

STABILITAS LARU TEMPE PENGHASIL VITAMIN B₁₂ SELAMA PENYIMPANAN

Oleh: Suryana Purawisastra; Mien K. Mahmud; dan Erwin Affandi

ABSTRAK

Telah dilakukan pengamatan terhadap stabilitas kemampuan laru penghasil tempe yang mengandung vitamin B₁₂ selama 6 minggu penyimpanan. Laru dikemas dalam kantong plastik tranparansi *polyethylene* (ukuran 5 x 10 cm; 65 mikron tebal) yang disimpan di ruangan terbuka tanpa ada pengaturan kondisi. Laru dibuat dengan cara pencampuran antara suspensi biakan murni *Rhizopus oligosporus* dan suspensi bakteri penghasil vitamin B₁₂ (*Klebsiella pneumoniae*) dengan perbandingan jumlah sel 1:1 dalam media beras yang telah digelatinisasi. Karena air merupakan faktor penting bagi kehidupan mikroorganisme, maka dalam penelitian ini diamati dua jenis laru yang mengandung air $\pm 10\%$ dan $\pm 15\%$ diawal penyimpanan. Pengamatan stabilitas laru dilakukan juga terhadap laru biasa sebagai kontrol. Setiap minggu dari masing-masing jenis laru diambil dua kantong plastik, dianalisis kadar air dan jumlah sel bakteri *K. pneumoniae* serta kemampuannya terhadap kandungan vitamin B₁₂ dalam tempe yang dihasilkannya. Hasil menunjukkan bahwa pada awal penyimpanan laru dengan kadar air $\pm 15\%$ menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂ lebih tinggi (16,70 ng) dari pada laru yang mengandung air $\pm 10\%$ (6,20 ng). Laru kontrol tanpa penambahan bakteri *K. pneumoniae* juga menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂ walaupun kadarnya jauh lebih rendah, yaitu 3,30 ng bagi laru mengandung air $\pm 15\%$ dan 1,43 ng bagi laru mengandung air $\pm 10\%$ per 100 gram tempe. Besarnya kadar vitamin B₁₂ tempe yang dihasilkan oleh laru selama 6 minggu penyimpanan memperlihatkan kecenderungan yang stabil. Kandungan air laru selama 6 minggu penyimpanan menaik, yaitu 9 % bagi laru dengan kadar air awal 15% dan 47% bagi laru dengan air awal $\pm 10\%$. Laru kontrol juga memperlihatkan profil kenaikan kadar air yang serupa. Jumlah total sel bakteri *K. pneumoniae* setelah 6 minggu penyimpanan berkurang 25% bagi laru dengan air $\pm 15\%$ dan 22% bagi laru dengan air $\pm 10\%$.

Pendahuluan

Vitamin B₁₂ dalam tempe merupakan hasil metabolisme bakteri kontaminan selama proses pembuatan tempe berlangsung (1), dan yang dominan adalah bakteri *Klebsiella pneumoniae* (2). Bakteri kontaminan dalam tempe termasuk strain non-pathogenik dapat hidup bersama dengan kapang tempe *Rhizopus* sp. tanpa menghambat proses fermentasi kedele menjadi tempe (3), dan tidak sensitif terhadap antibakterial yang dihasilkan oleh *Rhizopus* sp (4). Kemungkinan timbulnya efek negatif bagi kesehatan manusia akibat dari bakteri kontaminan dalam tempe tersebut dapat dihindari dengan adanya proses pemasakan (5).

Vitamin B₁₂ diperlukan oleh tubuh untuk digunakan dalam proses pembentukan sel darah merah sebagai pencegahan terjadinya anemia pernisiiosa (6). Hingga kini anemia gizi masih merupakan masalah di Indonesia (7). Pangan sebagai sumber alternatif bagi vitamin ini adalah pangan berasal dari hewan (8), dan tempe merupakan satu-satunya pangan nabati yang mengandung vitamin B₁₂. Tempe itu sendiri merupakan bahan makanan yang sudah lama membudaya di semua lapisan

masyarakat Indonesia (9), dan penelitian-penelitian yang lalu telah membuktikan bahwa tempe merupakan bahan pangan sumber zat gizi yang baik terutama karena memiliki nilai biologis yang tinggi (10).

