

PENGURANGAN AFLATOKSIN B₁ (AFB₁) DENGAN PROSES FERMENTASI MENGGUNAKAN *Rhizopus oligosporus* MK-1 PADA PEMBUATAN BUMBU PECEL

Reduction of Aflatoxin B₁ (AFB₁) "Bumbu Pecel" By Using Rhizopus oligosporus MK-1 for Fermentation

Yuliana Tandi Rubak¹, Endang S. Rahayu², Sardjono²

ABSTRAK

Aflatoxin B₁ adalah mikotoksin yang paling berbahaya untuk kesehatan manusia, karena bersifat racun, karsinogenik, teratogenik dan mutagenik. Aflatoxin adalah mikotoksin yang sering mencemari biji-bijian, kacang-kacangan dan juga produk biji-bijian maupun kacang-kacangan seperti bumbu pecel. Bumbu pecel adalah bumbu yang digunakan bersama sayuran yang biasa disebut "pecel" yang sangat populer di Indonesia. Reduksi biologis aflatoxin adalah proses yang sangat penting untuk menurunkan kandungan aflatoxin selama fermentasi kacang oleh *Rhizopus oligosporus* MK-1. Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu modifikasi proses produksi bumbu pecel dan uji sensoris terhadap bumbu pecel yang telah dimodifikasi. Modifikasi proses meliputi perendaman biji, pengupasan kulit biji, pencucian, perebusan, fermentasi *Rhizopus oligosporus* MK-1 dan penyangraian. Analisis aflatoxin menggunakan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses fermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* MK-1 menurunkan kadar aflatoxin B₁ sekitar 88,95 % selama 3 hari proses fermentasi. Semakin lama proses fermentasi, maka penurunan kadar aflatoxin juga semakin banyak dan berhubungan dengan pertumbuhan *Rhizopus oligosporus* MK-1. Fermentasi selama 2 hari tidak berpengaruh terhadap karakter sensoris bumbu pecel.

Kata kunci: Aflatoxin B₁, kacang tanah, bumbu pecel, fermentasi, *Rhizopus oligosporus* MK-1

ABSTRACT

Aflatoxin B₁ is the most harmful mycotoxin for human health because of the toxicity, carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity. Aflatoxin is the common mycotoxin contaminant in grains, nuts and their products such as "bumbu pecel". Bumbu pecel is a kind of spice used for serving vegetable foods called "pecel" which is very popular in Indonesia. Biological reduction of aflatoxin is an important process in order to degrade aflatoxin in foods. The aim of this research was to modify the steps of bumbu pecel production to reduce aflatoxin B₁ content through fermentation of peanut by *Rhizopus oligosporus* MK-1. The research was carried out in two steps that were modifying process in bumbu pecel production and sensory test for modified bumbu pecel. Modification process consisted of bean soaking, germ peeling, washing, steaming, fermentation of *Rhizopus oligosporus* MK-1 and roasting. Aflatoxin analysis was carried out by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). The result indicated that fermentation process by *Rhizopus oligosporus* MK-1 reduced 88.95 % aflatoxin B₁ accumulatively in three days fermentation. Aflatoxin reduction was greater with the of length fermentation time and correlated with the growth of *Rhizopus oligosporus* MK-1. Two days fermentation did not affect the sensory characteristic of bumbu pecel.

Keywords: Aflatoxin B₁, peanut, bumbu pecel, fermentation, *Rhizopus oligosporus*, MK-1

PENDAHULUAN

Keamanan pangan merupakan syarat kelayakan suatu produk pangan untuk dapat dikonsumsi. Salah satu isu sentral keamanan pangan adalah adanya fakta bahwa kacang-

kacangan dan produknya mengandung cemaran mikotoksin, khususnya aflatoxin. Hal tersebut sangat memprihatinkan mengingat kacang tanah merupakan komoditas kacang-

¹ Fakultas Pertanian, Universitas Nusa Cendana, Kupang, Jl. Adisucipto Penfui, Kupang, Nusa Tenggara Timur

² Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

kacangan kedua di Indonesia setelah kedelai yang terutama digunakan untuk tujuan konsumsi, disamping untuk pakan ternak dan bahan baku industri.

