

**PENINGKATAN PRODUKSI β -GLUKAN *Saccharomyces cerevisiae*
MENGUNAKAN SEL IMOBILISASI DAN
PENAMBAHAN ION LOGAM PADA MEDIA FERMENTASI**

Kusmiati & Ni Wayan S. Agustini

Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI Jl. Raya Bogor Km 46,
Cibinong 16911

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae produced β glucan is widely used in the food and pharmacy industry. The active compound is a homopolysaccharide consist of D-glucose monomers linked by β glucosidic bonds at C₁ and C₃ or C₁ and C₆. β -Glucan production can be increased by genetic modification of the strain *S. cerevisiae* and optimization of fermentation condition. Three cultures of *S. cerevisiae* (BR1, BR2 and SC) immobilized by sodium alginate was inoculated into glucose yeast peptone (GYP) medium contained metals ion Cu²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺ separately. Cultures in GYP medium (50 ml) in Erlenmeyer flasks was shaken at 150 rpm at 30°C for 7 days. β Glucan was extracted by acid alkalin neutralized method. The results showed that the highest β glucan content as glucose monomer of *S. cerevisiae* immobilized were 47,28% (BR2), 36,89% (SC) and 31,72% (BR1) in the medium contained Mn²⁺ ion.

Kata kunci: *Saccharomyces cerevisiae*, β glukon, sel imobilisasi, ion logam

PENDAHULUAN

β -glukan merupakan polisakarida yang disintesis pada dinding sel khamir (*yeast*), bakteri, jamur, dan tanaman tertentu seperti gandum. β -glukan yang diperoleh dari dinding sel khamir terdiri dari campuran struktur β -1,3 dan 1,6 -glukan yang memiliki efek terapi yang tinggi dengan efek samping yang minimal, sehingga bersifat aman untuk dikonsumsi. Polisakaridaini sukar dicerna sehingga sangat baik untuk diet (Barnet, 1990; Cheseeman & Brown, 2007; Kusmiati, 2007).

β -glukan dilaporkan dapat berperan sebagai aktivator sistem kekebalan tubuh. Senyawa ini mengaktifkan makrofag melalui sistem reseptor glukon berukuran 1 mikron dan harus melewati kondisi aktivasi yang melibatkan berbagai perubahan morfologi dan perubahan metabolik yang memproduksi sitokin sebagai regulator internal dari sistem

kekebalan tubuh, hal tersebut terjadi supaya makrofag dapat berfungsi secara imunologi. Selain itu, makrofag juga dapat melenyapkan serpihan-serpihan benda asing dan dapat memproduksi sejumlah sitokin esensial yang mampu menstimulasi sistem imun dan meningkatkan produksi sumsum tulang. Pada kondisi normal, peluang rusaknya sistem kekebalan tubuh ternyata cukup tinggi (Walker, 1998). Manfaat β -glukan lainnya sebagai antiseptik, antioksidan, antiaging, , proteksi terhadap radiasi, antiinflamasi, antidiabetes, antikolesterol dan sebagainya. Sedangkan di bidang industri makanan tercatat bahwa β -glukan telah dipasarkan di Taiwan, Korea dan Jepang sebagai penstabil makanan dan penambah rasa ([Http://colosmilk.blogspot](http://colosmilk.blogspot)).

Dalam penelitian ini menggunakan sel *Saccharomyces cerevisiae* yang diimmobilisasi dengan natrium alginat untuk mendapatkan sel biomassa yang lebih baik, yang memiliki kekuatan partikel, porositas dan ketahanan kimia yang tinggi (Walker, 1998). Ketahanan hidup sel immobil lebih stabil sehingga kultur akan tumbuh lebih baik selama fermentasi dan menghasilkan suatu produk metabolisme yang tinggi.