Karena mikroba penghasil vitamin B₁₂ dalam tempe bersifat kontaminan, sehingga cenderung ada ketergantungan terhadap keadaan sterilitas lingkungan tempat pembuatan tempe. Dengan demikian ada kemungkinan tidak semua tempe dapat mengandung vitamin B₁₂. Karena itu agar kadar vitamin B₁₂ dalam tempe diharapkan selalu ada bahkan kadarnya dapat meningkat, dicoba dibuat laru yang mengandung bakteri *K. pneumoniae* strain non-pathogenik. Akan tetapi laru yang biasa digunakan dalam pembuatan tempe adalah dalam bentuk bubuk kering, sedangkan bakteri umumnya tetap hidup dalam substrat yang mengandung air lebih banyak dari pada kapang (11). Kecukupan air ini tidak hanya berperan untuk mempertahankan kemampuan hidup, tetapi juga berperan dalam memelihara kemampuan proses metabolismenya (12).

Tulisan ini menyajikan hasil pengamatan terhadap stabilitas kemampuan laru tempe penghasil vitamin B₁₂ selama 6 minggu penyimpanan dalam menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂.

Bahan dan Cara

Laru tempe penghasil vitamin B₁₂, dibuat dengan mencampurkan biakan murni kapang tempe *R. oligosporus* dan bakteri penghasil vitamin B₁₂ *K. pneumoniae* dengan perbandingan 1:1 ke dalam media beras yang telah digelatinisasi. Ada dua jenis laru penghasil vitamin B₁₂ yang diamati, yaitu laru yang mengandung air pada awal penyimpanan sebanyak 10% dan 15%. Untuk dapat memperoleh laru dengan kadar air awal yang diinginkan, maka dilakukan pengukuran waktu yang diperlukan oleh pengering yang tersedia ketika mengeringkan laru.

Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap laru tempe tanpa penambahan bakteri *K. pneumoniae*.

Pembuatan laru tempe penghasil vitamin B₁₂

Sekitar 15 gram beras dalam erlenmeyer ditambah 15 ml aquadest, kemudian digelatinisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Setelah dingin ditambah 0.30 ml suspensi campuran kapang *R. oligosporus* dan bakteri *K. pneumoniae* dalam perbandingan total sel 1:1. Diaduk secara steril, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama waktu yang diperlukan oleh pengering untuk mengeringkan laru dengan kandungan air yang diinginkan. Substrat hasil inkubasi lalu diblender, dan diperoleh laru bubuk (13).

Di samping laru penghasil vitamin B₁₂, dibuat juga laru biasa *R. oligosporus* tanpa penambahan bakteri *K. pneumoniae*.

Penyediaan suspensi biakan murni *R. oligosporus* dan *K. pneumoniae*

Biakan murni dari agar miring diencerkan dengan menggunakan larutan buffer fosfat steril. Kemudian dihitung dengan menggunakan slide kamar hitung *Petroff Hausser* di bawah mikroskop. Bagi kapang, digunakan pembesaran 10 x 10, dan bagi bakteri digunakan pembesaran 10 x 100.

Penyimpanan laru

Laru dikemas dalam kantong plastik transparans yang memiliki ketebalan 65 mikron dengan ukuran 5 x 10 cm. Jumlah kantong plastik yang diperlukan setiap jenis laru adalah sebanyak 12 kantong, karena untuk setiap minggu diambil dua kantong plastik untuk penentuan kadar air, total bakteri *K. pneumoniae*, dan digunakan pada pembuatan tempe.

