

KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR ENZIM RENIN *Mucor pusillus* TERHADAP LINGKUNGAN

Characterization of Crude Extract of Mucor pusillus Rennin

Khothibul Umam Al Awwaly¹, Mustakim¹, Rachmat Agus Budiutomo²

¹Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

²Alumni Program Studi Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

diterima 1 Februari 2008; diterima pasca revisi 12 Agustus 2008

Layak diterbitkan 20 Agustus 2008

ABSTRACT

*The research preparation involved production of rennin, determination of optimum pH of crude extract of rennin, determination of optimum temperature of crude extract of rennin, and determination of enzyme kinetics. The obtained data was analyzed by descriptive analysis. Data was explained and elaborated according to science or new knowledge. The result from characterization of rennin enzyme of Mucor pusillus showed that optimum enzyme reaction at pH 6.0, temperature at 32°C and concentration of substrate optimum at 2%. Each activity of proteolytic enzyme of Mucor pusillus at pH, temperature and concentration of substrate were: 0.09599 unit/ml, 0.06942 unit/ml, and 0.07577 unit/ml, respectively. The obtained value of V_{max} and K_m were 0.0836 Unit/ml and 0.356, respectively. Conclusion of this research was crude extract of *M. pusillus* rennin had the optimum pH at 6,0, optimum of temperature at 32°C and optimum of substrat consentration at 2%.*

Key words: *rennin, Mucor pusillus, pH, temperature*

PENDAHULUAN

Protease merupakan salah satu enzim yang paling banyak digunakan dalam dunia industri. Secara komersial protease menduduki urutan tertinggi di antara enzim lainnya dan mencakup lebih dari 60% total penjualan enzim. Nilai impor protease terus meningkat, protease di Indonesia hampir 100% berasal dari impor. Protease banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi, deterjen, pengolahan susu, roti, dan produk kedelai (Fuad, Rahmawati dan Mubarik, 2004).

Protease dapat dihasilkan dari berbagai sumber seperti hewan, tumbuhan, dan mikroba. Salah satu mikroba penghasil

protease adalah *Mucor pusillus*. Keberhasilan rennin *M. pusillus* dalam mensubstitusi rennin hewani (chymosin) di dunia industri keju, menyebabkan enzim mikroba tersebut diproduksi secara komersial. Mengingat penggunaan enzim hewani sangat mahal dan pengambilan rennin yang terus-menerus akan menurunkan penyediaan daging dan populasi sapi. Harga rennin yang mahal akan meningkatkan biaya produksi keju, maka untuk mengurangi biaya, produksi rennin mikroba pada umumnya mendesak untuk dilakukan (Sardinas, 1972; Khan, Blain and Patterson, 1979).

M. pusillus dapat memproduksi enzim pada berbagai medium. Pemiakan

pada medium dedak gandum dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 116 jam menghasilkan enzim dengan aktifitas proteolitik sebesar 0,034 unit per mililiter dan aktivitas koagulasinya sebesar 4,018 unit/mg protein (Wisastra, Nugroho, dan Budiutomo, 2005). Fardiaz dan Radiati (1991) menambahkan bahwa enzim renin *M. pusillus* yang diproduksi dengan limbah industri minyak jagung memiliki aktifitas proteolitik sebesar 3,54 unit dan aktivitas koagulasinya sebesar 584,0 unit per gram.

Enzim renin kasar dari kapang *M. pusillus* secara optimal bekerja pada pH 3,5 tetapi enzim yang telah dimurnikan optimal pada pH 4,5. Enzim renin stabil pada pH 4,0-6,0 dan pada pH 5,0 mampu mempertahankan keaktifan secara maksimal dan mempunyai berat molekul sebesar 29.000 sampai 30.600 Dalton (Fardiaz dan Radiati, 1991).

