



Produksi Protein Sel Tunggal dari Kultur *Saccharomyces cerevisiae* dengan Medium Limbah Kulit Nanas (*Ananas comosus* L. MERR)

Krisna Juniharta Napitupulu¹, Yayuk Putri Rahayu², Haris Munandar Nasution³,
Minda Sari Lubis⁴

^{1,2,3,4}Program Studi Sarjana Farmasi, Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah

Korespondensi penulis: krisna98napitupulu@gmail.com¹

Abstract. Single cell protein is the term used for proteins derived from microbes such as fungi. Pineapple waste is one of the alternative media that has easiest source of carbohydrates to obtain, so it has the potential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. The purpose of this study was to determine whether pineapple waste could produce single cell protein production by adding nutrients to the fermentation medium. The research used in this research is experimental research. To determine the relationship between the independent variable and the dependent variable. Where the independent variables are the addition of nutrients and fermentation time on days 0,2,4,6 to see the dependant variable, namely the analysis of protein content, dry weight analysis of cells, analysis of glucose levels, pH and temperature analysis. The results of this study showed that the highest protein content was obtained in H4 fermentation by MFKN2, namely 0,43%, cell dry weight 0,851 grams, glucose content 1,3402%, pH 4,5, temperature 27,1 °C. Meanwile, MFKN1 showed the highest protein content in H6 fermentation, namely 0,38%, cell dry weight 0,817 grams, glucose content 1,3397%, pH 4, temperature 26,2 °C. The yield of glucose and pH tended to decrease as the fermentation process progressed until the last day of fermentation. The results of the temperature analysis tend to be stable as the fermentation process progresses until the last day of fermentation. The conclusion of this study is that pineapple waste can produced single cell protein from *Saccharomyces cerevisiae* culture and has different protein production with the addition of nutrients in the fermentation medium.

Keywords: pineapple waste, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstrak. Protein Sel Tunggal (PST) adalah protein yang berasal dari mikroba seperti bakteri, jamur, dan khamir. Limbah kulit nanas merupakan media alternatif yang memiliki sumber karbohidrat paling mudah diperoleh, sehingga berpotensi untuk pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui limbah kulit nanas dapat menghasilkan protein sel tunggal dari kultur *S. cerevisiae* dan untuk mengetahui perbedaan produksi protein dengan penambahan nutrisi pada medium fermentasi. Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Variabel bebas yaitu medium MFKN1 (Medium Fermentasi Limbah Kulit Nanas dengan penambahan nutrisi KH₂PO₄ dan gula) dan medium MFKN2 (Medium Fermentasi Limbah Kulit Nanas dengan penambahan nutrisi KH₂PO₄; (NH₄)₂SO₄ dan gula); dan lama fermentasi hari ke-0, 2, 4, dan 6. Variabel terikat yaitu analisis kadar protein, berat kering sel, kadar glukosa, pH dan suhu. Data hasil pada penelitian ini dianalisis statistik dengan metode *two way* Anova. Hasil penelitian ini diperoleh kadar protein tertinggi pada medium MFKN2 sebesar 0,43% (hari ke-4); berat kering sel 0,851 gram; kadar glukosa 1,3402%; pH 4,5 dan suhu 27,1 °C. Sedangkan pada medium MFKN1 diperoleh kadar protein tertinggi sebesar 0,38% (hari ke-6); berat kering sel 0,817 gram; kadar glukosa 1,3397%; pH 4 dan suhu 26,2 °C. Kesimpulan penelitian ini adalah limbah kulit nanas dapat menghasilkan protein sel tunggal dari kultur *S. cerevisiae* dan terdapat perbedaan hasil produksi protein dengan penambahan nutrisi pada medium fermentasi, dimana hasil kadar protein pada medium MFKN2 lebih tinggi dibandingkan pada medium MFKN1.

Kata kunci: protein sel tunggal, limbah kulit nanas, fermentasi, *Saccharomyces cerevisiae*

LATAR BELAKANG

Protein sel tunggal (PST) merupakan protein yang berupa sel kering atau biomassa renik seperti kapang, khamir, bakteri atau ganggang yang dapat digunakan sebagai sumber protein untuk pangan dan pakan. Dalam pembuatan protein sel tunggal selain jasad renik dengan daya rombak yang kuat, komposisi bahan dasar, teknologi proses

yang digunakan akan menentukan produk yang dihasilkan. Bahan baku dalam pembuatan protein sel tunggal (PST) harus mengandung air, sumber N, sumber C dan mineral (Naiola, 2008).

Mikroorganisme penghasil protein sel tunggal (PST) umumnya tumbuh pada limbah yang memiliki unsur karbon dan nitrogen. Bakteri, fungi, algae dan khamir merupakan jenis mikroorganisme yang mampu memproduksi protein sel tunggal (PST). Mikroorganisme yang digunakan sebagai penghasil protein sel tunggal (PST) harus memiliki beberapa kriteria yaitu tidak bersifat patogen, memiliki nilai nutrisi yang baik, dapat digunakan sebagai makanan atau pakan, tidak mengandung senyawa yang beracun, dan biaya produksinya murah (Inuhan *et al.*, 2016).

Salah satu mikroorganisme protein sel tunggal (PST) yang sedang dikembangkan ialah *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* merupakan khamir yang tergolong ke dalam kelas Ascomycetes yang banyak mengandung protein, karbohidrat, dan lemak sehingga dapat dikonsumsi oleh manusia dan hewan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi sehari-hari, selain itu *S. cerevisiae* mengandung vitamin yang merupakan vitamin B kompleks. Yeast jenis ini mampu berkembang biak didalam substrat yang mengandung gula sederhana seperti glukosa maupun gula kompleks disakarida seperti sukrosa. (Purwitasari *et al.*, 2004).

Nanas memiliki kandungan air 90% dan kaya akan kalium, kalsium, fosfor, magnesium, zat besi, natrium, iodium, sulfur, dan khlor. Selain itu, kaya asam, biotin, vitamin A, vitamin B12, vitamin C, vitamin E, dekstrosa, sukrosa atau tebu, serta enzim bromelin, yaitu enzim protease yang dapat menghidrolisis protein, protease, atau peptide sehingga dapat digunakan untuk melunakkan daging (Prahasta, 2009).