Pembuatan tempe

Kedele bersih direbus selama 60 menit. Setelah dingin, kulitnya dibuang, lalu direndam semalam. Esoknya direbus selama 45 menit, ditiriskan. Setelah dingin diinokulasi dengan laru, dibungkus dalam plastik berlubang. Diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam (14). Tempe yang dihasilkan dianalisis kandungan vitamin B₁₂, air, dan protein terlarut. Diamati pula keadaan kualitas visual tempe meliputi aroma, kenormalan tempe meliputi kekompakan biji kedelai, pertumbuhan miselium, serta ada atau tidak adanya lendir.

Analisis air dan protein

Penentuan kadar air dilakukan terhadap contoh laru yang diambil setiap minggu, dengan menggunakan metoda pengeringan pada oven 105°C sampai diperoleh bobot tetap (15). Analisis protein tempe yang dihasilkan laru, ditetapkan dengan metoda Biuret (16). Contoh yang sudah ditumbuk (+3 gram) ditambah aquadest sehingga volumenya menjadi 50 ml. Kemudian ditambah 1 ml NaOH 3 M, lalu dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, ditambah 1 ml larutan CuSO₄.5H₂O 5% dan dikocok. Warna biru yang terbentuk dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 555 nm. Penghitungan kandungan protein dilakukan dengan menggunakan kurva standar protein Bovine Serum Albumin.

Analisis vitamin B₁₂ tempe

Analisis vitamin B₁₂ dilakukan dengan metoda mikrobiologi menggunakan bakteri *Lactobacillus leichmanii* Atcc 7830. Prinsipnya adalah bahwa pertumbuhan bakteri ini dipengaruhi oleh vitamin B₁₂ dalam medium tempat tumbuhnya, sehingga penambahan jumlah sel bakteri dapat meningkatkan derajat kekeruhan (turbiditas) medium cair. Turbiditas medium kemudian diukur dengan menggunakan spektrophotometer pada panjang gelombang 620 nm. Karena peningkatan jumlah sel bakteri adalah sebanding dengan kandungan vitamin B₁₂ dalam medium, maka kandungan vitamin B₁₂ dapat dihitung dengan menggunakan kurva standar (17).

Vitamin B₁₂ dari tempe terlebih dahulu diekstrak dengan menggunakan larutan buffer asetat pH 4,5. Hasil ekstraksi kemudian ditambah larutan natrium sianida 1% untuk menjaga kestabilan sifat vitamin ini agar availabilitas vitamin bagi bakteri pengujian tidak terganggu.

Bakteri *Lactobacillus leichmanii* Atcc 7830 sebelum digunakan terlebih dahulu mengalami pra-kultifikasi, untuk mengadaptasikan sifat pertumbuhan bakteri yang berasal dari media padat sebagai media pemeliharaan ke dalam media cair (Media assay vitamin B₁₂) sebagai media analisis. Dengan demikian kepekaan pertumbuhan bakteri terhadap kebutuhan vitamin B₁₂ tidak berubah dengan adanya perubahan bentuk media.

Penentuan total bakteri *K. pneumoniae* laru

Jumlah sel bakteri *K. pneumoniae* dihitung dengan menggunakan media *Briliant Green Bile Lactose Agar* yang terdiri dari 10,0 gram pepton, 10,0 gram lactosa, 20,0 gram Ox Bile dried, 0.01333 gram Brilliant green, dan 20,0 gram agar-agar yang dilarutkan dalam 1 liter air destilat. Media ini khusus untuk pertumbuhan bakteri *K.pneumoniae*, karena brillian green dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya (18).

Hasil dan Bahasan

Kandungan vitamin B₁₂ tempe

Tabel 1. Rata-rata kadar vitamin B₁₂ dalam tempe hasil laru yang disimpan (ng per 100 gram)

Jenis Laru	Kadar vitamin B ₁₂ dalam tempe (ng per 100 gram)	
	0 minggu	6 minggu
A I	16.70	17.61
A II	6.20	10.75
B I	3.30	2.67
B II	1.43	2.65

