



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT
PENGHASIL SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI
KOPI RAKYAT DALAM WADAH BESEK DI KECAMATAN
SUMBERWRINGIN-BONDOWOSO**

SKRIPSI

Oleh
Debra Nastasya Ulfha
NIM 151710101063

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT
PENGHASIL SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI
KOPI RAKYAT DALAM WADAH BESEK DI KECAMATAN
SUMBERWRINGIN-BONDOWOSO**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh
Debra Nastasya Ulfha
NIM 151710101063

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Mama tercinta Sri Djasad Setiyani dan Ayah tersayang Anas Ritfaluti yang telah menyayangi, memotivasi, memberikan semua yang saya butuhkan untuk menyelesaikan tugas akhir ini;
2. Kakak saya Risky Ayun Desi Farera, Adik saya Kevin Wildan Taffaro, Kakak ipar Fras Sastya serta keluarga yang telah memberikan doa serta dukungan kepada saya;
3. Bapak Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App. Sc selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing utama skripsi saya yang telah memberikan banyak motivasi untuk terus melangkah;
4. Bapak Dr. Ir. Jayus selaku dosen pembimbing anggota skripsi saya yang telah banyak memberikan ilmu, motivasi, dan saran;
5. Dimas Wahyu Prihantoro yang mendampingi, banyak memberikan motivasi, semangat, saran, dukungan, dan doanya untuk menyelesaikan skripsi ini;
6. Semua guru-guruku selama saya bersekolah;
7. Almamater tercinta yang selalu saya banggakan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

MOTTO

Allah akan meninggikan derajat orang-orang yang beriman diantarakamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan (terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)^{*)}

Tuhan tidak mengharuskan kita sukses, Tuhan hanya mengharapkan kita mencoba.^{**)}

Rahasia kesuksesan adalah mengetahui yang orang lain tidak ketahui.^{***)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

^{**)} Mario Teguh

^{***)} Aristotle Onassis

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Debra Nastasya Ulfha

NIM : 151710101063

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kopi Rakyat dalam Wadah Besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Juni 2019

Yang menyatakan,

Debra Nastasya Ulfha
NIM 151710101063

SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI KOPI RAKYAT
DALAM WADAH BESEK DI KECAMATAN SUMBERWRINGIN-
BONDOWOSO**

Oleh
Debra Nastasya Ulfha
NIM 151710101063

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Jayus

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kopi Rakyat dalam Wadah Besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso” karya Debra Nastasya Ulfa telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 5 Juli 2019

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Dosen Pembimbing Utama,



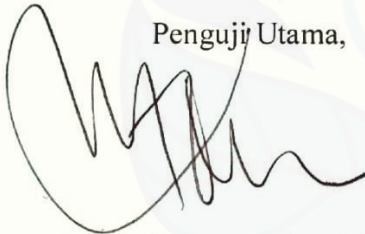
Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.,Sc.
NIP 196411091989021002

Dosen Pembimbing Anggota,



Dr. Ir. Jayus
196805161992031004

Penguji Utama,



Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.
NIP 196307011989031004

Penguji Anggota,



Ardiyan Dwi Masahid, S.TP., M.P.
NIP 198503292019031011

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember



Dr. Sasworo Soekarno, S.TP., M.Eng.
NIP 196809231994031009

RINGKASAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kopi Rakyat dalam Wadah Besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso; Debra Nastasya Ulfha, 151710101063; 2019: 69 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Kopi merupakan salah satu komoditi hasil perkebunan yang melimpah di Indonesia. Provinsi Jawa Timur merupakan salah satu provinsi yang menyumbang tingginya produksi kopi Indonesia. Sebanyak 35% produksi kopi Jawa Timur berasal dari wilayah Pegunungan Java Ijen Raung Bondowoso. Luas lahan perkebunan kopi di Kabupaten Bondowoso tahun 2016 mencapai 14.788 ha dengan produktivitas mencapai 12.798 ton dengan 51,74% luas lahan tersebut dikelola oleh rakyat. Kecamatan Sumberwringin merupakan kawasan sentra kopi arabika paling luas di Kabupaten Bondowoso dengan luas areal kopi sebesar 513,15 Ha atau 41,72% dari total luas perkebunan kopi arabika di Bondowoso. Sumberwringin berada di lereng Gunung Java Ijen-Raung dengan ketinggian 900-1300 mdpl sehingga cocok untuk pertumbuhan kopi jenis arabika. Mutu biji kopi hasil olahan rakyat cenderung dibawah standar karena penanganan pasca panen yang kurang tepat. Salah satu parameter mutu biji kopi dibawah standar yaitu adanya kontaminasi kapang. *Aspergillus sp.* dan *Penicillium sp.* merupakan kapang yang sering mengkontaminasi biji kopi. Kontaminasi ini dapat dicegah menggunakan biopreservatif berupa bakteri asam laktat (BAL). BAL mampu menghasilkan metabolit yang memiliki efek inhibitor pada mikroorganisme lain misalnya kapang. Kondisi Indonesia yang berupa negara kepulauan menjadikan kondisi lingkungan yang berbeda antar daerah. Selain kondisi lingkungan, wadah fermentasi juga mempengaruhi jenis BAL yang tumbuh pada fermentasi biji kopi. Salah satu alternatif wadah fermentasi berupa besek bambu karena mengingat sifat BAL yaitu anaerob aerotoleran. Oleh karena itu, isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada biji kopi olahan perkebunan rakyat perlu dilakukan. Tujuan penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat

yang mampu menghambat pertumbuhan kapang pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin, Bondowoso. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai jenis bakteri asam laktat yang menghasilkan senyawa antikapang pada fermentasi kopi rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin, Kabupaten Bondowoso, mengembangkan bakteri asam laktat dengan potensi antikapang sebagai starter tambahan pada fermentasi biji kopi rakyat untuk menekan kontaminasi kapang dan toksin yang dihasilkan, serta meningkatkan keamanan dan mutu biji kopi olahan rakyat sehingga dapat meningkatkan harga jual dan jumlah ekspor biji kopi di Indonesia.

Penelitian dilaksanakan dalam tiga tahap percobaan. Percobaan tahap pertama yaitu menganalisa perubahan fisik (perubahan suhu dan pH) dan mikrobiologis (total mikroba) serta isolasi mikroorganisme pada biji kopi selama fermentasi. Tahap kedua yakni deteksi isolat bakteri asam yang mampu menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* dan *Penicillium citrinum*. Tahap akhir dari penelitian ini yaitu mengidentifikasi bakteri asam yang potensial menghambat pertumbuhan kapang uji meliputi pewarnaan gram dan pengamatan bentuk selnya, uji aktivitas katalase, uji kemampuan memproduksi CO₂, uji pertumbuhan pada suhu berbeda, uji pertumbuhan pada kadar garam berbeda, uji kemampuan memproduksi dekstran dari sukrosa, uji kemampuan memproduksi ammonia dari arginin, dan uji kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat. Identifikasi bakteri yang dilakukan mengacu pada *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Hasilnya, sebanyak 9 dari 27 isolat mampu menghambat pertumbuhan kapang uji dan menunjukkan ciri umum dari BAL. Sebanyak 9 isolat BAL tersebut diduga merupakan spesies *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, dan *Leu. mesentroides*. Isolat yang mampu menghambat pertumbuhan kapang *A. flavus* terbesar (8,96 cm²) diduga merupakan spesies *L. plantarum*, sedangkan isolat yang mampu menghambat pertumbuhan kapang *P. citrinum* terbesar (3,00 cm²) diduga merupakan spesies *L. fermentum*.

SUMMARY

Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Anti-Fungal Compounds Isolated from *Sumberwringin* Coffee Fermentation in Bamboo Basket; Debra Nastasya Ulfha, 151710101063; 2019: 69 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agriculture Technology, University of Jember.

Coffee is one of the most abundant plantation commodities in Indonesia. East Java Province is one of the provinces that contribute to the high production of Indonesian coffee. A total of 35% of East Java coffee production comes from the Java Mountains region, Ijen Raung Bondowoso. The area of coffee plantations in Bondowoso District in 2016 reached 14,788 ha with productivity rate reaching 12,798 tons with 51.74% of the land area managed by the local people. Sumberwringin District is the largest area of arabica coffee center in Bondowoso with a coffee area of 513.15 Ha or 41.72% of the total area of arabica coffee cultivation in Bondowoso. Sumberwringin is on the slopes of Java Ijen-Raung Mountain with an altitude of 900-1300 meters above sea level, making it suitable for the growth of arabica type coffee. The quality of local people's processed coffee beans tends to be below of the standard because of inappropriate post-harvest treatment. One of parameters which is determined the quality of coffee beans is below the standard is the presence of mold contamination. *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. are molds that often contaminate coffee beans. This contamination can be prevented by using bio preservatives in the form of lactic acid bacteria (LAB). LAB is capable of producing metabolites that have inhibitory effects on other microorganisms such as mold. The state of Indonesia in the form of an archipelago makes different environmental conditions between regions. In addition to environmental conditions, fermentation containers also affect the type of LAB that grows in the fermentation of coffee beans. One alternative is a fermentation container in the form of bamboo basket because of the nature of the LAB which they are aerotolerant anaerobes. Therefore, isolation and identification of lactic acid bacteria in processed plantation coffee beans must be done. The aim of the study was to determine the types of lactic acid bacteria with the potential to

inhibit the growth of molds that were grown in the local people coffee beans fermentation in bamboo basket in Sumberwringin Sub-district, Bondowoso. This research is expected to provide information about the types of lactic acid bacteria that produce anti-fungi compounds in the the local people coffee beans fermentation in bamboo basket in Sumberwringin Sub-district, Bondowoso.

The research was conducted in three experimental stages. The first phase of the experiment was analyzing physical changes (changes in temperature and pH) and microbiology (total microbes) in coffee beans during fermentation and the isolation of microorganisms in coffee beans. The second phase was detecting of acid bacteria isolates which can inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum*. The final stage of this research was identifying LAB which has the potential to inhibit the growth of fungi including gram staining and cell shape observation, catalase activity test, CO₂ production ability test, growth test at different temperatures, growth test at different salt levels, test of dextran production ability from sucrose, test the ability to produce ammonia from arginine, and test the fermentation ability of various types of carbohydrates. The identification of LAB carried out refers to the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

As a result, 9 out of 27 isolates were able to inhibit the growth of mold and show general characteristic from LAB. A total of 9 LAB isolates were fathomed to be species of *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, and *Leu. mesentroides*. Isolates that are able to inhibit the growth of the largest *A. flavus* mold (8.96cm²) are thought to be *L. plantarum* species, while isolates capable of inhibiting the growth of the largest *P. citrinum* mold (3.00cm²) are thought to be *L. fermentum* species.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kopi Rakyat dalam Wadah Besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP, M.Eng selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember sekaligus Dosen Pembimbing Anggota skripsi saya yang telah memberikan ilmunya selama menulis skripsi ini;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App., Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Dosen Pembimbing Utama skripsi saya, yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa serta meluangkan waktu, pikiran, perhatian, dan material dalam menyelesaikan kuliah dan skripsi saya ini;
4. Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si. dan Ardiyan Dwi Masahid, S.TP., M.P. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan arahan dalam menyempurnakan skripsi ini;
5. Ayah dan Mama tercinta serta keluarga besar Anas Ritfaluti yang telah memberikan dukungan berupa moril dan material selama penulis menjalani studi ini;
6. Diri saya sendiri yang berjuang kuat dan selalu semangat sampai studi ini terselesaikan dengan baik;

7. Seluruh dosen Fakultas Teknologi Pertanian yang selama ini telah membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis sampai akhirnya dapat menyelesaikan studi ini;
8. Dimas Wahyu Prihantoro yang telah mendampingi, memberikan semangat, saran, dukungan, dan doanya selama ini;
9. Teknisi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Neny Novita Y., S.Si. yang banyak membantu selama penulis melaksanakan penelitian;
10. Teman-teman seperjuangan penelitian diantaranya Retno Ayu Ambarwati, Herinda Putri Septianti, dan Wilda Mukhollida yang selalu memberikan saran dan kritik selama menulis skripsi ini;
11. Bapak serta Ibu Mat Husen yang telah memberikan tempat dan kesempatan untuk melaksanakan penelitian lapang;
12. Keluarga besar Teknologi Hasil Pertanian angkatan tahun 2015 yang sama-sama berjuang menimba ilmu di Universitas Jember;
13. Dan pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak memberikan bantuan sejak awal penulis menempuh studi hingga dapat menyelesaikannya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak. Aamiin.

Jember, 27 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Efek Fermentasi terhadap Kualitas Kopi.....	5
2.1.2 Aktivitas Khamir Selama Proses Fermentasi Kopi	8
2.1.3 Aktivitas Kapang Selama Proses Fermentasi Kopi.....	9
2.2 Kandungan Kapang dan Mikotoksin pada Biji Kopi	10
2.2.1 <i>Aspergillus flavus</i> dan Aflatoksin	10
2.2.2 <i>Penicillium citrinum</i> dan Citrinin.....	11
2.3 Kemampuan Kerja Metabolit Antikapang dari Bakteri Asam Laktat.....	12
2.4 Metode Identifikasi Bakteri Asam Laktat	13
2.4.1 Pewarnaan Gram	14
2.4.2 Uji Katalase.....	14
2.4.3 Uji Produksi Gas CO ₂	15
2.4.4 Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda	15
2.4.5 Produksi Dekstran dari Sukrosa	15
2.4.6 Pertumbuhan pada Konsentrasi garam NaCl yang Berbeda	16
2.4.7 Pertumbuhan pada Karbohidrat yang Berbeda	16
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	17
3.3 Rancangan Penelitian.....	18
3.4 Parameter Pengamatan	18
3.5 Pelaksanaan Kegiatan	19

3.5.1	Analisa Fisik, Mikrobiologis, dan Isolasi Mikroorganisme dari Fermentasi Kopi	19
3.5.2	Uji Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Hasil Isolasi pada Fermentasi Kopi	24
3.5.3	Identifikasi Bakteri Asam secara Fenotip	27
3.6	Analisa Data.....	30
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1	Perubahan Fisik dan Mikrobiologis Biji Kopi Selama Fermentasi	31
4.1.1	Perubahan Fisik Selama Fermentasi Biji Kopi	31
4.1.2	Perubahan Mikrobiologis Biji Kopi Selama Fermentasi	33
4.2	Isolasi dan Uji Kemampuan Bakteri Asam sebagai Penghasil Metabolit Antikapang	35
4.2.1	Isolasi Bakteri Asam dari Fermentasi Kopi	36
4.2.2	Pengujian Isolat terhadap Aktivitas Pertumbuhan Kapang	37
4.3	Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kopi.....	39
4.3.1	Pewarnaan Gram	39
4.3.2	Aktivitas Katalase	40
4.3.3	Kemampuan Memproduksi CO ₂	40
4.3.4	Kemampuan Tumbuh pada Suhu Berbeda	42
4.3.5	Kemampuan Memproduksi Dekstran dari Sukrosa	44
4.3.6	Produksi Ammonia dari Arginin	46
4.3.7	Kemampuan Tumbuh pada Konsentrasi Garam Berbeda	48
4.3.8	Kemampuan Memfermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat	49
4.3.9	Penentuan Nama Spesies	51
BAB 5	PENUTUP	53
5.1	Kesimpulan	53
5.2	Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