Limbah nanas yang belum banyak dimanfaatkan dan hanya dibuang sehingga akan menimbulkan masalah lingkungan atau pencemaran lingkungan maka pemanfaatan limbah buah nanas perlu diperhatikan untuk mengatasi hal tersebut. Salah satu alternatif pemanfaatan dari limbah buah nanas yaitu dapat dilakukan dengan fermentasi. Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Nutrien yang paling dibutuhkan oleh mikroba baik untuk tumbuh maupun untuk menghasilkan produk fermentasi adalah karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber karbon yang berfungsi sebagai penghasil energi bagi mikroba, sedangkan nutrien lain seperti protein dibutuhkan dalam jumlah lebih sedikit daripada karbohidrat (Azizah, dkk. 2012).

Penelitian sebelumnya menurut Adi *et al.* (2019) perlakuan terbaik pada limbah nanas didapat pada perlakuan P1 karena terjadi peningkatan protein kasar yang cukup tinggi mencapai 9,55%. Peningkatan ini diduga terjadi karena kapang mampu menggunakan bagian dari substrat untuk pertumbuhan dan pembentukan protein mikroba selama proses fermentasi dengan sempurna. Selain itu juga waktu terbaik fermentasi menggunakan *Aspergillus niger* yaitu 4 hari yang juga merupakan lama waktu inkubasi dari perlakuan P1. Peningkatan protein diduga karena adanya penambahan protein yang disumbangkan oleh sel mikroba akibat pertumbuhannya yang menghasilkan produk protein sel tunggal (PST) atau biomassa sel yang mengandung sekitar 40-65% protein (Krisnan *et al.*, 2005).

Menurut Ani (2012) Fermentasi limbah buah nanas melalui proses hidrolisis dapat menghasilkan alkohol dan hasil sampingnya berupa ampas yang masih bisa dimanfaatkan sebagai makanan ternak. Pembuatan alkohol dapat dilakukan dengan fermentasi limbah buah nanas melalui proses hidrolisis dengan menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Pada penelitian ini produksi CO₂ yang terbanyak terjadi pada percobaan dengan volume media fermentasi 300 mL dan dalam penambahan starter 8% (v/v) suhu 27 dan pH 4, sedangkan kadar alkohol relatif optimum diperoleh pada waktu 11 jam, suhu 27 dan pH 4 sebesar 3,7% berat dengan konversi 82,92%.

Menurut Masitoh (2012) Bekatul dapat digunakan untuk media pembuatan protein sel tunggal (PST) menggunakan khamir roti *S. cerevisiae* melalui fermentasi. Untuk memaksimalkan hasil fermentasi perlu ditambahkan unsur karbon seperti sukrosa yang berfungsi sebagai sumber energi dan sumber karbon. Penggunaan konsentrasi sukrosa yang sesuai akan berpengaruh baik terhadap pertumbuhan *S. cerevisiae* dalam media bekatul. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan dan kadar protein khamir roti *S. cerevisiae*. Konsentrasi sukrosa 0,5; 1,5; 2,5; 3,5 dan 4,5% berpengaruh terhadap pertumbuhan khamir roti *S. cerevisiae* pada media bekatul dalam produksi PST. Semakin tinggi konsentrasi sukrosa dari 0,5-3,5% pertumbuhan khamir roti *S. cerevisiae* meningkat, namun pada konsentrasi sukrosa 4,5% pertumbuhan *S. cerevisiae* menurun. Konsentrasi sukrosa 3,5% dalam waktu inkubasi 72 jam menghasilkan pertumbuhan dan kadar protein sel optimum yaitu sebesar 39,7% dibanding konsentrasi sukrosa 0,5; 1,5; 2,5; 4,5% dan kontrol.

Berdasarkan penjelasan di atas, maka peneliti melakukan penelitian tentang produksi protein sel tunggal dari kultur *Saccharomyces cerevisiae* dengan memanfaatkan limbah nanas (*Ananas comosus* L. Merr) sebagai mediumnya.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat. Dimana variabel bebas yaitu perlakuan penambahan nutrisi dan lama fermentasi untuk melihat variabel terikat yaitu analisis kadar protein, analisis berat kering sel, analisis kadar glukosa, analisis pH dan suhu.

Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua variabel yaitu:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan adalah medium fermentasi limbah nanas dengan penambahan nutrisi KH_2PO_4 dan gula (MFKN1) dan medium fermentasi limbah nanas dengan penambahan nutrisi KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan gula (MFKN2) serta lama fermentasi hari ke-0,2,4, dan 6.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yang digunakan adalah analisis kadar protein, analisis berat kering sel, analisis kadar glukosa, analisis pH dan suhu.

Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini terdiri dari analisis kadar protein untuk mengukur kadar protein dengan menggunakan metode Kjeldahl, analisis berat kering sel, analisis glukosa dengan menggunakan refraktometer, analisis pH dan suhu dengan menggunakan pH meter dan termometer.

Jadwal dan Lokasi Penelitian

Jadwal Penelitian

Penelitian di lakukan pada bulan Januari hingga April 2022.

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dilaboratorium yang berbeda. Fermentasi protein sel tunggal dilakukan dilaboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan. Pengukuran kadar protein dilakukan di laboratorium Biokimia Universitas Sumatera Utara. Pengukuran berat kering sel, pH, dan suhu dilakukan dilaboratorium terpadu Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

Bahan dan Alat

Bahan

Aquadest, gula pasir (sukrosa), biakan murni khamir *Saccharomyces cerevisiae*, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, selenium, asam sulfat pekat, NaOH 30%, indikator metil merah, indikator metil biru, asam klorida 0,1 N, H_3BO_3 3%, selenium.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator, autoklaf, erlenmeyer, kawat ose, cling wrap, pisau cutter, timbangan, pH meter, cawan petri, corong, *laminar air flow*, panci *stainless steel*, *refractometer*, cawan porselein, pipet, batang pengaduk, spatula, gelas ukur, termometer dan blender.

Pembuatan Reagen

1. Asam Klorida (HCl) 0,1 N

Pembuatan larutan HCl 0,1 N sesuai dengan prosedur yang tercantum pada Farmakope Edisi III Tahun 1979. Encerkan 8,3 ml $\text{HCl}_{(p)}$ dengan air suling hingga 1000 ml.

2. Asam Borat (H_3BO_3) 3%

Pembuatan larutan Asam Borat (H_3BO_3) 3% sesuai dengan prosedur yang tercantum pada Farmakope Edisi III Tahun 1979. Dilarutkan 3 g H_3BO_3 dengan air suling hingga 100 ml.