Informasi tentang karakter enzim renin *M. pusillus* dengan media fermentasi dedak gandum belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu perlu dipelajari kondisi optimum enzim renin yang dihasilkan oleh *M. pusillus* yang dipengaruhi lingkungan (pH, suhu dan konsentrasi substrat) sehingga diketahui kondisi lingkungan yang optimum untuk mencapai aktifitas maksimum. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum reaksi enzimatik meliputi pH, suhu, konsentrasi substrat serta V_{max} dan K_m yang diperlukan untuk memproduksi keju yang baik dari enzim renin yang diisolasi dari *M. pusillus* dengan media fermentasi dedak gandum.

MATERI DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan antara lain : dedak gandum, kasein, pepton, urea, KCl, $MgSO_4$, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaOH, TCA 4% (b/v), alkohol, larutan Bradford, amonium sulfat, akuades, Tween 80, bufer fosfat.

Alat-alat yang digunakan adalah: timbangan analitik, autoklaf, inkubator suhu

37°C, magnetic stirrer, automatic stirring, sentrifus dingin suhu 4°C, blender, kompor listrik, vorteks, refrigerator, waterbath, erlenmeyer, beaker glass, tabung reaksi, kawat ose, pengaduk, corong, kertas saring, bunsen, aluminium foil.

Tahapan Penelitian

Produksi Enzim Renin (Radiati,1992) yang dimodifikasi

Renin *M. pusillus* dipersiapkan dengan cara membiakkan *M. pusillus* di dalam medium: 4% dedak gandum, 0,2% KH_2PO_4 , 0,05% $MgSO_4$, 0,5% KCl, 0,1% urea dan 1,0% pepton, akuades 250 ml dengan pH medium 4,0 sebelum sterilisasi. Medium diinokulasi dengan suspensi *M. pusillus* sebanyak 5 ml yang mengandung 9×10^6 spora per mililiter. Kemudian diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C selama 116 jam. Hasil fermentasi diekstraksi dengan menggunakan larutan tween 80 dan akuades. Untuk memperoleh filtrat enzim renin dilakukan pemisahan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, kemudian supernatan disaring dengan kertas Whatman 42 hingga didapatkan ekstrak kasar enzim. Selanjutnya ekstrak kasar enzim dipekatkan dengan amonium sulfat 80% untuk mendapatkan keaktifan enzim tertentu agar mampu menggumpalkan protein susu.

Penentuan pH Optimum Ekstrak Kasar Enzim Renin

Uji aktivitas proteolitik pada penentuan pH optimum ditentukan berdasarkan jumlah enzim yang menghasilkan hidrolisat tirosin terlarut dalam 4 % TCA (*Trichloro Acetic Acid*) yang dibebaskan dari 2 ml substrat kasein 0,5 % dalam bufer fosfat pH (6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; dan 7,0). Aktivitas enzim ditentukan setelah inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 10 menit. Satuan unit aktivitas proteolitik tersebut setara dengan absorbansi 0,1 pada panjang gelombang maksimum tirosin dan sebanding dengan 15

ug tirosin per ml (Leewit and Pornsukawang, 1998, dalam Yunita, 2000).

Penentuan pH optimum aktivitas enzim protease, dilakukan variasi pH substrat yaitu pH 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; dan 7,0. Masukkan 2 ml larutan kasein 0,5 % (b/v) dengan 0,5 ml larutan bufer fosfat dengan pH yang sesuai ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 1 ml larutan enzim protease. Larutan tersebut dimasukkan dalam penangas air pada suhu 37°C selama 10 menit. Kemudian larutan ditambah 2,5 ml larutan TCA 4% dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama ± 5 menit, kemudian filtrat yang diperoleh diambil 1 ml dan diencerkan sampai 6 ml dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV visual dengan panjang gelombang 275 nm. Dari nilai absorbansi larutan, kemudian dihitung aktivitas enzimnya.