A = laru penghasil vitamin B₁₂

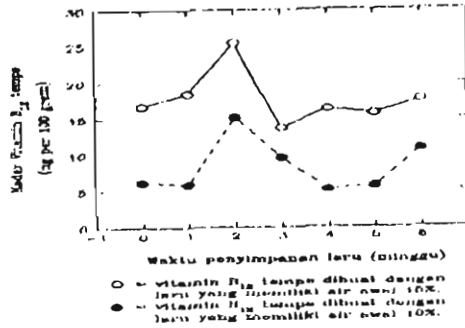
I = kadar air awal $\pm 15\%$

B = laru biasa

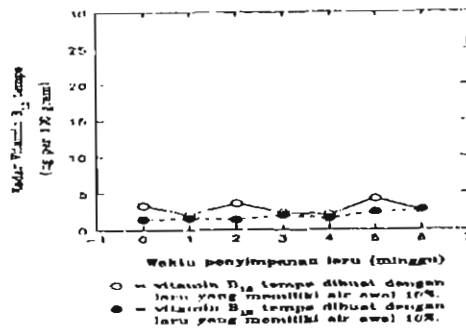
II = kadar air awal $\pm 10\%$

Ternyata bakteri *K. pneumoniae* dalam laru yang disimpan selama 6 minggu masih menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂ dengan kadar yang stabil. Akan tetapi laru murni tanpa penambahan bakteri *K. pneumoniae* juga menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂, walaupun kadarnya rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya kontaminasi selama pembuatan tempe, tidak hanya oleh bakteri *K.pneumoniae* tetapi mungkin juga oleh bakteri lain yang mempunyai kemampuan menghasilkan vitamin B₁₂ dalam sistem metabolismenya. Seperti yang diungkapkan oleh Okada dkk. (1985) yang berhasil mengisolasi bakteri penghasil vitamin B₁₂ lainnya yang ada dalam tempe, diantaranya *K. terrigen*, *K. planticola* dan *Enterobacter cloacae*.

Walaupun demikian penambahan bakteri *K. pneumoniae* ke dalam laru biasa secara deskriptif dapat meningkatkan kadarnya. Seperti terlihat pada Gambar 1 dan 2 yang menyajikan kadar vitamin B₁₂ dalam tempe yang dibuat dengan menggunakan laru selama 6 minggu penyimpanan. Laru tempe penghasil vitamin B₁₂ yang mengandung air $\pm 15\%$ pada awal penyimpanan dengan penambahan bakteri *K. pneumoniae* meningkatkan kandungan vitamin B₁₂ 4 kali dari pada laru biasa, dan peningkatan bagi laru yang mengandung air pada awal penyimpanan $\pm 10\%$ adalah 3 kali. Setelah 6 minggu penyimpanan peningkatan kandungan vitamin B₁₂ meningkat menjadi 5,5 kali bagi laru dengan kandungan air awal $\pm 15\%$, dan tetap konstan (3 kali) bagi laru yang mengandung air awal $\pm 10\%$.



Gambar 1. Rata-rata kandungan vitamin B12 dari tempe yang dibuat dengan menggunakan laru penghasil vitamin B12 selama penyimpanan.



Gambar 2. Rata-rata kandungan vitamin B12 dari tempe yang dibuat dengan laru biasa selama penyimpanan.

Pada penyimpanan minggu ke 2, tampak adanya kenaikan vitamin B₁₂ yang ekstrim tempe hasil laru penghasil vitamin B₁₂ (Gambar 1). Hal ini kemungkinan disebabkan bakteri *K. pneumoniae* berada dalam kondisi fase produksi atau pertumbuhan. Setiap mikroorganisme dalam siklus hidupnya mengalami 4 fase (12). Fase lag, fase dimana mikroorganisme mulai hidup dalam media baru dan tidak ada pertumbuhan. Fase eksponensial, fase dimana mikroorganisme mulai tumbuh dan menambah jumlah selnya. Fase stabil, fase dimana mikroorganisme tidak mengalami penambahan jumlah tetapi tetap hidup. Fase kematian, oleh karena faktor lingkungan meliputi kecukupan air, nutrisi, oksigen, perubahan pH dan suhu, atau terbentuknya antimikrobia. Tampaknya pada minggu ke-2 penyimpanan laru, bakteri *K. pneumoniae* dalam fase pertumbuhan sehingga produksi vitamin B₁₂ menaik lebih tinggi. Sedangkan pada laru biasa tidak terjadi kenaikan kandungan vitamin B₁₂ tempe yang mendadak (Gambar 2).