3. Natrium Hidroksida (NaOH) 30%

Pembuatan larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 30% sesuai dengan prosedur yang tercantum pada Farmakope Edisi III Tahun 1979. Dilarutkan 30 g NaOH dengan air suling hingga 100 ml.

4. Indikator Metil Merah 0,2%

Ditimbang 0,2 g indikator metil merah dilarutkan dengan etanol 96% sampai 100 ml.

5. Indikator Metil Biru 0,2%

Ditimbang 0,2 g indikator metil biru dilarutkan dengan etanol 96% sampai 100 ml.

6. Indikator Tashiro

Dicampurkan 2 bagian indikator metil biru 0,2% dan 1 bagian indikator metil merah 0,2% dalam etanol 96%.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini adalah *purposive sampling* (penunjukan langsung). Sampel limbah nanas diambil dari pasar Simalingkar, Medan.

Identifikasi Sampel

Limbah kulit nanas (*Ananas comosus* L. Merr) diidentifikasi di *Herbarium Medanese* (MEDA) Universitas Sumatera Utara.

Pengolahan Sampel

Limbah kulit nanas dibersihkan dengan cara dicuci dengan air mengalir kemudian dihancurkan dengan cara diblender sampai halus. Limbah kulit nanas yang sudah dihaluskan kemudian disaring untuk diambil filtratnya. Filtrat limbah kulit nanas yang sudah disaring disterilkan dengan cara dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit pada suhu 100 °C. Filtrat limbah kulit nanas yang sudah disterilkan didinginkan dengan cara dibiarkan disuhu ruang (Pawignya, 2011).

Penyiapan Formulasi Medium Fermentasi

Tabel 1. Formulasi Medium Fermentasi Limbah Kulit Nanas

Komposisi	Medium Fermentasi	
	MFKN1	MFKN2
KH ₂ PO ₄	0,1% (0,2 g)	0,1% (0,2 g)
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,1% (0,2 g)
Gula	2% (4g)	2% (4g)
Filtrat Limbah Nanas	ad 200 mL	ad 200 ml

Pembuatan medium fermentasi dilakukan dengan cara erlenmeyer dikalibrasi terlebih dahulu kemudian disterilkan. Erlenmeyer pertama yang sudah steril dimasukkan nutrisi KH₂PO₄ 0,1% dari 200 mL yaitu sebanyak 0,2 gram, ditambahkan gula pasir 2% dari 200 mL yaitu sebanyak 4 gram, ditambahkan filtrat limbah kulit nanas yang sudah steril dan dingin sampai tanda batas kalibrasi (MFKN1), ditambahkan NaOH sampai pH dari medium fermentasinya 5, kemudian disterilkan dengan cara dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit pada suhu 100 °C, kemudian didinginkan dengan cara dibiarkan disuhu ruang.

Erlenmeyer kedua yang sudah steril dimasukkan nutrisi KH₂PO₄ 0,1% dari 200 mL yaitu sebanyak 0,2 gram, (NH₄)₂SO₄ 0,1% dari 200 mL yaitu sebanyak 0,2 gram ditambahkan gula pasir 2% dari 200 mL yaitu sebanyak 4 gram, ditambahkan filtrat limbah kulit nanas yang sudah steril dan dingin sampai tanda batas kalibrasi (MFKN2), ditambahkan NaOH sampai pH dari medium fermentasinya 5, kemudian disterilkan dengan cara dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit pada suhu 100 °C, kemudian didinginkan dengan cara dibiarkan disuhu ruang (Somaye dkk, 2008).

Sumber Isolat

Isolat khamir *Saccharomyces cerevisiae* berasal dari biakan murni yang diperoleh dari marchgalery Kabupaten Jember-Jombang, Jawa Timur.

Identifikasi Khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Untuk mengidentifikasi khamir *S. cerevisiae* berdasarkan Cappucino (2002) dengan sedikit modifikasi dimana objek glass dibersihkan dengan alkohol hingga bebas lemak, kemudian dipanaskan pada nyala api bunsen atau api spiritus. *S. cerevisiae* diambil secara aseptis menggunakan kawat ose, kemudian ditaruh keatas objek glass yang ditetesi sedikit air kemudian ditutup deck glass. Diamati struktur khamir dengan menggunakan mikroskop, dimulai dari perbesaran rendah kemudian ke perbesaran tinggi (Cappucino, 2002).

Regenerasi Khamir

Diambil satu koloni khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan menggunakan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media Potato Dextrose Agar dengan menggores, setelah itu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 36 °C selama 18-24 jam.

Penyiapan Larutan NaCl 0.9%

Komposisi :	Natrium klorida	0.9 g
	Air suling steril	ad 100 mL

Ditimbang sebanyak 0,9 gram Natrium klorida lalu dilarutkan dalam air suling steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 mL sampai larut sempurna. Ditambahkan air suling steril sampai garis tanda, dimasukkan dalam Erlenmeyer steril yang bertutup lalu disterilkan pada autoklaf suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

Penyiapan Suspensi Standar Mc. Farland 0,5

Suspensi standar Mc. Farland 0,5 menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi khamir sama dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Komposisi :	Larutan asam sulfat 1%	9.95 mL
	Larutan barium klorida 1,1%	0.05 mL

Cara pembuatan :

Kedua larutan dicampurkan dalam labu tentu ukur 100 mL steril, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi khamir sama dengan kekeruhan suspensi standar Mc. Farland maka konsentrasi khamir 10^8 CFU/mL.

Tujuan dari pembuatan suspensi larutan Mc. Farland adalah sebagai referensi untuk menyesuaikan kekeruhan khamir suspensi sehingga jumlah khamir dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian (Fitri, 2015).

Penyiapan suspensi khamir *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan suspensi khamir dilakukan dengan menggunakan NaCl fisiologis 0.9%. Suspensi dibuat dengan cara beberapa ose kultur khamir uji dimasukkan kedalam NaCl

fisiologis 0.9% lalu divortex hingga homogen. Hasilnya dibandingkan dengan standar Mc.Farland (Lay, 1994).