Penentuan Suhu Optimum Ekstrak Kasar Enzim Renin

Untuk menentukan suhu optimum aktivitas enzim protease dilakukan variasi suhu reaksi, yaitu pada suhu 32, 37, dan 42 °C. Larutan kasein 0,5 % dalam larutan bufer fosfat pH optimum yang telah diperoleh pada percobaan sebelumnya dan diukur aktivitas enzim seperti pada prosedur di atas.

Penentuan Kinetika Enzim

Digunakan kurva konsentrasi substrat kasein yaitu 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; dan 3 % (b/v). Masing-masing diuji aktivitas enzimnya seperti prosedur di atas pada suhu dan pH optimal hasil percobaan sebelumnya dengan penambahan 1 ml larutan enzim renin. Data yang diperoleh merupakan aktivitas enzim dalam berbagai konsentrasi substrat. Nilai Km dan V_{maks} ditentukan melalui persamaan regresi dari grafik hubungan antara $1/V$ dan $1/[S]$. Notasi V adalah kecepatan berdasarkan nilai aktivitas enzim dan $[S]$ adalah konsentrasi substrat.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Data yang dihasilkan dijelaskan apa adanya dan berusaha mengeksplorasi ilmu atau pengetahuan baru (Amirin, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Renin

Penentuan pH optimum dalam karakterisasi enzim dilakukan dengan pengujian aktivitas enzim renin pada variasi pH 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,0. Muchtadi, Palupi, dan Astawan (1992) menyebutkan bahwa enzim renin mampu mengkoagulasi kasein susu pada kisaran pH 5,8 – 6,6. Dengan mengetahui hal tersebut maka pada penentuan pH optimum digunakan kisaran pH 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 6,8; 7,0. Selain daripada hal tersebut, pengambilan kisaran untuk penentuan pH optimum didasarkan atas substrat yang digunakan dalam pengujian aktivitas enzim memiliki pH 6,6. Aktivitas enzim renin pada variasi pH 6,0 sampai dengan 7,0 dengan kondisi suhu 37°C selama 10 menit dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim Renin

pH	Aktivitas (unit/ml/menit)			Rata-Rata
	I	II	III	
6,0	0,09701	0,09510	0,09587	0,09599 ± 0,000961
6,2	0,06687	0,06783	0,06654	0,06708 ± 0,000670
6,4	0,06377	0,06553	0,06501	0,06477 ± 0,000904
6,6	0,04910	0,04910	0,04968	0,04929 ± 0,000335
6,8	0,04691	0,05039	0,04714	0,04815 ± 0,001946
7,0	0,03320	0,03473	0,03377	0,03390 ± 0,000773

Setiap enzim memiliki pH optimum yaitu pH yang memberikan aktivitas enzim mencapai optimum dan merupakan pH yang paling sesuai untuk melakukan reaksi dengan substrat (Girindra, 1990). Winarno (1986) menyebutkan bahwa enzim renin stabil pada pH 5,3 – 6,3. Dari data di atas dapat diketahui bahwa aktivitas optimum yang dicapai pada pH 6,0 yaitu sebesar

0,09599 unit/ml/menit. Enzim renin yang digunakan merupakan enzim protease asam yaitu enzim yang keaktifannya pada pH asam. Mihalyi (1978) menerangkan bahwa enzim renin digolongkan ke dalam kelompok protease asam. Enzim tersebut memiliki kemampuan menghidrolisis protein menjadi polipeptida yang lebih sederhana. Hal tersebut ditandai dua gugus karboksil pada lokasi aktifnya. Lehninger (1995) menambahkan bahwa enzim memiliki pH optimum yang khas yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal, yakni pH pada saat gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada dalam tingkat ionisasi yang diinginkan. Enzim renin yang telah dimurnikan stabil pada pH 4,0 – 6,0 (Fardiaz dan Radiati, 1991).

