eptida-peptida dengan berat molekul yang rendah dari olipeptida, dalam hal ini dilakukan mikrofiltrasi dan

ultrafiltrasi menggunakan membran dengan ukuran masing-masing 0.22 µm dan 10 kDa. Kualitas produk hidrolisat ditentukan oleh konsentrasi protein terlarut setelah hidrolisis (Lowry, 1951). Produk dikarakterisasi kelarutannya dalam air dan derajat hidrolisisnya melalui rasio nilai amino nitrogen dengan total nitrogen (AN/TN), (Lahl & Braun, 1994) kadar air (AOAC,1984), kadar abu (AOAC, 1984) dan kadar protein metode Kjeldahl (AOAC,1984), sebagai standar digunakan *Bacto pepton* (Difco) dan *Yeast extract* (Difco). Hasil ditabulasi pada Tabel 1.

Kelarutan pepton hasil hidrolisis limbah bir relatif kurang dibandingkan dengan kelarutan *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar, hal ini disebabkan karena kandungan mineral yang sukar larut dalam air lebih tinggi, ini ditunjukkan dengan kadar abu yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kadar abu *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar. Untuk meningkatkan kelarutan pepton hasil hidrolisis limbah bir yaitu dengan melakukan ultrafiltrasi dengan menggunakan membran dengan ukuran lebih kecil (5 kDa). Rasio AN/TN pepton hasil hidrolisis limbah bir yang dihasilkan sedikit lebih besar dibandingkan dengan rasio AN/TN *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar. Fachraniah et al., (2002) melaporkan rasio AN/TN untuk beberapa pepton diantaranya adalah pepton bungkil kedelai, pepton limbah bir, *Soy pepton* dan *Bacto pepton* berturut-turut : 26.47; 27.62; 20.07; dan 10.91. Cowan (1983) melaporkan beberapa jenis pepton untuk keperluan mikrobiologis diantaranya hidrolisis protein daging dan protein kedelai dengan enzim papain. Nilai AN dan TN pepton daging sebesar 1.7% dan 14.5%, sedangkan pepton kedelai nilai AN dan TN sebesar 1.0% dan 10.1%. Karakteristik pepton produk hidrolisis limbah bir dengan skala 5 liter dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik pepton produk hidrolisis limbah bir

Karakteristik	Pepton hasil hidrolisis limbah bir (%)
Kelarutan	90.70
N-amino	2.20
N-total	11.23
AN/TN	19.60
Kadar air	5.50
Kadar abu	7.90
Kadar protein (Nx6.25)	70.19

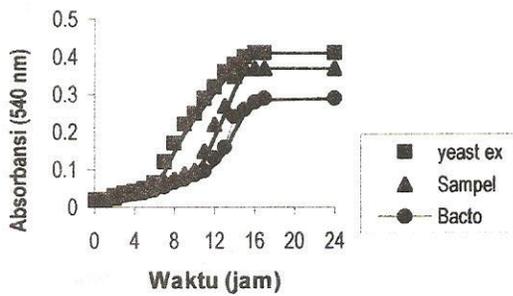
Hasil analisis kadar air pepton hasil hidrolisis limbah bir lebih besar dibandingkan dengan kadar air *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar, hal ini disebabkan dari teknik dan lama pengeringan yang dilakukan, namun demikian nilai kadar air tersebut masih pada batas yang aman bagi pertumbuhan mikroorganisme pada umumnya. Kadar protein pepton produk hidrolisis limbah bir lebih rendah dari kadar protein *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar, hal ini disebabkan pepton limbah bir masih mengandung

komponen-komponen yang dapat larut sehingga dapat lolos pada saat ultrafiltrasi (membran 10 kDa). Bridsson dan Brecker (1970) melaporkan pepton tanaman dan ekstrak kamir umumnya mengandung karbohidrat tinggi yang mudah larut.

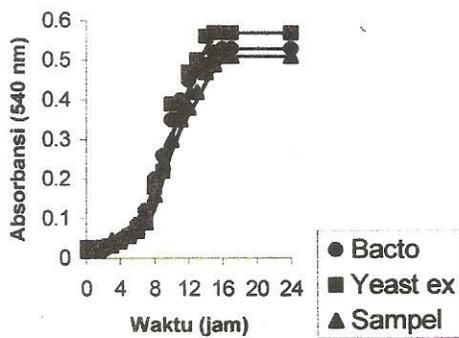
Efektivitas pepton terhadap pertumbuhan bakteri

Untuk menguji efektivitas pepton secara mikrobiologi dapat digunakan bakteri gr positif, gram negatif, aerobik dan anaerobik. Pertumbuhan bakteri tersebut diamati pada medium cair selama 24 jam untuk menilai fase log yaitu dengan mengukur perubahan nilai absorbansi medium (Bridsson & Brecker, 1970). Efektivitas pepton produk hidrolisis limbah bir, *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar ditunjukkan oleh kurva pertumbuhan bakteri *B.subtilis*, *E.coli*, *P.aerogenosa* dan *S.aureus* selama 24 jam (Gambar 5 – 8).

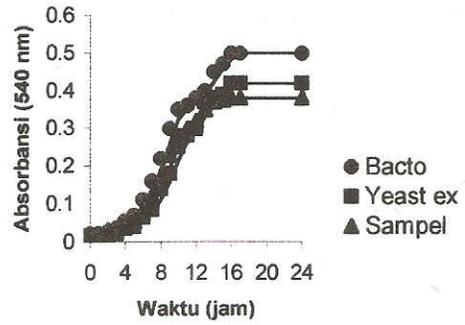
Dari kurva tersebut terlihat bahwa pola pertumbuhan bakteri pada pepton produk hidrolisis limbah bir memiliki karakteristik yang mirip dengan *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar.