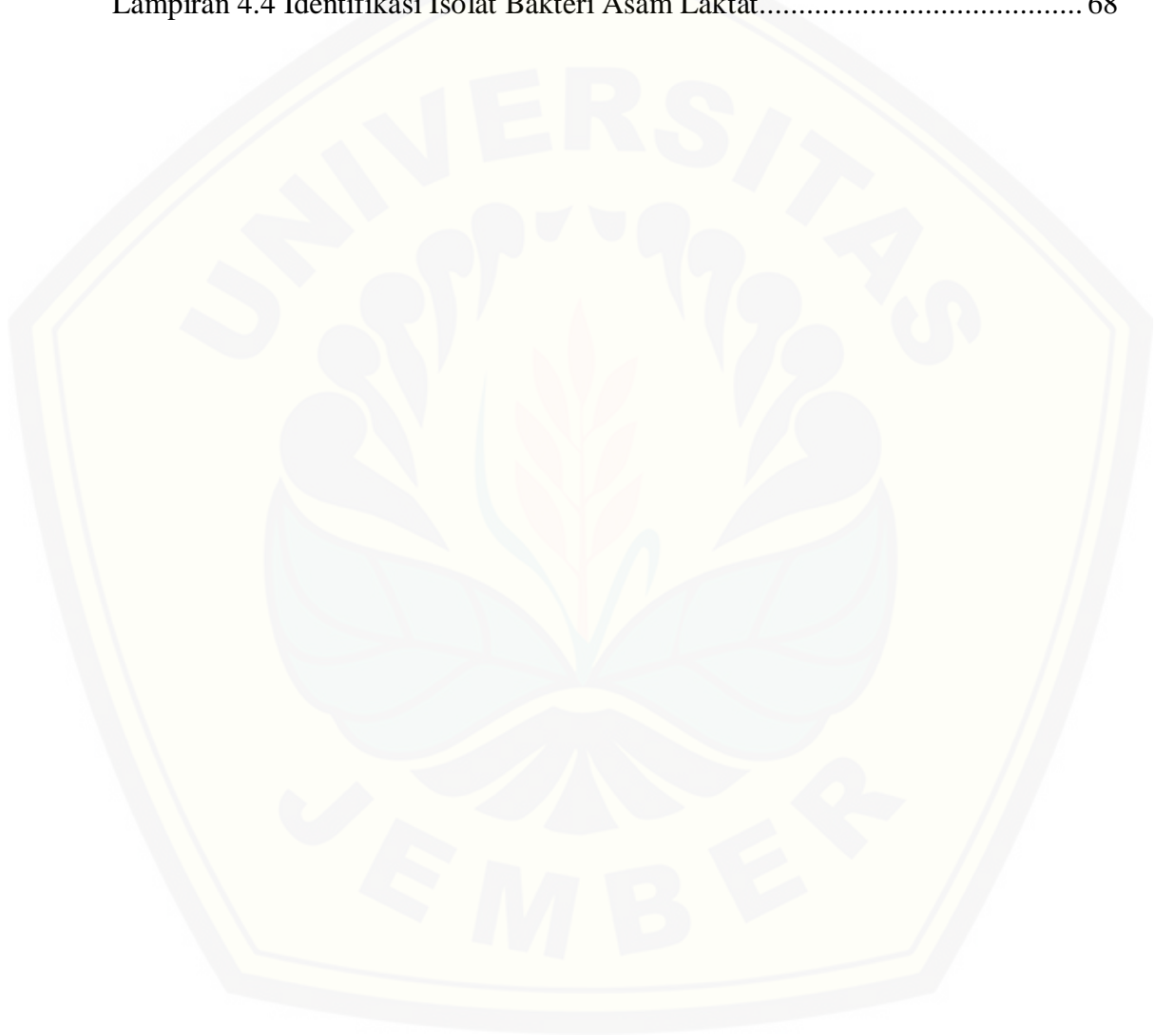
	Halaman
Tabel 2.1 Spesies bakteri yang dominan pada biji kopi arabika selama fermentasi	7
Tabel 2.2 Spesies khamir yang dominan pada biji kopi arabika selama fermentasi	9
Tabel 2.3 Beberapa mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang	11
Tabel 3.1 Daftar sampel kopi rakyat terfermentasi dalam besek.....	18
Tabel 4.1 Total isolat hasil isolasi dari fermentasi biji kopi dalam besek.....	36
Tabel 4.2 Data luas daerah hambatan oleh bakteri asam terhadap kapang uji.....	38
Tabel 4.3 Karakteristik morfologi bakteri asam dari fermentasi biji kopi.....	42
Tabel 4.4 Hasil pengujian kemampuan tumbuh pada suhu berbeda	43
Tabel 4.5 Hasil pengujian produksi dekstran dari sukrosa	45
Tabel 4.6 Hasil pengujian produksi ammonia dari arginin	46
Tabel 4.7 Hasil uji pertumbuhan isolat pada variasi konsentrasi garam.....	48
Tabel 4.8 Kemampuan isolat dalam memfermentasi berbagai jenis karbohidrat .	51
Tabel 4.9 Nama spesies BAL dari fermentasi kopi wadah besek	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Tahapan pelaksanaan kegiatan penelitian	20
Gambar 3.2 Pelaksanaan kegiatan analisa fisik	22
Gambar 3.3 Tahapan analisa mikrobiologis dan isolasi mikroba	23
Gambar 3.4 Tahapan peremajaan kapang	24
Gambar 3.5 Pengujian antikapang oleh bakteri asam	26
Gambar 4.1 Perubahan suhu dan pH selama fermentasi kopi	31
Gambar 4.2 Perubahan mikrobiologis selama fermentasi kopi berlangsung	35
Gambar 4.3 Populasi bakteri selama fermentasi biji kopi dalam besek	37
Gambar 4.4 Hasil pengujian aktivitas antikapang	38
Gambar 4.5 Hasil pewarnaan gram perbesaran 1000×	40
Gambar 4.6 Hasil pengujian aktivitas katalase	40
Gambar 4.7 Uji kemampuan memproduksi CO ₂	41
Gambar 4.8 Hasil uji pertumbuhan pada suhu berbeda	43
Gambar 4.9 Hasil uji kemampuan memproduksi dekstran dari sukrosa	45
Gambar 4.10 Hasil uji kemampuan memproduksi ammonia dari arginin	47
Gambar 4.11 Uji pertumbuhan isolat dengan variasi konsentrasi garam	49
Gambar 4.12 Uji kemampuan tumbuh pada variasi jenis karbohidrat	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Dokumentasi Tahapan Proses Fermentasi Kopi	60
Lampiran 4.1 Suhu, pH dan Total Mikroba Hasil Isolasi	63
Lampiran 4.2 Total Mikroba Hasil Isolasi	64
Lampiran 4.3 Hasil Uji Penghambatan Kapang dari Isolat Bakteri Asam	65
Lampiran 4.4 Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat.....	68



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu komoditi hasil perkebunan yang melimpah di Indonesia yaitu kopi. Kopi mempunyai peran cukup penting dalam kegiatan perekonomian di Indonesia, baik sebagai penyedia lapangan pekerjaan, bahan baku industri dan sumber devisa non-migas dalam kegiatan ekspor ke beberapa negara. Sehingga, eksistensi Indonesia sebagai penghasil biji kopi dunia cukup diperhitungkan dan dapat menjadi peluang dalam menguasai pasar global.

Provinsi Jawa Timur merupakan salah satu dari lima provinsi yang menjadi produsen kopi tertinggi di Indonesia. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Perkebunan (2018), produksi kopi rakyat di Jawa Timur pada tahun 2017 mencapai 34 ribu ton meliputi kopi robusta sebanyak 28,4 ribu ton dan kopi arabika sebanyak 5,6 ribu ton. Sebanyak 35% produksi kopi Jawa Timur berasal dari wilayah Pegunungan Java Ijen Raung Bondowoso (Yusiana, 2017). Luas lahan perkebunan kopi di Kabupaten Bondowoso tahun 2016 mencapai 14.788 ha dengan produktivitas mencapai 12.798 ton dengan 51,74% luas lahan tersebut dikelola oleh rakyat (Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso, 2017). Kecamatan Sumberwringin merupakan kawasan sentra kopi arabika paling luas di Kabupaten Bondowoso dengan luas areal kopi sebesar 513,15 Ha atau 41,72% dari total luas perkebunan kopi arabika di Bondowoso (Yusiana, 2017). Sumberwringin berada di lereng Gunung Java Ijen-Raung dengan ketinggian 900-1300 mdpl sehingga cocok untuk pertumbuhan kopi jenis arabika.

Mutu biji kopi hasil olahan rakyat cenderung rendah dan dibawah standar ekspor. Pengawasan terhadap kualitas biji kopi hingga proses penanganan pasca panen menjadi faktor penentu mutu biji kopi yang dihasilkan (Prayuginingsih *et al.*, 2012). Mutu biji kopi akan cenderung rendah apabila faktor-faktor tersebut tidak dipenuhi. Rendahnya mutu biji kopi olahan rakyat dapat disebabkan karena adanya kontaminasi kapang. Syarat mutu biji kopi berdasarkan SNI 01-2907-2008 alah satunya yaitu tidak terdapat biji kopi yang berbau kapang. Kapang yang dominan mengkontaminasi biji kopi yaitu *Aspergillus* (78,33%) dan *Penicillium*

(21,67%) (Aaraj *et al.*, 2015). Kapang ditemukan tumbuh sejak fermentasi kopi berlangsung, sehingga spora kapang dapat terbawa hingga proses penyimpanan. Hal tersebut mengakibatkan kemungkinan kontaminasi kapang pada biji kopi semakin meningkat.

Salah satu pencegahan kerusakan biji kopi oleh kapang penghasil toksin dapat menggunakan biopreservatif atau pengawet pangan alami dari mikroorganisme seperti bakteri asam laktat (BAL). BAL mampu menghasilkan metabolit yang memiliki efek inhibitor pada mikroorganisme lain, misalnya kapang (Lindgren dan Dobrogosz, 1990). Bakteri asam laktat diketahui mampu memproduksi asam organik, bakteriosin, hidrogen peroksida, asam lemah dan diasetil yang memiliki aktivitas antikapang (Jenie *et al.*, 2002).

Kondisi geografis, jenis wadah fermentasi, cara pembudidayaan, umur panen kopi dan penanganan pasca panen yang tidak sama antar petani kopi memungkinkan adanya perbedaan jenis bakteri asam laktat yang dapat tumbuh pada fermentasi tiap-tiap kopi yang dihasilkan antar daerah (Ridwansyah, 2003).. BAL yang tumbuh pada fermentasi kopi di Kabupaten Kintamani yaitu *L. fermentum* (Hatiningsih, 2018), sedangkan di Jember yaitu *Leu. mesentroides*, *S. faecium*, *L. brevis* (Susanti, 2011).

Petani di Sumberwringin umumnya menggunakan wadah fermentasi berupa bak plastik, karung plastik, bak semen dan besek bambu. Besek bambu merupakan wadah fermentasi yang masih jarang digunakan oleh petani kopi namun besek dapat digunakan sebagai alternatif wadah fermentasi kopi karena sifat bakteri asam laktat pada umumnya yaitu anaerob aerotoleran atau tidak sensitif terhadap O₂ (Madigan dan Martinko, 2006).

Bakteri asam laktat yang tumbuh pada fermentasi biji kopi hasil perkebunan rakyat memiliki jenis serta bentuk morfologi dan mikroskopis yang beragam sebab spesies bakteri asam laktat tertentu memiliki syarat tumbuh yang berbeda antar spesies. Oleh karena itu, isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat pada biji kopi olahan perkebunan rakyat diperlukan untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat yang tumbuh pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin Bondowoso.

1.2 Rumusan Masalah

Karakteristik biji kopi rakyat antar daerah di Indonesia memiliki perbedaan tergantung dari tempat dihasilkannya biji kopi. Hal tersebut disebabkan dari perbedaan kondisi lingkungan dan cara penanganan yang kadang berbeda dari petani kopi, sehingga menyebabkan adanya perbedaan jenis bakteri asam laktat yang tumbuh pada fermentasi kopi. Menurut Kustyawati dan Setyani (2008), ekologi mikrobial yang terlibat dalam fermentasi dipengaruhi oleh tempat fermentasi, jenis atau varietas, dan kondisi geografis tempat tumbuhnya. Fermentasi kopi pada umumnya di masyarakat Bondowoso menggunakan wadah berupa karung plastik, ember plastik, dan besek bambu. Oleh karena itu, isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi kopi perlu dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat yang tumbuh pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin, Bondowoso.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat yang mampu menghambat pertumbuhan kapang penghasil toksin pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin, Bondowoso

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. sumber informasi mengenai jenis bakteri asam laktat yang menghasilkan senyawa antikapang pada fermentasi kopi rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin, Kabupaten Bondowoso;
2. mengembangkan bakteri asam laktat dengan potensi antikapang sebagai starter tambahan pada fermentasi biji kopi rakyat untuk menekan kontaminasi kapang dan toksin yang dihasilkan; dan
3. meningkatkan keamanan dan mutu biji kopi olahan rakyat sehingga dapat meningkatkan harga jual dan jumlah ekspor biji kopi di Indonesia.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Efek Fermentasi terhadap Kualitas Kopi

Fermentasi merupakan salah satu proses terpenting pada pengolahan biji kopi karena sangat menentukan kualitas akhir biji kopi terutama citarasanya. Tujuan utama fermentasi yaitu menghilangkan lapisan lendir (*mucilage*) yang melekat pada kulit tanduk biji kopi. Lapisan lendir tersebut mengandung senyawa gula sederhana dan pektin yang diubah menjadi alkohol dan asam-asam organik oleh mikroorganisme selama fermentasi berlangsung sehingga dapat menurunkan pH biji serta merubah tekstur lapisan lendir menjadi mudah untuk dicuci dan dihilangkan (Correa, *et al.*, 2014).

Biji kopi akan mengalami proses fermentasi, terjadi pertumbuhan mikroba, mengaktifkan enzim-enzim, kemudian terjadi reaksi pencoklatan enzimatis sehingga berwarna lebih coklat dan memperbaiki profil citarasanya. Proses fermentasi ini ditandai dengan adanya peningkatan suhu biji kopi dalam karung (fermentasi kering) atau timbul gelembung-gelembung udara walaupun suhunya tidak meningkat (fermentasi basah atau semi basah) (Yusianto dan Nugroho, 2014).

Fermentasi biji kopi juga berpengaruh terhadap pembentukan citarasa biji kopi terutama untuk mengurangi rasa pahit dan mendorong terbentuknya kesan *mild* pada citarasa seduhannya. Mikroba yang berperan selama fermentasi juga mampu menghasilkan metabolit yang membentuk citarasa asam dan alkoholis pada seduhan kopi. Citarasa yang terbentuk selama fermentasi diantaranya adalah *aroma, aftertaste, acidity, body, uniformity, balance, clean cup, sweetness* dan lain sebagainya. Sebaliknya fermentasi yang berlebihan dapat menyebabkan cacat citarasa dalam biji kopi seperti *fermented taste, sour* dan *stinkers* (Yusianto dan Widyotomo, 2013).

Faktor utama penentu kualitas dan citarasa fermentasi biji kopi adalah jenis kopi, suhu dan pH fermentasi, lama fermentasi dan penggunaan wadah fermentasi utamanya suhu dan lama fermentasinya (Masoud *et al.*, 2006; Yusianto dan Widyotomo, 2013). Hal ini dikarenakan suhu sangat mempengaruhi

kehidupan dan kematian mikroorganisme selama fermentasi biji kopi berlangsung yakni berkisar 15-30°C (Sisbudi dan Fauzi, 2015). Hal serupa juga diungkapkan oleh Yusianto dan Widyotomo (2013) bahwa fermentasi biji kopi terbaik dalam menghasilkan citarasa khas kopi adalah dengan menggunakan karung selama 12 jam. Nilai *balance* dan *overall* terbaik dari beberapa parameter citarasa seduhan kopi juga optimum pada lama fermentasi 12 jam dengan suhu 25 °C.

Selama fermentasi biji kopi berlangsung terdapat aktivitas mikroorganisme terutama BAL dan khamir yang merombak lapisan lendir menjadi senyawa asam-asam organik sehingga pH lapisan lendir menjadi lebih asam yaitu sebesar 6,5 menjadi 4,1-4,3 (Yusianto dan Widyotomo, 2013). Asam-asam organik tersebut berperan dalam citarasa asam pada seduhan kopi selain juga bersifat *biopreservatif agent*.