Aktivitas enzim renin yang memiliki pH di atas pH optimum yaitu pH 6,2; 6,4;....; 7,0 menunjukkan aktivitas yang semakin menurun. Hal ini disebabkan oleh enzim renin mengalami denaturasi enzim. Menurut Harper (1971), salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim yaitu denaturasi enzim yang disebabkan pH yang terlalu tinggi atau rendah. Denaturasi enzim secara fisik dapat dipandang sebagai suatu perubahan konformasi rantai polipeptida yang tidak mempengaruhi struktur primernya namun terjadi perubahan struktur sekunder atau tersier, sehingga sisi aktif enzim terbuka dan enzim tidak mengalami aktivitas biologi. Lehninger (1995) menambahkan bahwa pH dapat menyebabkan terjadinya perubahan keadaan muatan gugus fungsional dari enzim atau substrat. Selain itu pengaruh pH dapat dihubungkan dengan titik isoelektrik. Titik isoelektrik merupakan suatu kondisi pH yang menyebabkan suatu protein memiliki jumlah muatan positif dan muatan negatif yang sama. Scott (1986) menerangkan bahwa enzim renin memiliki titik isoelektrik pada pH 4,5.

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Renin

Penentuan suhu optimum pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan uji aktivitas enzim pada suhu yang bervariasi yaitu suhu 32°C, 37°C, 42°C dan dilakukan pada pH 6,0. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Renin

Suhu (°C)	Aktivitas (unit/ml/menit)			Rata-rata
	I	II	III	
32	0,06878	0,06959	0,06988	0,06942 ± 0,000570
37	0,04858	0,04958	0,04968	0,04928 ± 0,000608
42	0,04127	0,04170	0,04136	0,04144 ± 0,000227

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pada suhu 32°C aktivitas enzim renin mencapai maksimal yaitu sebesar 0,06942 Unit/ml/menit. Sebelum mencapai suhu optimum aktivitas enzim terus meningkat dengan semakin meningkatnya suhu perlakuan. Peningkatan suhu pada suatu reaksi berhubungan dengan bertambahnya energi kinetik molekul baik molekul enzim maupun molekul substrat. Energi kinetik yang lebih besar akan mempercepat gerakan-gerakan vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan molekul substrat sehingga kontak antara substrat dan enzim dapat terjadi dengan frekuensi yang lebih banyak (Suhartono, 1989).

Setelah suhu optimum tercapai maka suhu yang semakin naik menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim. Penurunan aktivitas ini terjadi pada suhu 37°C dan 42°C dan penurunan aktivitas enzim disebabkan oleh adanya proses denaturasi enzim. Hal ini terjadi karena suhu yang semakin tinggi akan mempengaruhi ikatan nonkovalen pada enzim yaitu ikatan hidrogen, ikatan ionik dan ikatan *Van der walls*. Ikatan ikatan ini dalam keadaan normal akan memelihara struktur sekunder dan tersier enzim (Bodanszky, 1993). Apabila terjadi proses denaturasi maka

bagian aktif enzim akan terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan aktivitas enzim akan menurun (Poejiadi, 1994). Suhartono (1989) menambahkan bahwa kenaikan suhu secara terus-menerus menyebabkan energi kinetik molekul- molekul enzim menjadi meningkat dan semakin besar energi kinetik dapat membuat ikatan-ikatan sekunder (ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik, serta ikatan elektrostatis) enzim menjadi rusak. Ikatan-ikatan sekunder enzim tersebut berfungsi untuk mempertahankan enzim dalam keadaan alaminya. Enzim akan kehilangan struktur tiga bentuk alamiah dan sisi aktif terbuka sehingga enzim akan kehilangan kemampuan katalitik (inaktif). Substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya berubah dan mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim.