Pembuatan starter

Pembuatan starter dilakukan dengan cara masing-masing medium fermentasi MFKN1 dan MFKN2 diambil 10% (v/v) dari 200 mL yaitu sebanyak 20 mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berbeda secara terpisah. Selanjutnya dibuat suspensi bakteri *S. cerevisiae* $OD_{600} = 0,5$ menggunakan larutan fisiologis (NaCl 0,9%) sebanyak 5% (v/v) dari media starter (Rahayu, 2018; Rahayu dkk., 2019). Suspensi bakteri $OD_{600} = 0,5$ sebanyak 5% (v/v) dari 20 mL yaitu 1 ml dimasukkan ke dalam masing-masing media starter MFKN1 dan MFKN2. Kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30 °C sambil sesekali diaduk agar homogen. Hingga diperoleh starter bakteri masing-masing media MFKN1 dan MFKN2.

Proses Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan dengan cara medium fermentasi yang terdapat dalam erlenmeyer pertama dan sudah ditambahkan nutrisi, ditambahkan starter yang sudah diinkubasi selama 2 hari, ditutup rapat, kemudian diinkubasi selama 6 hari dan dianalisis kadar protein, berat kering sel, kadar glukosa, pH dan suhu pada fermentasi hari ke-0, 2, 4, dan 6 (Pawignya, 2011)

Proses fermentasi dilakukan dengan cara medium fermentasi yang terdapat dalam erlenmeyer kedua dan sudah ditambahkan nutrisi, ditambahkan starter yang sudah diinkubasi selama 2 hari, ditutup rapat, diinkubasi selama 6 hari dan dianalisis kadar protein, berat kering sel, kadar glukosa, pH dan suhu pada fermentasi hari ke-0, 2, 4, dan 6 (Pawignya, 2011).

Analisis Kadar Protein

Medium fermentasi ditimbang sebanyak 1 g kemudian dimasukkan kedalam beaker labu kjeldahl lalu ditambahkan selenium sebanyak 0,2 g dan $H_2SO_{4(P)}$ 98% sebanyak 15 mL. setelah itu dipanaskan diatas kjeldahl apparatus sehingga diperoleh larutan berwarna bening kehijauan. Larutan tersebut kemudian didinginkan dan dimasukkan kedalam labu alas. Lalu ditambahkan aquadest sebanyak 100 ml dan $NaOH_{(aq)}$ 30% sampai pH menjadi basa. Kemudian didestilasi selama beberapa menit dan destilat yang diperoleh ditampung dalam erlenmeyer yang telah berisi H_3BO_3 3% dan indikator tashiro sehingga diperoleh larutan berwarna hijau. Larutan hijau yang diperoleh kemudian dititrasi dengan larutan standar $HCl_{(aq)}$ 0,1 N hingga berubah warna menjadi larutan ungu. Kemudian dihitung kadar proteinnya (SNI, 1992).

Kadar protein akan dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\%P = \frac{(Vs-VB) \times NHCl \times BM \text{ Nitrogen} \times fk}{m \times 1000} \times 100\% \text{ (Pawignya, 2011).}$$

Analisis Berat Kering Sel

Cawan porselein dibersihkan kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam. Cawan porselein didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian ditimbang untuk mengetahui beratnya. Perhitungan biomassa dilakukan dengan menentukan berat kering sel khamir. Dimasukkan 1 mL medium fermentasi kedalam sentrifuge kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Isolat yang disentrifugasi akan menghasilkan supernatan. Kemudian endapan sel khamir tersebut di masukkan kedalam cawan porselein kemudian di oven dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan disuhu ruang dan ditimbang berat keringnya. Berat kering yang didapatkan dikurang dengan berat kosong cawan porselein maka didapat biomassa khamir tersebut (Nasution *et al*, 2021).

Analisis Kadar Glukosa

Kadar glukosa limbah nanas yang terdapat pada medium fermentasi diukur dengan alat refraktometer. Dipipet medium fermentasi dan diteteskan ke alat refraktometer sampai lensa indeks bias nya tertutup. Kemudian dicatat kadar glukosanya.

Analisis pH dan Suhu

Analisis pH dan Suhu dilakukan menggunakan alat pH meter dengan cara dimasukkan pH meter dan termometer kedalam medium fermentasi dan dicatat hasilnya.

Analisa Data

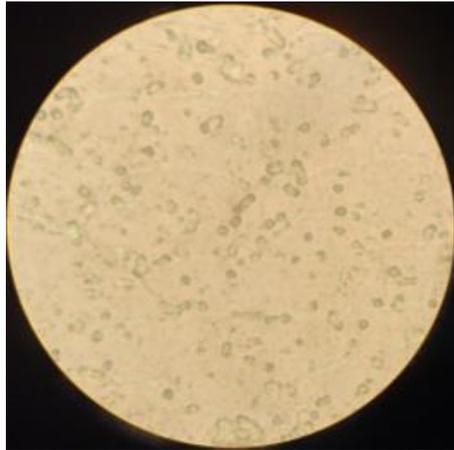
Data yang diamati meliputi kadar protein produk khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan berat kering sel pada media kultur dan media pemeliharaan lingkungan dilakukan dengan analisis sidik ragam (ANAVA), setelah itu dilakukan uji normalitas sebaran dan homogenitas ragam error. Jika diperoleh perbedaan signifikan diantara setiap perlakuan maka dilanjutkan dengan uji wilayah ganda dari Duncan/DMRT (Duncan`s new Multiple Range Test) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dan perlakuan mana yang memberikan pengaruh terbaik (Gomez, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Determinasi Tanaman

Hasil identifikasi tumbuhan yang dilakukan di *Herbarium Medanese* (MEDA) Pusat Penelitian Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara membuktikan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah kulit nanas (*Ananas comosus* L.Merr). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 2.

Hasil Identifikasi Khamir *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 1. Khamir *Saccharomyces cerevisiae* perbesaran 100x

Hasil identifikasi khamir *Saccharomyces cerevisiae* secara mikroskopis menunjukkan bahwa sel khamir memiliki ciri berbentuk oval, satu sel memiliki satu nukleus dan dari kumpulan sel menunjukkan terdapat sel tunggal dan berpasangan. Reproduksi aseksual dilakukan dengan pertunasan multilateral. Ciri-ciri ini sesuai dengan Muhibuddin *et al.* 2016 yang mendeskripsikan bahwa sel khamir *S. cerevisiae* berbentuk bulat sampai oval dan multilateral budding.