Aflatoksin merupakan produk metabolit sekunder yang dihasilkan strain toksigenik *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus*. Kerusakan yang diakibatkan oleh kedua jamur tersebut tidak hanya kerusakan fisik tetapi lebih kepada kerusakan kualitas kacang tanah. Aflatoksin bersifat mutagenik, karsinogenik, teratogenik, hepatotoksik, immunosupresif, dan menyebabkan penghambatan beberapa sistem metabolik.

Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya, telah ditemukan adanya aflatoksin dengan kadar yang cukup tinggi pada kacang tanah pasca panen dan beberapa produk olahan kacang tanah (kacang garing, kacang oven, kacang atom, bumbu pecel, dan enting-enting gepuk) di atas batas maksimal yang diperbolehkan badan POM yaitu 20 ppb (Badan POM, 2004). Dalam penelitian yang telah dilakukan Lilieanny dkk. (2005) terungkap bahwa dari 12 sampel bumbu pecel rerata kandungan aflatoksinnya adalah 41,6 ppb. Penelitian tentang sebaran kandungan aflatoksin pada bumbu pecel juga telah dilaporkan oleh Mahardikarani (2007) bahwa dari 16 merk bumbu pecel yang beredar di pasaran Daerah Istimewa Yogyakarta kandungan aflatoksinnya ada yang mencapai 121,26 ppb. Hal yang perlu mendapat perhatian adalah bahwa bumbu pecel yang digunakan sebagai bumbu pelengkap sayuran yang dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia terutama Jawa, telah tercemar aflatoksin melebihi batas yang diperbolehkan. Adanya fakta ini menimbulkan kekhawatiran tersendiri. Jika kandungan aflatoksin pada bahan baku cukup tinggi maka diharapkan bahwa pada proses pengolahan kacang tanah selanjutnya terdapat tahapan yang diharapkan bisa mereduksi atau meminimalkan kandungan aflatoksin B₁. Reduksi aflatoksin dapat dilakukan secara kimiawi, fisik dan biologis.

Metode biologis dipandang sebagai alternatif cara yang lebih baik dibandingkan metode fisikawi maupun kimiawi karena pertimbangan dari segi keberadaan zat gizi dalam suatu produk pangan serta dampak terhadap kesehatan manusia. Jensen dkk. (1997) menyatakan bahwa keberadaan *Rhizopus spp* mampu merubah 87 % AFB₁ menjadi senyawa yang bersifat nonfluorescence dan lebih lanjut dijelaskan bahwa pada proses fermentasi menggunakan *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* terjadi degradasi AFB₁ sehingga terbentuk aflatoksikol A yang toksisitasnya 10 kali lebih rendah bila dibandingkan AFB₁.

Sandhi (2005) juga telah melaporkan kemampuan isolat *Rhizopus oligosporus* MK-1 untuk mereduksi kandungan aflatoksin dalam media cair dan pembuatan tempe kedelai. Reduksi isolat ini pada media cair memiliki laju penurunan konsentrasi tertinggi dibanding isolat *Rhizopus* lain yang digunakan. Pada pembuatan tempe kebele reduksi AFB₁ oleh isolat ini mencapai 41,47 %.

Penelitian ini dilakukan untuk memodifikasi tahapan pembuatan bumbu pecel dengan proses fermentasi biji kacang tanah menggunakan *Rhizopus oligosporus* MK-1 guna menurunkan cemaran AFB₁ pada kacang tanah sebagai bahan baku untuk pembuatan pecel.

METODE PENELITIAN

Mikroorganisme

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *Aspergillus flavus* FNCC 0546 dan isolat *Rhizopus oligosporus* MK-1 yang diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Media

Media Potato Dextrose Agar (PDA) digunakan untuk menumbuhkan isolat dan untuk produksi spora. Untuk membuat 1000 ml media PDA dibutuhkan 200 g kentang, 20 g glukosa, dan 20 g agar.

Persiapan Kacang Tanah Berafatoksin

Sebanyak 20 ml suspensi spora *Aspergillus flavus* FNCC 0546 dengan konsentrasi 10⁶ spora/ml diinokulasikan ke kacang tanah grade 2 sebanyak 20 kg, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 1-2 bulan untuk memberi kesempatan jamur tersebut memproduksi aflatoksin.

