

# LAPORAN PENELITIAN



## **KURVA PERTUMBUHAN ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT (BAL) BIJI KOPI LUWAK PADA BEBERAPA MEDIA**

Oleh:  
Ir. Mukhammad Fauzi, MSi.

**JURUSAN TEKNOLOGI HASILPERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2009**

## HALAMAN PENGESAHAN

<b>1. Judul Penelitian</b>	Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (Bal) Biji Kopi Luwak Pada Beberapa Media
<b>2. Ketua Peneliti</b> a. Nama Lengkap b. Jenis Kelamin c. Golongan/Pangkat/NIP d. Jabatan Akademik e. Fakultas/Jurusan	Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si. Laki-laki IV-a/Pembina /196307011989031004 Lektor Kepala Teknologi Pertanian/Teknologi Hasil Pertanian
<b>3. Perguruan Tinggi</b>	Universitas Jember
<b>4. Jangka Waktu Penelitian</b>	1(satu) tahun
<b>5. Biaya</b>	Rp. 3.000.000,- (tiga juta rupiah)
<b>6. Sumber Dana</b>	Mandiri

Mengetahui  
Dekan Fak. Teknologi Pertanian

Jember, 22 Oktober 2009  
Peneliti,

Dr.Ir. Iwan Taruna, M.Eng.  
NIP. 196910051994021001

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.  
NIP. 196307011989031004

## RINGKASAN

Isolat BAL dari biji kopi yang keluar bersamaan dengan feses luwak teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. paramesenteroides* perlu dipelajari pola kurva pertumbuhannya dalam beberapa media cair, seperti GYP (Glucose Yeast Peptone), tetes dan gula pasir untuk penggunaannya lebih lanjut.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui media cair (*broth*) yang tepat dan ekonomis untuk produksi massal isolat BAL, waktu panen yang optimum pada produksi massal sel BAL sebagai inokulan pada proses produksi ragi kopi luwak bentuk kering.

Penelitian ini menggunakan dua faktor perlakuan yaitu: faktor A adalah jenis media (tetes dan gula pasir) dan faktor B adalah konsentrasi media (0,5%, 1% dan 1,5%) dan sebagai kontrol digunakan media GYP *broth*. Parameter pengamatan pendukung dalam penelitian ini meliputi: total sel bakteri menggunakan PCA (*Plate Count Agar*), gula reduksi dengan metode Nelson-Somogy, nitrogen terlarut dengan metode formol dan total asam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa media substitusi GYP *broth* yang lebih baik dari media kedua jenis media untuk pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *Lacto bacillus plantarum* dan *L. Brevis*. Media tetes 1,5% merupakan media yang tepat secara komersial dari pada media gula pasir. Waktu panen yang tepat untuk *L. mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *L. plantarum* dan *L. brevis* pada media tetes 1,5% berturut-turut adalah pada jam ke-18-24, 24-96, 30-36 dan 48-60.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke Hadlirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian ini yang berjudul Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Biji Kopi Luwak Pada Beberapa Media.

Kepada pihak-pihak yang telah banyak membantu kelancaran penyelesaian pekerjaan ini, kami mengucapkan terima kasih :

1. Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan dan arahan guna menyelesaikan penelitian ini.
2. Ketua Jurusan THP FTP UENJ yang telah memberikan fasilitas laboratorium untuk mempelajari pola pertumbuhan isolat BAL kopi luwak.
3. Ketua kelompok petani kopi rakyat Sido Mulyo Garahan Kabupaten Jember yang telah meyediakan biji kopi Luwak.

Semoga hasil penelitian dapat bermanfaat untuk pengembangan teknologi pengolahan biji kopi. Kami tetap berharap banyak adanya kritikan dan saran-saran yang konstruktif kepada semua pihak untuk peningkatan kualitas laporan penelitian yang lain.