Besarnya kandungan air laru ternyata berpengaruh terhadap kadar vitamin B₁₂ dalam tempe yang dihasilkannya. Laru yang memiliki air lebih tinggi ($\pm 15\%$) menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂ 1,7 kali lebih tinggi pada awal penyimpanan, dan 0,6 kali lebih tinggi dari pada dalam tempe yang dibuat dengan menggunakan laru berkadar air lebih rendah ($\pm 10\%$). Sedangkan selama penyimpanan kenaikan kadar vitamin B₁₂ tempe meningkat sebesar $1,4 \pm 0,8$ kali. Bagi laru biasa, pengaruh kandungan ini hanya tampak pada awal penyimpanan sebesar 1,3 kali, dan selama penyimpanan sebesar $0,6 \pm 0,2$ kali.

Perubahan kandungan air laru

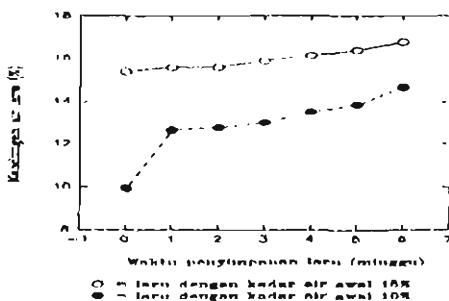
Kandungan air laru setelah 6 minggu penyimpanan menaik bagi laru yang memiliki kandungan air awal $\pm 10\%$, dan polanya mirip baik bagi laru penghasil vitamin B₁₂ maupun bagi laru biasa seperti yang terlihat pada Tabel 2. Tampak lebih jelas pada Gambar 3 dan 4 yang menyajikan hasil analisis air laru selama 6 minggu penyimpanan.

Tabel 2. Rata-rata kadar laru setelah 6 minggu penyimpanan

Jenis Laru	Kadar Air Laru (%)	
	0 minggu	6 minggu
A I	15.34	16.79
A II	9.92	14.63
B I	15.24	16.89
B II	10.17	14.71

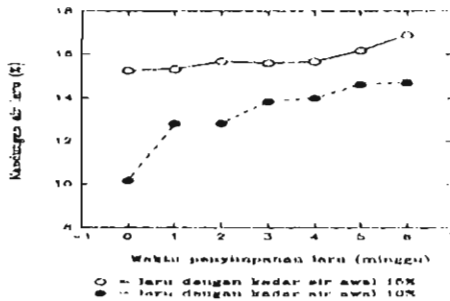
A = laru penghasil vitamin B12 I = kadar air awal $\pm 15\%$

B = laru biasa II = kadar air awal $\pm 10\%$



Gambar 3. Rata-rata kandungan air laru penghasil vitamin B12 selama penyimpanan

Barangkali karena laru tersebut lebih kering sehingga menjadi lebih higroskopis. Selain itu peningkatan air ini terjadi karena adanya proses metabolisme mikroorganisme yang kemudian diikuti dengan pelepasan air (12).