Modifikasi Tahapan Pembuatan Bumbu Pecel dengan Fermentasi Menggunakan *Rhizopus oligosporus* MK-1

Kacang tanah yang telah tercemar aflatoksin direndam dalam air yang telah dididihkan selama 30 menit, dihilangkan kulit arinya dan kemudian dicuci hingga bersih. Kacang tanah yang telah bersih kemudian dikukus selama 20 menit. Kacang tanah yang telah dikukus dikering anginkan, selanjutnya diinokulasi dengan spora *Rhizopus oligosporus* MK-1 dengan konsentrasi 10⁶ spora/ml sebanyak 1 % (v/b), dan kemudian di fermentasi selama 1, 2, dan 3 hari. Kacang tanah hasil fermentasi dikeringkan dengan *cabinet dryer* pada suhu 70 °C, kemudian disangrai. Sebagai pembanding digunakan kontrol yakni bumbu pecel yang biji kacang tanahnya tidak melewati proses fermentasi.

Pembuatan Bumbu Pecel Termodifikasi untuk Pengujian Sensoris

Kacang tanah yang digunakan untuk pengujian sensoris adalah kacang tanah grade 2 yang tidak dicemari oleh aflatoksin, berbeda dengan kacang tanah yang digunakan pada tahapan reduksi aflatoksin B₁. Kacang tanah disangrai, kemudian digiling, lalu dilakukan pencampuran dengan bumbu yang terdiri dari gula merah, asam jawa, kencur, cabe merah dan daun jeruk.

Pengujian Aflatoksin B₁

Uji aflatoksin B₁ dilakukan dengan menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). ELISA kit untuk analisis AFB₁ yang dikembangkan adalah format ELISA kompetitif langsung yang dikembangkan oleh Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Dengan menggunakan ELISA kit tersebut, AFB₁ dapat terdeteksi sampai 0,3 ppb (0,3 µg/ml) dalam ekstrak sampel. Prinsip dasar metode immunoassay adalah reaksi spesifik antara antigen dan antibody, hasil reaksi dapat diamati menggunakan penanda. Sampel yang dianalisis meliputi kacang tanah hasil pencemaran aflatoksin B₁, kacang tanah setelah perendaman, pengukusan, fermentasi, dan penyangraian.

Persentase penurunan AFB₁ (pada bahan) oleh satu tahap pengolahan bumbu pecel dihitung pada pra dan pasca pengolahan dengan rumus:

$$\text{Reduksi} = \frac{\text{ppb AFB}_1 \text{ bahan input} - \text{ppb AFB}_1 \text{ bahan output}}{\text{ppb AFB}_1 \text{ bahan input}} \times 100 \%$$

Keterangan :

ppb AFB₁ bahan input = kadar AFB₁ pada kacang pra perlakuan oleh satu tahapan pengolahan enting-enting (ppb)

ppb AFB₁ bahan output = kadar AFB₁ pada kacang pasca perlakuan oleh satu tahapan pengolahan enting-enting (ppb)

Analisa Kadar Air

Penentuan kadar air dengan metode thermogravimetri (Sudarmadji dkk., 1997).

Pengujian Sensoris Produk Bumbu Pecel Termodifikasi

Pengujian sensoris bumbu pecel yang dihasilkan dilakukan oleh 20 panelis terhadap warna, aroma, tekstur dan rasa. Skala yang digunakan 1-5 yaitu 1 (sangat tidak suka), 2 (tidak suka), 3 (cukup suka), 4 (suka), 5 (sangat suka).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengurangan Aflatoksin B₁ pada Perendaman dan Pengukusan

Perendaman biji kacang tanah dilakukan dengan tujuan untuk memudahkan menghilangkan kulit ari. Perendaman menyebabkan terjadinya penetrasi air ke kulit ari biji kacang tanah. Data hasil pengujian alatoksin B₁ menunjukkan bahwa terjadi penurunan kandungan aflatoksin melalui tahapan ini. Aflatoksin awal pada kacang tanah adalah 90,78 ppb, setelah perendaman terjadi penurunan aflatoksin menjadi 86,11 ppb atau terjadi reduksi sebesar 5,14 %.

Tahapan selanjutnya pada modifikasi pembuatan bumbu pecel ini adalah penghilangan kulit ari, pencucian dan

pengukusan. Data hasil pengujian aflatoksin B₁ menunjukkan terjadinya penurunan atau reduksi kandungan aflatoksin B₁ pada biji kacang tanah sebesar 12,32 %.

