

# NICHE Journal of Tropical Biology

Available online: <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/niche>

## Pengaruh variasi sumber karbon terhadap aktivitas enzim isolat khamir Ep A dari limbah kulit buah nanas madu (*Ananas comocus* L.)

The effect of variation of carbon sources on the activity of Ep A yeast isolate enzyme from honey pineapple rind (*Ananas comosus* L.)

Evi Simanjuntak<sup>a</sup>, Endang Kusdiyantini<sup>a\*</sup>, Arina Tri Lunggani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto No.13, Kec. Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275

### ABSTRACT

Ep A isolate is a yeast isolated from the waste of honey pineapple (*Ananas comosus* L.). This isolate has enzyme activity like most yeasts. The purpose of this study was to determine what enzymes were produced by Ep A yeast isolates and to analyze the effect of variations in carbon sources on the enzyme activity. The research methods included qualitative enzymatic testing using selective media for amylase, lipase, cellulase and protease, starter production in YEPG medium (Yeast Extract Peptone Glucose) for 24 hours, growth and enzyme activity using YEPG medium with a variation of 2% carbon sources of glucose, fructose and galactose using YEPG media then glucose replaced with 2% fructose and galactose. Growth was measured by cell dry weight, enzyme activity was analyzed by the DNS method. This research used a factorial completely randomized design (RAL). Data were analyzed using One-Way ANOVA test and Duncan's continued test. The qualitative test results showed that Ep A yeast isolate could only produce amylase enzyme with a clear zone around the colony visible. The highest amylase enzyme activity was produced in the treatment with glucose carbon sources, namely 0.033 U/mL, fructose 0.032 U/mL and galactose 0.031 U/mL. The results of the analysis using the One-Way ANOVA test showed a significant effect ( $p < 0.05$ ) of the variation in the carbon source used. This research shows that Ep A yeast isolate can produce amylase enzymes and amylase activity is influenced by carbon sources.

**Keywords:** Carbon Sources, Enzymes, Enzyme Activity, Yeast

### ABSTRAK

Isolat Ep A merupakan khamir yang diisolasi dari limbah kulit buah nanas madu (*Ananas comosus* L.). Isolat ini mempunyai aktivitas enzim seperti pada umumnya khamir. Tujuan penelitian ini adalah menguji enzim apa yang dihasilkan isolat khamir Ep A dan menganalisis pengaruh variasi sumber karbon terhadap aktivitas enzim. Metode penelitian meliputi uji enzimatik secara kualitatif menggunakan media selektif untuk amilase, lipase, selulase dan protease. Starter dikulturkan menggunakan medium YEPG (*Yeast Extract Peptone Glucose*) selama 24 jam. Pertumbuhan dan aktivitas enzim menggunakan medium YEPG dengan variasi sumber karbon glukosa, fruktosa, dan galaktosa sebanyak 2%. Pertumbuhan diukur dengan berat kering sel, aktivitas enzim dianalisis dengan metode DNS. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial. Data dianalisis menggunakan uji One-Way ANOVA dan uji lanjut Duncan. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa isolat khamir Ep A hanya dapat memproduksi enzim amilase dengan terlihat adanya zona bening di sekitar koloni. Aktivitas enzim amilase tertinggi dihasilkan pada perlakuan dengan sumber karbon yaitu glukosa sebesar 0,033 U/mL, fruktosa sebesar 0,032 U/mL dan galaktosa sebesar 0,031 U/mL. Hasil analisis menggunakan uji One-Way ANOVA menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dari variasi sumber karbon yang digunakan. Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat khamir Ep A dapat memproduksi enzim amilase dan aktivitas amilase dipengaruhi oleh sumber karbon.

**Kata kunci:** Enzim, Khamir, Sumber Karbon, Aktivitas Enzim

\*Penulis korespondensi: [kusdiyantini@yahoo.com](mailto:kusdiyantini@yahoo.com)

## I. PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang terdiri dari berbagai jenis tumbuhan, hewan dan mikroba yang memiliki potensi dalam produksi enzim. Enzim bekerja untuk memudahkan ribuan reaksi kimia untuk memungkinkan sel untuk hidup dan berkembang. Beberapa tahun terakhir ini, industri enzim telah berkembang pesat dan berperan penting dalam dunia industri. Kesadaran masyarakat dengan kondisi lingkungan saat ini menjadikan enzim sebagai salah satu alternatif untuk menggantikan proses kimia dalam bidang industri.