2.1.1 Aktivitas Bakteri Selama Proses Fermentasi Kopi

Menurut hasil penelitian Nasanit *et al.* (2015), bakteri yang merupakan populasi terbesar yang berhasil diidentifikasi selama fermentasi biji kopi di empat provinsi di Thailand, terdiri dari *Enterobacteriaceae* sebesar 44,5% (241 isolat), bakteri asam laktat sebesar 43,8% (237 isolat) dan bakteri gram positif pembentuk spora sebesar 8,5% (46 isolat) yakni *Bacillus subtilis* dan *B. cereus*, seperti terlihat pada Tabel 2.1.

Berdasarkan Tabel 2.1 diketahui bahwa bakteri dominan selama fermentasi biji kopi arabika adalah *Enterobacteriaceae* dan bakteri asam laktat yang beberapa strain dari spesies tersebut mikroorganisme pektinolitik. Tabel 2.1 juga menunjukkan bahwa *Enterobacter agglomerans* dan *Leuconostoc mesenteroides* merupakan bakteri yang paling dominan selama fermentasi biji kopi arabika berlangsung. *Leuconostoc mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum* dan *E. casseliflavus* merupakan contoh spesies bakteri asam laktat yang memproduksi asam laktat sehingga mampu menurunkan pH lapisan lendir atau *pulp* selama fermentasi.

Bakteri genus *Enterobacteriaceae* memiliki aktivitas pektinolitik seperti *E. dissolvens*, *E. herbicola* dan *K. pneumonia*. Beberapa spesies *Bacillus* juga memproduksi enzim ekstraseluler yang mampu mendegradasi pektin seperti *B.*

subtilis dan *B. cereus*. Beberapa spesies *Pseudomonas* juga diketahui memproduksi enzim pektinolitik (Nasanit *et al.*, 2015).

Tabel 2.1 Spesies bakteri yang dominan pada biji kopi arabika selama fermentasi

Fermentasi Jam ke-	Spesies Bakteri	Persentase (%)
0	<i>Enterobacter agglomerans</i>	27,3
	<i>Erwinia dissolvens</i>	17,6
	<i>Lactobacillus brevis</i>	16,4
	<i>Bacillus subtilis</i>	14,3
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	12,2
	<i>Leuconostoc mesentroides</i>	12,2
12	<i>Enterobacter agglomerans</i>	34,2
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	19,3
	<i>Bacillus subtilis</i>	18,3
	<i>Lactobacillus brevis</i>	14,1
24	<i>Leuconostoc mesentroides</i>	14,1
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	42,4
	<i>Leuconostoc mesentroides</i>	21,7
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	19,2
36	<i>Erwinia dissolvens</i>	16,7
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	37,1
	<i>Leuconostoc mesentroides</i>	24,4
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	22,1
	<i>Lactobacillus brevis</i>	16,4

Sumber : Nasanit *et al.*, (2015) (diolah)

Menurut Madigan dan Martinko (1997), bakteri asam laktat selain merombak pektin juga diketahui dapat merombak glukosa dalam lapisan lendir atau *pulp* biji kopi menjadi asam laktat dan bertujuan untuk mendapatkan energi berupa ATP (*adenosine triphosphate*).

Senyawa yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat diantaranya adalah asam organik, suatu peptida, diasetil, CO₂, asetaldehid, d-isomer, asam-asam amino dan utamanya adalah bakteriosin yang bersifat antimikroba dan efektif menghambat pertumbuhan mikroflora (Yang *et al.*, 2012). Corsetti (2005) juga menemukan hal yang sama bahwa beberapa *strain* bakteri asam laktat memproduksi asam laktat, asam asetat, kaproat, asam format, asam fenilaktat, asam lemak berantai pendek, senyawa protein dengan BM rendah dan bakteriosin yang dapat menambah citarasa asam pada seduhannya.

2.1.2 Aktivitas Khamir Selama Proses Fermentasi Kopi

Khamir juga merupakan salah satu mikroorganisme yang berperan selama fermentasi biji kopi arabika (*Coffea arabica*). Hasil penelitian Nasanit *et al.* (2015) juga menunjukkan bahwa 15,8% dari populasi mikroba selama fermentasi biji kopi arabika (*Coffea arabica*) di Thailand Utara adalah khamir. Populasi khamir mulai meningkat setelah fermentasi jam ke-12 saat pH lapisan lendir atau *pulp* menurun sekitar 4-5. Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi diketahui bahwa genus khamir yang dominan terdapat selama fermentasi adalah *Pichia* sp. (28 isolat), *Candida* sp. (25 isolat), *Kluyveromyces* sp. (23 isolat), *Saccharomyces* sp. (19 isolat) dan *Debaryomyces* sp. (10 isolat). Empat genus yang paling banyak keberadaannya adalah *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. dan *Candida* sp. Frekuensi keberadaaan khamir selama tahapan fermentasi dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Genus khamir yang paling banyak selama fermentasi biji kopi adalah *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Kluyveromyces* sp. dan *Candida* sp. Beberapa dari jenis khamir memproduksi enzim pektinolitik, terutama *Pichia kluyvery* dan *P. anomala* yang memiliki aktivitas pektinolitik sangat tinggi. Khamir jenis lain seperti *S. cerevisiae* dan *C. parapsilosis* mampu memproduksi aroma khas biji kopi berupa aroma karamel, *herbs* dan aroma seperti buah pada biji kopi namun jika proses pengolahan biji kopi secara kering (*dry processing*) (Evangelista *et al.*, 2014).

Beberapa jenis khamir yang berperan selama fermentasi biji kopi juga mampu menghasilkan etanol seperti yang diungkapkan oleh Sisbudi *et al.* (2015) yakni *S. cerevisiae* yang diisolasi dari fermentasi biji kopi di Kabupaten Jember, Jawa Timur. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Hamadi *et al.* (2014) yakni melakukan isolasi dan mengidentifikasi khamir pada fermentasi biji kopi alami di Mbinga, wilayah Ruvuma dan Hai, wilayah Kilimanjaro, Tanzania. Hamadi *et al.* (2014) mengisolasi khamir *indigenous* yang potensial menghasilkan etanol. Beberapa khamir potensial tersebut adalah *Pichia kudriavzevii*, *Issatchenkia orientalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia anomala* dan lain sebagainya.

Tabel 2.2 Spesies khamir yang dominan pada biji kopi arabika selama fermentasi

Fermentasi Jam ke-	Spesies Bakteri	Persentase (%)
0	<i>Saccharomyces</i> sp.	57,1
	<i>Kluyveromyces</i> sp.	42,9
12	<i>Pichia</i> sp.	33,3
	<i>Saccharomyces</i> sp.	33,3
	<i>Kluyveromyces</i> sp.	33,3
24	<i>Pichia</i> sp.	46,0
	<i>Candidia</i> sp.	27,0
	<i>Saccharomyces</i> sp.	27,0
	<i>Kluyveromyces</i> sp.	39,0
36	<i>Candidia</i> sp.	33,1
	<i>Saccharomyces</i> sp.	27,9

Sumber : Nasanit *et al.*, (2015) (diolah)

2.1.3 Aktivitas Kapang Selama Proses Fermentasi Kopi

Kapang ditemukan tumbuh dari awal fermentasi, namun dalam jumlah yang sedikit. Keberadaan kapang perlu tetap diperhatikan secara serius karena beberapa kapang menghasilkan mikotoksin yang sangat berbahaya bagi kesehatan. Berdasarkan hasil penelitian Nasanit *et al.* (2015), diketahui bahwa *Penicillium* sp. adalah genus kapang yang paling banyak mengkontaminasi biji kopi arabika (*Coffea arabica*) selama fermentasi berlangsung. Hasil penelitian Aaraj *et al.* (2015), menunjukkan bahwa kapang yang paling dominan mengkontaminasi biji kopi adalah genus *Aspergillus* (78,33%) dan *Penicillium* (19,42%), spesiesnya *A. niger* (38,68%), *A. ochraceus* (12,80%), *A. flavus* (11%) dan *A. fumigatus* (7,18%).

Beberapa kapang memiliki aktivitas pektinolitik yang berguna untuk menguraikan *pulp* yang menempel pada biji kopi yakni *Penicillium* sp. Kapang tersebut dapat tetap tumbuh hingga proses penyimpanan biji kopi, tetapi keberadaannya ini malah dapat menimbulkan perubahan biokimia hingga rusaknya biji. Kerusakan bisa secara fisik, penurunan bobot biji, timbulnya cacat cita rasa, yaitu menjadi tidak enak (*unpleasant, mouldy, musty, earthy*), walaupun hanya terdapat 3% bagian biji yang berkapang sudah dapat terdeteksi dalam citarasa. Disisi lain, beberapa jenis kapang menghasilkan mikotoksin yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia, seperti *Penicillium* sp., *Aspergillus* dan *Fusarium*.

2.2 Kandungan Kapang dan Mikotoksin pada Biji Kopi

Biji kopi merupakan salah satu komoditi pertanian yang mudah terserang kapang, termasuk pada produk olahannya seperti kopi instan. Oleh karena itu, di Indonesia, standar untuk mensyaratkan jumlah kapang pada kopi instan juga sangat ketat yakni 5×10^1 koloni/g (Yuniarti *et al.*, 2014). Beberapa jenis kapang yang dapat tumbuh dan menyerang biji kopi, antara lain *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Sporedonema* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., dan *Fusarium* sp. *Aspergillus* dapat menyebabkan alergi dan asma, terutama bagi manusia (Sheikh *et al.* 2014). Selain itu, beberapa jenis kapang ini mampu menghasilkan mikotoksin yang berbahaya bagi kesehatan, seperti terlihat pada Tabel 2.3.

Paparan mikotoksin pada manusia dan hewan melalui udara atau makanan dapat menyebabkan disfungsi imun pada tubuh terutama pada sistem pencernaan dan pernapasan (Park *et al.*, 2015; Rai *et al.*, 2012). Mikotoksin dapat menurunkan pembentukan glutathione sehingga menyebabkan kelebihan stress oksidatif didalam tubuh yang menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit sistemik hingga penyakit akut dan kronis (Guilford dan Hope, 2014).

2.2.1 *Aspergillus flavus* dan Aflatoksin

Aspergillus merupakan jenis kapang yang tumbuh pada suhu dan kelembaban bervariasi, misalnya *Aspergillus flavus* yang tumbuh baik pada suhu 37°C. Kapang jenis ini sangat mudah ditemui di lingkungan. *A. flavus* bersifat saprofit yang dapat ditemukan di udara, tanah, dan bahan pangan. Koloni *A. flavus* berwarna kuning abu-abu hingga kehitaman (Amalia, 2013). *A. flavus* juga menghasilkan mikotoksin jenis aflatoksin. Aflatoksin merupakan mikotoksin yang paling toksik dan banyak dijumpai pada produk pertanian. Keberadaan toksin lain seperti fumonisin, okratoksin, zearalenon, dan trikoten bersama aflatoksin akan meningkatkan toksisitas pada suatu komoditi akibat adanya interaksi sinergis dari mikotoksin tersebut (Maryam, 2006).

Tabel 2.3 Beberapa mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang

Mikotoksin	Jenis Kapang	Referensi
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i>	Wangge <i>et al.</i> (2012), Carvajal (2015)
	<i>A. parasiticus</i>	
	<i>A. nomius</i>	
	<i>A. tamari</i>	
	<i>A. pseudotamarii</i>	
Alimentary toxin aleukia	<i>Fusarium sp.</i>	Suwasono (2016)
Asam penisilat	<i>Penicillium cyclopium</i>	Waluyo (2004)
	<i>Penicillium martensii</i>	
	<i>Aspergillus ochraceoroseus</i>	
	<i>Aspergillus melleus</i>	
Brevianamide A	<i>Penicillium sp.</i>	Tanada dan Kaya (1993)
Canescins	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Chaetoglobosin A,C	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Citreoviridin	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Communesin A,B	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Eslanditoksin	<i>Penicillium islandium</i>	Waluyo (2004)
Expansolide	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Meleagrinchysogine	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Ochratoksin	<i>Aspergillus ochraceoroseus</i>	Wangge <i>et al.</i> (2012), Hsuuw dan Yu (2013), Yuniati <i>et al.</i> (2014), Gan <i>et al.</i> (2015)
	<i>A. melleus</i>	
	<i>A. sulphureus</i>	
	<i>A. niger</i>	
Patulin	<i>A. viridicatum</i>	Seifert dan Frisvad (2000), Waluyo (2004) dan Handajani dan Setyaningsih (2006)
	<i>Penicillium patulum</i>	
Roquefortine C	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Rugulosin	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Sitrinin	<i>Penicillium versicolor</i>	Seifert dan Frisvad (2000), Bovdisova <i>et al.</i> (2016)
	<i>P. citrinum</i>	
Sterigmatosistin	<i>Aspergillus versicolor</i>	Waluyo (2004)
	<i>A. citrinum</i>	
Xanthocillins	<i>Penicillium sp.</i>	Seifert dan Frisvad (2000)
Tremorgenic	<i>Penicillium sp.</i>	Handajani dan Setyaningsih (2006)
Trikotesen	<i>Fusarium tricichum</i>	Dube (1993), Waluyo (2004), Febby (2008)
Yellow rice toxin	<i>Penicillium sp.</i>	Handajani dan Setyaningsih (2006)
Zearelenon	<i>Giberella zeae</i>	Dube (1993), Waluyo (2004)

2.2.2 *Penicillium citrinum* dan Citrinin

Penicillium citrinum merupakan spesies kapang yang menyebabkan kerusakan pada biji kopi, sayur-sayuran, buah-buahan dan beberapa jenis serealia lainnya (Samson *et al.*, 2004). *Penicillium sp.* memiliki ciri-ciri yaitu hifa septat, miselium bercabang dan biasanya tidak berwarna. Kepala *Penicillium* membentuk

seperti sapu dan membawa spora dengan sterigmata atau fialida yang muncul dalam kelompok. Konidia membentuk rantai karena muncul satu-persatu dari sterigmata. Warna konidia pada hampir seluruh spesies yang masih muda akan hijau kemudian berubah menjadi kecoklatan (Purwantisari dan Hastuti, 2009). Jenis *penicillium* yang menghasilkan mikotoksin adalah *P. verrucosum*, *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. carbonarius* (Palacios dan Taniwaki, 2004, Schmidt *et al.*, 2004).

P. citrinum menghasilkan mikotoksin yang disebut citrinin. Pada tahun 1931 oleh Hetherington dan Raistrick mikotoksin yang dihasilkan secara konsisten oleh *P. citrinum* diberi nama citrinin. Citrinin adalah mikotoksin nefrotoksik yang diproduksi oleh beberapa strain kapang dengan genus *Penicillium*, *Aspergillus*, dan *Monascus*. Citrinin biasanya ditemukan bersama dengan mikotoksin nefrotoksik lain seperti okratoksin A (OTA). OTA termasuk mikotoksin yang karsinogenik.

Cemaran mikotoksin tidak hanya membahayakan kesehatan saja, tetapi juga mengancam perekonomian global secara signifikan. Produk-produk pertanian lokal yang tidak memenuhi persyaratan akibat kontaminasi alfatoksin menjadikan sulit untuk menembus pasar global (Sheikh *et al.*, 2014). Oleh Karena itu, pencegahan cemaran kapang penghasil mikotoksin menggunakan senyawa antikapang yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat perlu diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kopi ini sebagai salah satu upaya untuk meningkatkan keamanan biji kopi.

2.3 Kemampuan Kerja Metabolit Antikapang dari Bakteri Asam Laktat

Salah satu mikroorganisme yang mampu berfungsi sebagai pengawet alami (*biopreservative*) adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat dapat berfungsi sebagai *biopreservatif* karena kemampuannya untuk menghasilkan substansi antimikroba (Suardana *et al.*, 2007). Senyawa yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat diantaranya adalah asam organik, suatu peptida, diasetil, CO₂, asetaldehid, d-isomer, asam-asam amino dan bakteriosin yang bersifat antimikroba (Surono, 2004).