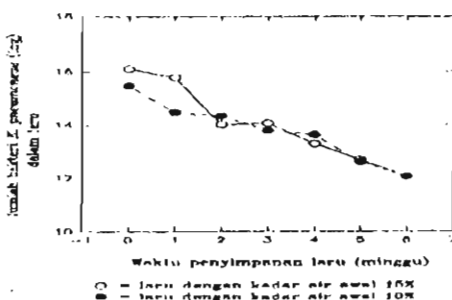


Gambar 4. Rata-rata kandungan air laru biasa selama penyimpanan

Pengamatan total bakteri *K. pneumoniae* laru

Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 5) menunjukkan bahwa jumlah bakteri *K. pneumoniae* dalam laru selama penyimpanan mengalami penurunan secara logaritmik. Walaupun demikian, tempe yang dihasilkannya masih mengandung vitamin B₁₂ dalam kadar yang relatif stabil. Hal ini bisa dijelaskan bahwa bakteri *K. pneumoniae* yang dapat mempertahankan viabilitasnya, memiliki sifat proteksi dan adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan sekitarnya, walapun faktor penunjang hidupnya dalam keadaan kritis, misalnya nutrisi ataupun air (12). Dengan demikian kemampuan metabolismenya dalam menghasilkan vitamin B₁₂ dalam tempe juga masih dapat bertahan.

Gambar 5 juga memperlihatkan bahwa pengaruh kadar air laru pada awal penyimpanan antara yang $\pm 15\%$ dan $\pm 10\%$ tidak tampak perbedaan terhadap total bakteri *K. pneumoniae*.



Gambar 5. Rata-rata jumlah bakteri *K. pneumoneae* dalam laru selama penyimpanan

Pengamatan mutu tempe

Mutu tempe dapat dilihat pada keadaan kualitas visualnya, serta aroma dan ada atau tidak adanya lendir. Hasilnya disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data hasil pengamatan tempe hasil laru yang disimpan

Waktu Penyimpanan (minggu)	Keadaan visual tempe yang dihasilkan oleh laru			
	A I	A II	B I	B II
0	normal	normal	normal	normal
1	normal	normal	normal	normal
2	ada lendir	normal	normal	normal
3	ada lendir	normal	normal	normal
4	ada lendir	normal	normal	normal
5	ada lendir	normal	normal	normal
6	ada lendir	normal	normal	normal

Keterangan :

A = laru penghasil vitamin B₁₂

B = laru biasa

I = kadar air awal $\pm 15\%$

II = kadar air awal $\pm 10\%$

Pada laru penghasil vitamin B₁₂ dengan kadar air awal $\pm 15\%$ mulai pada minggu ke-2 menghasilkan tempe yang tampak sedikit berlendir. Pada minggu berikutnya lendir tersebut semakin jelas, dan diikuti bau amonia yang semakin kuat. Sedangkan tempe hasil laru lainnya termasuk laru penghasil vitamin B₁₂ dengan kadar air awal $\pm 10\%$ memperlihatkan kenormalan lazimnya tempe.

Kemungkinannya adalah bahwa dengan kandungan air laru $\pm 15\%$ merupakan pertumbuhan yang baik bagi bakteri, tidak hanya *K.pneumoniae* tetapi bakteri lain yang megghakibatkan timbulnya lendir.

Bila diamati perubahan protein terlarut pada tempe yang dihasilkan oleh laru selama 5 minggu penyimpanan (Tabel 4). Tampaknya tidak ada perbedaan antara laru penghasil vitamin B₁₂ dengan kadar air 15% maupun dengan yang $\pm 10\%$. Secara umum terjadi penurunan kandungan protein terlarut dari tempe yang dihasilkannya.

Tabel 4. Kandungan protein terlarut tempe hasil laru yang disimpan

Waktu penyimpanan minggu)	Kadar protein (gram per 100 gram)			
	A I	A II	B I	B II
0	4.79	4.03	4.18	4.02
1	4.74	4.36	4.79	3.94
2	4.31	3.85	4.00	4.47
3	3.82	3.71	3.67	3.56
4	4.30	3.59	3.87	3.62
5	3.23	3.63	3.75	4.43
6	3.69	4.13	3.95	3.42