S. cerevisiae membutuhkan nutrisi dan kondisi yang optimum untuk pertumbuhan dan reproduksi. Vitamin dan elemen mikro juga berperan penting dalam meningkatkan fungsi dari beberapa jenis *Saccharomyces*. Persediaan air yang cukup memadai dapat melindungi aktivitas hidup mereka ([Http://wikipedia.org](http://wikipedia.org)). Media pertumbuhan harus mengandung unsur-unsur yang diperlukan untuk metabolisme sel yaitu berupa unsur makro seperti C, H, O, N, P dan unsur mikro seperti Fe, Cu, Mg.

Saccharomyces membutuhkan kandungan nutrisi dan bahan aktif yang diperlukan untuk perkembangbiakan secara seimbang. Berlatar belakang tersebut maka pada penelitian ini dilakukan produksi β glukan dalam media yang diberi perlakuan ion logam berbeda yaitu tembaga sulfat (Cu^{2+}), besi klorida (Fe^{3+}), dan mangan sulfat (Mn^{2+}). Ketiga jenis ion logam tersebut memiliki peranan yang sangat penting bagi pertumbuhan *Saccharomyces*, sehingga diharapkan *Saccharomyces* dapat tumbuh optimum dan menghasilkan β glukan yang maksimal.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme. *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan terdiri dari 3 galur yaitu BR1, BR2, dan SC yang merupakan koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI Cibinong –Bogor.

Media. Peremajaan *S. cerevisiae* pada media GYP yang terdiri dari glukosa 2 % ekstrak ragi 1%, pepton 2%, dan bakto agar 1,5%. Sedangkan media fermentasi merupakan media GYP cair tanpa bakto agar. Bahan media ditimbang dan dilarutkan dengan akuades, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atmosfer selama 15 menit.

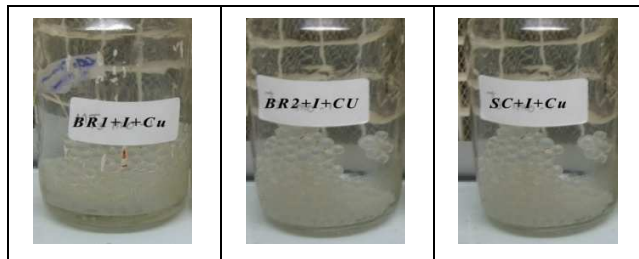
Peremajaan sel *Saccharomyces cerevisiae*. Satu ose stok kultur *S. cerevisiae* BR1, BR2, dan SC diinokulasikan ke dalam media GYP agar dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30 °C.

Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Kultur *S. cerevisiae* BR1, BR2 dan SC segar diinokulasikan masing-masing ke dalam media GYP cair dan diamati pertumbuhannya dengan mengukur kerapatan sel (optical density) menggunakan spektrofotometer pada λ 560 nm. Pengamatan kurva tumbuh bertujuan untuk menentukan waktu yang tepat untuk proses regenerasi dan panen β -glukan.

Prakultur *S. cerevisiae* dalam media GYP cair. Sebanyak satu ose isolat dipindahkan ke dalam 20 ml medium GYP cair, inkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 30 °C selama 48 jam dengan kecepatan 150 rpm (Walker, 1998).

Proses Imobilisasi Sel dengan Natrium Alginat. Sejumlah 5 ml kultur *S. cerevisiae* segar dituang ke dalam 15 ml larutan Natrium Alginat 5% yang sudah steril, aduk sampai homogen kemudian secara aseptik campuran larutan tersebut diteteskan menggunakan jarum suntik steril ke dalam larutan CaCl₂ 1% hingga terbentuk manik-manik sel. Sel yang telah terimobilisasi dibiarkan selama 1 jam, setelah itu dibilas dengan

H₂O steril dan dicuci dengan NaCl sebanyak tiga kali. Manik-manik sel dikering udara selama 18 jam (Jenie, 1992).



Gambar 1 Sel *S. cerevisiae* galur BR1, BR2 dan SC yang diimobilisasi natrium alginat 5%.