Jember, Oktober 2009

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>Halaman Pengesahan</b> .....	ii
<b>Ringkasan</b> .....	iii
<b>Kata Pengantar</b> .....	iv
<b>Daftar isi</b> .....	
<b>Daftar Tabel</b> .....	
<b>Daftar Gambar</b> .....	
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Kopi.....	4
2.2 Produksi dan Pasar Kopi Indonesia.....	5
2.3 Pengolahan Kopi.....	5
2.4 Fermentasi Biji Kopi.....	6
2.5 Kopi Luwak.....	6
2.6 Isolat Mikroba dari Kotoran Luwak.....	7
2.7 Media <i>Glucose Yeast Peptone (GYP) Broth</i> .....	8
2.8 Kecambah Kedelai.....	8
2.9 Tetes Tebu (Molases) dan Gula Pasir.....	9
2.10 Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri.....	10
2.11 Metabolisme Gula pada BAL.....	11
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	
3.1 Bahan dan Alat Penelitian.....	15
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.3 Metode Penelitian.....	15
3.4 Parameter Pengamatan.....	18
3.5 Prosedur Analisis.....	18
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	21
4.1 Pertumbuhan <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	21
4.1.1 Media Tetes.....	21
4.1.2 Media Gula.....	22
4.1.3 Pola Perubahan Kandungan Gula Reduksi dan Total Asam pada Media.....	23
4.2 Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	27
4.2.1 Media Tetes.....	27
4.2.2 Media Gula.....	28
4.2.3 Pola Perubahan Kandungan Gula reduksi dan Total Asam pada Media.....	28

4.3 Pertumbuhan <i>Lactobacillus brevis</i> .....	31
4.3.1 Media Tetes.....	31
4.3.2 Media Gula.....	32
4.3.3 Pola Perubahan Kandungan Gula reduksi dan Total Asam pada Media.....	33
4.4 Pertumbuhan <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> .....	35
4.4.1 Media Tetes.....	35
4.4.2 Media Gula.....	36
4.4.3 Pola Perubahan Kandungan Gula reduksi dan Total Asam pada Media.....	37
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	40
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	41

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1	Komposisi Kimia Kopi .....	4
2.3	Komposisi Kimia Tetes Tebu (Molases).....	9
2.4	Komposisi Gula Pasir.....	10
2.5	Aktivitas Enzimatis <i>L. mesenteroides</i> .....	12

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Kandungan Nitrogen Terlarut Kotiledon Pada Berbagai Umur Perkecambahan .....	8
2.2	Kurva Pertumbuhan Bakteri .....	11
2.3	Kurva Pertumbuhan <i>L. plantarum</i> pada Media MRS Broth Suhu 30°C .....	13
2.4	Pertumbuhan <i>L. paramesenteroides</i> pada Media MRS Broth Suhu 30°C.....	14
3.1	Diagram Alir Pembuatan Starter Isolat BAL .....	23
3.2	Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Kecambah Kedelai .....	17
4.1	Pertumbuhan <i>L. mesenteroides</i> pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi .....	22
4.2	Pertumbuhan <i>L. mesenteroides</i> pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi .....	23
4.3	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi <i>L. mesenteroides</i> .....	24
4.4	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi <i>L. mesenteroides</i> .....	26
4.5	Pertumbuhan <i>L. plantarum</i> pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi .....	27
4.6	Pertumbuhan <i>L. plantarum</i> pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi .....	28
4.7	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi <i>L. plantarum</i> .....	29
4.8	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi <i>L. plantarum</i> .....	31
4.9	Pertumbuhan <i>L. brevis</i> pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi .....	32
4.10	Pertumbuhan <i>L. brevis</i> pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi .....	32
4.11	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi <i>L. brevis</i> .....	33
4.12	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi <i>L. brevis</i> .....	34
4.13	Pertumbuhan <i>L. paramesenteroides</i> pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi.....	36
4.14	Pertumbuhan <i>L. paramesenteroides</i> pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi.....	37
4.15	15 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi <i>L. paramesenteroides</i> .....	38
4.16	Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi <i>L. paramesenteroides</i> .....	38



## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Indonesia merupakan produsen kopi terbesar keempat di dunia dengan produksi saat ini mencapai 348.000 ton setelah Brazil 2,76 juta ton, Vietnam 1,17 juta ton dan Kolombia sebesar 738.000 ton. Umumnya petani di Indonesia menanam kopi jenis robusta, sementara kopi jenis arabika hanya ditanam oleh kurang dari 10% petani kopi (Herman, 2003). Pada tahun 2000 ekspor kopi Indonesia mencapai 340.900 ton, namun tahun berikutnya turun menjadi 250.800 ton. Pada tahun 2004 ekspor kopi kembali meningkat menjadi 344.100 ton, dan melonjak mencapai 445.900 ton pada tahun 2005. Rendahnya produktivitas kopi biji dikarenakan petani kopi Indonesia menghasilkan kopi biji yang berkualitas rendah dengan kualitas yang bervariasi antar produsen, dan bukan merupakan produk yang siap dikonsumsi.