Salah satu jenis mikroorganisme yang banyak menghasilkan enzim adalah khamir. Khamir adalah mikroorganisme uniseluler yang dapat hidup dalam berbagai jenis habitat. Khamir dapat dimanfaatkan dalam bidang pertanian, bidang peternakan, industri pangan dan industri kimia. Khamir banyak ditemukan pada buah-buahan, salah satunya adalah nanas madu. Nanas madu banyak mengandung gula tetapi kandungan airnya lebih sedikit dibandingkan dengan nanas pada umumnya. Jenis gula yang terdapat pada nanas madu adalah sukrosa (6,47 g), fruktosa (2,15 g), dan dekstrosa (1,70 g) (USDA, 2018).

Media pertumbuhan merupakan salah satu faktor penting yang diperlukan untuk menumbuhkan dan mempelajari sifat-sifat mikroorganisme. Media harus mencukupi nutrisi, sumber energi dan kondisi lingkungan tertentu (Aini & Rahayu, 2015). Khamir biasanya menggunakan glukosa sebagai sumber karbon. Namun, ketika glukosa tidak tersedia, sumber karbon yang digunakan untuk energi metabolisme dan biomassa seluler adalah gula alternatif seperti galaktosa, sukrosa, dan maltosa serta karbon nonsugar seperti etanol, laktat, gliserol, dan oleat (Bernard dkk, 2009).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian ini dengan tujuan menguji aktivitas enzim pada isolat khamir Ep A dan mengetahui pengaruh variasi sumber karbon terhadap aktivitas enzim. Sumber karbon yang digunakan adalah glukosa, fruktosa dan galaktosa.

## II. MATERI DAN METODE

Isolat khamir Ep A diperoleh dari koleksi laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro.

Proses peremajaan, uji enzimatik secara kualitatif, pengukuran pertumbuhan dan pengukuran aktivitas enzim dilakukan di laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan dari Februari 2020 sampai dengan Juni 2020.

### Peremajaan Isolat khamir Ep A

Peremajaan kultur biakan murni dilakukan dengan menumbuhkan kultur biakan murni pada media YEPG dalam cawan petri. Kultur biakan murni diambil dari isolat khamir Ep A hasil isolasi dari buah nanas madu (*Ananas comosus* L) yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Departemen Biologi Universitas Diponegoro. Hasil inokulasi dalam cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 72 jam.

### Uji Enzimatik

- a. Uji aktivitas selulase  
Kultur khamir yang diperoleh kemudian di ujikan pada medium CMC agar dan diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 28°C. Setelah itu, medium diberi congo red 0,1% dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu 28°C. Medium yang telah ditunggu kemudian dibilas dengan NaCl 1M selama 15 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni (Adelabu *et al.*, 2019).
- b. Uji aktivitas amilase  
Kultur khamir yang telah diperoleh diinokulasikan dalam medium YEPG yang telah diberi penambahan amilum 0,2 %. Hasil inokulasi diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam kemudian ditambahkan larutan iodin. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening yang muncul disekitar koloni (Freire *et al.*, 2017).
- c. Uji aktivitas protease  
Kultur khamir yang telah diperoleh kemudian diinokulasikan ke dalam medium skim milk agar (Budak *et al.*, 2016). Inkubasi dilakukan selama 48 jam dengan suhu 28°C. Aktivitas protease akan terlihat dengan adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni.
- d. Uji aktivitas enzim lipase

Kultur khamir yang telah diperoleh diinokulasikan pada medium YEPG yang telah ditambahkan dengan minyak kelapa sebagai sumber lipid (Ayadi *et al.*, 2018). Hasil inokulasi kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C. Aktivitas lipase akan terlihat dengan adanya zona bening disekitar koloni.

