

OPTIMIZATION OF *Bacillus cereus* GROWTH IN MEDIA WITH DIFFERENT CARBON SOURCES

Muhammad Hendra Putra^{1*}, Feliatra¹, Irwan Effendi¹

¹Faculty of Fisheries and Marine, University of Riau, Indonesia

*muhammadhendraputra@gmail.com

ABSTRACT

Bacillus cereus is a probiotic bacteria that requires media as a source of nutrients for its growth. This study aims to the media used were tofu liquid waste, sago liquid waste, and molasses. The method used is an experimental method, namely testing two groups of bacterial isolates; *B. cereus* SN7 and the consortium (combination of five isolates from *B.cereus* with different strains). Each group of isolates was grown with three replications on each waste medium. bacterial growth every six hours for twenty four hours using two methods; Total Plate Count (TPC) and bacterial cell biomass. There was no significant difference in growth between the two groups of bacterial isolation. The optimal growth of each isolate was found in molasses waste. The growth between two bacterial isolates in the liquid waste media was *B. cereus* SN7 bacterial isolate.

Keywords: *Bacillus cereus*, carbon, molasses, optimal growth, incubation time

I. PENDAHULUAN

Bakteri merupakan salah satu golongan organisme prokariotik yang tidak mempunyai selubung inti [1]. Organisme ini paling banyak ditemukan jumlahnya dan tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lainnya. Hal tersebut dikarenakan bakteri dapat tumbuh dan berkembang di berbagai habitat dengan cara memanfaatkan zat-zat yang ada di lingkungannya sebagai sumber nutrisi.

Bakteri memiliki potensi yang tinggi sebagai probiotik. Probiotik merupakan mikroba hidup yang memiliki pengaruh menguntungkan bagi inang melalui modifikasi bentuk keterikatan (asosiasi) dengan inang atau komunitas mikroba lingkungan hidupnya sehingga dapat memiliki pengaruh memperbaiki pencernaan makanan, melindungi dari serangan patogen dan memperbaiki kualitas lingkungan [2]. Pemanfaatan bakteri probiotik dapat dijadikan sebagai protein sel tunggal (PST) yang telah banyak

memberi keuntungan bagi manusia. Hal yang menguntungkan lainnya dari bakteri probiotik ini memiliki manfaat bagi bidang perikanan karena dapat membunuh bakteri patogen.

Salah satu bakteri yang potensial dikembangkan sebagai agen PST adalah *B.cereus* yang tergolong dalam bakteri heterotrofik [3]. *B. cereus* sebagai bakteri probiotik telah dibuktikan dari berbagai penelitian yang menyatakan bahwa bakteri ini dapat menghambat beberapa bakteri patogen dan juga merupakan bakteri heterotrofik yang dapat mendegradasi bahan organik yang bersifat toksik di lingkungan terutama perairan [4-5]. Kemampuan bakteri heterotrof dalam menghambat pertumbuhan patogen menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat menghasilkan metabolit sekunder atau senyawa bioaktif [6].

Bacillus cereus mempunyai kemampuan mengontrol bakteri patogen dan menekan pertumbuhan bakteri lain

melalui antibiotik yang dihasilkannya/kompetisi dalam hal perebutan nutrisi dan ruang. Menurut [7], *B. cereus* merupakan bakteri probiotik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Aeromonas* sp. Bakteri ini memiliki potensi sebagai tambahan pakan berupa enzim mananase [8].

Untuk mengkultur bakteri diperlukan media sebagai wadah pertumbuhannya. *Bacillus* mempunyai kemampuan mengontrol bakteri patogen dan menekan pertumbuhan bakteri lain melalui antibiotik yang dihasilkannya/kompetisi dalam hal perebutan nutrisi dan ruang.

Media yang digunakan harus memenuhi persyaratan nutrisi yaitu karbon, nitrogen, unsur non logam (sulfur dan fosfor), unsur logam (Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe), vitamin, air, dan energi [9]. Umumnya untuk pembuatan media pertumbuhan bakteri menggunakan media *Nutrient Agar* (NA). Akan tetapi, dengan harga media NA yang relatif mahal, sehingga beberapa peneliti membuat media alternatif. Salah satu media yang dapat diasumsikan sebagai media pertumbuhan *B. cereus* yaitu limbah cair tahu, media cair sagu, dan molase. Penelitian ini bertujuan untuk menguji bakteri *B. cereus* dapat tumbuh pada media modifikasi dan waktu pertumbuhan terbaik dengan menggunakan sumber karbon dari limbah cair tahu, sagu, dan molase.

2. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Juni-Juli 2021 di Laboratorium Mikrobiologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau.

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang menggunakan beberapa isolat dari galur atau strain yang berbeda. Galur atau

strain adalah koloni mikrobial (hasil biakannya) dengan sifat-sifat fisiologi yang sama sebagai hasil proses isolasi. Strain yang digunakan yaitu isolat bakteri *B. cereus* strain SN7 dan konsorsium (*B. cereus* strain SP4, *B. cereus* strain S5, *B. cereus* strain Xmb051, *B. cereus* strain BF2 dan *B. cereus* strain SN7) yang ada di Laboratorium Mikrobiologi Laut.

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap faktorial yang memiliki dua faktor yaitu media dan isolat. Media memiliki lima taraf yang terdiri dari media limbah tahu, limbah sagu, limbah molase, kontrol positif, dan kontrol negatif. Sedangkan isolat memiliki dua taraf yaitu *B. cereus* SN7 dan konsorsium yang diulang masing-masing sebanyak tiga kali..

Prosedur Penelitian

Media yang digunakan pada kultur bakteri *B. cereus* ini adalah media pertumbuhan dengan cara memodifikasi limbah cair menjadi media pertumbuhan bagi *B. cereus*. Komposisi media modifikasi yang digunakan dalam penelitian ini memiliki yaitu:

LCT = 5,8 ml limbah cair tahu + 15,8 gram K_2HPO_4 + 12,8 gram KH_2PO_4 + 5 mg Vitamin B_{12} + 17 ml putih telur + aquades sampai larut dengan volume 1000 ml.

LCS = 6,5 ml limbah sagu + 15,8 gram K_2HPO_4 + 12,8 gram KH_2PO_4 + 5 mg Vitamin B_{12} + 17 ml putih telur + aquades sampai larut dengan volume 1000 ml

LCM = 42,8 ml molase + 15,8 gram K_2HPO_4 + 12,8 gram KH_2PO_4 + 5 mg Vitamin B_{12} + 17 ml putih telur + aquades sampai larut dengan volume 1000 ml.

Biakan murni *B. cereus* dibuat sub kultur pada media NA miring dan

diinkubasi pada suhu 37°C selama $\pm$ 24 jam. Untuk membuat 120 ml kultur bakteri, sebanyak 100 ml media modifikasi dimasukkan ke dalam botol kaca kemudian disterilkan dengan dipasteurisasi di *Water Bath Shaker* pada suhu 63-66°C, selama 30 menit.

Isolat bakteri *B.cereus* strain SN7 disuspensikan ke dalam 20 mL dan konsorsium 20 mL (masing-masing streinnya 4 mL) larutan fisiologis 0,9% NaCl secara aseptis dan dihomogenkan menggunakan *vortex* sampai kekeruhan suspensi bakteri setarakan dengan larutan standar 0,5 McFarland. Kedua suspensi bakteri *B. cereus* 20 mL kemudian dimasukkan ke dalam media pertumbuhan limbah modifikasi. Media kultur yang telah berisi bakteri diinkubasi dalam *Water Bath Shaker* yang diatur dalam suhu 37°C dengan kecepatan 90 rpm selama 24 jam.

Pengukuran pertumbuhan kultur bakteri dilakukan setiap 6 jam selama 24 jam dengan menggunakan dua cara yaitu metode TPC dan pengukuran biomassa sel bakteri. Teknik yang digunakan pada metode TPC dalam penelitian ini yaitu teknik cawan sebar (*spread plate*). Sampel bakteri pada media pertumbuhan diencerkan terlebih dahulu sampai pengenceran 10^{-5} , kemudian 0,1 mL diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media PCA. Sampel bakteri pada media kemudian disebar dan diratakan menggunakan batang drigalski secara aseptis didekat bunsen, setelah itu sampel bakteri diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator kemudian koloni bakteri yang tumbuh pada media PCA dihitung menggunakan *colony counter*. Hasil jumlah koloni yang didapat kemudian dimasukkan kedalam rumus perhitungan bakteri sebagai berikut [11].