Penentuan V_{maks} dan K_m

Penentuan nilai V_{maks} dan K_m diperlukan untuk mengetahui karakteristik enzim. K_m merupakan konsentrasi substrat untuk mencapai kecepatan aktivitas enzim $\frac{1}{2}$ maksimum sedangkan V_{maks} adalah kecepatan aktivitas enzim maksimal. Menurut Lehninger (1995), nilai K_m bersifat khas bagi setiap enzim pada pH, suhu, waktu reaksi enzim dan substrat tertentu. Penentuan nilai K_m dan V_{maks} dapat dilakukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat dengan jumlah enzim yang digunakan konstan. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0%, pH 6,0, suhu $32^{\circ}C$, selama 10 menit. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim renin ditunjukkan pada Tabel 3.

Berdasarkan data pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa aktivitas enzim meningkat dari konsentrasi substrat terendah (0,5%) hingga pada suatu titik dimana aktivitas enzim berada pada aktivitas tertinggi (2,0%) kemudian mengalami penurunan aktivitas

seiring dengan semakin meningkatnya konsentrasi substrat. Menurut Martin *et al.* (1983) aktivitas reaksi enzimatik meningkat saat konsentrasi substrat meningkat hingga mencapai suatu titik yang mana enzim dikatakan jenuh dengan substrat, peningkatan konsentrasi substrat berikutnya tidak mempengaruhi aktivitas enzim.

Tabel 3. Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Enzim Renin

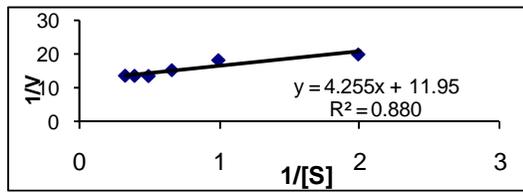
Konsentrasi Substrat (%)	Aktivitas (unit/ml)			Rata-rata
	I	II	III	
0,5	0,05049	0,05039	0,05068	0,05052 ± 0,000147309
1,0	0,05526	0,05550	0,05541	0,05539 ± 0,000121244
1,5	0,06692	0,06654	0,06673	0,06673 ± 0,000190000
2,0	0,07556	0,07599	0,07576	0,07577 ± 0,000215174
2,5	0,07552	0,07552	0,07547	0,07550 ± 0,000028867
3,0	0,07513	0,07533	0,07504	0,07517 ± 0,000148436

Pada penentuan nilai V_{maks} dan K_m sangat sulit menggunakan persamaan Michaelis-Menten, oleh karena itu digunakan persamaan Lineweaver-Burk sehingga diperoleh grafik Lineweaver-Burk dengan cara mengubah V menjadi $1/V$ dan $[S]$ menjadi $1/[S]$ kemudian diplotkan $1/V$ sebagai ordinat dan $1/[S]$ sebagai absis. Hubungan antara $1/V$ dan $1/[S]$ dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 1.

Tabel 4. Hubungan Antara $1/V$ dan $1/[S]$

$1/[S]$	$1/V$
2,000	19,794
1,000	18,054
0,667	14,986
0,500	13,198
0,400	13,245
0,333	13,303

Pada grafik Gambar 1 dapat diketahui persamaannya adalah $Y = 4,2551x + 11,955$ yang mana $Y=1/V$ dan $X = 1/[S]$ dan persamaan tersebut menjadi $1/V = 4,2551 \frac{1}{[S]} + 11,955$ sehingga dari persamaan tersebut didapat nilai V_{maks} sebesar 0,0836 Unit/ml, sedangkan K_m sebesar 0,356.



Gambar 1. Grafik Hubungan Antara 1/V dengan 1/[S]

Km dan V_{maks} merupakan dua parameter utama untuk mencirikan enzim, tetapi keduanya memiliki perbedaan. Pada jenis enzim yang sama tidak selalu memiliki kecepatan maksimum (V_{maks}) yang sama, karena V_{maks} dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsentrasi enzim namun jika Km pada jenis enzim yang sama besarnya akan tetap sama, jika jenis substrat dan kondisi lingkungan tetap sama (Suhartono, 1989). Nilai Km dan V_{maks} enzim tergantung pada jenis substrat dan keadaan lingkungan seperti suhu dan pH. Nilai Km yang semakin kecil maka ikatan substrat dengan enzim akan semakin kuat sehingga akan mudah untuk menghasilkan produk.