Reproduksi *S. cerevisiae* dilakukan dengan membentuk tunas dan spora seksual (Fardiaz, 1992; Jutono dkk., 1980). Menurut Martinez (2004), *S. cerevisiae* merupakan organisme uniseluler yang memiliki sifat fisiologis antara lain bersifat fluktuatif anaerob, tidak memiliki miselium sel, sel berbentuk oval atau bulat, diameter sel berkisar 5-10 μ m, dinding sel tersusun atas β -1,6 glukukan dan mannan dan bereproduksi secara pertunasan (budding).

Hasil Pengolahan Limbah Nanas

Hasil pengolahan limbah nanas (*Ananas comosus* L.Merr) dengan berat basah 2 kg, diperoleh filtrat limbah nanas sebanyak 500 mL.

Hasil Analisis Kadar Protein

Hasil kadar protein dapat dilihat dari Tabel 2 dan gambar 2.

Tabel 2. Hasil Analisis Kadar Protein

Medium Fermentasi	Kadar Protein (%)			
	Fermentasi Hari Ke-			
	H0	H2	H4	H6
MFKN1	0,43	0,29	0,35	0,38
MFKN2	0,56	0,38	0,43	0,29

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

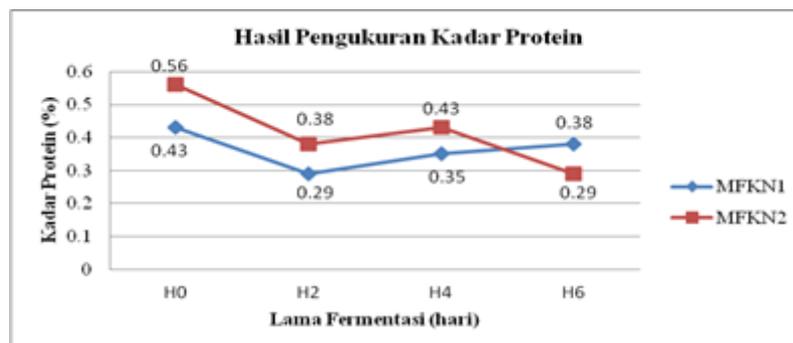
MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6



Gambar 2. Grafik hubungan lama fermentasi terhadap kadar protein

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6

Hasil kadar protein pada lama fermentasi hari ke-0 pada MFKN1 sebanyak 0,43%, sedangkan pada MFKN2 diperoleh kadar protein sebanyak 0,56%. Pada lama fermentasi hari ke-2 kadar protein mengalami penurunan baik pada MFKN1 maupun pada MFKN2 diperoleh kadar protein sebanyak 0,29% dan 0,38% hal ini dikarenakan pertumbuhan *saccharomyces cerevisiae* mengalami fase adaptasi, yang dimana pada fase ini *S. cerevisiae* menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya dan belum mengadakan perbanyakan sel. Pada lama fermentasi hari ke-4 kadar protein mengalami peningkatan baik MFKN1 maupun pada MFKN2 diperoleh kadar protein sebanyak 0,35% dan 0,43%. Pada lama fermentasi hari ke-6 terdapat perbedaan perolehan kadar protein antara MFKN1 maupun pada MFKN2 yang dimana pada MFKN1 kadar protein yang diperoleh mengalami peningkatan sedangkan pada MFKN2 diperoleh penurunan kadar protein yakni 0,38% dan 0,29% hal ini dikarenakan pada MFKN1 pertumbuhan *S. cerevisiae* memasuki fase stasioner, yang dimana pada fase ini jumlah sel yang bertambah dan jumlah sel mati relative seimbang. Sedangkan, pada MFKN2 pertumbuhan *S. cerevisiae* memasuki fase kematian dipercepat, jumlah sel-sel yang mati lebih banyak daripada sel-sel yang masih hidup. Peningkatan protein diduga karena adanya penambahan protein yang disumbangkan oleh sel mikroba akibat pertumbuhannya yang menghasilkan produk protein sel tunggal (PST) atau biomassa sel yang mengandung sekitar 40-65% protein (Krisnan *et al.*, 2005)

Hasil kadar protein tertinggi yang diperoleh dari media fermentasi MFKN1 yaitu 0,35% pada lama fermentasi hari ke-4. Sedangkan pada media fermentasi MFKN2 diperoleh kadar protein tertinggi sebanyak 0,43% pada lama fermentasi hari ke-4. Sehingga diperoleh perbandingan bahwa media fermentasi MFKN2 dapat menghasilkan kadar protein daripada media fermentasi MFKN1. Hal ini berhubungan dengan ketersediaan nutrisi dalam medium. Menurut Fardiaz (1992), semakin baik nutrisi di dalam substrat tempat tumbuhnya, maka pertumbuhan sel semakin cepat yang akan meningkatkan kadar protein sel. Selain itu, kadar protein sel dipengaruhi oleh waktu pembiakan. Menurut Kuswardani dan Wijajaseputra (1998) waktu pembiakan yang terlalu singkat akan menghasilkan PST dalam jumlah rendah karena biokonversi komponen medium belum optimal. Sedangkan waktu pembiakan yang terlalu lama akan menyebabkan penurunan protein yang terakumulasi dalam PST akibat autolisis untuk memenuhi kebutuhan energinya sehubungan dengan ketersediaan nutrisi dalam medium yang semakin tidak mencukupi.

Selama fermentasi berjalan pada hari ke-4 *S. cerevisiae* mengalami pertumbuhan yang cepat karena nutrisi yang terkandung dalam medium tersedia dalam jumlah yang berlebih untuk dimanfaatkan *S. cerevisiae* bagi pertumbuhannya. *S. cerevisiae* memanfaatkan protein,

karbon, dan mineral dalam medium sebagai substrat metabolisme untuk sintesis komponen sel. Protein, karbon, dan mineral tersebut dapat diperoleh dari ekstrak khamir, pepton, dekstrosa, limbah kulit nanas. Menurut Machud dkk. (1989), peningkatan jumlah sel dan massa sel menandai adanya pertumbuhan mikroorganisme. Kemudian menurut Fardiaz (1987), semakin tinggi kecepatan pertumbuhan semakin banyak jumlah massa sel. Hasil analisis kadar protein dapat dilihat pada lampiran 3.

Hasil Analisis Berat Kering Sel

Hasil analisis berat kering sel dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.3.