Inokulasi *Saccharomyces cerevisiae* ke dalam medium fermentasi GYP cair. Sel *S. cerevisiae* galur BR1, BR2 dan SC yang sudah diimobilisasi dimasukkan ke dalam 50 ml medium fermentasi GYP cair yang masing-masing diberi perlakuan penambahan tembaga sulfat (CuSO_4) 0,3 μM , besi klorida (FeCl_3) 1,2 μM , dan mangan sulfat (MnSO_4) 3 μM (Loukin & Ching Kung, 1995). Selanjutnya disterilkan dengan otoklaf. Kultur sel dalam media perlakuan baik sel bebas (tanpa imobilisasi) maupun manik-manik sel diimobilisasi diinkubasi pada inkubator goyang dengan kecepatan putaran 150 rpm pada suhu ruang 30°C selama 7 hari.

Ekstraksi β -glukan dari kultur sel *Saccharomyces cerevisiae*. Kultur *Saccharomyces cerevisiae* yang berumur 7 hari disentrifus dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 30°C selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Biomassa dihidrolisis dengan natrium hidroksida 0,75 M dalam penangas air selama 6 jam pada suhu 75°C. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 30°C selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Endapan yang terkumpul dicuci dengan asam asetat 0,5 M, kemudian disentrifus dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 30°C selama 15 menit, dan supernatan dibuang. Pencucian diulangi sebanyak tiga kali. Endapan selanjutnya dibilas dengan air dan etanol, kemudian disentrifus dengan kecepatan 7000 rpm pada suhu 30°C selama 15 menit, supernatan yang terpisah dibuang (Hisamatsu, 2003).

Bobot kering β -glukan. Endapan hasil ekstraksi dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama kurang lebih dua hari, kemudian ditimbang sebagai bobot kering β -glukan kasar dari masing-masing perlakuan media fermentasi *Saccharomyces cerevisiae* galur BR1, BR2, dan SC.

Kadar Glukosa menggunakan metode fenol sulfat (Chaplin & Kennedy, 2006). Larutan stok glukosa 1000 ppm dibuat deret standar masing-masing 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 dan 100 ppm. Sejumlah 500 μ l masing-masing deret standar dan sampel β glukan dipipet ke dalam tabung reaksi, ditambah 250 μ l fenol 5%, selanjutnya ditambah 1ml H₂SO₄ pekat, aduk hingga homogen selama 10 menit, dan ukur serapan dengan spektrofotometer pada λ 490nm. Dikerjakan larutan blanko dengan menggunakan akuades sebagai pengganti sampel.

Kadar protein menggunakan metode Lowry (Copeland, 2006). Larutan stok standar protein Bovine serum albumin (BSA) 1000 ppm dibuat deret standar masing-masing 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 180 dan 200 ppm. Sejumlah 250 μ l masing-masing deret standar dan sampel β glukan ditambah 250 μ l NaOH 1N. Larutan dididihkan selama 20 menit dalam penangas air, selanjutnya didinginkan. Larutan ditambah 2,5 ml pereaksi Lowry dan 250 μ l larutan folin C, selanjutnya diamkan selama 30 menit. Larutan diukur dengan spektrofotometer pada λ 750nm. Dilakukan blanko dengan menggunakan akuades sebagai pengganti sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

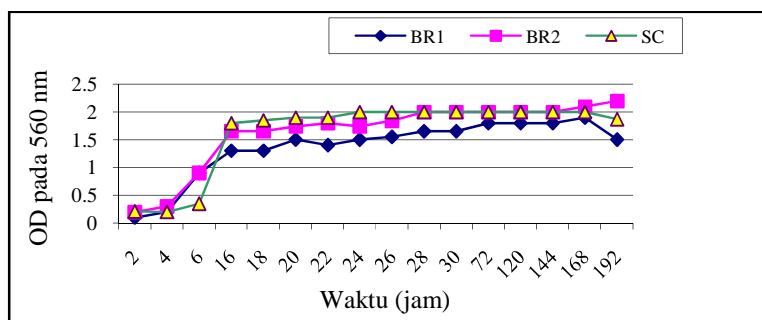
Hasil pengamatan secara morfologi di bawah mikroskop bahwa *S. cerevisiae* yang diteliti merupakan jenis khamir yang berbentuk oval. Diketahui bahwa dalam kultur yang sama, ukuran dan bentuk sel khamir bisa berbeda karena pengaruh umur sel dan kondisi lingkungan selama pertumbuhan (Kristiansen, 1994).