Corsetti (2005) juga menemukan hal yang sama bahwa beberapa strain bakteri asam laktat memproduksi senyawa antikapang, diantaranya asam laktat, asam asetat, kaproat, asam format, asam fenilaktat, dan asam 4-hidroksi fenilaktat, dipeptida siklik seperti siklo (Gly-L-Leu), siklo (L-Phe-L-Pro), siklo (LPhe-trans-4-OH-L-Pro), asam benzoat, methyl hidantoin, mevano lakton, asam lemak berantai pendek, senyawa protein dengan BM rendah dan bakteriosin.

Mekanisme penghambatan kapang oleh bakteri asam laktat belum diketahui secara pasti. Diduga asam-asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat memiliki aktivitas seperti detergen yang akan mempengaruhi struktur membran sel kapang yaitu meningkatkan permeabilitas membran dan membebaskan elektrolit serta protein intraseluler yang mengakibatkan disintegrasi sitoplasma sel kapang (Fitriyana, 2011).

Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai bakteri asam laktat yang menghasilkan senyawa antikapang antara lain yaitu Cahyaningsih (2006) melaporkan bahwa *L. plantarum* nl-249 yang diisolasi dari nira lontar mempunyai aktivitas antikapang terhadap kapang *A. flavus*. Sheikh *et al.* (2014) juga melaporkan bahwa Kultur campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus* (produsen Aflatoksin) sebesar 37,08 %. Ress (2006) melaporkan bahwa *L. plantarum* memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antikapang yang mampu menghambat kapang *Fusarium* sp. dan *A. niger*. Shindy (2014) juga melaporkan bahwa bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi di Yogyakarta adalah *Pediococcus* sp., *Leu. paramesenteroides*, *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum* efektif menghambat *A. ochraceus*, *Penicillium* sp. dan *A. flavus*.

2.4 Metode Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi isolat bakteri asam laktat didasarkan pada karakter fenotip mengacu pada “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”. Berikut ini beberapa uji yang perlu dilakukan:

2.4.1 Pewarnaan Gram

Bakteri asam laktat pada dasarnya termasuk gram positif (Wibowo dan Ristanto, 2012). Bakteri gram positif memiliki membran sel dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada gram negatif, lapisan ini dapat menyerap warna ungu hasil reaksi antara yodium dan kristal violet. Bakteri gram positif pada awal pengecatan banyak menyerap warna ungu dari kristal violet-yodium dan menahannya dalam lapisan peptidoglikan sehingga saat pencucian dengan alkohol 95% sebagian besar warna ungu masih tertahan dan tidak hilang. Oleh karena itu, pada saat pengamatan akhir bakteri menunjukkan warna ungu. Sebaliknya, pada bakteri gram negatif, lapisan peptidoglikannya tidak mampu mempertahankan warna ungu kristal violet-yodium saat dicuci dengan alkohol, sehingga warna sel menjadi merah setelah penambahan safranin (Fardiaz, 1992).

Genus bakteri asam laktat dapat dibedakan berdasarkan bentuk selnya yang juga dapat teridentifikasi melalui uji pewarnaan gram (Sudarmadji *et al.*, 1989). Genus *Streptococcus* selnya berbentuk kokus yang berpasangan atau berantai dengan ukuran 0,7-0,9 μm . Genus *Pediococcus* selnya berbentuk kokus berpasangan atau tetrad atau bergerombol (Frazier dan Westhoff, 1988). Genus *Leuconostoc* selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai (Ray, 2004). Genus *Lactobacillus* selnya berbentuk batang yang bervariasi dari batang yang sangat pendek sampai batang yang panjang (Wibowo dan Ristanto, 1988).

2.4.2 Uji Katalase

Bakteri asam laktat pada dasarnya termasuk katalase negatif karena ketidakmampuannya dalam menghasilkan enzim katalase. Pengujian katalase dilakukan untuk mengetahui toleransi bakteri terhadap oksigen. Bakteri yang tidak memiliki enzim katalase yang berfungsi untuk memecah adanya H_2O_2 hasil reaksi dari flavoprotein bakteri dan oksigen termasuk dalam bakteri katalase negatif. Bakteri katalase negatif menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat non-oksidatif (bakteri anaerob), sehingga reaksi tersebut tidak dapat menimbulkan gelembung pada akuades, yang merupakan salah satu ciri bakteri asam laktat. Sebaliknya, bakteri yang memiliki enzim katalase dapat menguraikan hidrogen

peroksida menjadi air dan oksigen, termasuk dalam bakteri katalase positif (bakteri aerob). Reaksi penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dapat menimbulkan gelembung pada akuades (Biehl, 1984).

2.4.3 Uji Produksi Gas CO₂

Berdasarkan tipe fermentasi gulanya, bakteri asam laktat dibagi atas dua kelompok yaitu bakteri yang memproduksi asam laktat murni (homofermentatif) dan bakteri yang memproduksi asam laktat, CO₂ dan produk peragian lain (heterofermentatif) (Buckle *et al.*, 1987). Bakteri asam laktat homofermentatif, diantaranya *L. acidophilus*, *L. bulgaris*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. helveticus* dan *L. plantarum*, *S. thermophilus* dan *Pediococcus acidilactici* sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif antara lain yaitu *L. bervis*, *L. fermentum*, *Leu. lactis* dan *W. confuse* (Yunenshi, 2011). Oleh karena itu, uji produksi gas (CO₂) ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat (Schlegel dan Schmidt, 1994).

2.4.4 Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda

Masing-masing spesies bakteri asam laktat memiliki suhu pertumbuhan optimum yang berbeda (Vos *et al.*, 2009). *Lactobacillus* yang tumbuh pada suhu 45°C atau lebih dan tidak dapat tumbuh pada suhu 20°C maupun 15°C, diantaranya *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* dan *L. fermentum*, sedangkan *Lactobacillus* yang tumbuh pada suhu 15°C tetapi tidak tumbuh pada suhu 45 °C, diantaranya *L. brevis*, *L. buchneri* dan *L. coprophilus* (Waluyo, 2004). Bakteri asam laktat yang tumbuh baik pada suhu 45-47°C adalah *L. cellobiosus*, suhu 40-45°C adalah *L. plantarum*, suhu 40°C adalah *L. hilgardii* (Ardhana dan Fleet, 2003). Oleh karena itu, uji pertumbuhan bakteri pada suhu yang berbeda ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat.

2.4.5 Produksi Dekstran dari Sukrosa

Ciri khas dari bakteri asam laktat dari genus *Leuconostoc* adalah memiliki kemampuan untuk memproduksi dekstran (Edward dan James, 1945) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Leuconostoc* mampu mendegradasi sukrosa menjadi lendir dekstran, dengan bantuan enzim dekstran sukrase. Edward dan James

(1945) menyatakan bahwa lendir dekstran yang dihasilkan oleh bakteri dari genus *Leuconostoc* tidak berperan dalam pertumbuhan sel, tetapi kapsul ini berperan bagi sel dalam menyesuaikan diri dengan lingkungan hidupnya, terutama pada kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti sumber karbon yang berlebihan dalam media pertumbuhannya (> 1%). Ray (2004) menyebutkan bahwa beberapa spesies dari genus *Leuconostoc*, diantaranya *Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. carnosum* dan *Leu. gelidum*. Oleh karena itu, apabila isolat bakteri diuji produksi dekstran dalam media sukrosa agar hasilnya positif maka diduga kuat bakteri asam laktat tersebut merupakan genus *Leuconostoc*.

2.4.6 Pertumbuhan pada Konsentrasi garam NaCl yang Berbeda

Masing-masing spesies bakteri asam laktat memiliki perbedaan toleransi untuk tumbuh pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda (Vos *et al.*, 2009). Bakteri asam laktat yang mampu tumbuh dan berkembang pada fermentasi menggunakan kadar garam tinggi (6,5%) diperkirakan adalah BAL dari genus *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* (Buckle *et al.*, 1987). Sebaliknya, bakteri asam laktat yang tidak dapat tumbuh baik pada media dengan konsentrasi garam tinggi (6,5%) adalah genus *Streptococcus*, diantaranya *S. lactis*, *S. lactissubsp. diacetylactis*, *S. cremoris*, dan *S. thermophilus* (Ray, 2004). Oleh karena itu, uji pertumbuhan bakteri pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat.

2.4.7 Pertumbuhan pada Karbohidrat yang Berbeda

Bakteri asam laktat mampu memfermentasi karbohidrat (monosakarida dan disakarida) menjadi asam laktat sebagai senyawa utamanya. Glukosa, fruktosa, dan arabinosa termasuk golongan monosakarida, sedangkan sukrosa dan maltosa termasuk golongan disakarida (Sudarmadji *et al.*, 1989). Fitriyana (2011) menyatakan bahwa setiap spesies bakteri mampu memfermentasi karbohidrat jenis tertentu dan tidak mampu memfermentasi jenis karbohidrat yang lain. Oleh karena itu, uji kemampuan memfermentasi berbagai karbohidrat yang berbeda ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Isolasi bakteri asam laktat dari fermentasi kopi rakyat dalam wadah besek dilakukan di Kelompok Tani Maju Desa Sukorejo Kecamatan Sumberwringin Kabupaten Bondowoso untuk mendapatkan sampel berupa isolat bakteri asam laktat untuk selanjutnya diidentifikasi jenisnya di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian ini dimulai pada bulan Juli 2018 sampai Januari 2019.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi besek bambu dengan tinggi ± 40 cm dan diameter ± 30 cm, neraca analitik (Ohaus, *Analytical Plus*), autoklaf sterilisasi (*Hirayana Manufacturing*, Model HL-36, Japan), *Laminar Air Flow* (Cruma SA, Type 9005-FL, Spanyol), *Colony Counter* (*Stuart Scientific*, Ukraina), mikropipet, inkubator suhu 27°C, 37°C dan 45°C (*Heraeus Instrument D-63450 Hanau tipe B 6200*, USA), pH meter (*Trans Instrumen*), mikroskop binokuler (XSZ-107), *hot plate stirrer, vortex*, kulkas, tabung reaksi (Pyrex), termometer, erlenmeyer, cawan petri sekali pakai, gelas ukur, gelas beker, gelas objek, gelas penutup, tabung durham, tabung eppendorf, *blue tip*, *yellow tip*, spatula, batang stirrer, jarum ose, bunsen, dan pipet tetes.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolat bakteri asam dari fermentasi kopi arabika rakyat dari kelompok tani maju (diambil pada jam ke-0, 12, 24, 36, dan 48 selama fermentasi). Bahan lain yang digunakan yaitu MRS (*deMan Rogosa Sharpe*) agar, MRS (*deMan Rogosa Sharpe*) broth, MEA (*Malt Extract Agar*), akuades, alkohol 70 % dan 96%, NaCl, CaCO₃, H₂O₂, L-arginin monohidroklorida, tripton, ekstrak yeast, d-glukosa, K₂PO₄, arabinosa, sukrosa, fruktosa, maltose, manitol, ammonium asetat, kalium iodida, etanol, safranin, kristal violet, mordan, minyak imersi, spiritus, aluminium foil, tissue, dan amonium oksalat.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan metode eksploratif tiga kali ulangan dengan perbedaan waktu fermentasi. Fermentasi biji kopi arabika rakyat dilakukan selama 48 jam dalam wadah besek di Desa Sukorejo Kecamatan Sumberwringin Kabupaten Bondowoso. Daftar Sampel yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Daftar sampel kopi rakyat terfermentasi dalam besek

No.	Kode Sampel	Keterangan
1.	B ₁ (0)	Kopi terfermentasi 0 jam ulangan 1
2.	B ₂ (0)	Kopi terfermentasi 0 jam ulangan 2
3.	B ₃ (0)	Kopi terfermentasi 0 jam ulangan 3
4.	B ₁ (12)	Kopi terfermentasi 12 jam ulangan 1
5.	B ₁ (24)	Kopi terfermentasi 24 jam ulangan 1
6.	B ₁ (36)	Kopi terfermentasi 36 jam ulangan 1
7.	B ₁ (48)	Kopi terfermentasi 48 jam ulangan 1
8.	B ₂ (12)	Kopi terfermentasi 12 jam ulangan 2
9.	B ₂ (24)	Kopi terfermentasi 24 jam ulangan 2
10.	B ₂ (36)	Kopi terfermentasi 36 jam ulangan 2
11.	B ₂ (48)	Kopi terfermentasi 48 jam ulangan 2
12.	B ₃ (12)	Kopi terfermentasi 12 jam ulangan 3
13.	B ₃ (24)	Kopi terfermentasi 24 jam ulangan 3
14.	B ₃ (36)	Kopi terfermentasi 36 jam ulangan 3
15.	B ₃ (48)	Kopi terfermentasi 48 jam ulangan 3

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi perhitungan tingkat keasaman (pH) kopi selama fermentasi (Fitriyana, 2011), perubahan suhu selama fermentasi (Fitriana, 2015), perhitungan total bakteri asam; bakteri non-asam; kapang; dan khamir (*Bacteriological Analytical Manual, 2001*), perhitungan luas area bening pada uji kemampuan kerja metabolit antikapang oleh isolat dengan *overlay method* (Magnusson dan Schnurer, 2001), pewarnaan gram (Bell *et al.*, 2005), uji katalase (Bell *et al.*, 2005), produksi CO₂ pada MRS-Broth (Cappucino dan Sherman, 2005), pertumbuhan isolat pada suhu berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005), pertumbuhan isolat pada konsentrasi NaCl (garam) berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005), produksi dekstran dari sukrosa (Cappucino dan Sherman, 2005), produksi ammonia dari arginin (Fauzi, 2008) dan uji kemampuan

memfermentasi berbagai jenis karbohidrat (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*).