Tabel 3. Hasil Analisis Berat Kering Sel

Medium Fermentasi	Berat Kering Sel (g)			
	Fermentasi Hari Ke-			
	H0	H2	H4	H6
MFKN1	0,827	0,774	0,845	0,817
MFKN2	0,885	0,828	0,851	0,814

Keterangan :

MFKN1 : Media Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

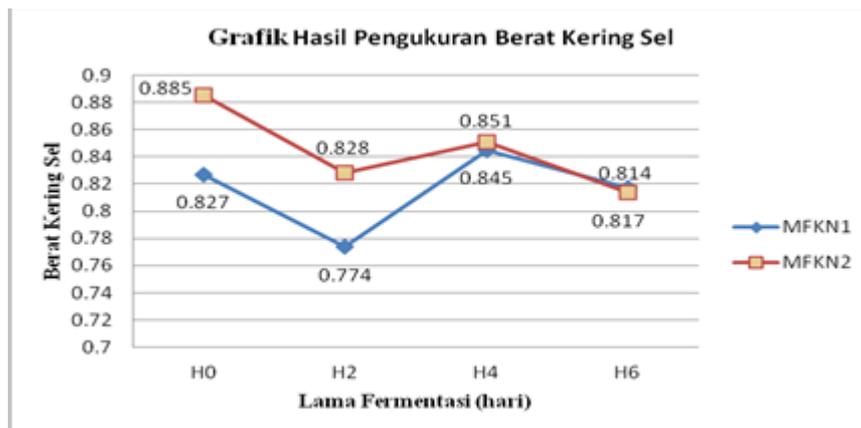
MFKN2 : Media Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6



Gambar 3. Grafik hubungan antara lama fermentasi (hari) dengan hasil analisis berat kering sel

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6

Hasil berat kering sel tertinggi terdapat pada media fermentasi MFKN1 pada hari ke-4 sebanyak 0,845 g sedangkan pada media fermentasi MFKN2 didapat hasil berat kering sel tertinggi pada lama fermentasi hari ke-4 sebanyak 0,851 g. Berat kering sel dipengaruhi oleh media pertumbuhan dan dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.3 berat kering sel optimum didapat pada hari ke-4.

Pengaruh perbedaan penambahan nutrisi dan lama fermentasi berpengaruh secara signifikan terhadap berat kering sel yang dihasilkan dalam proses fermentasi seperti terlihat pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.3.

Selain pengaruh perbedaan penambahan nutrisi dalam media fermentasi, lama fermentasi juga berpengaruh terhadap berat kering sel khamir. Lama fermentasi hari ke-0, 2, 4, dan 6 berbeda signifikan terhadap berat kering sel. Semakin lama fermentasi, berat kering sel yang dihasilkan meningkat sampai hari ke-4. Berat kering sel yang dihasilkan selama proses fermentasi ditentukan oleh jumlah sel yang tumbuh. Semakin banyak jumlah sel yang dihasilkan, maka berat kering sel meningkat. Dalam produksi Protein Sel Tunggal ini lama fermentasi pada hari ke-4 dapat mengoptimalkan pertumbuhan sel khamir karena sel membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik yang ditandai dengan jumlah sel hidup lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah sel yang mati, sehingga meningkatkan hasil berat kering sel (Masithoh,2012). Hasil analisis berat kering sel dapat dilihat pada lampiran 10.

Hasil Analisis Kadar Glukosa

Hasil analisis kadar glukosa dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.4.

Tabel 4. Hasil Analisis Kadar Glukosa

Medium Fermentasi	Kadar Glukosa (%)			
	Fermentasi Hari Ke-			
	H0	H2	H4	H6
MFKN1	1,3409	1,3392	1,3401	1,3397
MFKN2	1,3423	1,3395	1,3402	1,3390

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

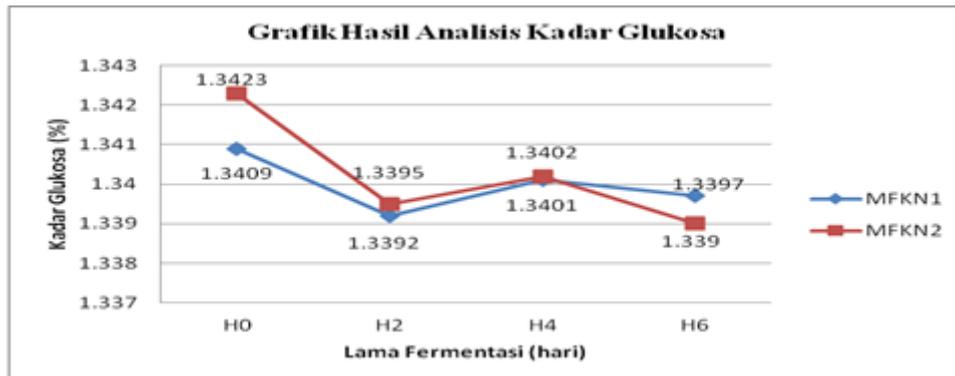
MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6



Gambar 5. Grafik hubungan antara lama fermentasi dan Hasil Analisis Kadar Glukosa

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6

Hasil pengukuran kadar glukosa tertinggi didapat pada media fermentasi MFKN2 pada hari ke-4 sebanyak 1,3402%. *Saccharomyces cerevisiae* berkembang biak dengan membelah dirimelalui “budding cell”. Yeast jenis ini mampu berkembang biak didalam substrat yang mengandung gula sederhana seperti glukosa maupun gula kompleks disakarida seperti sukrosa. Lama fermentasi pada hari ke-2 kadar glukosa menurun karena *S. cerevisiae* mengalami fase adaptasi yang dimana pada fase ini *S. cerevisiae* terlebih dahulu menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya dan belum mengadakan perbanyakan sel, pada hari ke-4 kadar glukosa meningkat karena *S. cerevisiae* mengalami fase eksponensial yang dimana pada fase ini *S. cerevisiae* telah dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya.

Pembelahan sel terjadi sangat cepat secara eksponensial. Pada hari ke-6 kadar glukosa menurun dikarenakan *S. cerevisiae* mengalami fase kematian atau jumlah sel menurun.