Secara umum dua proses pengolahan kopi biji yaitu pengolahan secara kering dan pengolahan secara basah. Pengolahan secara kering masih banyak dilakukan oleh petani, padahal kualitas kopi biji yang dihasilkan lebih rendah dibanding pengolahan secara basah yang menggunakan tahap fermentasi (Anonim, 2009a). Hal ini karena petani memandang proses pengolahan secara kering relatif lebih mudah dan lebih efisien terlebih dengan kuantitas produksi yang tidak terlalu banyak dibanding kopi perkebunan. Kopi pengolahan basah memiliki mutu, citarasa dan aroma yang lebih baik dibandingkan kopi pengolahan kering akibat dari terbentuknya prekursor- prekursor pembentuk citarasa dan aroma selama proses fermentasi oleh bantuan mikroba fermentasi.

Salah satu produk kopi fermentasi yang mempunyai nilai jual cukup tinggi adalah kopi luwak. Kopi luwak dihasilkan dari fermentasi kopi dalam perut luwak dengan bantuan enzim yang kemudian dikeluarkan bersama feses binatang luwak. Rasa yang dihasilkan lebih kuat dengan citarasa yang lebih sempurna. Diperkirakan produksi tahunannya hanya sekitar 226,8 kg dan karena kelangkaannya inilah harga kopi luwak melambung tinggi mencapai 12 juta rupiah per kg (Anonim, 2009b).

Upaya rekayasa ragi fermentasi dari kotoran binatang luwak untuk menghasilkan kopi berspesifikasi kopi luwak yang bermutu tinggi didasari atas dugaan adanya peranan bakteri asam laktat (BAL) dalam fermentasi kopi luwak. Isolat bakteri asam laktat dari kotoran binatang luwak ini digunakan sebagai awal pengembangbiakan dan pembuatan ragi monokultur yang selanjutnya akan diproduksi menjadi ragi fermentasi multikultur kopi berspesifikasi kopi luwak. Rekayasa ini diharapkan dapat menghasilkan kopi berspesifikasi kopi luwak yang mempunyai mutu mendekati kopi luwak sehingga dapat meningkatkan mutu kopi dan nilai jualnya.

Dari hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan berbagai macam uji diketahui bahwa diperoleh lima spesies BAL yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dan *L. Brevis*, *Leuconostoc paramesenteroides* dan *L. mesenteroides* serta *Streptococcus faecium*. Dari kelima spesies tersebut yang paling dominan jumlahnya dalam proses fermentasi kopi luwak adalah *Leuconostoc paramesenteroides* (Fauzi, 2008).

Pengembangbiakan isolat BAL dari kotoran binatang luwak yang telah teridentifikasi pada berbagai media cair (*broth*) perlu dilakukan sebagai langkah awal pembuatan ragi fermentasi kopi luwak. Media cair yang digunakan untuk pertumbuhan isolat BAL dapat berupa tetes tebu (molases), gula pasir dan *Glucose Yeast Peptone* (GYP) cair (*broth*). Tetes tebu merupakan produk samping dari industri gula. Tetes tebu dan gula pasir mudah diperoleh dan harganya ekonomis sehingga memungkinkan dikembangkan sebagai media tumbuh BAL secara komersial.

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui jenis media tumbuh yang optimum untuk tiap-tiap isolat dan menentukan waktu panen yang tepat. Pertumbuhan dan masa panen BAL antara lain dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi media tumbuh.

## **1.2 Rumusan permasalahan**

Jenis media cair menyebabkan perbedaan komposisi nutrisi untuk pertumbuhan BAL yang dapat mempengaruhi pertumbuhan serta masa panen BAL. Namun pengaruhnya terhadap pola pertumbuhan dan masa

panen sel BAL belum ada informasi, maka perlu dipelajari pola kurva pertumbuhan sel Isolat BAL biji kopi luwak.

### **1.3 Tujuan**

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan media cair (*broth*) yang tepat dan ekonomis untuk produksi massa sel isolat BAL dan waktu panen yang optimum massa sel BAL berdasarkan kurva pertumbuhannya sebagai inokulan pada pembuatan ragi kopi luwak bentuk kering.