Penurunan aflatoksin pada tahapan ini diduga disebabkan tidak hanya oleh pengukusan, tetapi juga penghilangan kulit ari yang telah mengeliminasi sebagian kandungan aflatoksin yang terdapat pada biji kacang tanah. Kontaminasi aflatoksin B₁ (AFB₁) pada kacang tanah dimulai pada kulit luar atau kulit ari (Diener dkk., 1982). Penghilangan kulit ari mungkin lebih banyak mengeliminasi kandungan aflatoksin pada biji kacang tanah ini dibandingkan dengan pengukusan. Hal ini dapat dipahami bahwa aflatoksin cenderung lebih stabil pada perlakuan pengukusan (Bahri, 2001). Data selengkapnya penurunan kandungan aflatoksin B₁ pada tahapan ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Reduksi aflatoksin B₁ tahapan perendaman dan pengukusan biji kacang tanah

Tahapan pengolahan bumbu pecel	AFB ₁ kacang tanah (ppb)	Reduksi AFB ₁ kacang tanah (%)
Kacang awal	90,78	-
Perendaman	86,11	5,14
Pengukusan	75,5	12,32

Penurunan Aflatoksin B₁ Tahap Fermentasi

Tahapan setelah pengukusan adalah fermentasi biji kacang tanah. Fermentasi dilakukan selama tiga hari. Pengujian aflatoksin B₁ pada tahapan ini dilakukan pada hari pertama sampai dengan hari ketiga. Data hasil pengujian aflatoksin pada kacang tanah yang difermentasi selama 1, 2, dan 3 hari disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengurangan aflatoksin B₁ pada tahapan fermentasi biji kacang tanah dengan *Rhizopus oligosporus* MK-1

Tahapan pengolahan bumbu pecel	AFB ₁ kacang tanah (ppb)	Reduksi AFB ₁ kacang tanah (%)
Awal	75,5	-
Fermentasi 1 hari	37,68	50,1
Fermentasi 2 hari	26,29	65,18
Fermentasi 3 hari	23,09	69,41

Pada fermentasi 1, 2 dan 3 hari, masing-masing menunjukkan bahwa terjadi penurunan AFB₁. Reduksi aflatoksin meningkat bersamaan dengan lamanya waktu fermentasi. Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa jamur mampu mereduksi atau menurunkan kandungan aflatoksin. Penelitian yang dilakukan oleh Shandi (2005), dengan menggunakan *Rhizopus oligosporus* melaporkan bahwa kemampuan reduksi aflatoksin oleh isolat ini berkisar 4,35 ppb sampai 81,13 ppb.

Secara visual penurunan atau reduksi AFB₁ nampak seiring dengan pertumbuhan *Rhizopus oligosporus* MK-1. Makin lama waktu fermentasi, pertumbuhan makin lebat dan reduksi aflatoksin B₁ makin besar. *Rhizopus oligosporus* MK-1 mampu mendegradasi aflatoksin sehingga terjadi penurunan aflatoksin B₁ selama proses fermentasi. Penelitian ini dilakukan Sandhi (2005) yang mengukur berat miselia dalam media cair mendukung hal ini bahwa berat miselia *Rhizopus oligosporus* MK-1 sejalan dengan penurunan aflatoksin. Jumlah miselia tertinggi juga menunjukkan penurunan aflatoksin tertinggi. Mekanisme degradasi aflatoksin oleh *Rhizopus oligosporus* MK-1 diduga berlangsung secara enzimatis melalui perubahan aflatoksin B₁ dengan mereduksi ikatan siklopentanon sehingga terbentuk aflatoxicol A. Seperti halnya penelitian-penelitian sebelumnya, mekanisme degradasi aflatoksin oleh jamur dan bakteri dapat berlangsung secara enzimatis. Smiley dan Draughon (2000) membuktikan bahwa degradasi aflatoksin B₁ oleh *Flavobacterium aurantiacum* terjadi secara enzimatis. Sardjono dkk. (2004) membuktikan bahwa enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh *Aspergillus oryzae* KKB4 mampu mendetoksifikasi aflatoksin B₁. Berdasarkan pada analisis spektrum IR menunjukkan kemampuan enzim tersebut dalam mendegradasi cincin lakton, reduksi siklo-pentanon, dan membuka cincin difuran pada molekul aflatoksin.