Menurut (Muhammad *et al.*, 2017), semakin lama waktu fermentasi, maka kadar glukosa dalam tape onggok semakin meningkat hingga jam ke-72. Hal ini disebabkan adanya aktivitas mikroba dalam ragi yang semakin meningkat dalam memecah pati onggok menjadi glukosa, seiring dengan fermentasi glukosa menjadi alkohol. Pada jam ke-96 kadar glukosa mengalami penurunan. Diduga aktivitas metabolisme mikroba dalam ragi mulai dibatasi dengan semakin bertambahnya alkohol. Hasil analisis kadar glukosa dapat dilihat pada lampiran 11.

Hasil Analisis pH

Hasil Analisis pH dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.5.

Tabel 5. Hasil Analisis pH

Medium Fermentasi	Nilai Ph			
	Fermentasi Hari Ke-			
	H0	H2	H4	H6
MFKN1	5	4,6	4,4	4
MFKN2	5	4,6	4,5	3,8

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

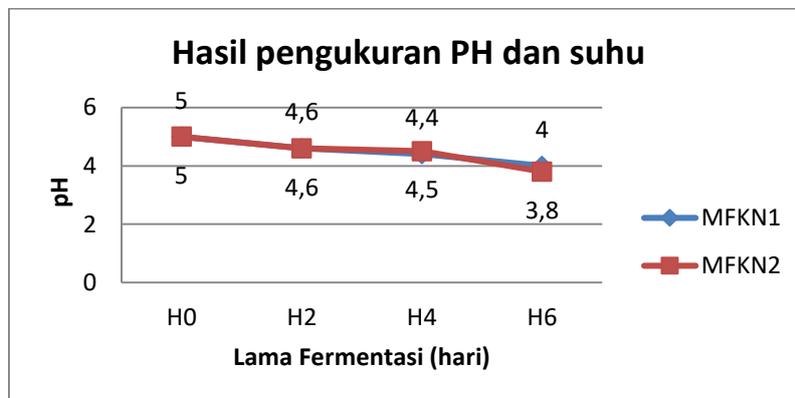
MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6



Gambar 6. Grafik hubungan antara lama fermentasi dan Hasil Analisis pH

Keterangan	:
MFKN1	: Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula
MFKN2	: Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula
H0	: Fermentasi Hari ke-0
H2	: Fermentasi Hari ke-2
H4	: Fermentasi Hari ke-4
H6	: Fermentasi Hari ke-6

Hasil analisis pH pada medium fermentasi MFKN1 dan MFKN2 menggunakan *S. cerevisiae* berlangsung selama 6 hari. Selama fermentasi terjadi perubahan pH media fermentasi karena pengaruh perlakuan penambahan nutrisi dan lama fermentasi. Perlakuan penambahan nutrisi, lama fermentasi berbeda signifikan terhadap perubahan pH medium fermentasi. Hal ini disebabkan sumber karbon dalam medium mulai tidak mencukupi sehingga terjadi pembongkaran protein dalam medium untuk aktivitas metabolismenya. Proses metabolisme tersebut akan menghasilkan metabolit-metabolit hasil degradasi protein seperti urea dan ion-ion amonium yang dapat menyebabkan kenaikan pH (Kuswardani dan Wijajaseputra, 1998). Namun, perubahan pH selama fermentasi oleh *S. cerevisiae* masih dalam kisaran pH untuk pertumbuhan *S. cerevisiae* yaitu 3,8-4,6 seperti terlihat pada Tabel 6 dan Gambar 7 Pawignya (2011) menyatakan bahwa pH untuk pertumbuhan *S. cerevisiae* berkisar antara 3,5-5,5.

Selama proses fermentasi terjadi penurunan pH medium, hal ini disebabkan karena *S. cerevisiae* selama fermentasi mampu menghasilkan CO_2 dan metabolit sekunder seperti asam-asam organik. Amerine dalam Wignyanto (2001) menyatakan bahwa perubahan pH selama fermentasi oleh *S. cerevisiae* disebabkan karena dalam aktivitasnya, sel *S. cerevisiae* selain menghasilkan etanol sebagai metabolit primer dan juga menghasilkan asam-asam organik seperti asam malat, asam sitrat, asam asetat, asam tartarat, asam laktat, asam butirat dan asam propionate sebagai hasil sampingan. Asam-asam inilah yang berperan dalam menurunkan pH medium. Hasil analisis pH dapat dilihat pada lampiran 12.

Hasil Analisis Suhu

Hasil Analisis suhu dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 7.

Tabel 6. Hasil Analisis Suhu

Medium Fermentasi	Suhu (°C)			
	Fermentasi Hari Ke-			
	H0	H2	H4	H6
MFKN1	26,5	31,2	26,3	26,2
MFKN2	26,4	30,4	27,1	28

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

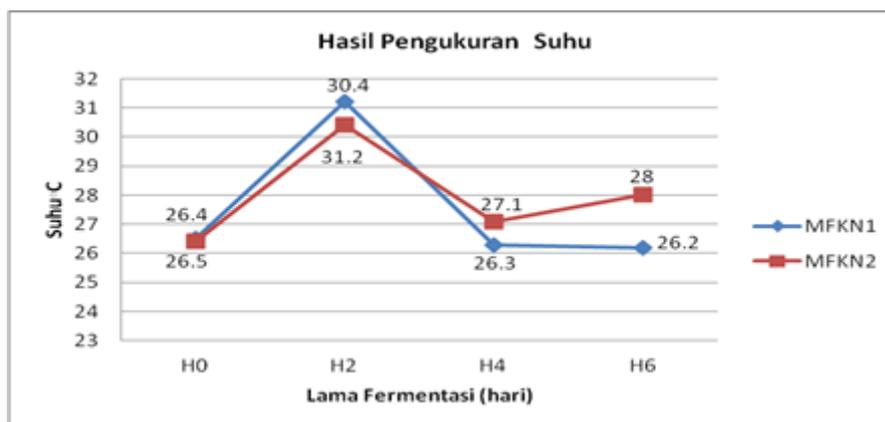
MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6



Gambar 7. Grafik hubungan antara lama fermentasi dan Hasil Analisis Suhu

Keterangan :

MFKN1 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + Gula

MFKN2 : Medium Fermentasi Kulit Nanas + KH_2PO_4 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Gula

H0 : Fermentasi Hari ke-0

H2 : Fermentasi Hari ke-2

H4 : Fermentasi Hari ke-4

H6 : Fermentasi Hari ke-6

Suhu mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Setiap spesies mempunyai rentang suhu yang ditentukan oleh sensitivitas sistem enzim terhadap panas. Suhu optimum yang dapat menunjang pertumbuhan *S. cerevisiae* yaitu berkisar antara 25°C-30°C. Pada Tabel 6 dan gambar 7 bahwa hasil pengukuran suhu pada MFKN1 semakin lama fermentasi maka suhu mengalami penurunan. Sedangkan pada MFKN2 lama fermentasi mempengaruhi kenaikan pada hari ke-2 dan hari ke-6 dan mengalami penurunan suhu pada hari ke-4.