### **1.4 Manfaat**

Manfaat penelitian ini diharapkan untuk menjadi basis untuk pengembangan teknologi pengolahan kopi luwak yang lebih mudah dan harga yang relatif lebih bersaing tanpa harus mengumpulkan biji kopi dari feses luwak secara manual di lahan kebun kopi.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kopi

Kopi (*Coffea* spp) merupakan jenis tanaman tropis yang dapat tumbuh dimana-mana, kecuali tempat yang terlalu tinggi dengan temperatur sangat dingin atau daerah-daerah tandus yang memang tidak cocok bagi kehidupan tanaman. Ada tiga jenis kopi yang berkembang di negara Indonesia, yaitu kopi jenis Arabika, Robusta dan Liberika. Akan tetapi umumnya petani menanam kopi jenis robusta, sementara kopi jenis arabika hanya ditanam oleh kurang dari 10% petani kopi (Herman, 2003; Anonim, 2007a).

Komponen penting dalam biji kopi adalah kafein dan kafeol. Kandungan kafein pada biji kopi bervariasi menurut jenisnya. Kadar kafein yang terdapat dalam kopi Robusta lebih tinggi dari pada kopi Arabika. Kopi Arabika lebih banyak mengandung zat gula dan minyak atsiri (James, 1990). Kafein tergolong jenis alkaloid yang juga dikenal sebagai trimetilsantin yang merupakan zat perangsang syaraf yang sangat penting dalam bidang farmasi dan kedokteran, sedangkan kafeol merupakan salah satu zat pembentuk cita rasa dan aroma. Kafein terdapat pada biji, daun atau di bagian lain dari tanaman kopi. Komposisi kimia kopi dapat dilihat pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1 Komposisi Kimia Kopi**

Senyawa	(% Basis Kering)
Kafeol	0,7 - 1,1
Kafein	0,6 - 1,5
Asam Kaffeoylkuinat	5,2 - 6,4
Asam Dikaffeolkuinat	0,7 - 1,0
Asam Feuloykunat	0,3 - 0,5
Sukrosa dan gula-gula pereduksi	5,3 - 9,3
Asam Amino bebas total	0,4 - 2,4
Senyawa aktif strecker	0,1 - 0,5
Araban	9 - 13
Mannan	25 - 30
Galaktakan	4 - 6
Polisakarida lain	8 - 10
Trigliserida	10 - 14
Protein	12
Trigonelin	1

Lipida yang lain	2
Abu	4
Total	90 - 114

---

Sumber: Mulato (1995)

## 2.2 Produksi dan Pasar Kopi Indonesia

Produksi dan luas lahan kopi di Indonesia umumnya berfluktuasi. Jika dilihat dari kepemilikan dan pengelolanya, kebun kopi terbesar di Indonesia adalah perkebunan rakyat (PR) dengan luas 1,2 juta hektar atau 95,8% dari total areal tanam. Berikutnya adalah perkebunan swasta (PBS) 26.800 hektar (2,1%) dan perkebunan negara (PBN) 26.400 hektar (2,1%). Sebagian besar areal perkebunan berlokasi di Propinsi Sumatra Selatan (272.540 hektar) dan Lampung (166.060 hektar) (Herman, 2003). Amerika Serikat (AS) merupakan negara tujuan ekspor terbesar bagi Indonesia. Pada tahun 2005, AS mengimpor 84.420 ton kopi dari Indonesia, atau 18,9% dari seluruh total ekspor. Berikutnya adalah Jerman dengan 78.750 ton (17,7%), Jepang 49.930 ton (11,2%), dan Italia 30.500 ton (6,8%) (Anonim, 2007a).

## 2.3 Pengolahan Kopi

Pada prinsipnya pengolahan kopi untuk memisahkan kopi dari dagingnya, kulit tanduk dan kulit ari hingga tinggal biji kopinya. Pengolahan kopi secara garis besar dibagi menjadi dua cara yaitu pengolahan kering dan pengolahan basah. Pada perkebunan besar umumnya kopi diolah dengan cara basah kecuali kopi inferior yang berasal dari pemeeikan lelesan, racutan dan buah-buah muda. Sedangkan perkebunan kopi rakyat umumnya diolah secara kering (Muljana,1982).

Tahap-tahap pengolahan kopi cara basah meliputi: sortasi gelondong, pulping (pengupasan kulit buah), fermentasi, pencucian, pengeringan, hulling (pemecahan kulit tanduk), dan sortasi biji (Kartasapoetra, 1988).