$$CFU = \frac{1}{Volume \times \sum Faktor Pengenceran} \times \sum Koloni$$

Pengukuran biomassa bakteri dilakukan dengan cara menentukan berat

kering pada sel bakteri. *Microtube* yang menjadi wadah sel bakteri ditimbang terlebih dahulu dengan timbangan analitik, dicatat, dan dimasukkan 1 mL bakteri yang diambil pada media kultur. *Microtube* yang berisi isolat bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit Supernatan yang telah terbentuk dibuang menggunakan pipet tetes sampai hanya endapan sel bakteri yang tersisa. *Microtube* yang berisi sel bakteri kemudian di oven dengan suhu 100°C selama 15 menit. Setelah di oven, mikrotube didinginkan kemudian ditimbang berat keringnya. Berat kering yang telah didapatkan dikurang dengan berat *microtube* sebelumnya sesampai didapatkan berat kering yang sebenarnya dari bakteri.

Pengukuran Pertumbuhan Bakteri

Ada tiga metode pengukuran pertumbuhan bakteri yang digunakan, yaitu [11]:

Teknik yang digunakan pada metode TPC dalam penelitian ini yaitu teknik cawan sebar (*spread plate*). Langkah pertama dalam metode ini yaitu menyiapkan media PCA (*Plate Count Agar*) yang telah dibuat, disterilkan dan ditempatkan pada cawan petri secara aseptis. Sampel bakteri pada media pertumbuhan diencerkan terlebih dahulu sampai pengenceran 10^{-5} , kemudian 0,1 ml diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam cawan petri yang berisi media PCA. Sampel bakteri pada media kemudian disebar dan diratakan menggunakan batang drigalski secara aseptis di dekat bunsen, setelah itu sampel bakteri diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator kemudian koloni bakteri yang tumbuh pada

Data hasil pengukuran pertumbuhan sel bakteri dapat disajikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dibahas secara deskriptif. Untuk uji statistik terhadap semua perlakuan yang diberi dilakukan dengan uji ANOVA, jika pada hasil pada

uji ANOVA berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%, maka akan dilakukan uji lanjut menggunakan uji beda nyata (Student Newman Keuls). Kemudian data pertumbuhan bakteri *B. cereus* pada media berbeda yang telah didapat dibandingkan berdasarkan literatur yang berkaitan dengan pertumbuhan bakteri *B. cereus*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Jumlah Koloni Bakteri *B. cereus*

Hasil pengukuran pertumbuhan rata-rata jumlah koloni bakteri *B. cereus* strain SN7 dan konsorsium pada media limbah cair tahu, limbah cair sagu dengan metode TPC (*Total plate count*) pada penelitian yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Metode TPC Bakteri *B. cereus* strain SN7

Media Limbah	Jumlah Koloni Bakteri ($\times 10^8$ CFU/mL) pada Waktu Inkubasi (Jam ke-)				
	0	6	12	18	24
T	1,397	1,657	2,077	2,883	3,197
S	1,770	1,910	2,553	3,157	2,983
M	1,570	2,007	2,517	3,373	3,653
K (+)	1,697	2,093	2,530	3,117	2,977
K (-)	1,610	1,827	1,847	1,700	1,907

Tabel 2. Metode TPC Bakteri *B. cereus* strain SN7

Media Limbah	Jumlah Koloni Bakteri ($\times 10^8$ CFU/mL) pada Waktu Inkubasi (Jam ke-)				
	0	6	12	18	24
T	1,400	1,683	1,913	2,520	2,586
S	1,707	1,767	2,047	2,523	2,343
M	1,277	1,537	2,390	3,000	2,983
K (+)	1,687	1,803	1,990	2,463	2,350
K (-)	1,520	1,693	1,560	2,000	1,850

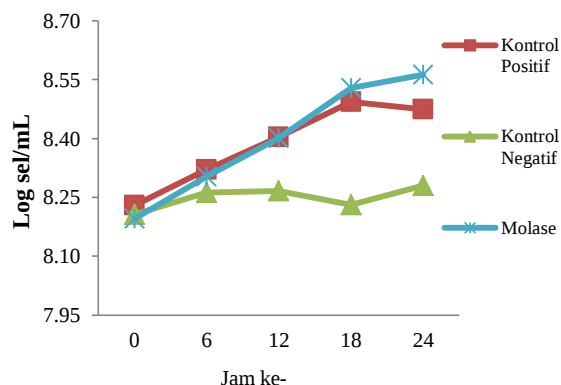
Keterangan: T : Media Limbah Cair Tahu, S : Media Limbah Cair Sagu, M : Media Limbah Molases, K (+) : Kontrol Positif, K (-) : Kontrol Negatif