### Pengukuran Pertumbuhan Sel Khamir

Kultur khamir pada starter setelah 24 jam diambil sebanyak 5% (v/v), diinokulasikan pada medium produksi steril pada erlenmeyer dengan sumber karbon yang bervariasi yaitu glukosa, fruktosa dan galaktosa. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi dengan *rotary shaker* agitasi 120 rpm pada suhu 28°C. Pengukuran pertumbuhan sel khamir dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1,5 mL setiap pagi dan sore selama 6 hari kemudian tiap sampel yang diperoleh di sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Dari hasil sentrifugasi akan diperoleh natan (pelet) dan supernatan. Hasil sentrifugasi berupa natan digunakan untuk pengukuran pertumbuhan sel khamir. Hasil sentrifugasi berupa supernatan merupakan *crude enzyme* yang akan digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim.

Pengukuran pertumbuhan dilakukan dengan mengukur berat kering dari pelet yang diperoleh dari hasil sentrifugasi. Pengukuran berat kering dilakukan dengan menggunakan metode Scragg (1991) yaitu pelet dicuci dengan akuades 1,5 mL dan disentrifugasi kembali, kemudian pelet yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 90°C selama 20 jam atau sampai mendapatkan berat konstan lalu dilakukan penimbangan. Berat kering sel (X) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$X \text{ (g/L)} = \frac{\text{berat tabung berisi sel kering (g)} - \text{berat tabung kosong (g)}}{\text{volume sampel (mL)}} \times 10^3$$

### Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengukuran aktivitas enzim secara kuantitatif menggunakan reagen *3,5-Di Nitro Salisilic Acid* (DNS) berdasarkan estimasi jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari substrat. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan enzim kasar yang digunakan untuk uji aktivitas enzim dengan metode gula reduksi. Supernatan hasil sentrifugasi disimpan dalam kulkas pada suhu 4°C.

Aktivitas enzim dianalisis dengan cara menyiapkan 4 reaksi yang berbeda pada tabung reaksi. Reaksi- reaksi tersebut antara lain reaksi enzim substrat (ES), reaksi substrat (S), reaksi enzim (E), dan reaksi blanko. Reaksi enzim substrat (ES) berisi 0,5 mL substrat ; 0,4 mL buffer sodium asetat; dan 0,1 mL crude enzim. Reaksi substrat (S) berisi substrat 0,5 mL; buffer asetat 0,4 mL, dan akuades 0,1 mL. Reaksi enzim (E) berisi 0,4 mL buffer sodium asetat; 0,1 mL crude enzim; 0,5 mL akuades. Reaksi blanko berisi buffer sodium asetat 0,4 mL dan akuades 0,6 mL. Setiap reaksi (ES, S, E) dari tiap umur kultur diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Tiap tabung sampel dimasukkan dalam air mendidih selama 5 menit untuk menghentikan reaksi enzim yang terjadi. Sampel yang telah dingin ditambahkan reagen DNS sebanyak 1 mL dan dipanaskan kembali dalam air mendidih selama 3 menit. Selanjutnya setiap tabung reaksi (ES, S, E) ditambahkan 5 mL akuades untuk diukur kerapatan dan optisnya dengan spektrofotometer ( $\lambda 570 \text{ nm}$ ). Aktivitas enzim diperlakukan menggunakan 3 jenis sumber karbon yaitu glukosa, fruktosa dan galaktosa. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

Nilai aktivitas enzim ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut:

$$AE = \frac{(\text{AbsES} - \text{AbsE} - \text{AbsS}) \text{ glukosa} \times 1000}{\text{BM produk} \times t}$$

Keterangan :