A = laru penghasil vitamin B₁₂

I = kadar air awal 15%

B = laru biasa

II = kadar air awal 10%

Simpulan

1. Kemampuan laru tempe penghasil vitamin B₁₂ masih tampak stabil selama 6 minggu penyimpanan.
2. Laru yang mengandung air 15% pada awal penyimpanan menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂ 1,7 kali lebih tinggi dari pada tempe hasil laru yang mengandung air 10%. Akan tetapi kualitas visual tempe pada minggu ke-2 bagi hasil laru berkadar air 15% sudah menampakkan ketidak normalan. Karena itu untuk menghasilkan tempe yang mengandung vitamin B₁₂ lebih baik menggunakan laru yang berkadar air 10%.
3. Kebadiran bakteri *K. pneumoniae* dalam laru dengan perbandingan total sel 1:1 dengan kapang *R. oligosporus*, dapat meningkatkan kandungan vitamin B₁₂ dari tempe yang dihasilkannya.

Ucapan terima kasih

Terima kasih penulis kepada Sdr. Mety Sumiati, mahasiswa IPB yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

Rujukan

1. Liem, I.T.H., K.H. Steinkraus, dan T.C. Cronk. Production of vitamin B₁₂, a fermented soybean food. Appl environ micorbiol 1977, 34(6):773-776.
2. Curtis, R.R., R.E. Cullen, dan K.H. Steinkraus. Identity of a bacterium producing vitamin B₁₂ activity in tempe. Symposium on Indigenous Fermented Foods 1977. Bangkok, Thailand.

3. Steinkraus, K.H. The book of indigenous fermented foods. New York : Marcel Decker, 1983.
4. Shurtleff, W., dan A. Aoyagi. The book of tempeh. New York : Harper & Row Publishers, 1979.
5. Winarno, F.G., dan N.R. Reddy. Legume based fermented food. Dept of Food Science and Technol. Virginia Polytechnic and State University. Blackburg, Virginia, 1985.
6. Winarno, F.G. Tempe - Peningkatan mutu dan statusnya di masyarakat. Dalam : Simposium Pemanfaatan Tempe Dalam Peningkatan Upaya Kesehatan dan Gizi. Puslitbang Gizi, 1985:73.
7. Widya Karya Pangan dan Gizi. Sambutan Pengarahan Menteri Negara Urusan Pangan/Ketua Bulog. Jakarta, 1994.
8. Buss, D. dan J. Robertson. Manual of nutrition. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Her Majesty's office, 1978. London : 47.
9. Sayogyo. Tempe di dalam pola makanan Indonesia. Dalam: Simposium Pemanfaatan Tempe Dalam Peningkatan Upaya Kesehatan dan Gizi, Puslitbang Gizi, 1985:85.
10. Karyadi, D. Prospek pengembangan tempe dalam upaya peningkatan status gizi dan kesehatan masyarakat. Dalam : Simposium Pemanfaatan Tempe Dalam Peningkatan Upaya Kesehatan dan Gizi, 1985:20.
11. Jay, J.M. Modern Food Microbiology. 2 nd edition. D. Van Nostrand Company, London, 1978.
12. Brock, T.D., M.T. Madigan. Biology of Microorganism. 5 th ed. Prentice Hall International Inc.
13. Rahman, A. Pengantar Teknologi fermentasi. Bogor : PAU Pangan dan Gizi IPB, 1989.
14. Rahayu dan Suliantari. Teknologi fermentasi umbi-umbian dan biji-bijian. Bogor : PAU Pangan dan Gizi IPB, 1990.
15. Horwitz, W., A. Sensel, H. Reynold, D.L. Pard. Official method of analysis of the association of official analytical chemists, 12 nd ed. Washington D.C. AOAC, 1975:13.
16. Mitchell, D.A., E. Gumbira-Sa'id, P.F. Greenfield, H.W. Doelle Protein measurement in solid-state fermentation. Biotechnology techniques 5(6), 1991:437.
17. Okada, N., J. Hariantono, R.S. Hadioetomo. Survey of vitamin B12 producing bacteria isolated from Indonesian tempeh. Food Res Inst, 47, 1985:49-56.
18. Cowan, S.T., K.J. Steel, C. Shaw, J.P. Duguid. A classification of the klebsiella group. Journal of General Microbiology 23, 1960:601.