Pertumbuhan *Saccharomyces* dapat diamati dengan cara mengukur kerapatan sel (*optical density*) menggunakan spektrofotometer. Pengukuran kerapatan sel bertujuan untuk mengetahui fase pertumbuhan dari *Saccharomyces cerevisiae* BR1, BR2, dan SC, sehingga dapat menentukan fase logaritma yang tepat untuk proses regenerasi sel dan

saat yang tepat untuk panen β -glukan. Dilaporkan bahwa produksi β -glukan terakumulasi pada fase pertumbuhan stasioner.

Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*

Hasil pengukuran OD (*optical density*) *Saccharomyces cerevisiae* BR1, BR2 dan SC pada panjang gelombang 560 nm dapat dilihat pada Gambar 2.



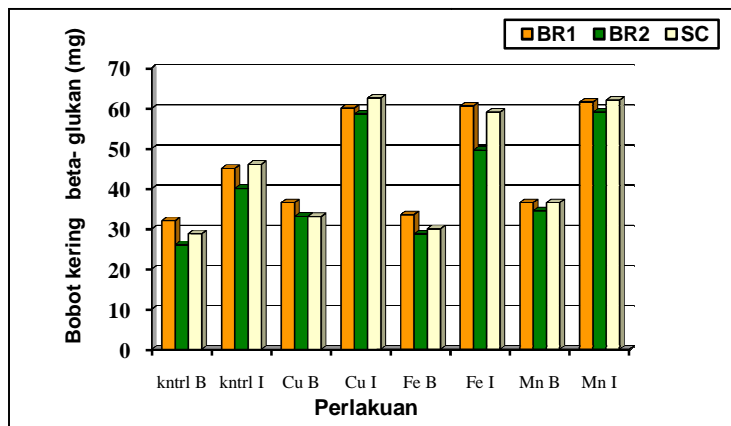
Gambar 2 Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media GYP

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fase lag *Saccharomyces* BR1, BR2 tercapai pada 4 jam masa inkubasi, sedangkan untuk *Saccharomyces* SC 6 jam setelah diinkubasi, pada fase ini nilai OD masih rendah. Selanjutnya ketiga kultur *S. cerevisiae* memasuki fase logaritma sampai 16-18 jam masa inkubasi dan kultur mencapai fase stasioner hingga 168 jam masa inkubasi. Dari kurva di atas maka dapat ditentukan bahwa untuk proses regenerasi kultur *S. cerevisiae* yaitu pada fase logaritma dengan nilai OD ± 1.0 dicapai pada 10 jam diinkubasi. Proses ekstraksi β -glukan dilakukan pada fase stasioner yaitu pada 7 hari inkubasi.

Bobot kering β -glukan

Hasil penimbangan ekstrak β glukan kasar dari masing-masing *S. cerevisiae* dapat dilihat pada Gambar 3. Dari data yang diperoleh diketahui bahwa penggunaan sel *S. cerevisiae* imobil menghasilkan bobot β -glukan kasar lebih tinggi dibandingkan menggunakan sel *S. cerevisiae* bebas. Hasil tertinggi diperoleh pada kultur *S. cerevisiae* galur SC yang ditumbuhkan pada media mengandung ion Cu^{2+} . Sedangkan bobot β -

glukan kasar terendah diperoleh pada perlakuan sel bebas *S. cerevisiae* BR2 dalam media kontrol (tanpa penambahan ion logam).