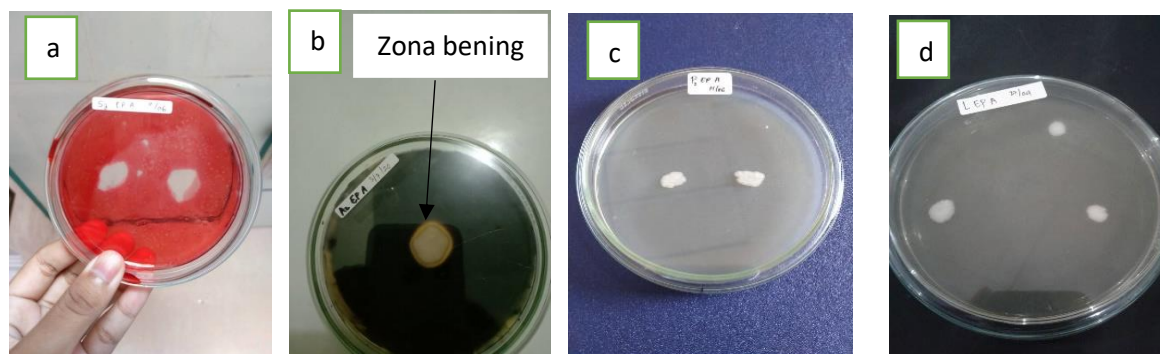
AE : Aktivitas Enzim (Unit/mL)  
 Abs ES : Absorbansi enzim substrat  
 Abs E : Absorbansi enzim

Abs S : Absorbansi substrat  
 BM : Berat Molekul (180,156 g/mol)  
 t : Waktu inkubasi (menit)

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Uji Enzimatik Khamir

Uji enzimatik khamir yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji selulase, uji amilase, uji protease dan uji lipase. Uji enzimatik dilakukan secara kualitatif yaitu dengan melihat adanya zona bening disekitar koloni.



**Gambar 1.** Uji Enzimatik Isolat Khamir Ep A: Uji Selulase (a), Uji Amilase (b), Uji Protease (c), Uji Lipase (d)

Hasil uji selulase pada isolat khamir Ep A dengan menggunakan media CMC menunjukkan hasil negatif (Gambar 1.a) atau tidak memiliki aktivitas enzim selulase. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni. Mangunwardoyo dkk (2007) berhasil melakukan uji enzim selulase secara kualitatif dengan media CMC pada isolat khamir potensial penghasil selulase dengan diameter zona bening sebesar 27,63 mm. Menurut Hasanah (2015) isolat yang memiliki potensi selulase mempunyai zona bening yang terbentuk disekitar koloni. Zona bening tersebut menunjukkan zona tempat terputusnya ikatan  $\beta$ -1,4-glikosidik yang menghubungkan monomer D-glukosa pada CMC.

Uji selanjutnya adalah uji Amilase menggunakan media YEPG agar (*Yeast Extract Peptone Glucose*) yang telah ditambahkan amilum. Uji amilase (Gambar 1.b) menunjukkan hasil positif. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni khamir. Savitree *et al.*, (2002) berhasil melakukan uji enzim amilase pada *Saccharomyces fibuligera* dengan diameter zona bening sebesar 2.84 mm. Menurut Pricilia (2018) hasil positif aktivitas amilase ditandai dengan adanya zona bening disekitar koloni pada media agar selektif amilum. Khamir yang mampu memproduksi amilase dapat dideteksi dengan adanya zona bening yang terbentuk pada media selektif amilase setelah ditetesi larutan iodium. Zona bening yang terbentuk merupakan amilum yang mengalami hidrolisis menjadi gula sederhana, sedangkan media yang berwarna biru kehitaman menandakan pati yang belum terhidrolisis.

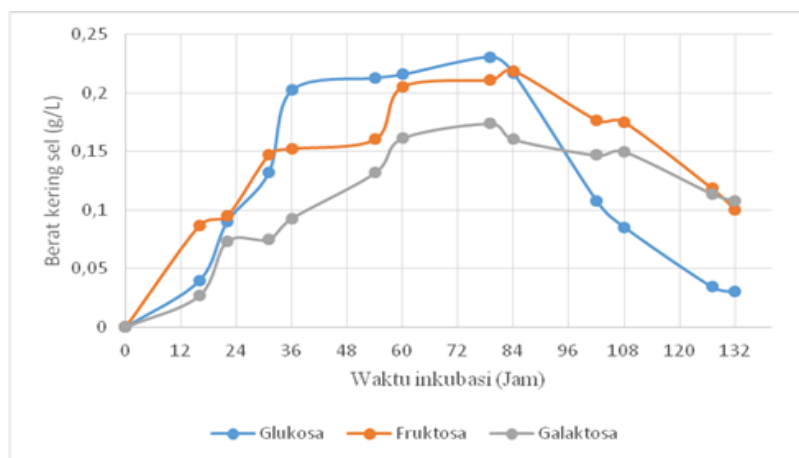
Uji selanjutnya adalah uji protease dengan menggunakan media *skim milk agar*. Uji protease (Gambar 1.c) menunjukkan hasil negatif. Hal tersebut dapat diketahui karena tidak adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni khamir yang menunjukkan bahwa tidak adanya aktivitas enzim protease. Jane *et al.*, (2013) berhasil melakukan uji enzim protease pada khamir *Candida paraguosa* dengan diameter zona bening yang terbentuk sebesar  $36.667 \pm 5.4$  mm. Menurut Pricilia (2018) aktivitas protease secara kualitatif ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni pada medium SMA (*skim milk agar*). Zona bening yang terbentuk terjadi karena pemutusan ikatan peptida pada protein oleh protease menjadi unit peptida yang lebih kecil, hidrolisis sempurna dari protein akan menghasilkan asam amino. Besarnya zona bening yang terbentuk disekitar koloni menandakan banyaknya produk yang dihasilkan dari hidrolisis protein oleh protease.