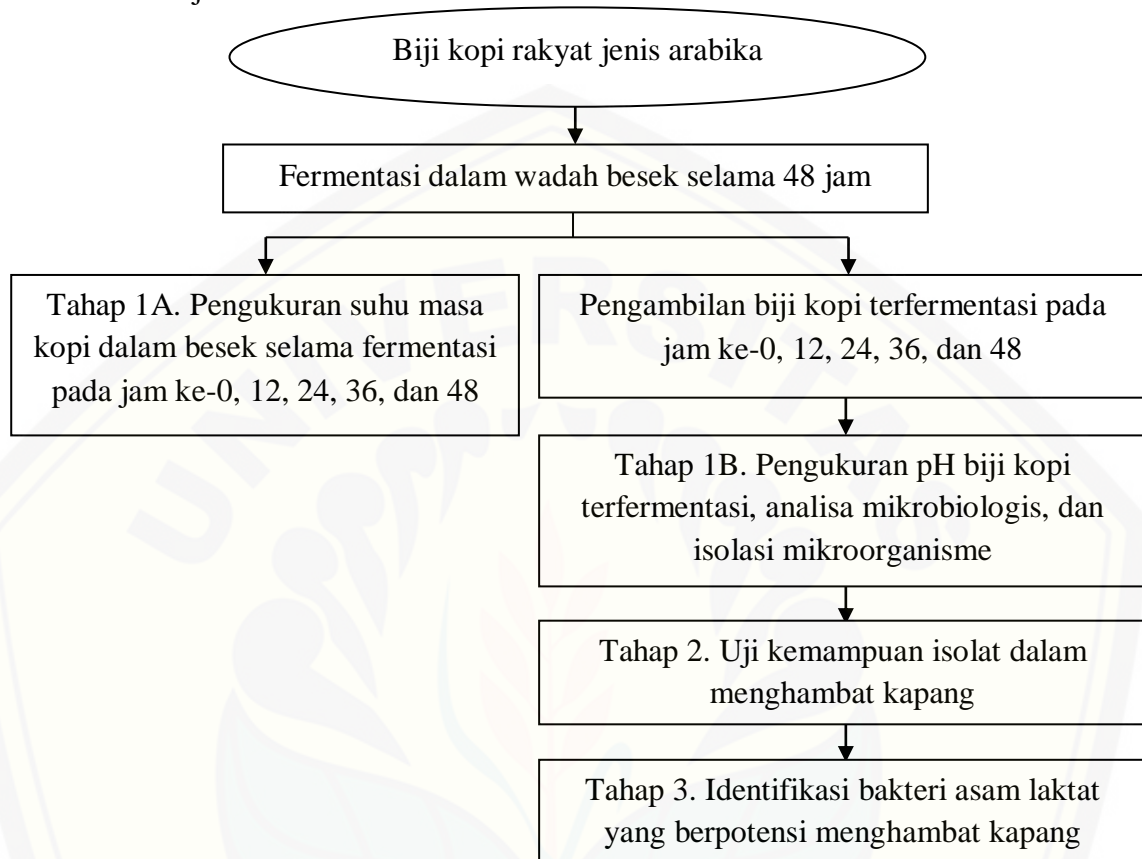
3.5 Pelaksanaan Kegiatan

Penelitian ini dilakukan dengan tiga tahapan. Tahap pertama yaitu melakukan analisa perubahan fisik dan mikrobiologis pada biji kopi selama fermentasi serta isolasi mikroorganisme yang berada pada biji kopi. Analisis perubahan fisik yang dilakukan yaitu pengukuran suhu dan pH selama fermentasi sedangkan analisis perubahan mikrobiologis yaitu perhitungan total mikroba meliputi total bakteri asam, bakteri non-asam, khamir dan kapang. Tahap kedua yakni deteksi isolat bakteri asam yang mampu menghambat pertumbuhan kapang. Pada tahap ini, bakteri asam akan diujikan dengan dua spesies kapang yang sering mengkontaminasi biji kopi yaitu *Aspergillus flavus* dan *Penicillium citrinum* untuk diamati kemampuan menghambat pertumbuhannya. Luaran dari tahapan ini yaitu mendapatkan isolat bakteri asam yang potensial menghambat pertumbuhan kapang atau memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antikapang. Tahap akhir dari penelitian ini yaitu mengidentifikasi bakteri asam yang potensial menghambat pertumbuhan kapang meliputi pewarnaan gram dan pengamatan bentuk selnya, uji katalase, uji kemampuan memproduksi CO₂, uji pertumbuhan pada suhu berbeda, uji pertumbuhan pada kadar garam berbeda, uji kemampuan memproduksi dekstran dari sukrosa, uji kemampuan memproduksi ammonia dari arginin, dan uji kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat. Luaran dari tahap ini yaitu menemukan dan mengetahui spesies BAL yang potensial menghasilkan metabolit antikapang yang diisolasi dari fermentasi biji kopi dalam wadah besek. Diagram rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.5.1 Analisa Fisik, Mikrobiologis, dan Isolasi Mikroorganisme dari Fermentasi Kopi

Penelitian ini diawali dengan melakukan fermentasi kopi sesuai dengan prosedur masyarakat di Desa Sukorejo, Kecamatan Sumberwringin, Bondowoso. Kopi yang digunakan yaitu kopi gelondong merah yang sudah dikupas kulitnya. Hasil pengupasan buah kopi menghasilkan biji kopi dengan *pulp* yang masih

menempel. *Pulp* itulah yang akan menjadi substrat pertumbuhan mikroorganisme saat biji kopi difermentasi. Biji kopi yang telah dikupas kemudian difermentasi selama 48 jam.



Gambar 3.1 Tahapan pelaksanaan kegiatan penelitian

a. Pengukuran Suhu Selama Fermentasi Biji Kopi (Fitriyana, 2011)

Pengukuran suhu pada biji kopi dilakukan untuk mengetahui kondisi fermentasi yang sedang berlangsung. Pengukuran suhu dilakukan dengan menancapkan ujung *thermometer stick* dengan kedalaman 10-15 cm dari permukaan biji kopi yang sedang difermentasi pada jam ke-0, 12, 24, 36, dan 48 di tiga titik berbeda pada setiap wadah.

b. Pengukuran Tingkat Keasaman (pH) Biji Kopi Terfermentasi (Fitriyana, 2011)

Secara kimiawi, indikator berlangsungnya fermentasi dapat diketahui dari laju perubahan derajat keasaman (pH) biji kopi selama fermentasi berlangsung. Pengukuran tingkat keasaman (pH) biji kopi dilakukan dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi. Pengadukan menggunakan sendok steril dengan

kecepatan ± 60 rpm dilakukan sebelum pengambilan sampel. Pengadukan dilakukan hingga ke dasar wadah fermentasi. Pengukuran tingkat keasaman dilakukan dengan mengambil biji kopi terfermentasi kemudian dicampur dengan 45 ml akuades kemudian diukur pH larutannya. Pengukuran dilakukan selama fermentasi berlangsung pada jam ke-0, 12, 24, 36, dan 48. Tahapan proses analisa perubahan fisik pada fermentasi kopi dapat dilihat pada Gambar 3.2.

c. Perhitungan Total Mikroba (*Bacteriological Analytical Manual*, 2001)

Perhitungan total mikroba dilakukan setelah diinkubasi pada suhu ruang atau $27-28^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam. Metode ini dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung koloni bakteri asam dan bakteri non-asam yang tumbuh pada media MRSA+CaCO₃ 1%. Bakteri asam menghasilkan zona bening pada media MRSA+CaCO₃ 1%, sedangkan bakteri non-asam yaitu bakteri yang tumbuh pada media MRSA+CaCO₃ 1% namun tidak menghasilkan zona bening. Selain bakteri, kapang dan khamir pada media MEA juga dihitung. Perhitungan mikroba dilakukan dengan memilih cawan petri yang memiliki jumlah koloni antara 25-250 dan dihitung menggunakan rumus:

$$N \text{ (cfu/ml)} = \frac{\Sigma C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

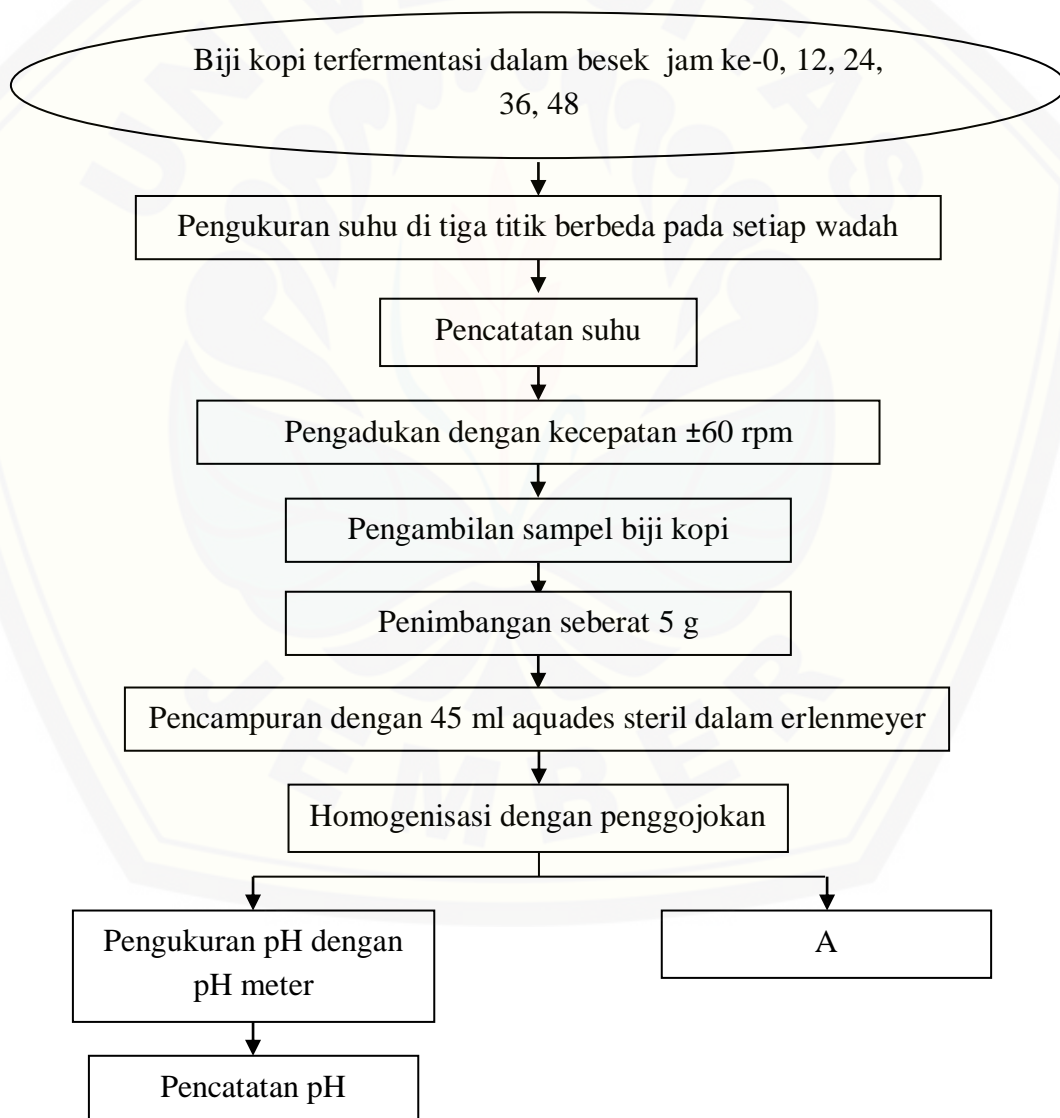
Keterangan:

- N = jumlah koloni
- ΣC = total koloni pada semua cawan yang dihitung
- n_1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama
- n_2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua
- d = tingkat pengenceran yang diperoleh dari cawan yang pertama dihitung

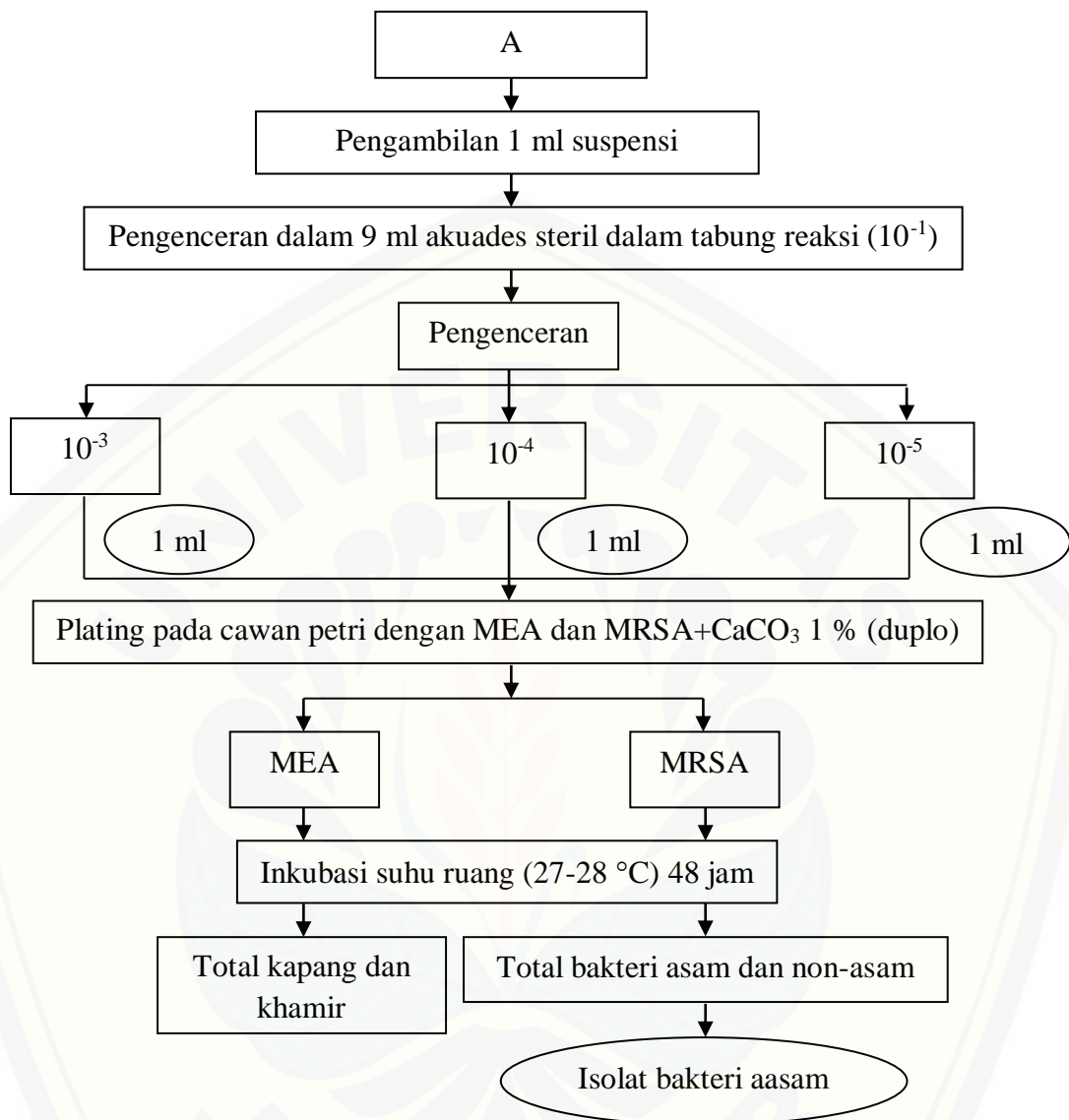
d. Isolasi Mikroorganisme

Isolasi mikroorganisme dilakukan dari suspensi berupa 5 g biji kopi terfermentasi dalam 45 ml akuades. Suspensi tersebut kemudian diambil 1 ml dan diencerkan dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril untuk konsentrasi 10^{-1} selanjutnya dihomogenkan. Pengenceran dilakukan hingga konsentrasi 10^{-5} . Suspensi kultur mikroorganisme dari masing-masing pengenceran (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) diambil 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri steril kemudian ditambahkan

media berupa 15 ml MRSA+CaCO₃ 1% atau MEA secara duplo. Media MEA untuk menumbuhkan kapang dan khamir, sedangkan MRSA+CaCO₃ 1% digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam dan bakteri non-asam yang berperan selama fermentasi kopi secara kuantitatif (Hatningsih, 2018). Media MEA dan MRSA+CaCO₃ 1% kemudian diinkubasi pada suhu ruang atau 27-28°C selama 48 jam dengan posisi terbalik. Inkubasi pada suhu ruang dipilih untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan fermentasi yang dilakukan oleh petani. Diagram alir tahapan analisa mikrobiologis pada fermentasi kopi dalam besek dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.2 Pelaksanaan kegiatan analisa fisik



Gambar 3.3 Tahapan analisa mikrobiologis dan isolasi mikroba
(Sumber: Hatiningsih, 2018 dengan modifikasi)

Koloni yang menghasilkan daerah bening dengan diameter minimal 0,5 cm akan diinokulasi dengan cara digoreskan kembali pada media MRSA+CaCO₃ 1% secara kuadran. Hasil penggoresan kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C guna mendapatkan kultur murni dari isolat. Kultur murni yang diperoleh selanjutnya ditumbuhkan kembali pada media MRSA dalam tabung reaksi (agar tegak) dengan menusukkan isolat dengan jarum ent ke dalam 7 ml media MRSA steril yang telah memadat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

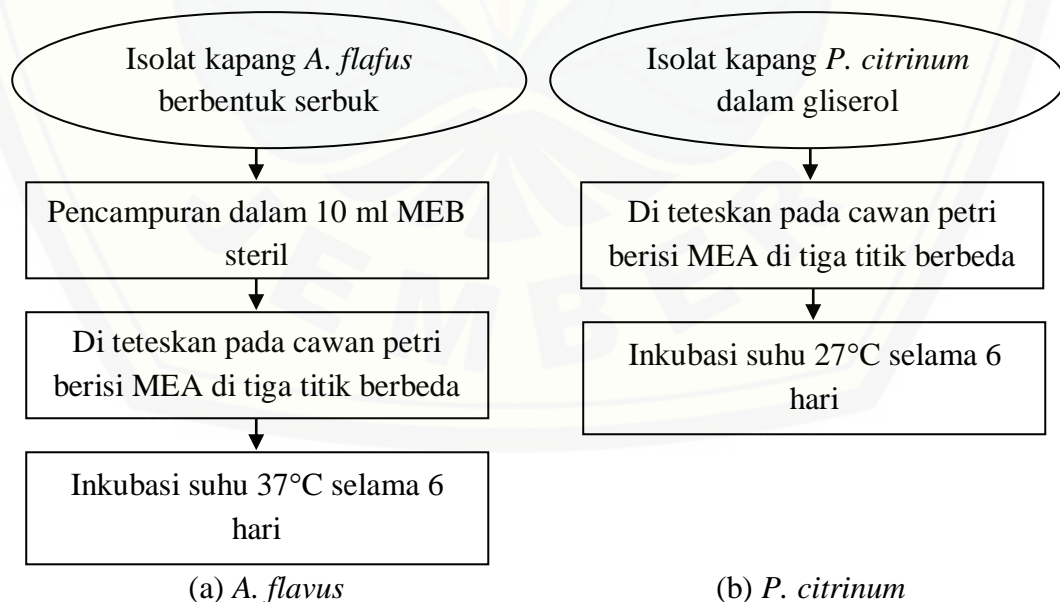
Koloni yang tumbuh pada agar tegak dapat disimpan dalam lemari pendingin sebagai kultur stok.