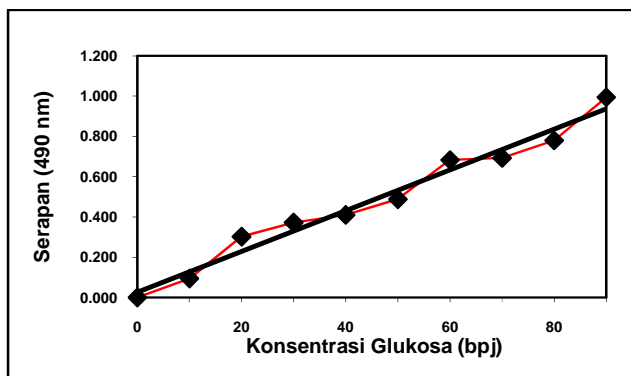
Gambar 3 Bobot kering β -glukan *S. cerevisiae* galur BR1, BR2 dan SC pada media mengandung ion logam (B: sel bebas, I: sel imobilisasi).

Penetapan kadar glukosa dengan metode fenol-sulfat

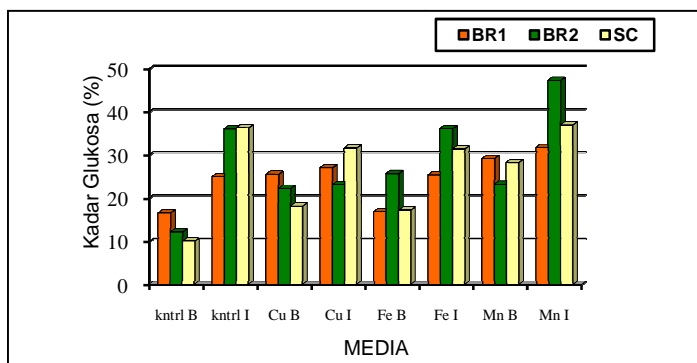
Penentuan kurva kalibrasi larutan standar glukosa menggunakan metode fenol-sulfat untuk mengetahui kadar glukosa pada sampel dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 490 nm, hasil dapat dilihat pada Gambar 4. Dari kurva kalibrasi tersebut menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,048 + 0,0091x$ dan koefisien korelasi 0,996. Hasil pengukuran serapan sampel diekstrapolasi ke persamaan garis regresi larutan standar glukosa, untuk memperoleh kadar glukosa dalam larutan uji β -glukan.

Kadar glukosa dalam sampel dari kultur *S. cerevisiae* dalam media fermentasi mengandung ion logam dapat dilihat pada Gambar 5. Berdasarkan histogram pada gambar 5 dapat dilihat bahwa penggunaan sel imobil menghasilkan kadar glukosa lebih tinggi pada semua perlakuan media fermentasi dibandingkan menggunakan sel bebas. Teknik imobilisasi merupakan suatu teknik dengan cara mengikat sel pada suatu bahan yang *inert* dan tidak larut seperti natrium alginat. Dengan sistem ini, sel dapat lebih tahan terhadap perubahan kondisi seperti pH atau temperatur. Sistem ini juga membantu sel berada di tempat tertentu selama berlangsungnya reaksi sehingga memudahkan proses pemisahan

dan memungkinkan untuk dipakai lagi pada proses fermentasi berikutnya. Sistem ini memiliki keunggulan dalam hal efisiensi, dikarenakan dapat meningkatkan konsentrasi sel *Saccharomyces cerevisiae* dalam media fermentasi (Jenie, 1992).



Gambar 4 Kurva kalibrasi Larutan Standar glukosa



Gambar 5 Histogram kadar glukosa (%) dalam sampel dari kultur *S. cerevisiae* BR1, BR2 dan SC dalam media mengandung ion logam (B: sel bebas, I: sel imobilisasi)

Kadar glukosa tertinggi diperoleh *S. cerevisiae* galur BR2 imobil dalam media mengandung ion Mn^{2+} yaitu sebesar 47,28%. Hasil pengukuran kadar glukosa dalam sampel β glukon tercantum pada Tabel 1.