Uji Selanjutnya adalah uji lipase menggunakan media YEPG yang ditambahkan *olive oil*. Uji lipase (Gambar 1.d) menunjukkan tidak adanya aktivitas enzim lipase atau hasil negatif. Hal tersebut ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening yang terbentuk disekitar koloni khamir yang tumbuh. Yalcin *et al.*, (2013) berhasil melakukan uji enzim lipase

pada *Candida albicans* dengan diameter zona bening sebesar 3 mm. Menurut Raj *et al.*, (2016) aktivitas enzim lipase dapat teramati dengan adanya zona bening disekitar koloni khamir. Zona bening tersebut terjadi karena adanya aktivitas hidrolisis oleh enzim lipase pada lipid menjadi asam lemak dan gliserol yang terkandung dalam media.

#### Pengaruh Variasi Sumber Karbon Terhadap Pertumbuhan Sel Khamir Ep A

Pengukuran pertumbuhan dilakukan dengan mengukur berat kering sel isolat khamir Ep A setiap dua kali dalam sehari selama 6 hari dengan interval 5-19 jam dimulai pada jam ke-0, ke-16, ke-22, ke-31, ke-36, ke-54, ke-60, ke-79, ke-84, ke-102, ke-108, ke-127 dan ke-132. Isolat khamir Ep A ditumbuhkan pada media YEPG dengan variasi sumber karbon yaitu glukosa, fruktosa, dan galaktosa.

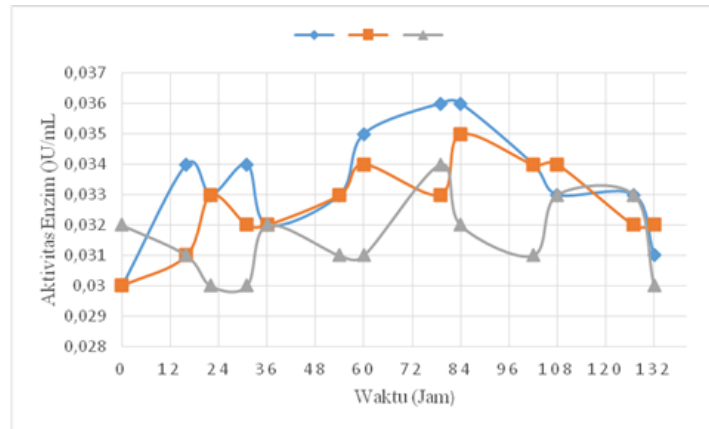


**Gambar 2.** Kurva Pertumbuhan Khamir Ep A selama waktu inkubasi 132 jam pada temperature 28 °C

Berdasarkan pengamatan kurva pertumbuhan, dapat diketahui bahwa isolat khamir Ep A dapat tumbuh dengan cukup baik pada media YEPG dengan variasi sumber karbon glukosa, fruktosa dan galaktosa. Menurut hasil penelitian Polak dan Berecka (2010) glukosa merupakan sumber karbon yang paling baik dibandingkan monosakarida dan gula-gula lainnya dengan urutan dari yang terbaik adalah glukosa, fruktosa, galaktosa, saccharose dan maltosa. Hal ini didukung oleh pendapat Kristina dan Syahid (2012) yang menyatakan bahwa karbohidrat sederhana seperti glukosa, sukrosa, fruktosa, inositol dan sorbitol dapat digunakan oleh khamir sebagai sumber karbon. Menurut Sumantha *et al.*, (2006) perbedaan sumber karbon pada media tumbuh akan mempengaruhi pertumbuhan dan hasil metabolit sekunder dari mikroba.