3.5.2 Uji Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Hasil Isolasi pada Fermentasi Kopi.

Isolat bakteri asam dari fermentasi kopi akan diidentifikasi yang hanya memiliki kemampuan kerja antikapang. Oleh karena itu, pengujian kemampuan kerja antikapang harus dilakukan sebelum melakukan identifikasi. Kapang yang diuji merupakan kapang yang tumbuh dominan selama fermentasi kopi yaitu *Aspergillus flavus* dan *Penicillium citrinum*. Pengujian ini dilakukan dengan dua tahapan yaitu peremajaan kapang dan pengujian antikapang.

a. Peremajaan Kapang

Isolat kapang *A. flavus* yang berbentuk serbuk di remajakan dengan cara dicampurkan dengan 10 ml MEB untuk selanjutnya ditetaskan di tiga titik berbeda pada cawan petri berisi MEA steril. Kapang diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 hari. Isolat kapang *P. citrinum* dalam gliserol di remajakan dengan cara diambil 1 ml dari suspensi tersebut dan di teteskan pada tiga titik berbeda pada cawan petri berisi media MEA steril. Kapang ini diinkubasi pada suhu 27°C selama 6 hari. Tahapan peremajaan kapang dapat dilihat pada Gambar 3.4



Gambar 3.4 Tahapan peremajaan kapang

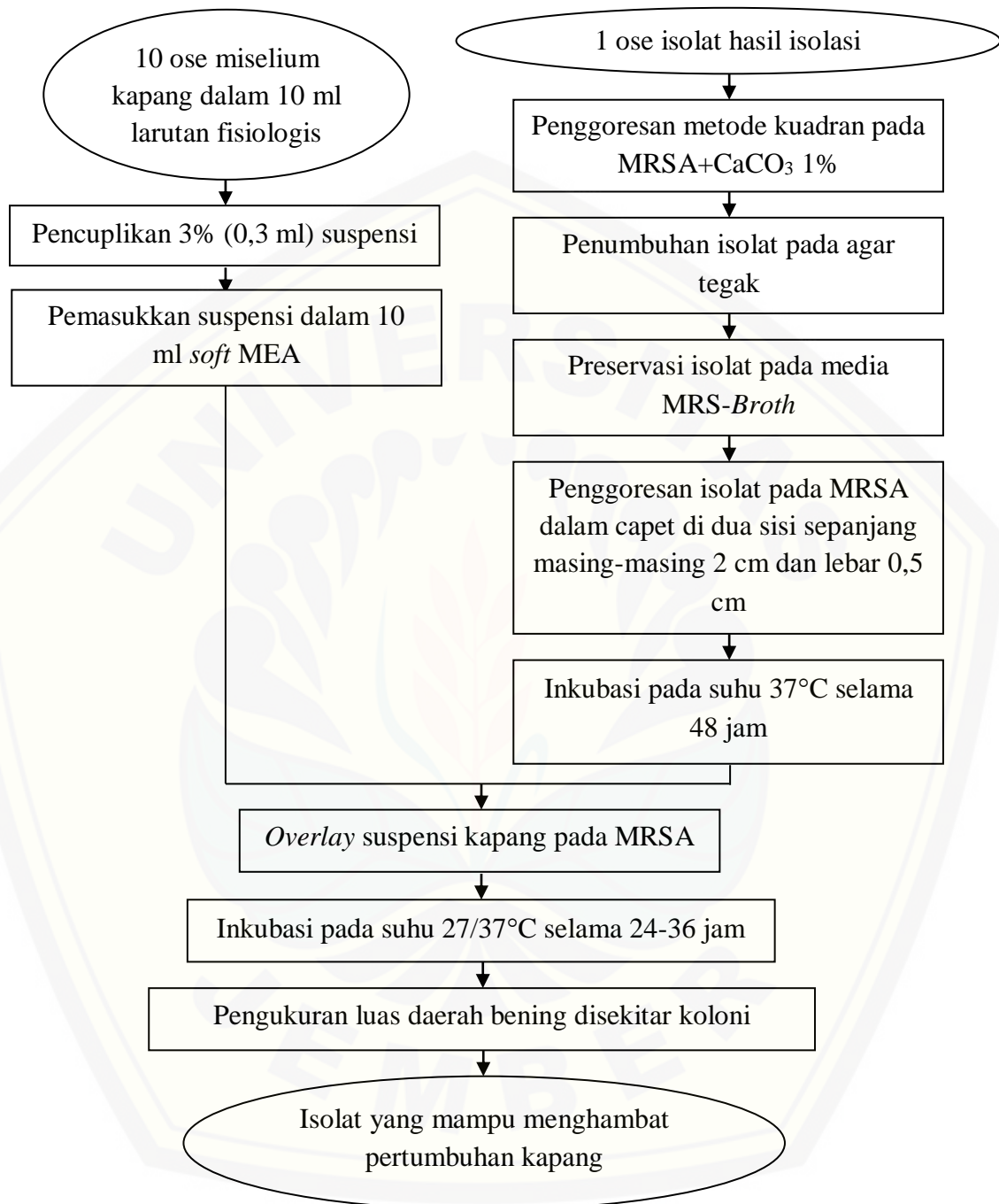
b. Pengujian Antikapang dari Bakteri Asam

Uji kemampuan kerja metabolit antikapang dari bakteri asam dilakukan dengan *overlay method* (Magnusson dan Schnurer, 2001). Metode tersebut dilakukan dengan cara menggoreskan biakan isolat bakteri asam sepanjang ± 2 cm dan lebar $\pm 0,5$ cm pada media MRSA di kedua sisi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Tahap kedua yaitu menyiapkan isolat kapang yang digunakan. Sebanyak 10 ose miselium kapang yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam 10 ml larutan fisiologis. Sebanyak 0,3 ml dari suspensi kapang tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam 10 ml *soft MEA*. *Soft MEA* atau *malt extract soft agar* dibuat dengan cara menimbang 2 g *malt extract* dan 0,7 g agar kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades dan disterilisasi. Suspensi kapang dalam *soft MEA* yang sudah dibuat selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri berisi MRSA yang telah ditumbuhi koloni bakteri asam kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk *Aspergillus flavus* dan suhu 27°C selama 24-36 jam untuk *Penicillium citrinum*. Daerah bening yang dihasilkan kemudian diukur panjang dan lebarnya agar dapat dihitung luas daerah beningnya tersebut. Perhitungan luas daerah bening mengacu pada perhitungan luas oval dikurangi luas koloni bakteri asam yang tumbuh. Tahapan pengujian aktivitas penghambatan kapang oleh bakteri asam dapat dilihat pada Gambar 3.5.

$$\text{Luas zona bening} = \text{luas oval} - \text{luas BA} = (\pi \times a \times b) - (p \times l)$$

Keterangan:

- π = satuan hitung (22/7 atau 3,14)
- a = $\frac{1}{2}$ panjang elips
- b = $\frac{1}{2}$ lebar elips
- p = panjang koloni bakteri asam (cm)
- l = lebar koloni bakteri asam (cm)



Gambar 3.5 Pengujian antikapang oleh bakteri asam

3.5.3 Identifikasi Bakteri Asam secara Fenotip

Identifikasi isolat bakteri asam yang diisolasi dari cairan fermentasi kopi didasarkan pada karakter fenotip mengacu pada “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”. Isolat bakteri asam yang telah tumbuh diidentifikasi sifat-sifat fenotipnya untuk menentukan dugaan spesies isolatnya. Identifikasi meliputi sifat morfologi yaitu pewarnaan gram, sifat katalase, produksi CO₂, produksi dekstran dari sukrosa agar, produksi ammonia dari arginin, dan pertumbuhan pada suhu, garam serta karbohidrat yang berbeda.

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram merupakan cara untuk menentukan morfologi suatu mikroorganisme berdasarkan reaksi terhadap pewarnaan gram, bentuk sel secara mikroskopik dan ukurannya. Cara pewarnaan gram ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Bell *et al.* (2005). Gelas objek dan gelas penutup dibersihkan dengan cara disemprot menggunakan alkohol 70% dan dikeringanginkan terlebih dahulu. Akuades steril diteteskan diatas gelas objek, ditambahkan 1 ose isolat berumur 24 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas objek. Proses selanjutnya yaitu dengan memfiksasi preparat (dilewatkan diatas nyala api bunsen beberapa kali) hingga terbentuk noda. Diatas noda tersebut diteteskan pewarna kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Langkah selanjutnya, gelas objek ditetesi larutan mordan dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan serta ditetesi dengan alkohol 96% sampai cat luntur atau tidak berwarna. Tahap terakhir dari pewarnaan gram yaitu gelas objek ditetesi dengan pewarna safranin selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Gelas objek yang telah kering lalu ditutup dengan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000. Jika isolat menghasilkan warna merah menandakan isolat tersebut diduga termasuk bakteri gram negatif dan jika warnanya ungu berarti isolat termasuk bakteri gram positif yang merupakan ciri umum dari BAL.

b. Uji Katalase

Pengujian aktivitas katalase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi H_2O_2 . Cara pengujian katalase ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Bell *et al.* (2005). Satu ose isolat bakteri asam berumur 12-36 jam dioleskan pada gelas objek lalu di atasnya ditetesi dengan H_2O_2 3% dan didiamkan kurang lebih satu menit. Jika muncul gelembung udara maka isolat tersebut termasuk dalam bakteri katalase positif (aerob), sedangkan jika tidak muncul gelembung udara maka isolat bakteri asam tersebut termasuk bakteri katalase negatif (anaerob) yang merupakan ciri umum dari BAL (Bell *et al.*, 2005).

c. Uji Kemampuan Memproduksi CO_2 dengan MRS-Broth

Uji ini bertujuan untuk menentukan bakteri asam termasuk golongan heterofermentatif atau homofermentatif. Cara pengujian produksi CO_2 oleh bakteri asam laktat dengan MRS-Broth ini mengacu metode yang dilakukan oleh (Cappucino dan Sherman, 2005) yaitu dengan cara mengambil 1 ml bakteri asam dalam MRS *broth* diinokulasikan pada 5 ml MRS *broth* steril pada tabung reaksi yang berisi tabung durham dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 48 jam. Apabila terdapat gelembung udara dalam tabung durham atau produksi gas maka bakteri asam tersebut termasuk ke dalam kelompok heterofermentatif. Sebaliknya, apabila bakteri asam tidak memproduksi gas maka termasuk kedalam kelompok homofermentatif (Cappucino dan Sherman, 2009).

d. Uji Pertumbuhan pada Suhu Berbeda

Cara pengujian pertumbuhan bakteri pada suhu berbeda ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Sebanyak 1 ose isolat bakteri asam diinokulasikan pada media MRS *broth* sebanyak 1-1,5 ml. Isolat tersebut diinkubasi selama 48 jam pada suhu yang berbeda yaitu $15^\circ C$ dalam lemari es, $37^\circ C$ dan $45^\circ C$ dalam inkubator. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan, dan gas.

e. Uji Kemampuan Produksi Dekstran dari Sukrosa

Cara pengujian produksi dekstran dari sukrosa oleh bakteri ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Sebanyak

1 ose isolat bakteri asam diinokulasikan dalam tabung ependorf berisi 1-1,5 ml MRS *broth* steril. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sampel kemudian diambil 0,1 ml kultur bakteri asam dan diinokulasikan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan 10 ml sukrosa agar dan diratakan. Isolat bakteri asam diinkubasi dengan posisi cawan terbalik pada suhu 37°C selama 5 hari dalam inkubator setelah media memadat. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya produksi lendir dekstran dari sukrosa pada cawan yang berarti isolat tersebut genus *Leuconostoc*. Jika tidak memproduksi dekstran maka bakteri asam tersebut tidak termasuk jenis *Leuconostoc* meskipun ada sebagian dari spesies *Leuconostoc* tidak mampu memproduksi dekstran dari sukrosa, seperti *Leu. paramesenteroides*, *Leu. oenos*, *Leu. cremoris* dan *Leu. lactis*.

f. Uji Kemampuan Produksi Ammonia dari Arginin

Pengujian produksi ammonia dari arginin mengacu pada metode yang dilakukan oleh Fauzi (2008). Uji produksi ammonia dari arginin digunakan untuk membedakan *Lactobacillus* heterofermentatif dengan homofermentatif dan juga untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Leuconostoc*. *Lactobacillus* heterofermentatif dapat menghidrolisa arginin, sedangkan *Lactobacillus* homofermentatif tidak dapat menghidrolisa arginin dan *Streptococcus* dapat memproduksi ammonia dari arginin.

MRS arginin *Broth* digunakan untuk membedakan *Lactobacillus* sp. yang bersifat homofermentatif dengan heterofermentatif. MRSB-Arginin dibuat dengan menambahkan 3 g L-arginin monohidroklorida ke dalam 1 liter MRS *broth*, sedangkan untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Leuconostoc* menggunakan media arginin *broth* yang dibuat dengan melarutkan 5 g tripton, 2,5 g yeast *extract*, 0,5 g D-glukosa, 2 g K₂PO₄ dan 3 g L-arginin monohidroklorida dalam 1 liter akuades dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Satu ose penuh isolat bakteri asam diinokulasikan ke dalam media MRS arginin *broth* atau arginin *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-5 hari. Isolat yang tumbuh pada media uji selanjutnya ditambah reagen *nessler* dengan volume yang sama. Reaksi positif atau pembentukan ammonia ditandai dengan perubahan warna orange kecoklatan setelah penambahan reagen *nessler*.

g. Uji Pertumbuhan pada Konsentrasi Garam (NaCl) Berbeda

Pengujian pertumbuhan bakteri pada konsentrasi garam (NaCl) berbeda ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Konsentrasi garam (NaCl) yang digunakan terdiri dari NaCl 4 %, NaCl 6,5 % dan kontrol (tanpa penambahan garam). Masing-masing konsentrasi garam tersebut dicampurkan dalam MRS *broth* dan disterilisasi. Media MRS-*Broth* NaCl dimasukkan ke dalam tabung ependorf steril sebanyak 1ml. Sebanyak 50 µl isolat diinokulasi dalam media yang telah disediakan. Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan, dan gas.

h. Uji Kemampuan Memfermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat

Pengujian kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat mengacu pada *Bergey's Manual*. Caranya yaitu sebanyak 0,1 ml isoat bakteri asam diinokulasikan kedalam 1 ml media MRS *broth* termodifikasi. MRS *broth* termodifikasi artinya yaitu glukosa yang digunakan dalam MRS *broth* diganti dengan karbohidrat yang diujikan, seperti arabinosa, fruktosa, glukosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Sampel kemudian diinkubasi selama 48 jam. Reaksi positif ditandai dengan adanya endapan.