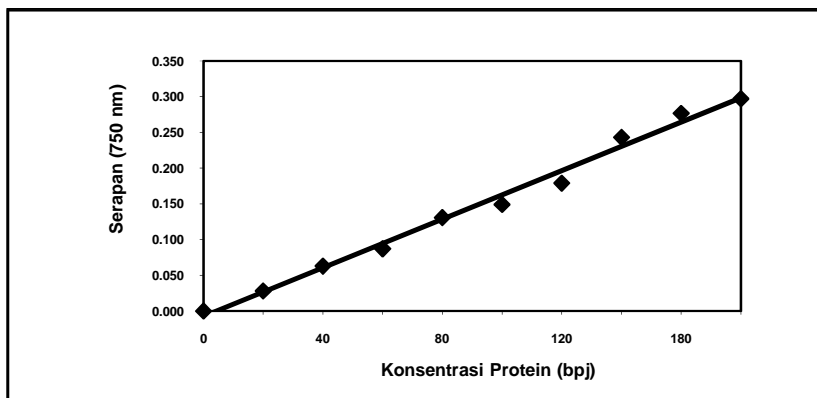
Tabel 1. Kadar Glukosa (%) dalam sampel β -glukan dari kultur *S. cerevisiae* pada media GYP mengandung ion logam.

No	Perlakuan Media	<i>S. cerevisiae</i> BR1		<i>S. cerevisiae</i> BR2		<i>S. cerevisiae</i> SC	
		Bebas	Imobil	Bebas	Imobil	Bebas	Imobil
1.	Kontrol	25,02	16,57	12,19	36,0	10,06	36,27
2.	Cu ²⁺	25,54	26,98	22,24	23,13	18,10	31,57
3.	Fe ²⁺	16,89	25,37	25,68	36,09	17,21	31,38
4.	Mn ²⁺	29,19	31,72	23,21	47,28	28,21	36,89

Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar glukosa tertinggi dicapai pada fermentasi yang menggunakan sel imobil dalam media mengandung Mn²⁺. Kadar glukosa tertinggi pada *S. cerevisiae* BR1, BR2 dan SC berturut-turut 31,72%, 47,28% dan 36,89%. Demikian halnya pada fermentasi menggunakan sel bebas, hasil terbaik diperoleh pada media fermentasi mengandung Mn²⁺. Kadar glukosa *S. cerevisiae* BR1 dan SC mencapai tertinggi masing-masing 29,19% dan 28,21%. Sedangkan galur BR2 menghasilkan kadar glukosa tertinggi pada media mengandung Fe²⁺ sebesar 25,68%.

Kadar protein dengan metode Lowry

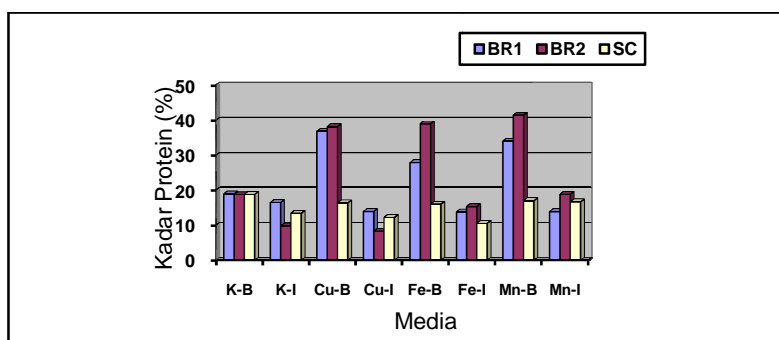
Penentuan kurva kalibrasi larutan standar BSA dilakukan dengan metode Lowry menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm, untuk mengetahui kadar protein dalam sampel. Kurva larutan standar BSA dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva kalibrasi larutan standar protein BSA

Dari kurva kalibrasi larutan standar BSA menghasilkan persamaan garis regresi $y = 0,0043 + 0,0014x$ dan koefisien korelasi 0,998.

Koefisien korelasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa ada hubungan linier yang baik antara serapan dan konsentrasi larutan standar BSA. Kadar protein pada sampel dapat diketahui dengan memasukkan nilai serapan ke dalam persamaan garis tersebut.



Gambar 7. Histogram kadar protein (%) dalam sampel dari kultur *S. cerevisiae* BR1, BR2 dan SC dalam media mengandung ion logam (B: sel bebas, I: sel imobilisasi).