Berdasarkan Tabel 1, hasil pengukuran TPC isolat *B. cereus* strain SN7 dapat dilihat bahwa pertumbuhan paling baik terjadi pada media modifikasi limbah molase dengan nilai $3,653 \times 10^8$ CFU/mL pada jam ke-24. Hasil pengukuran TPC isolat *B. cereus* konsorsium dapat dilihat bahwa pertumbuhan paling baik terjadi pada media modifikasi limbah molase dengan nilai $3,000 \times 10^8$ CFU/mL pada jam ke-18.

Hasil ini menunjukkan bahwa molase memiliki nutrisi terutama karbon yang baik sehingga dapat memberi pertumbuhan yang optimal pada bakteri. Hal ini sesuai dari pernyataan [12], “bahwa molase memiliki kandungan karbohidrat berupa gula yang dapat dijadikan sumber energi serta gula-gula yang terkandung dalam molase mudah dicerna dan diserap oleh sel bakteri” yang artinya molase memiliki kandungan karbon atau karbohidrat berupa gula yang tepat bagi pencernaan dan pertumbuhan sel bakteri.

Pada media limbah sagu dan limbah tahu pertumbuhan *B. cereus* lebih sedikit dibandingkan dengan limbah molase karena *B. cereus* merupakan salah satu bakteri yang memanfaatkan karbon yang tinggi yang terkandung dalam sukrosa. Hal ini didukung oleh pernyataan [13], “bahwa molase mengandung gula sebanyak 50%, baik dalam bentuk sukrosa maupun dalam bentuk gula pereduksi” yang artinya dengan banyaknya kandungan gula pada molase menjadikannya kaya akan kandungan unsur karbon.

Pengukuran jumlah koloni pada penelitian ini menghasilkan satu pertumbuhan optimal pada masing-masing isolat. Pertumbuhan optimal tersebut dapat dibandingkan antar media modifikasi dengan kontrol. Perbandingan pertumbuhan ini disajikan dalam bentuk grafik pada Gambar 1 dan Gambar 2.



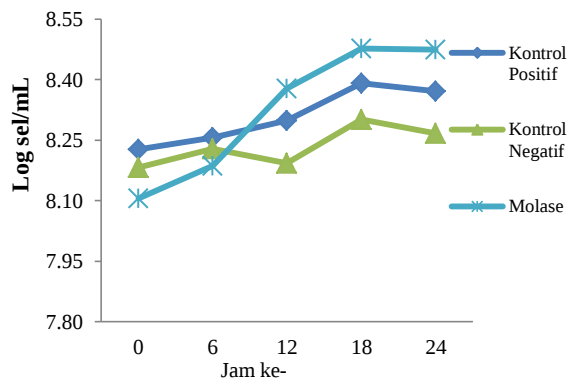
Gambar 1. Pertumbuhan Optimal Sel Bakteri *B. cereus* strain SN7

Berdasarkan Gambar 1 dan Gambar 2, pertumbuhan optimal isolat *B. cereus* strain SN7 terdapat pada media modifikasi limbah molase yaitu dengan nilai $3,653 \times 10^8$ CFU/mL pada jam ke-24. Dilihat dari grafik menunjukkan bahwa pertumbuhan *B. cereus* strain SN7 masih naik, yang akan memungkinkan terjadi pertumbuhan di jam berikutnya. Pertumbuhan optimal pada isolat *B. cereus* konsorsium juga terdapat pada media modifikasi limbah molase yaitu dengan nilai $3,000 \times 10^8$ CFU/mL.

Pada pengukuran ini, isolat yang memiliki lebih banyak fase pertumbuhan terdapat pada isolat *B. cereus* konsorsium di media modifikasi limbah molase. Pertumbuhan dengan fase eksponensial ini terjadi dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-18. Sedangkan pada jam ke-18 sampai dengan jam ke-24 bakteri sudah mengalami fase stasioner. Sedangkan pada isolat *B. cereus* strain SN7 hanya mengalami fase eksponensial mulai dari jam ke-0 s/d jam ke-24.