KESIMPULAN

Karakter enzim renin *M. pusillus* yang ditumbuhkan pada media dedak gandum memiliki aktivitas optimum pada pH 6,0 sebesar 0,09599 unit/ml/menit, suhu 32°C sebesar 0,06942 unit/ml/menit dan konsentrasi substrat 2% sebesar 0,07577 unit/ml/menit serta V_{maks} dan Km sebesar 0,0836 unit/ml/menit dan 0,356.

DAFTAR PUSTAKA

Amirin, M.T., 1990. Menyusun Rencana Penelitian. Rajawali Pers, Jakarta.
Bodanszky, M., 1993. Principles of Peptide Synthesis, 2nd. Revised Edition. Springer-Verlag. Berlin.
Fardiaz, D. dan L.E. Radiati. 1991. Produksi Renin *Mucor pusillus* pada Substrat

Limbah Minyak Jagung. P.A.U. Pangan dan Gizi. IPB. Bogor.
Fuad, A.M., Rahmawati, R., dan Mubarik, N.R., 2004. Produksi dan Karakterisasi Parsial Protease Alkali Termotabil *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01. J. Mikrobiol. Indones. 9 (1) : 29-35
Girindra, A. 1990. Biokimia I. Penerbit Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
Harper, H.A, 1971. Review of Physiological Chemistry. Marujen Company, Jepang.
Khan, M.R., J.A. Blain and J.D.E. Patterson, 1979. Extracellular protease of *Mucor pusillus*. J. Applied and Environmental Microbiology. 17 (4):719-724.
Lehninger, A.L., 1995. Dasar-dasar Biokimia. Jilid 1. Erlangga. Jakarta.
Martin, D.W., Mayes, D.A., and Rodwell, V.W, 1983. Biokimia. Diterjemahkan Oleh Adji, D. dan Andreas, S.K. EGC Penerbit, Buku Kedokteran.
Mihalyi, E., 1978. Application of Proteolytic Enzymes to Protein Structure Studies. Vol. I. 2nd Edition. Academic Press Inc. Florida.
Muchtadi, D., S.R. Palupi dan M. Astawan, 1992. Enzim dalam Industri Pangan. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
Radiati, L.E, 1992. Pemurnian Enzim Renin *Mucor pusillus*. Jurnal Universitas Brawijaya. 1992. Vol 4 (2) : 35-45.
Sardinas, J.I., 1972. Microbial rennet. J. Appl. Microbiol. 15: 39-66.
Scott, R.M., 1986. Cheese making practice. 2nd Ed. Elsevier Applied Sci. Publ. London.
Suhartono, M.T., 1989. Enzim dan Bioteknologi. Depdikbud. IPB Bogor.
Utomo, R.A.B., 2006. Karakteristik Ekstrak Kasar Enzim Renin *Mucor pusillus* Terhadap Lingkungan. Skripsi.

- Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Winarno, F.G, 1986. Enzim Pangan. Edisi II, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wisastra, A.D.Y., Nugroho, A. Dan Budiutomo, R.A.B, 2005. Pemanfaatan Dedak Gandum (*Wheat Bran*) Untuk Produksi Enzim Renin Mikrobial dan Aplikasinya Dalam Pembuatan Keju. Laporan Akhir Pelaksanaan Penelitian Program Bogasari Nugraha 2004. Program Studi Teknologi Hasil Ternak Universitas Brawijaya, Malang.
- Yunita, 2000. Pengaruh Ekstraksi Enzim *Mucor pucillus* Sebagai Pengganti Rennet Sapi Terhadap Kualitas Keju Gauda. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya, Malang.