Pada Gambar 7 dapat dilihat bahwa penggunaan sel *S. cerevisiae* bebas memberikan kadar protein yang tinggi dibandingkan dengan penggunaan sel yang diimobilisasi dengan natrium alginat 5%. Hal ini memberikan informasi yang baik karena dalam produk β glukon diharapkan kandungan proteinnya rendah, kaitannya untuk mengurangi efek alergi bila dikonsumsi. Dilaporkan bahwa β glukon telah umum digunakan di industri makanan sebagai penstabil, pengemulsi, bahan penebal dan sebagainya. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa penggunaan sel *S. cerevisiae* yang diimobilisasi menjadi menguntungkan.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar protein terendah diperoleh pada fermentasi menggunakan isolat *S. cerevisiae* BR2 terimobilisasi yang ditumbuhkan pada media mengandung ion Cu^{2+} , sedangkan *S. cerevisiae* BR1 menunjukkan kadar protein terendah pada sel imobil yang difermentasi dalam media mengandung ion Mn^{2+} dan *S. cerevisiae* SC pada sel imobil dalam media mengandung Mn^{2+} . Kadar protein dalam sampel β glukon tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar Protein (%) dalam sampel β -glukan dari kultur *S. cerevisiae* pada media GYP mengandung ion logam.

No	Perlakuan Media	<i>S. cerevisiae</i> BR1		<i>S. cerevisiae</i> BR2		<i>S. cerevisiae</i> SC	
		Bebas	Imobil	Bebas	Imobil	Bebas	Imobil
1.	Kontrol	18,93	16,46	18,69	9,72	18,82	13,39
2.	Cu ²⁺	36,79	13,86	38,11	8,26	16,37	12,18
3.	Fe ²⁺	27,84	13,79	38,93	15,26	15,97	10,52
4.	Mn ²⁺	33,95	13,85	41,34	18,84	16,98	16,65

Hasil Analisis menunjukkan bahwa β -glukan yang dihasilkan lebih tinggi pada kultur *S. cerevisiae* yang ditumbuhkan pada media mengandung ion Mn²⁺ dibanding dengan ion Fe³⁺ dan Cu²⁺. Hal ini disebabkan karena ion Mn²⁺ sangat berperan di dalam metabolisme *Saccharomyces*, sebagai mediator fisiologi buding sel dan perkembangan *nuclear yeast* serta berfungsi sebagai signal transducer intraselular (Loukin & Ching, 1995). Unsur Mn²⁺ merupakan elemen esensial bagi kekebalan tubuh dan sangat penting untuk fungsi fisiologik.

Elemen dasar yang penting untuk pertumbuhan dan reproduksi khamir (yeast) diantaranya: karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, fosfat, potassium, sulfur, kalsium, iron dan magnesium. Elemen sisa seperti Boron, Copper, Iodine, Iron, Zinc juga sangat berperan penting dalam meningkatkan fungsi dari beberapa tipe khamir (yeast). Dalam penelitian ini dipilih senyawa tembaga sulfat (CuSO₄), Besi klorida (FeCl₃·6H₂O) dan Mangan sulfat (MnSO₄·7H₂O) sebagai ion logam yang ditambahkan ke dalam media untuk memproduksi β -glukan, karena ketiga elemen tersebut memiliki peranan penting dalam meningkatkan fungsi *Saccharomyces* (Loukin & Ching, 1995). Fungsi ion Cu²⁺ berperan penting sebagai kofaktor berbagai enzim yang terlibat dalam berbagai proses biokimia seperti *cytochrome c oxidase*, Cu Zn superoxide dismutase dan sebagainya, serta berperan dalam asimilasi Fe. Ion Fe²⁺ merupakan komponen esensial untuk mensintesis hemoglobin dan sitokrom (Day, 2002; Pearce & Sherman, 1999).