Menurut Forsith (1963), *S. cerevisiae* mempunyai suhu optimal untuk pertumbuhan mikroba. Suhu dibawah minimal dan diatas maksimal dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim sehingga tidak dapat tumbuh. Sebagian besar *S. cerevisiae* umumnya tumbuh baik pada kisaran suhu 25-46 °C. Maka rata-rata suhu yang didapat yaitu antara 26,2-31,2 °C tidak menyebabkan pertumbuhan *S.cerevisiae* terhambat. Hasil analisis suhu dapat dilihat pada lampiran 12.

Hasil Analisis Data

Hasil uji normalitas dari kadar protein, diketahui nilai p (Sig.) $0.471 > 0.05$ maka H_0 diterima data berdistribusi normal. Sehingga data dalam penelitian ini berasal dari populasi dalam sebaran yang normal dan dapat dilakukan pengujian homogenitas varians data. Hasil uji homogenitas dari kadar protein, diketahui jika standar deviasi bernilai konstans, maka berdasarkan hasil tersebut pengujian hipotesis penelitian tidak dapat dilanjutkan.

Hasil uji normalitas dari berat kering sel, diketahui nilai p (Sig.) $0.632 > 0.05$ maka H_0 diterima data berdistribusi normal. Sehingga data dalam penelitian ini berasal dari populasi dalam sebaran yang normal dan dapat dilakukan pengujian homogenitas varians data. Hasil uji homogenitas dari berat kering sel diketahui jika standar deviasi bernilai konstans, maka berdasarkan hasil tersebut, pengujian hipotesis penelitian tidak dapat dilanjutkan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa limbah nanas dapat menghasilkan protein sel tunggal dari kultur *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa terdapat perbedaan hasil produksi protein dengan penambahan nutrisi pada media fermentasi, dimana hasil kadar protein pada media MFKN2 lebih tinggi dibandingkan kadar protein pada media MFKN1.

Saran

Disarankan pada peneliti selanjutnya untuk melakukan variasi pH agar dapat mengetahui perbedaan yang didapat dalam mengetahui kadar protein, berat kering sel dan kadar glukosa.

DAFTAR REFERENSI

- Adi, P. K., Siti, C., dan Mashudi. (2019). Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Limbah Buah Nanas (*Ananas comosus* L. Merr) Terhadap Kualitas Fisik Dan Kandungan Nutrien Menggunakan *Aspergillus niger*
- Ahmad, R. Zainuddin. 2005. Pemanfaatan Khamir *Saccharomyces cerevisiae* Untuk Ternak. Balai Penelitian Veteriner. Bogor 16114.
- Aini, N., 2015. Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Amaria, Isnawati, Rini, & Tukiran. 2001. Biomassa *Saccharomyces cerevisiae* dari Limbah Buah dan Sayur Sebagai Sumber Vitamin B. Himpunan Makalah Seminar Nasional Teknologi Pangan. 150p.
- Andarwulan, N., Kusnandar, F., dan Herawati. 2011. Analisis Pangan. Dian Rakyat: Jakarta
- AOAC International. 1999. *Official Method of Analysis*.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz, N.L. Puspitasari, S. Yasni dan S. Budiyanto. 1989. Petunjuk Praktikum Analisis Pangan. IPB Press, Bogor.
- Azizah, N., Al-Barrii, A. N., & Mulyani, S. (2012). Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar alkohol, pH, dan produksi gas pada proses fermentasio bioetanol dari *whey* dengan substitusi kulit nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 1(3), 72–78.
- Barus, A. 2008. Agroteknologi Tanaman Buah-buahan. USU-Press. Medan. 162 hal.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (2000). *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi* (Third Edition). Minneapolis, Minnesota : Burges Publishing Company.
- Cappucino, J. G., and Sherman, N., 2014. *Manual Laboratorium Mikrobiologi*. 8th ed. J. Manurung dan H. Vidhayanti, Ed.. Jakarta: EGC.
- Cooney, C.L., 1981, "Growth of Microorganism in Biotechnology", Verlag, Chemie, Weinheim
- Dwidjoseputro, D. 2005. Pengantar Mikologi. Penerbit Alumni. Bogor
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Fitri, K, S.A., Agung, M.U.K., dan Meika, J. 2015. *Larutan McFarland standar digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan kekeruhan bakteri suspensi sehingga jumlah bakteri dalam kisaran yang diberikan untuk membakukan mikroba pengujian*. *Jurnal Akuatika*, 6(2) : 128-139
- Forsith, W.G.C V.C, Quesnel. 1963. *Mechanisme of Cacao Cuning Advence in Enzimologist*. New York: Mc Graw Hill Book Co.
- Inuhan, B; Savante. A., & Muhammad. A.W. 2016. Optimasi Produksi Protein Sel Tunggal (PST) Dari Bakteri Yang Terdapat Pada Gastrointestinal (GI) Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dan Ikan Kembung (*Scomber canagorta*). JKK. Vol

5(1): 24-28

- Irfandi. 2005. Karakterisasi Morfologi Lima Populasi Nanas (*Ananas Comosus* (L.) Merr.) Skripsi. Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Krisnan, R. (2005). The effect of application of tea waste (*Camellia sinensis*) fermented with *Aspergillus niger* on broiler. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 10(1), 1–5. <https://doi.org/10.14334/JITV.V10I1.470>
- Kuswardani, I dan A. I. Wijajaseputra. 1998. Produksi Protein Sel Tunggal *Phanerochaete chrysosporium* pada media limbah cair tahu yang diperkaya: kajian optimasi waktu panen. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi*. 604-613.
- Kwoseh, C. K., Asomani-Darko, M., and Adubofour, K., 2012. Cassava starch-agar blend as alternative gelling agent for mycological culture media. *Bots. J. Agric. Appl. Sci*, 8(1).
- Lay, B. W. (1994). *Analisis Mikroba Di Laboratorium*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.