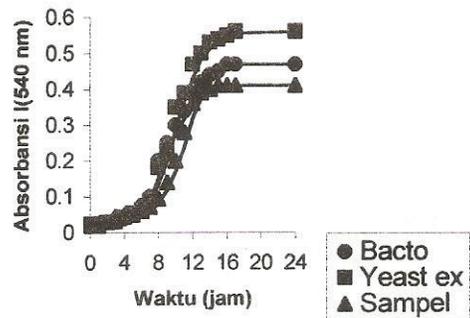
Gambar 5. Kurva pertumbuhan *B.subtilis* pada beberapa media pepton.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan *E.coli* pada beberapa media pepton.

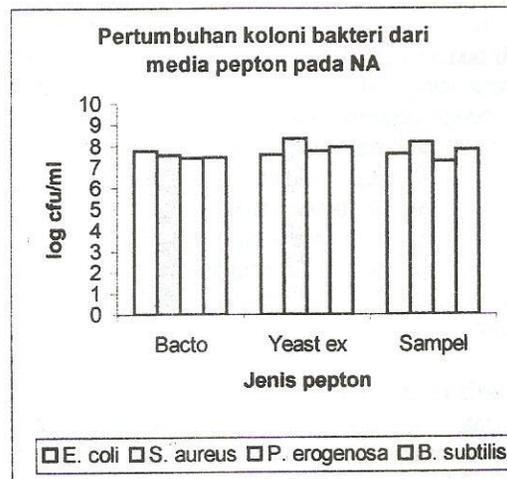


Gambar 7. Kurva pertumbuhan *S.aureus* pada beberapa media pepton.



Gambar 8. Kurva pertumbuhan *P. aerogenosa* pada beberapa media pepton.

Untuk melihat kualitas pertumbuhan bakteri tersebut, dilakukan pemupukan 0.1 ml setiap pengenceran tertentu dari suspensi bakteri yang tumbuh pada medium agar nutrien (NA), kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pertumbuhan koloni sel bakteri dihitung sebagai cfu/ml (Gambar. 9). Hasil pertumbuhan bakteri uji pada medium nutrien agar terlihat bahwa pepton produk hidrolisis limbah bir mirip dengan *Bacto pepton* dan *Yeast extract* standar.



Gambar 9. Pertumbuhan koloni bakteri dari medium pepton pada Nutrien Agar.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Enzim papain memiliki aktivitas sebagai enzim protease menghidrolisis protein dari limbah industri bir untuk produksi pepton. Kondisi optimum untuk produksi pepton dari substrat limbah bir adalah [S] = 3.2%, [E] = 0.4%, suhu 60-70°C, pH 6.0 dan waktu hidrolisis 5 jam. Rendemen pepton yang dihasilkan pada produksi skala 5 liter 19.23% dengan karakteristik kelarutan 90.7%, N-amino 2.25, N-total 11.23%, protein 70.19%, air 5.5% dan abu 7.9%. Efektivitas pepton produk hidrolisis limbah bir terhadap pertumbuhan bakteri uji (*B.subtilis*, *E.coli*, *P.aerogenosa* dan *S.aureus*) mirip dengan Bacto pepton (Difco) dan Yeast extract (Difco) standar.

Saran

Disarankan ada rancangan lebih lanjut untuk produksi pepton dari limbah industri bir dengan skala industri yang dikaitkan dengan keuntungan komersial.

DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim] 2001. Buletin perdagangan luar negeri. Impor. BPS. Jakarta.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis of The Association Analytical Chemiss, Washington DC.
- Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspita, N.L., Sedarnawati dan Budiyanto, S. 1989. Analisis Pangan. PAU Pangan dan Gizi, IPB. Bogor.
- Atmaka, W. 1997. Sifat-sifat fungsional konsentrat protein dari yeast press industri bir. Tesis. UGM, Yogyakarta.
- Belitz HD, Grosch W. 1999. Food Chemistry. Germany. Springer.
- Bridsson EY. and Brecker A. 1970. Design and formulation of microbial culture media. Di dalam Norris JR, Ribbons DW. Editor. Methods In Microbiology. London Academic Press.
- Cowan D. 1983. Protein. Di dalam : Godfrey T, Reichelt J. editor. Industrial Enzymology. USA. Macmillan.
- Fachraniah, Fardiaz D, Idiyanti T. 2002. Pembuatan pepton dari bungkil kedelai dan limbah bir dengan enzim papain untuk medium pertumbuhan bakteri. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. XIII: 260-266.
- Gopaul S. and Price N.S. 1999. Local production of protein bait for use in fruit fly monitoring and control. Ministry of Agriculture, Food Tech and Natural Resources.
- Hettiarachchy N.S., Griffin V.K, and Gnanasambandam R. 1996. Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. Cereal Chem. 73: 363-367.
- Kelly M. 1983 Yeast Extract. Di dalam : Godfrey T, Reichelt J, editor. Industrial Enzymology. USA : Macmillan. 457 – 465.
- Lahl W. dan Braun SD. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysate for food use. Food Tech. 68 – 71.
- Lowry. 1951. Analisis Pangan. Di dalam Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N. L., Sedarnawati., dan Budiyanto, S. 1989. Analisis Pangan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
- Muchtadi D., Palupi N.S., dan Astawan M. 1992. Enzim Dalam Industri Pangan. PAU IPB. Bogor.
- Netto F.M. and Galeazzi M.A.M. 1998. Production and characterization of enzymatic hydrolysate from protein isolate. Lebensmittel und Wissenschaft Technologie. 31.624-631
- Silvestre, M.P.C. 1997. review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chem. 60(2):263-271.
- Winarno, F.G. 1986. Enzim Pangan. Gramedia. Jakarta.