3.6 Analisa Data

Data yang didapatkan dari hasil pengukuran suhu, pH, total bakteri asam, bakteri non-asam total kapang, total khamir, dan aktivitas penghambatan kapang dianalisa secara statistik dengan menggunakan Microsoft Exel. Data hasil identifikasi dan pengamatan lainnya disajikan dalam bentuk data kualitatif dan dianalisa secara deskriptif serta dibandingkan dengan literatur yang bersumber dari buku, jurnal, dan studi literatur terkait. Berdasarkan hasil analisa data tersebut kemudian dapat dirumuskan kesimpulan.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa bakteri asam laktat (BAL) yang mampu menghambat pertumbuhan kapang diduga dari spesies *L. fermentum* (33,33%), *L. plantarum* (33,33%), *Leu. mesentroides* (22,22%), dan *L. brevis* (11,11%). Semua spesies yang telah teridentifikasi tersebut dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37-45°C. Isolat yang mampu menghambat pertumbuhan kapang *A. flavus* terbesar (8,96 cm²) diduga merupakan spesies *L. plantarum*. Isolat yang mampu menghambat pertumbuhan kapang *P. citrinum* terbesar (3,00 cm²) diduga merupakan spesies *L. fermentum*.

5.2 Saran

Penelitian identifikasi BAL ini dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi dan fenotipnya sehingga hanya dapat untuk pendugaan spesies saja. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian secara genotip atau pengujian DNA untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan pasti mengenai spesies BAL yang mampu menghambat pertumbuhan kapang. Aplikasi BAL hasil isolasi pada penelitian ini yang mampu menghambat pertumbuhan kapang juga perlu dilakukan sebagai starter fermentasi kopi untuk mencegah kontaminasi kapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaraj, C.E., Bakkali, M., Infantino, A Arakrak dan Laglaoui, A. 2015. Mycotoxigenic Fungi in Cereals and Coffee From The North of Morocco. *American Journal of Research Communication* 3(2): 130-142
- Adawyah, R. 2008. *Pengolahan dan Pengawetan Ikan*. Jakarta: PT. Bumi Aksara.
- Alsop, R.M. 1983. Industrial Production of Dextrans. *Progress Industrial Microbiology (Microbial Polysaccharides)*. Amsterdam: Elsevier 18: 1-44.
- Amalia, N. 2013. Identifikasi Jamur *Aspergillus flavus* pada Kacang Tanah (*Arachis hypogea* L.) yang dijual di Pasar Kodim. *Jurnal Analisis Kesehatan Klinik Sains* 1(1): 1-10.
- Ardhana, M.M dan Fleet, G.H. 2003. The Microbial Ecology of Cocoa Beans Fermentation in Indonesia. *International Journal Food Microbiology* 86(1-2):87-99.
- Astuti dan A. Rahmawati. 2010. Asimilasi Kolesterol dan Dekonjugasi Garam Empedu oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Limbah Kotoran Ayam secara In Vitro. *Prossiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Badan Standarisasi Nasional. 2008. *Standar Nasional Indonesia (SNI) Biji Kopi 01-2907-2008*. Jakarta: Dewan Standarisasi Indonesia.
- Barker, P.E. dan Ajongwhen, N.J. 1991. The Production of the Enzyme Dextranucrase using Non-aerated Fermentation Techniques. *Biotechnology and Bioengineering Journal* 37: 703-707
- Bell, C., Neaves, P., dan Williams A.P. 2005. *Food Microbiology: Laboratory Practice*. USA: Blackwell Publishing.
- Biehl, B., 1984. Cocoa Fermentation and Problems of Acidity Over Fermentation and Low Cocoa Flavor. Proceedings of the Internatinal Comference of Cocoa and Coconut, Kualalumpur. *Journal Agriculture*. No.561-566.
- Buckle, K. A., Edwards, R. A., Fleet, G. H., and Wotton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Penerjemah Hari Purnomo dan Adiono. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Cahyaningsih, H. 2006. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar serta Aplikasinya dalam Mereduksi *Salmonella thypimurium* dan *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao. *Journal Agriculture* 48: 3806-3816.
- Cappucino, J.G. dan Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual, Dary, The Benjamin or Cummings*. New York: Pulb. Co. Inc.
- Carvajal-Moreno, M., 2015. Metabolic Changes of Aflatoxin B1 to Become An Active Carcinogen and The Control of This Toxin. *Immunome Research* 11(2): 1-14.

- Correa, E.C., Jimenez, T.A., Diaz, B.V., Barreiro, P., Diezma, B., Oteros, R., Echeverri, C., Arranz, F.J., Ruiz, A.M. 2014. Advanced Characterisation of a Coffee Fermenting Tank by Multi-distributed Wireless Sensors: Spatial Interpolation and Phase Space Graphs. *International Journal of Food and Bioprocess Technology*. ISSN 1935-5130.
- Corsetti, A., Gobetti, M., Angelis, M.D. dan Cagno, R.D. 2005. Biochemistry and physiology of Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Journal Food Science and Technology* 16: 57-69.
- Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso. 2017. *Statistik Luas Perkebunan Kopi Kabupaten Bondowoso 2016*. Bondowoso: Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2018. *Statistik Perkebunan Indonesia Tahun 2015-2017*. Kementerian Pertanian.
- Edward dan James. 1945. *Formation of Serologically Reactive Dextrans by Streptococci from Subacute Bacterial Endocarditis*. New York: The Department of Bacteriology and Immunology, Cornell University Medical College.
- Evangelista, S.R., Gabriela, M.C.P.M., Souza, C.C., Ferreira, C.S., Carla, A.M.P. dan Freitas, R.S. 2014. Inoculation of Starter Cultures in a Semi-Dry Coffee (*Coffea arabica*) Fermentation Process. *Journal of Food Microbiology* (44):87-95.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Fauzi, M. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Biji Kopi Luwak (*Civet coffe*). *Laporan Penelitian*. Jember: Universitas Jember.
- Feng, Y., Backues, S.K., Baba, M., Heo, J.M., Harper, J.W., dan Klionsky, D.J. 2016. Phosphorylation of Atg9 regulates movement to the phagophore assembly site and the rate of autophagosome formation. *Autophagy* 12(4):648-58.
- Fitriyana, N.I. 2011. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat *Indigenous* dengan Potensi Antikapang dari Fermentasi Kakao di PTPN XII Kebun Banjarsari, Jember. *Tesis*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Frazier, W.C. dan D.C. Westhoff. 1988. *Food Microbiology 4th edition*. New York: Mc Graw Hill Book Company.
- Guilford, F.T. dan Hope, J., 2014. Deficient Glutathione In The Pathophysiology of Mycotoxin-Related Illness. *Toxins* 6(2): 608-623.
- Hamadi, S., Masoud, H.M., dan Ken, M.M.H. 2014. Isolation and Identification of Local Ethanolic Yeast Inhabiting Coffee Processing Environments in Tanzania. *International Journal of Life Sciences* 3(4): 213-220.

- Hatiningsih, S. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang dari Fermentasi Kopi Rakyat asal Kintamani Kabupaten Bangli. *Tesis*. Denpasar: Universitas Udayana.
- Jenie B.S.L., Apriyantono A. dan Dharmaputra, O.K. 2002. Peningkatan Keamanan Makanan Tradisional Berbasis Kacang Tanah Melalui Pemanfaatan Bakteri Laktat yang Bersifat Antimikotik dan Antimikotoksigenik. *Laporan RUT VIII Bidang Teknologi Hasil Pertanian*.
- Kustyawati dan Setyani, 2008. Pengaruh Penambahan Inokulum Campuran terhadap Perubahan Kimia dan Mikrobiologi Selama Fermentasi Coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 13(2): 73-84.
- Landon, R. S, Hudson, W. Kramer, dan C. Webb. 1993. *A Model of Dextranucrase Synthesis by Leuconostoc mesenteroides*. Transaction of the institution of chemical engineers 72:209-215.
- Lindgren, S.E. dan W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and fermentation. *FEMS microbial* 87: 149-164.
- Madigan, M.T. dan Martinko, J.M. 1997. *Brock: Biology of Microorganisms*. New York: Prentice Hall International, Inc.
- Madigan, M.T., dan Martinko, J.M. 2006. *Brock: Biology of Microorganism*. Inggris: Pearson Education International. ISBN 0-13-196893-9. 375-377.
- Madrigal-Bujaidar, E., Morales-Gonzalez, J., Sanchez-Gutierrez, M., Izquierdo-Vega, J., Reyes-Arellano, A., Alvarez-Gonzalez, I., Perez-Pasten, R. dan Madrigal-Santillan, E. 2015. Prevention of Aflatoxin B1-Induced DNA Breaks By Beta]-D-Glucan. *Toxins* 7(6): 2145-2158.
- Magnusson, J. dan Schnurer, J. 2001. Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 Produced a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Appl. Environ. Journal Microbiology* 67(1): 1-5.
- Maryam, R. 2006. Pengendalian Terpadu Kontaminasi Mikotoksin. *Wartazoa* 16(1): 21-30.
- Masound, W. dan Jerpersen, L. 2006. Pectin Degrading Enzymes in Yeast Involved in Fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Food Microbiology* 110: 291-296.
- Mubarok, F. 2014. Perubahan Kadar Kafein Biji Kopi Arabika Hasil Pengolahan Semi Basah dengan Perlakuan Variasi Jenis Wadah dan Lama Fermentasi. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Nasanit, R. dan Satayamut, K. 2015. Microbiological Study during Coffee Fermentation of *Coffea Arabica* var. chiangmai 80 in Thailand. *International Journal, Kasetsart Journal of Natural Science* 49:32-41.
- Ostovar, K. dan P. G. Keeney. 1973. Isolation and characterization of microorganisms involved in the fermentation of Trinidad's cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38:611-617.

- Palacios, C.H.A dan Taniwaki, M.H. 2004. Effect of Equilibrium Relative Humidity on Ochratoxin A Production by *Aspergillus carbonarius* in Raw Coffee Beans. *Brazilian Journal of Food Technology* 7(2):111-114.
- Park, S., Kim, D., Kim, J. dan Moon, Y., 2015. Effects of Mycotoxins on Mucosal Microbial Infection and Related Pathogenesis. *Toxins* 7(11): 4484-4502.
- Prayuginingsih, H., Santosa, T.H., Hazmi, M., dan Rizal, N.S. 2012. Peningkatan Daya Saing Kopi Rakyat di Kabupaten Jember. *Jurnal Sosial Ekonomi Pertanian* 6(3):26-40.
- Purwantisari, S dan Hastuti, R.B. 2009. Isolasi dan Identifikasi Jamur *Indigenous Rhizosfer* Tanaman Kentang dari Lahan Pertanian Kentang Organik di Desa Pakis, Magelang. *Jurnal Bioma* 11(2):45-53.
- Rai, M.K., Bonde, S.R., Ingle, A.P. dan Gade, A.K., 2012. Mycotoxin: Rapid Detection, Differentiation and Safety. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* 3(1):22-34.
- Ray, G.C. 2004. *Sherris Medical Microbiology An Introduction to Infections Diseases*. USA: Mc Graw Hill.
- Ress, T.J. 2006. *Development of a Novel Antifungal Silage Inoculant*. New Delhi: Mc Graw Publishing Company Limited.
- Ridwansyah. 2003. *Pengolahan Kopi*. Medan: Jurusan Teknologi Pertanian. Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara.
- Rinto, A.D., Sasanti, dan K. Fitria. 2012. Aktivitas Penghambatan Isolat Bakteri Asam Laktat Ikan Nila dan Tongkol terhadap Bakteri Merugikan Produk Perikanan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 15(2): 94-100.
- Rohan, A.T. 1963. The Processing of Row Cocoa for The Market. *FAO Journal of Agric*. Rome: Studies.
- Salminen, S. dan Von Wright, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. New York: CRC Press.
- Samson, R.A., Hoekstra E. S., Frisvad J.C. 2004. Penicillium subgenus Penicillium: New Taxonomic Schemes and Mycotoxins and Other Extrolites. *Studies in Mycology* 49(49):1-260.
- Schlegel, H. G., dan Schmidt, K. 1994. *Mikrobiologi Umum Edisi keenam*. Yogyakarta: UGM Press,.
- Schmidt, H. Taniwaki M.H., Vogel, R.F., and Niessen, L. 2004. Utilization of AFLP Markets for PCR-based Identification of *Aspergillus carbonarius* and Identification of its Presence in Green Coffee Samples. *Journal of Applied Microbiology* 97(5):899-909.
- Seely, H.W., P.W.V Mark, dan J.J. Lee. 2001. *Microbes in Action*. A Laboratory Manual of Microbiology, 4th Edition. New York: Freeman and Comp.

- Sheikh-Ali, S., Ahmad, A., Mohd-Setapar, S., Zakaria, Z. A., Abdul-Talib, N., Khamis, A. K. dan Hoque, M. E. 2014. *The Potential Hazards of Aspergillus Sp.* Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Shindy, B.P. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat sebagai Antikapang dari Fermentasi Kakao Rakyat di Gunung Kidul. Yogyakarta. *Skripsi.* Jember: Universitas Jember.
- Silva, C.F., D.M. Vilela, S.C. De, W.F. Duwarte, D.R. Dias, dan R.F. Schwan. 2013. Evaluation of a Potential Starter Culture for Enhance Quality of Coffee Fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29(2):235-47
- Sisbudi, S.H dan Fauzi, M. 2015. Bioethanol Production from Coffee Mill Effluent as Potential Renewable Energy. *International Journal of Tropical Natural Science* 1(2):18-22.
- Suardana, I.W., Suarsana, I.N., Sujaya, I.N. dan Wiryawan, K.G. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *Jurnal Veteriner* 8(4):155-159.
- Sudarmadji, S; B. Haryono dan Suhardi. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian.* Yogyakarta: Liberty.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan.* Jakarta: Tri Cipta Karya.
- Susanti, S. 2011. Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Fermentasi Semi Basah Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*). *Skripsi.* Jember: Universitas Jember.
- Vos, D.P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., dan Whitman, W.B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* New York: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Waluyo, A.W. 2004. Fermentasi Biji Kakao dan Penerapannya. *Jurnal Biodiversitas* 7(3):212-215.
- Wayan G. 2011. Produksi Selulase Kasar dari Kapang *Trichoderma Viride* dengan Perlakuan Konsentrasi Substrat Ampas Tebu dan Lama Fermentasi. *Jurnal Biologi* 10(2): 29-33.
- Wibowo, M.S dan Ristanto. 2012. *Pertumbuhan dan Kontrol Bakteri Asam Laktat.* Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press.
- Widagdo, A. 2008. Aplikasi Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Kakao dalam Menghambat Kapang *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao Underfermented dengan Metode Semprot. *Skripsi.* Jember: Universitas Jember.
- Widyastuti, Y. dan E. Sofarianawati. 1999. Karakter Bakteri Asam Laktat *Enterococcus sp.* yang Diisolasi dari Saluran Pencernaan Ternak. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 4(2):50-53.