#### Pengaruh Variasi Sumber Karbon Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

Pengukuran aktivitas enzim amilase dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim amilase terhadap isolat khamir Ep A. Pengukuran aktivitas enzim amilase dilakukan menggunakan supernatan hasil sentrifugasi sampel yang telah diinokulasikan pada media dengan variasi karbon berbeda yaitu glukosa, fruktosa, dan galaktosa. Kemampuan mikroorganisme dalam menghasilkan enzim amilase ditentukan oleh nutrisi dalam media tumbuh sel khamir, yang salah satunya adalah sumber karbon.



**Gambar 3.** Kurva Nilai Aktivitas Enzim Amilase

Berdasarkan pengukuran aktivitas enzim amilase (Gambar 4.3) dapat diketahui bahwa pada media kontrol dengan sumber karbon glukosa, isolat khamir Ep A memiliki aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-79 dan ke-84 dengan nilai sebesar 0,036 U/mL. Aktivitas enzim dengan sumber karbon fruktosa memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-84 dengan nilai sebesar 0,035 U/mL. Aktivitas enzim dengan sumber karbon galaktosa memiliki nilai aktivitas enzim tertinggi pada jam ke-79 dengan nilai sebesar 0,034 U/mL. Oliveira *et al.*, (2015) berhasil mengukur aktivitas enzim amilase pada khamir *Saccharomyces cerevisiae* dengan nilai aktivitas enzimnya sebesar 0,34 U/mL.

**Tabel 1.** Analisis Uji One-Way ANOVA

Aktivitas enzim	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	5.339	.009
Within Groups	.000	36	.000		
Total	.000	38			

Berdasarkan hasil uji ANOVA diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,009 hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara jenis sumber karbon yang digunakan yaitu glukosa, fruktosa dan galaktosa terhadap aktivitas amilase yang dihasilkan oleh isolat khamir Ep A. Hal ini dapat dilihat melalui nilai ( $p < 0,05$ ), sehingga untuk melihat beda nyata perlakuan maka dilakukan uji lanjut Duncan.

Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan diketahui bahwa antara perlakuan sumber karbon glukosa menghasilkan pengaruh berbeda nyata terhadap galaktosa namun tidak berbeda nyata terhadap fruktosa. Perlakuan dengan sumber karbon fruktosa terhadap galaktosa menunjukkan pengaruh tidak berbeda nyata. Berdasarkan pengamatan tersebut diketahui bahwa adanya pengaruh perlakuan variasi sumber karbon terhadap aktivitas enzim amilase isolat khamir Ep A. Menurut Dinarvand (2012) komposisi media kultur adalah faktor yang paling penting yang berpengaruh terhadap produksi enzim, pertumbuhan, fisiologi sel, dan meningkatkan pembentukan bioproduk.

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Anto Budiarmo di Laboratorium Bioteknologi Universitas Diponegoro atas masukannya dalam penulisan ini.

**DAFTAR PUSTAKA**

Adelabu, BA., Kareem, SO., Oluwafemi, F. and Adeogun, IA. 2019. Biocoverison of Corn Straw to Ethanol by Cellulolytic Yeasts Immobilized in Mucuna urens Matrix. *Journal of King Saud University – Science*. 31 : 136-141. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.005>