Pertumbuhan Biomassa Sel Bakteri *B. cereus*

Hasil pengukuran biomassa bakteri *B. cereus* strain SN7 dan konsorsium yang telah didapat kemudian dirata-ratakan dan ditentukan standar deviasinya berdasarkan 3 kali ulangan pada setiap perlakuan. Hasil yang telah didapatkan dalam pengukuran ini dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.



Gambar 2. Pertumbuhan Optimal Sel Bakteri *B. cereus* Konsorsium

Tabel 3. Biomasa TPC Bakteri *B. cereus* strain SN7

Media Limbah	Waktu Inkubasi (Jam ke-) (g/mL)				
	0	6	12	18	24
T	0,973	0,981	0,981	1,008	1,011
S	1,003	1,007	1,025	1,026	1,022
M	1,011	1,027	1,029	1,030	1,035
K (+)	1,018	1,032	1,044	1,050	1,040
K (-)	0,969	0,969	0,981	0,976	0,985

Tabel 4. Biomassa bakteri *B. cereus* konsorsium

Media Limbah	Waktu Inkubasi (Jam ke-) (g/mL)				
	0	6	12	18	24
T	0,948	0,961	0,962	0,977	0,972
S	1,013	1,020	1,018	1,017	1,016
M	1,005	1,019	1,027	1,033	1,032
K (+)	0,974	0,992	1,006	1,009	1,005
K (-)	0,981	0,976	0,972	0,982	0,969

Keterangan: T : Media Limbah Cair Tahu, S : Media Limbah Cair Sagu, M : Media Limbah Molases, K (+) : Kontrol Positif, K(-) : Kontrol Negatif.

Berdasarkan hasil perhitungan (Tabel 3 dan 4), dapat dilihat bahwa biomassa tertinggi terdapat pada media modifikasi molase, dimana kedua isolat bakteri *B. cereus* strain SN7 dengan nilai 1,035 g/ml pada inkubasi jam ke-24 dan isolat bakteri *B. cereus* konsorsium memiliki jumlah nilai biomassa 1,033 g/mL pada inkubasi jam ke-18.

Pada pengukuran ini, isolat yang memiliki lebih banyak fase pertumbuhan terdapat pada isolat *B. cereus* konsorsium di media modifikasi limbah molase. Pertumbuhan dengan fase eksponensial ini terjadi dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-18. Sedangkan pada jam ke-18 sampai dengan 1 jam ke-24 bakteri sudah mengalami fase stasioner. Pada isolat *B. cereus* strain SN7 hanya mengalami fase eksponensial mulai dari jam ke-0 s/d jam ke-24.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh [14], media limbah cair dengan nutrien yang cukup dalam kadar tertentu dapat menghasilkan kultur mikroalga dan bakteri heterotrofik yang mampu mengkonversi bahan organik menjadi sel-sel baru dari limbah itu sendiri sehingga meningkatkan pertumbuhan biomassa dari kultur mikroba. Sedangkan menurut [15], molase adalah hasil samping industri gula yang mengandung senyawa nitrogen, *trace element* dan kandungan gula yang cukup tinggi terutama kandungan sukrosa sekitar 34% dan kandungan total karbon sekitar 37%. Sedangkan menurut [16] kandungan karbon sebesar 21,4%, nitrogen sebesar 2,14%, dan rasio C:N pupuk molase adalah 10%. Hal ini menunjukkan bahwa limbah molase dapat

menjadi media pertumbuhan karena dapat memenuhi sumber bahan organik terutama karbon sebagai sumber nutrisi bagi isolat *B. cereus* yang dibuktikan dari pertumbuhan isolat *B. cereus* strain SN7 dan *B. cereus* konsorsium dapat tumbuh lebih baik dari media limbah tahu dan limbah sagu selama masa inkubasi selama 24 jam.

4. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Media pertumbuhan yang paling optimal untuk bakteri *B. cereus* strain SN7 dan konsorsium adalah media modifikasi limbah molase yang diinkubasi selama 24 jam, dibandingkan dengan media modifikasi limbah sagu dan limbah tahu. Untuk perbandingan isolat *B. cereus* strain SN7 masih memiliki potensi pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat *B. cereus* konsorsium yang telah diinkubasi selama 24 jam.

Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya agar memperpanjang masa inkubasi isolat bakteri *B. cereus* strain SN7 untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimal pada penggunaan media modifikasi limbah molase dan perlu dilakukan uji proksimat

DAFTAR PUSTAKA

1. Holderman, M.V., E. de Queljoe, dan S.B. Rondonuwu. (2017). Identifikasi bakteri pada pegangan eskalator di salah satu pusat perbelanjaan di kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(1) : 13-18
2. Wardika, A.S., Suminto, dan A. Sudaryono. (2014). Pengaruh Bakteri Probiotik pada Pakan dengan Dosis Berbeda terhadap Efisiensi Pemanfaatan Pakan, Pertumbuhan dan Kelulushidupan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(4): 9-17
3. Feliatra, F., N. Syirwani, A. Tanjung, D.S. Adithiya, M. Susanna, dan I. Lukistyowati. (2018). The Effectiveness of Heterotrophic Bacteria Isolated from Dumai Marine Waters of Riau, Used as Antibacterial against Pathogens in Fish Culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 116 (1) : 012034.
4. Nainggolan, A.H. (2019). Uji Metabolit Bakteri Heterotrofik dari Muara Sungai Siak terhadap Bakteri Patogen. *Skripsi*. Pekanbaru. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. 61 hlm

5. Siregar, I.A. (2019). Efektifitas Penggunaan Bakteri Heterotrofik terhadap Pertumbuhan Ikan Nila Merah (*Oreochromis niloticus*). *Skripsi*. Pekanbaru. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau. 80 hlm
6. Nursyirwani, N., F. Feliatra, D. Yoswaty, dan R.L. Dinata. (2018). Activity of heterotrophic bacteria from marine area of Siak District against pathogenic bacteria. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 216(1) : 012047.
7. Feliatra, F., I. Effendi, dan S.L. Yanti. (2018). Characteristic genetics of heterotrophic bacteria in Siak River Estuary, Riau Province, Indonesia as Prospective Anti-pathogenic Bacteria to Fish and Shrimps. *J Pure Appl Microbiol.*, 12(4) : 1801-1808
8. El-Sharouny, E.E., N.M.K. El-Toukhyb, N.A. El-Sersyc dan A.A. El-Aal ElGayara. (2015). Optimization and purification of mannanase produced by an alkaliphilic-thermotolerant *Bacillus cereus* N1 isolated from Bani Salama Lake in Wadi El-Natron. *Biotechnol. Equip.*, 29 (3) : 15-323
9. Anisah dan R. Triastuti. (2015). Media Alternatif untuk Pertumbuhan Bakteri Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS*. 855 – 860.
10. Wulandari, Z., E. Taufik, M. Syarif. (2017). Kajian Kualitas Produk Susu Pasteurisasi Hasil Penerapan Rantai Pendingin. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 5(3): 94- 100.
11. Effendi, I. (2020). *Metode Identifikasi dan Klasifikasi Bakteri*. Pekanbaru: Oceanum Press. 142 hlm
12. Nengsih, I. A., F. Feliatra, dan I. Effendi. (2020). Growth of Bacteria *Bacillus cereus* in Liquid Mediums with Different Carbohydrate Sources. *Journal of Coastal and Ocean Sciences*, 1(1) : 68-73
13. Endah, W., I. Tami, dan S. Ernawati. (2012). Limbah Molase: Pemanfaatan sebagai Sumber Karbohidrat untuk Perkembangbiakan Mikroorganisme. *Valensi* 2(5): 565-572
14. Septiani, W.D., A. Slamet, dan J. Hermana. (2014). Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Laju Pertumbuhan Alga dan Bakteri Heterotropik. *Jurnal Teknik POMITS*, 3 (2) : D98 – D103.
15. Suastuti M. (1998). Pemanfaatan Hasil Samping Industri Pertanian Molase dan Limbah Cair Tahu sebagai Sumber Karbon dan Nitrogen untuk Produksi Biosurfaktan oleh *Bacillus* sp Galur Komersil dan Lokal. *Tesis*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
16. Alviolita, C. (2017). Pengaruh Pemberian Tetes Gula (Molase) Sebagai Pupuk Alami Terhadap Kelimpahan *Nannochloropsis* Sp. *Skripsi*, Universitas Brawijaya.