- Wood, G.A.R. dan R.A. Lass. 1985. *Cocoa. 4th edition. Tropical Agriculture Series*. New York: Longman Scientific and Technical.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C. dan Fillmore, S. 2012. Antimicrobial Activity of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Cheeses and Yoghurt. *AMB Express 2012, A Springer Open Journal* 2-12.
- Yunenshi, F. 2011. Pengaruh Pemberian Probiotik *Pediococcus pentosaceus* Asal Fermentasi Kakao Hibrid terhadap Penurunan Kolesterol Telur Itik Pitalah. *Tesis*. Padang: Universitas Andalas.
- Yuniarti, M.P., Dewanti, H.R. dan Rahayu, W.P. 2014. Kajian Standar Cemaran Mikroba dalam Pangan di Indonesia. *Jurnal Standardisasi* 16(2):113-124.
- Yusiana, H. 2017. Implementasi Peraturan Bupati Bondowoso No. 25 Tahun 2016 tentang Tata Kelola dan Tata Niaga Kopi Arabika Java Ijen Raung di Desa Sukorejo Kecamatan Sumberwringin Kabupaten Bondowoso. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Yusianto dan Nugroho, D. 2014. Mutu Fisik dan Citarasa Kopi Arabika yang Disimpan Buahnya Sebelum di-Pulping. *Pelita Perkebunan* 30(2):137-158.
- Yusianto dan Widyotomo, S. 2013. Mutu dan Citarasa Kopi Arabika Hasil Beberapa Perlakuan Fermentasi: Suhu, Jenis Wadah, dan Penambahan Agens Fermentasi. *Pelita Perkebunan* 29(3):220-239.
- Yusmarini, E.R. 2004. Evaluasi Mutu Soygurt yang dibuat dengan Penambahan Beberapa Jenis Gula. *Jurnal Natur Indonesia* 6(2): 104-110.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Dokumentasi Tahapan Proses Fermentasi Kopi



Buah kopi arabika masak pohon



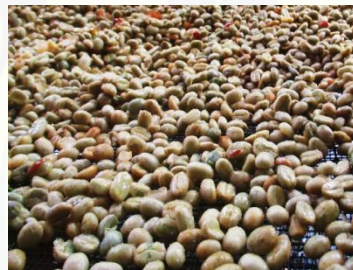
Sortasi buah kopi



Sortasi basah



Pengupasan Kulit (*Pulping*)



Biji kopi setelah dikupas



Wadah fermentasi



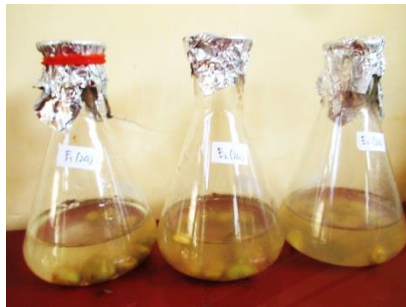
Pengukuran suhu selama proses fermentasi



Pengukuran pH biji kopi selama proses fermentasi



Penimbangan sampel biji kopi sebanyak 5 gr



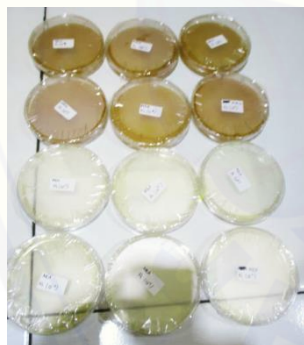
Biji kopi dalam akuades steril



Pengenceran suspensi biji kopi hasil fermentasi



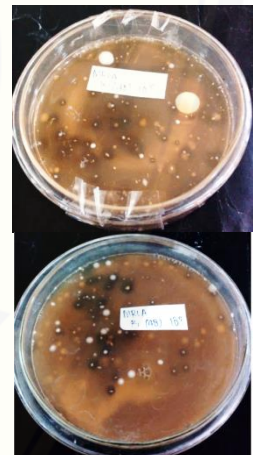
Plating sampel secara aseptis



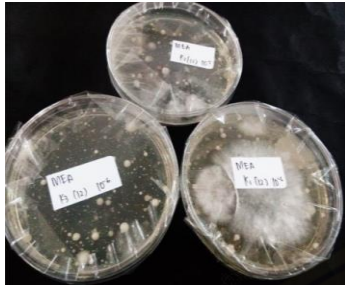
Hasil *plating*



Inkubasi dalam kotak *styrofoam*



Hasil isolasi BAL dalam media MRSA



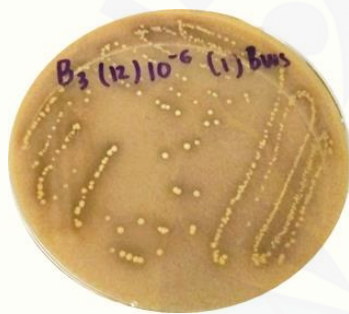
Hasil isolasi kapang dan khamir pada media MEA



Perhitungan mikroba dengan menggunakan colony counter



Proses peremajaan bakteri asam yang dilakukan didalam laminar airflow



Hasil goresan kuadran



Pengembangan isolat pada media agar tegak



Media MRSA dan MEA



Preservasi Isolat pada Media MRSB



Pertumbuhan bakteri asam pada Media MRSB



Pengamatan mikroskopik

Lampiran 4.1 Suhu, pH dan Total Mikroba Hasil Isolasi

1. Data Hasil Pengukuran Suhu Biji Kopi Rakyat Selama Fermentasi dalam Wadah Besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso

Sampel	Jam	Suhu Ulangan (°C)				Suhu Rata-rata		STDEV
		1	2	3	Rata-rata	Jam	Suhu (°C)	
B1	0	27	27	26	26.67			
	12	29	28	28	28.33	0	25.78	0.84
	24	32	32	32	32.00			
	36	24	24	24	24.00			
	48	23	24	24	23.67	12	28.11	0.19
B2	0	27	26	24	25.67			
	12	27	29	28	28.00			
	24	31	30	30.5	30.50	24	30.56	1.42
	36	25	26	26	25.67			
	48	25	25	25	25.00			
B3	0	25	24	26	25.00	36	25.00	0.88
	12	27.5	28	28.5	28.00			
	24	29	29.5	29	29.17			
	36	27	25	24	25.33	48	24.44	0.69
	48	25	25	24	24.67			

2. Data Pengukuran pH Biji Kopi Rakyat Selama Fermentasi dalam Wadah Besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso

Waktu	pH			Rata-rata	STDEV
	B1	B2	B3		
0	4.80	4.90	4.70	4.80	0.10
12	3.30	3.40	3.20	3.30	0.10
24	3.30	3.30	3.20	3.27	0.06
36	3.10	3.10	3.00	3.07	0.06
48	3.10	3.00	3.00	3.03	0.06

Lampiran 4.2 Total Mikroba Hasil Isolasi

1. Data pertumbuhan bakteri asam selama fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso

Jam	Jumlah Bakteri Asam (cfu/g)			Rata-rata	STDEV
	B1	B2	B3		
0	1.85E+05	2.57E+05	2.88E+05	2.43E+05	5.31E+04
12	1.79E+06	1.86E+06	1.84E+06	1.83E+06	3.50E+04
24	2.93E+07	2.75E+07	2.83E+07	2.84E+07	8.57E+05
36	1.47E+07	1.49E+07	1.48E+07	1.48E+07	9.00E+04
48	3.48E+06	3.52E+06	3.49E+06	3.50E+06	1.87E+04

2. Data pertumbuhan bakteri non-asam selama fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso

Jam	Jumlah Bakteri Non-asam (cfu/g)			Rata-rata	STDEV
	B1	B2	B3		
0	1.04E+05	1.04E+05	1.04E+05	1.04E+05	0.00E+00
12	7.38E+05	7.43E+05	7.43E+05	7.41E+05	2.60E+03
24	1.61E+06	1.61E+06	1.62E+06	1.62E+06	7.79E+03
36	1.16E+06	1.16E+06	1.20E+06	1.17E+06	2.60E+04
48	7.43E+05	7.56E+05	7.47E+05	7.49E+05	6.87E+03

3. Data pertumbuhan khamir selama fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso

Jam	Jumlah Khamir (cfu/g)			Rata-rata	STDEV
	B1	B2	B3		
0	4.64E+05	4.46E+05	5.27E+05	4.79E+05	4.25E+04
12	2.45E+07	1.96E+07	2.06E+07	2.16E+07	2.60E+06
24	1.81E+07	1.61E+07	1.55E+07	1.66E+07	1.36E+06
36	3.50E+06	3.14E+06	2.98E+06	3.21E+06	2.65E+05
48	1.80E+06	1.84E+06	1.82E+06	1.82E+06	2.26E+04

4. Data pertumbuhan kapang selama fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso

Jam	Jumlah Kapang (cfu/g)			Rata-rata	STDEV
	B1	B2	B3		
0	4.50E+04	4.95E+04	5.85E+04	5.10E+04	6.87E+03
12	7.65E+04	7.20E+04	7.65E+04	7.50E+04	2.60E+03
24	8.55E+04	8.55E+04	1.04E+05	9.15E+04	1.04E+04
36	9.90E+04	1.26E+05	1.31E+05	1.19E+05	1.70E+04
48	1.17E+05	1.40E+05	1.35E+05	1.31E+05	1.19E+04

Lampiran 4.3 Hasil Uji Penghambatan Kapang dari Isolat Bakteri Asam

1. Data pengamatan kemampuan kerja antikapang isolat bakteri asam yang diisolasi pada fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso terhadap kapang *A. flavus*

No.	Kode Isolat	Nomor Bakteri	Hasil Pengukuran		Luas Zona Bening (cm ²)	Luas koloni bakteri (cm ²)	Luas Penghambatan (cm ²)	Rata-rata (cm ²)	STDEV
			a (cm)	b (cm)					
1.	B1(0)10 ⁻³ (3)	1	2.4	1.9	3.58	1	2.58	1.26	1.86
		2	2	0.6	1.06	1	0.06		
2.	B2(0)10 ⁻³ (3)	1	3.2	1.5	3.77	1	2.77	1.96	1.13
		2	2.3	1.2	2.16	1	1.16		
3.	B3(12)10 ⁻⁵ (8)	1	2.2	1.3	2.24	1	1.14	3.65	3.40
		2	3.1	2.9	7.05	1	6.05		
4.	B3(12)10 ⁻⁵ (7)	1	2.9	1.9	4.32	1	3.32	3.98	0.93
		2	3.0	2.4	5.65	1	4.65		
5.	B3(12)10 ⁻⁵ (10)	1	2.9	2.4	5.46	1	4.46	6.00	2.17
		2	3.4	3.2	8.54	1	7.54		
6.	B3(12)10 ⁻⁵ (9)	1	2.2	4.0	6.90	1	5.90	3.57	3.29
		2	2.2	1.3	2.24	1	1.24		
7.	B1(48)10 ⁻⁵ (6)	1	4.5	3.0	10.59	1	9.59	8.96	0.89
		2	4.1	2.9	9.33	1	8.33		
8.	B1(48)10 ⁻⁵ (1)	1	3.0	1.5	3.53	1	2.53	1.27	1.77
		2	1.0	1.3	1.02	1	0.02		

2. Data pengamatan kemampuan kerja antikapang isolat bakteri asam yang diisolasi pada fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah besek di Kecamatan Sumberwringin-Bondowoso terhadap kapang *P. citrinum*

No.	Kode Isolat	Nomor Bakteri	Hasil Pengukuran		Luas Zona Bening (cm ²)	Luas Koloni Bakteri (cm ²)	Luas Penghambatan (cm ²)	Rata-rata (cm ²)	STDEV
			a (cm)	b (cm)					
1.	B1(0)10 ⁻⁵ (1)	1	3.0	0.9	2.12	1	1.12	2.86	2.46
		2	3.4	2.1	5.60	1	4.60		
2.	B1(0)10 ⁻³ (3)	1	2.5	1.8	3.53	1	2.53	3.00	0.66
		2	3.0	1.9	4.47	1	3.47		
3.	B2(0)10 ⁻³ (1a)	1	2.6	0.9	1.83	1	0.83	1.86	1.44
		2	3.3	1.5	3.88	1	2.88		
4.	B2(0)10 ⁻³ (1b)	1	2.3	1.0	1.80	1	0.80	1.96	1.63
		2	3.5	1.5	4.12	1	3.12		
5.	B2(0)10 ⁻³ (2)	1	2.0	1.5	2.35	1	1.35	0.86	0.69
		2	2.9	0.6	1.36	1	0.36		
6.	B2(0)10 ⁻³ (3)	1	2.6	1.0	2.04	1	1.04	1.78	1.05
		2	3.0	1.5	3.53	1	2.53		
7.	B3(0)10 ⁻⁴ (1)	1	2.8	1.8	3.95	1	2.95	1.95	1.40
		2	2.5	1.0	1.96	1	0.96		
8.	B3(12)10 ⁻⁵ (8)	1	2.5	0.9	1.76	1	0.76	0.86	0.13
		2	2.5	1.0	1.96	1	0.96		
9.	B3(12)10 ⁻⁵ (7)	1	2.2	1.2	2.07	1	1.07	0.72	0.46
		2	2.0	0.9	1.41	1	0.41		
10.	B3(12)10 ⁻⁵ (10)	1	2.1	0.7	1.15	1	0.15	0.51	0.51
		2	2.0	1.2	1.88	1	0.88		

No.	Kode Isolat	Nomor Bakteri	Hasil Pengukuran		Luas Zona Bening (cm ²)	Luas Koloni Bakteri (cm ²)	Luas Penghambatan (cm ²)	Rata-rata (cm ²)	STDEV
			a (cm)	b (cm)					
11.	B2(12)10 ⁻⁵ (5)	1	2.5	1.1	2.15	1	1.15	1.49	0.47
		2	3.0	1.2	2.82	1	1.82		
12.	B1(48)10 ⁻⁵ (6)	1	2.0	1.2	1.88	1	0.88	0.64	0.33
		2	2.0	0.9	1.41	1	0.41		

Lampiran 4.4 Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat

	Kode Isolat Bakteri Asam Laktat						<i>Bergey's Manual</i>		
	B1(0)10 ⁻⁶ (1) Batang	B2(0)10 ⁻³ (1a) Batang	B2(0)10 ⁻³ (1b) Batang	B2(0)10 ⁻³ (3) Batang	B3(12)10 ⁻⁵ (8) Batang	B3(12)10 ⁻⁵ (7) Batang	<i>L. plantarum</i> Batang	<i>L. brevis</i> Batang	<i>L. fermentum</i> batang
Bentuk Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dekstran dari sukrosa	-	-	-	-	-	-	*	*	*
Produksi CO ₂ dari arginin:	+	+	+	+	-	-	-	+	+
• MRSB-Arg	+	-	-	-	-	-	-	+	-
• Arginin-Broth	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Pertumbuhan pada:									
• garam 4%	+	+	+	+	+	+	*	*	+
• garam 6,5%	+	-	+	+	+	+	*	*	*
• suhu 15°C	-	-	-	-	-	-	+	+	-
• suhu 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• suhu 45°C	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Kemampuan memfermentasi:				+					
• arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	D
• manitol	+	+	+	+	+	+	+	d	*
• sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• fruktosa	+	+	+	+	+	+	+	#	*
• glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• Maltosa	+	+	+	+	+	+	d	+	*
(Dugaan) spesies	<i>L. brevis</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>			

	Kode Isolat Bakteri Asam Laktat			<i>Bergey's Manual</i>		
	B3(12)10 ⁻⁵ (10) Batang	B3(12)10 ⁻⁵ (9) Kokus	B2(12)10 ⁻⁵ (5) Kokus	<i>L. plantarum</i> Batang	<i>L. plantarum</i> Batang	<i>Leu. mesentroides</i> Kokus
Bentuk Gram	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	-	-	-	-
Dekstran dari sukrosa	-	+	+	*	*	+
Produksi CO ₂ dari NH ₃ arginin:		+	+	-	-	*
• MRSB-Arg	-	-	+	-	-	*
• Arginin-Broth	-	-	-	-	-	*
Pertumbuhan pada:						
• garam 4%	+	+	-	*	*	+
• garam 6,5%	+	+	-	*	*	D
• suhu 15°C	-	+	+	+	+	*
• suhu 37°C	+	+	+	+	+	D
• suhu 45°C	+	+	+	-	-	*
Kemampuan memfermentasi:						
• arabinosa	+	+	+	+	+	+
• manitol	+	+	+	+	+	D
• sukrosa	+	+	+	+	+	+
• fruktosa	+	+	+	+	+	+
• glukosa	+	+	+	+	+	*
• Maltosa	+	+	+	d	d	+
(Dugaan) spesies	<i>L. plantarum</i>	<i>Leu. mesentroides</i>	<i>Leu. mesentroides</i>			

Bergey's Manual (Gibbons dan Buchanan, 1974): + = <90% strain memberikan reaksi positif; - = <90% strain memberikan reaksi negatif; d = beberapa strain menunjukkan reaksi positif, beberapa lainnya negatif; # = reaksi lemah, lambat, atau negatif; * = tidak diketahui.