- Aini, N. dan Rahayu, T., 2015. Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. *Jurnal Pangan dan Agorindustri*, 1(10) : 13-19. <https://media.neliti.com/media/publications/175619>
- Ayadi I., Belghith H., Gargouri A. and Guerfali M. 2018. Screening of New Oleaginous Yeasts for A Single Cell Oil Production, Hydrolytic Potential Exploitation and Agro-industrial by-Products Valorization. *Process Safety and Environmental Protection*. 119 : 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.pesp.2018.07.012>
- Bernard, T., Xiao, B.L., Francois, R. and Nitnipa, S. 2009. Transcriptional Regulation of Nonfermentable Carbon Utilization Budding Yeast. *FEMS Yeast Res (10)*. Mc-Gill University. Canada.
- Budak, S. O., Wiebenga A., Bron PA. and Vries RPD. 2016. Protease and Lipase Activities of Fungal and Bacterial Strains Derived from an Artisanal Raw Ewe's Milk Cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 237 : 17-27. <https://10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>
- Dinarvand M, Arbakariya A, Moeini H, Ajdari Z, Mousavi SS. and Nahavandi R. 2012. Optimization of medium composition and culture conditions for invertase production by *Aspergillus niger* ATCC, 20611. *Minerva Biotechnologica* 24(4):135–140.
- Freire AL., Ramos CL., Souza PNDC., Cardoso MGB. and Schwan RF. 2017. Nondairy Beverage Produced by Controlled Fermentation with Potential Probiotic Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria and Yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 248 : 39-46. <https://dx.doi.org/10.18860/al.v0i0.2907>
- Hasanah, N. 2015. Aktivitas Selulase Isolat Jamur Dari Limbah Media Tanah Jamur Merang. *Jurnal Pros Sem Nas Masy Biodiv Indom (1) no.5*. <https://doi.org/10.1016/j.psnmbi.2015.07.013>
- Jane, S.M., Ken, M.H. and Masoud, M. 2013. Molecular Identification and Proteinase Activity of Yeast Isolated from Fermented Milk. *International Journal of Dairy Science Research*. Tanzania. <https://doi.org/10.1016/ijdsr.2013.08.011>
- Mangunwardoyo W., Reno F. and Ariyanti, O. 2007. Screening Cellulase Activity of Yeast Isolates from Molluse, Litter and Plant samples from Taman Nasional Gunung Halimun. *Biota Vol. 12 (3): 186-191*. ISSN 0853-8670.
- Natural Resource and Conservation Service, USDA. 2019. *Taxonomi Klasifikasi buah nanas*. Diperoleh dari <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ANCO30> pada tanggal 03 Desember 2019 pukul 13.30 wib.
- Oliveira, A.P.A., De Silvester M.A., Alves-prado H.F., Rodrigues A., Fossa M., Fonseca G.G. and Leite R.S.R. 2015. Bioprospecting of yeast for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extract. *Afr. J. Biotechnol.* 14(14): 1215-1223. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/116>
- Polak and Berecka M. 2010. Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology. *Pol J Microbiol* 59 (2):113-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20734756>
- Pricilia S., Winni A. dan Eva, M. 2018. *Skrining Bakteri Endofit Penghasil Amilase, Lipase, dan Protease dari Daun Macaranga hullettii* King ex Hook.f. Universitas Mulawarman. Kalimantan Timur.
- Raj, A., Baby, G., Dutta, S., Sarkar, A. and Rao, K.V.B. 2016. Isolation, Characterization and Antioxidant Activity of Lipase Enzyme Producing Yeast Isolated from Spoiled Sweet Sample. *Scholars Research Library*, 8 (10) 129-135. <https://doi.org/10.1016/6583-20035-1>
- Savitree, L., Somporn, S., Poonpilai, Sand Napha, L. 2002. Yeast Diversity in Thai Traditional Alcoholic Starter. *Journal of Natural Science*. Kasetsart University. <https://doi.org/10.1016/jons.2002.09.014>
- Scragg, A.H. 1991 *Biotechnology for Engineers*. England: Ellis Horwood Ltd. ISBN 10:0470212365
- Sumantha, A., C. Larroche and A. Pandey. 2006. Microbiology and industrial of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology Biotechnology* 44 (2): 211–220. <https://www.researchgate.net/publication/228618618>
- Yalcin, T.H., Corbaci, C. and Fusun, B.U. 2013. Molecular Characterization and Lipase Profiling of The Yeast Isolated from Environments Contaminated With Petroleum. *Journal of Basic Microbiology*. Turkey. <https://doi.org/10.1016/jobm.2013.06.015>
-