Reduksi Aflatoksin B₁ pada Tahapan Penyangraian

Tahapan selanjutnya setelah fermentasi adalah penyangraian. Sebelum masuk ke tahapan ini dilakukan pengeringan untuk mendapatkan tekstur kacang yang bagus untuk penyangraian. Tekstur kacang tanah setelah fermentasi menjadi lunak. Dengan bertambahnya waktu fermentasi tekstur kacang tanah semakin lunak. Pengeringan dilakukan di cabinet dryer pada suhu 70 °C, dan setelah itu dilakukan penyangraian. Data hasil pengujian aflatoksin B₁ dapat dilihat pada Tabel 3.

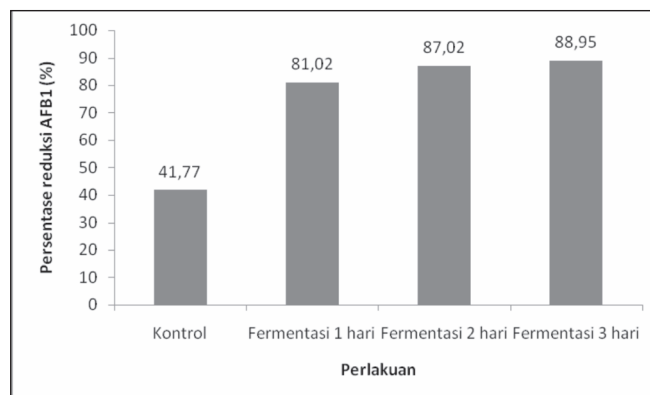
Tabel 3. Reduksi aflatoksin B₁ pada tahapan penyangraian

Tahapan pengolahan bumbu pecel	AFB ₁ kacang tanah (ppb)		Reduksi AFB ₁ kacang tanah (%)
	Sebelum Penyangraian	Sesudah Penyangraian	
Fermentasi 1 hari	37,68	17,21	54,32
Fermentasi 2 hari	26,29	11,78	55,20
Fermentasi 3 hari	23,09	10,03	56,57

Data kandungan aflatoksin B₁ pada tahapan penyangraian menunjukkan bahwa tahapan ini mampu mereduksi aflatoksin B₁ hingga 56 % pada fermentasi selama 3 hari. Reduksi aflatoksin B₁ yang besar ini kemungkinan karena terdapat dua kali proses perlakuan menggunakan panas yang kontak dengan bahan, yakni proses pengeringan dengan cabi-

net dryer dan penyangraian. Walaupun aflatoksin stabil terhadap proses thermal, namun beberapa studi telah melaporkan bahwa beberapa proses pengolahan menggunakan panas seperti roasting dapat menurunkan atau mereduksi kandungan aflatoksin (Christensen dkk., 1977; Luster dkk., 1982; Conway dkk., 1978).

Keseluruhan tahapan modifikasi pembuatan bumbu pecel mampu menurunkan kandungan aflatoksin pada biji kacang tanah. Modifikasi ini melibatkan perlakuan fisik yang meliputi perendaman, pengukusan, pengeringan, penyangraian dan perlakuan biologis yakni dengan proses fermentasi. Pada tahap akhir tahapan modifikasi bumbu pecel ini jumlah aflatoksin yang tertinggal 10,03 ppb pada fermentasi selama 3 hari dari jumlah aflatoksin awal 90,8 ppb, yang berarti bahwa sampai pada tahapan akhir jumlah aflatoksin yang tereduksi sebesar 88,95 %. Hasil reduksi aflatoksin B₁ oleh *Rhizopus oligosporus* MK-1 hingga tahapan akhir disajikan pada Gambar 1.