Hasil uji statistik menggunakan metode anava dua arah dan dilanjutkan dengan uji Duncan, sebagai faktor pertama adalah perbedaan perlakuan sel dan faktor kedua perlakuan media dengan penambahan ion logam. Berdasarkan hasil analisis variansi terdapat perbedaan yang sangat nyata terhadap kadar protein dan glukosa yang dihasilkan oleh tiga galur *S. cerevisiae*.

KESIMPULAN

- Penggunaan tiga galur *Saccharomyces cerevisiae* yaitu BR1, BR2 dan SC mempengaruhi terhadap peningkatan kadar glukosa. Galur *Saccharomyces cerevisiae* yang menghasilkan kadar glukosa tertinggi adalah galur *Saccharomyces cerevisiae* BR2.
- Fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* dalam bentuk sel bebas dan sel yang diimobilisasi dengan natrium alginat menghasilkan β glukukan dalam jumlah yang berbeda. Penggunaan sel yang diimobilisasi menghasilkan kadar glukosa tertinggi dan kadar protein yang rendah sehingga lebih menguntungkan .
- Penambahan ion logam Cu^{2+} , Fe^{3+} dan Mn^{2+} pada media fermentasi mempengaruhi terhadap β -glukan yang dihasilkan yang diukur sebagai monomer glukosa. Kadar glukosa tertinggi dihasilkan akibat penambahan ion Mn^{2+} .

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh dana DIPA Tahun 2008 untuk penelitian Onggok Sdri Kusmiati. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada Sdri K. Destilawati yang telah membantu selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnet JA, 1990. Characteristic and Identification Yeast. New York: Cambridge University Press.
- Chaplin MF dan Kennedy JF. 2006. Carbohydrate Analysis. A Practical Approach 2nd edition. Oxford IRL Press. Oxford University Press. Hal 1-3
- Cheseeman, IM., M.Brown. 2007. Microscopy of curdlan structure, <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpage/mbrown/congress/html>. diakses Maret 2007
- Copeland, A.R. 1994. Methods for Protein Analysis. New York-London: Chapman & Hall. Hal:43-33
- Day, Jr. R.A and A.L. Underwood. 2002. Analisis Kimia Kuantitatif, Edisi 6, terjemahan Alloysius Hadiyana P, Erlangga, Jakarta. Hal 382-404, 553-561.

- Hisamatsu, M. 2003. Pure Glucan (Curdlan) Basic Properties and Food Applications. Takeda Chemical Industries, Ltd. Japan
- [Http://www.colostamilk.blogspot.com](http://www.colostamilk.blogspot.com). 2008. Beta gluklan. diakses 14 Juni 2008
- [Http://www.en.wikipedia.org/wiki/Beta-glucan](http://www.en.wikipedia.org/wiki/Beta-glucan). diakses 20 Januari 2008.
- [Http://www.imucell.com/pages/pdfs/cholesterol pdf](http://www.imucell.com/pages/pdfs/cholesterol_pdf). Beta gluklan Research - *Saccharomyces cerevisiae*. 10 Desember 2007
- [Http://www.pdrhealth.com/](http://www.pdrhealth.com/). 2008. Yeast Beta-D-Glukan. Diakses 20 Januari 2008
- Jenie Betty S.L. 1992. Imobilisasi Sel Mikroba untuk Industri Pangan. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 1992. Hal 5-16
- Kristiansen, B. 1994. The Production of Bakerys Yeast. Integrated Design of Fermentation Plant. Tokyo. 13-15
- Kusmiati, Swasono R. Tamat, S. Nuswantara, I. Nita. 2007. Produksi dan Penetapan Kadar Beta gluklan dari Tiga Galur *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Mengandung Molase. Pusat Penelitian Bioteknologi. Cibinong
- Loukin, S. & Ching Kung. 1995. Manganese Effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. The Journal of Cell Biology . Vol: 131(4) 1025-1037
- Pearce, D.A & F. Sherman. 1999. Toxicity of Copper, Cobalt and Nickel Salts is dependent on histidine metabolim in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. Vol 181(16):4774-4779
- Walker Grame M. 1998. Yeast Physiology and Biology. British Library. 52-59