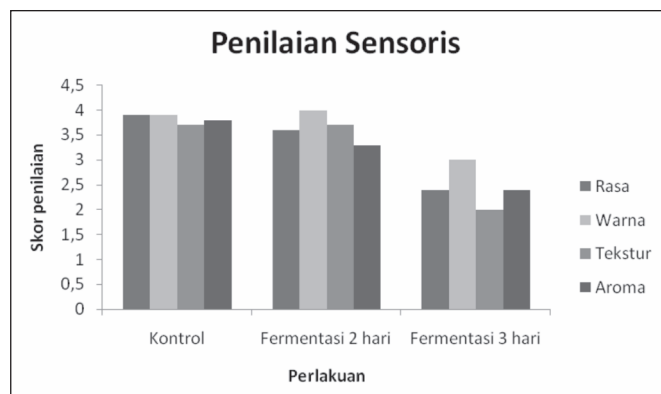
Gambar 1. Persentase reduksi aflatoksin B₁ kontrol dan bumbu pecel hasil modifikasi

Sifat Sensoris Bumbu Pecel Termodifikasi

Hasil pengujian sensoris terhadap warna, tekstur, aroma, dan rasa menunjukkan bahwa tingkat kesukaan panelis terhadap kedua produk bumbu pecel termodifikasi yang difermentasi 2 hari tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kontrol, tetapi pada fermentasi 3 hari berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa penerapan modifikasi pengolahan bumbu pecel yang difermentasi sampai 2 hari tidak memberikan perbedaan yang nyata pada sifat sensoris dengan bumbu pecel yang tidak difermentasi.

KESIMPULAN

Aplikasi fermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* MK-1 pada tahapan pembuatan bumbu pecel mampu mereduksi aflatoksin B₁ dengan makin bertambahnya waktu fermentasi. Reduksi aflatoksin B₁ tertinggi diperoleh pada fer-



Gambar 2. Hasil pengujian sensoris bumbu pecel

mentasi 3 hari sebesar 69,41 %. Reduksi aflatoksin B₁ hingga tahapan terakhir sebesar 88,95 % dari kandungan aflatoksin awal. Hasil pengujian sensoris dengan waktu fermentasi sampai 2 hari tidak memberikan perbedaan terhadap sifat sensoris bumbu pecel yang dihasilkan dengan bumbu pecel dari biji kacang tanah tanpa fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan POM. (2004). *Aflatoksin*, Buletin POM: Keamanan Pangan, Volume 2 Edisi 1.
- Bahri, S. (2001). Mewaspadaai cemaran aflatoksin pada bahan pangan, pakan dan produk peternakan di Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian* **20**: 55-63.
- Christensen, C.M., Mirocha, C.I. dan Meronuck, R.A. (1997). Mold, mycotoxin and micotoxicosis. *Dalam: Agricultural Experiment Station Report*. University of Minosita.
- Conway, H.F., Anderson, R.A. dan Bagley, E.B. (1978). Detoxification of aflatoxin-contaminated corn by roasting. *Cereal Chemistry* **55**:115.
- Diener, U.L., Petit, R.E. dan Cole, R.J. (1982). Aflatoxins and other mycotoxins in peanuts. *Dalam: Pattee, H.E. dan Young, C. T. (eds.). Peanuts Science and Technology*. Americans Peanut Research and Education Society, Texas, USA.
- Jannsen, M.M.T., Put, H.M. dan Nout, C. (1997). Natural toxins. *Dalam: de Vries, J. (ed.). Food Safety and Toxicity*. CRC Press, Boca Raton.
- Lilieanny, Dharmaputra, O.S. dan Putri, A.S.R. (2005). Populasi kacang pasca panen dan kandungan aflatoksin pada produk plahan kacang tanah. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **5**: 17-20.
- Luter, L., Wyslousil, W. dan Kashyap, S.C. (1982). The destruction of aflatoxin in peanuts by microwave roasting. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* **15**: 236.
- Mahardikarani (2007). *Peta Sebaran Aflatoksin pada Produk Bumbu Pecel yang Diproduksi dan Dipasarkan di DIY*. Skripsi. Teknologi Pengolahan Hasil Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sandhi, P.A. (2005). *Kemampuan Rhizopus oligosporus MK-1 Menurunkan AFB₁*. Tesis S2. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Sardjono, Raharjo, S., Rahayu, E.S. dan Rahayu, K. (2004). The role of extracellular enzymes produced by *Aspergillus oryzae* KKB4 in biodegradation of Aflatoxin B₁. *Indonesian Food and Nutrition Progress* **11**: 30-34.
- Smiley, R. D dan Draughon, F.A. (2000). Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium auranticum* is enzymatic. *J. Food Protection*. Vol **63**(3): P415-418.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. (1997). *Prosedur Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty, Yogyakarta.