Sortasi glondong dimaksudkan untuk memisahkan kopi merah yang berbiji dan sehat dengan kopi yang hampa dan terserang bubuk. Pulping bertujuan untuk memisahkan biji dari kulit buahnya sehingga diperoleh biji kopi yang masih terbungkus oleh kulit tanduknya. Fermentasi, bertujuan untuk membantu

melepaskan lapisan lendir yang masih menyelimuti kopi yang keluar dari mesin pulper. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan seluruh lapisan lendir dan kotoran-kotoran lainnya yang masih tertinggal setelah difermentasi atau setelah keluar dari mesin pulper (Kartasapoetra, 1988).

Pengeringan, bertujuan untuk menurunkan kadar air tersebut menjadi 8-10%. Hulling bertujuan untuk memisahkan biji kopi yang sudah kering dari kulit tanduk dan kulit arinya. Sortasi biji, dimaksudkan untuk membersihkan kopi beras dari kotoran sehingga memenuhi syarat mutu, dan mengklasifikasikan kopi tersebut menurut standart mutu yang telah ditetapkan (Harahap, 1981).

Sedangkan untuk pengolahan kering prosesnya sama dengan pengolahan basah tanpa melalui proses pulping, fermentasi dan pencucian (Najiyati dan Danarti, 1999).

#### **2.4 Fermentasi Biji Kopi**

Fermentasi bertujuan untuk membantu melepaskan lapisan lendir yang masih menyelimuti kopi yang keluar dari mesin pulper. Proses fermentasi ini dapat terjadi dengan bantuan bakteri asam laktat (BAL). Selama fermentasi terjadi pemecahan komponen lapisan lendir yaitu protopektin dan gula yang menghasilkan asam dan alkohol. Dengan terjadinya proses pemecahan komponen lapisan lendir tersebut maka akan terlepas dari permukaan kulit tanduk biji (ICCRI, 2006).

Prinsip fermentasi pada pengolahan biji kopi adalah peruraian senyawa-senyawa yang terkandung di dalam lapisan lendir oleh mikroba alami dan dibantu dengan oksigen dari udara. Proses fermentasi dapat dilakukan secara basah (merendam biji kopi dalam air) dan secara kering (tanpa air) (Djumarti, 1999). Akhir fermentasi ditandai dengan mengelupasnya lapisan lendir yang menyelimuti kulit tanduk (ICCRI, 2006).

#### **2.5 Kopi Luwak**

Kopi luwak adalah jenis kopi dari buah kopi yang telah dimakan dan melewati saluran pencernaan luwak. Kemasyhuran kopi ini telah terkenal sampai luar negeri. Bahkan di Amerika Serikat, terdapat kafe atau kedai yang menjual kopi luwak (Civet Coffee) dengan harga yang cukup mahal. Binatang luwak senang

sekali mencari buah buahan yang cukup baik termasuk buah kopi sebagai makanannya.

Kopi luwak dihasilkan dalam jumlah yang tidak banyak. Diperkirakan produksi tahunannya hanya sekitar 226,8 kg. Karena kelangkaannya itulah, maka kopi luwak tidak dapat dinikmati di setiap tempat (Anonim, 2007a).

Biji kopi dipisahkan dari daging buah kopi menggunakan pulper dan selanjutnya difermentasi menggunakan isolat BAL kotoran luwak selama 2-3 hari sehingga diperoleh kopi biji dengan flavor yang baik dan body sedang serta berat yang relatif konstan. Pada fermentasi selama satu minggu juga diperoleh kopi biji dengan flavor yang baik, tetapi terjadi penyusutan berat yang cukup signifikan. Oleh karena itu pada kotoran luwak tersebut diduga kuat mengandung mikroba maupun enzim yang sangat berperan dalam proses fermentasi kopi luwak (Anonim, 2007b).

## **2.6 Isolat Mikroba dari kotoran luwak**

Hasil isolasi mikroba dari kotoran luwak diperoleh 25 isolat bakteri dan seluruh isolat bakteri yang diidentifikasi merupakan bakteri gram positif. Pada uji katalase, terdapat 23 isolat menunjukkan katalase negatif dan merupakan bakteri asam laktat (BAL). Pada umumnya mampu tumbuh dengan baik pada suhu 37 oC dan mampu menghasilkan asam dan juga pH media tumbuhnya berkisar 3,37- 4,57. Diperoleh enam isolat BAL yang mampu memproduksi dekstran, sehingga diduga dari genus *Leuconostoc* dan tiga isolat mampu memproduksi amonia sehingga diduga sebagai *Streptococcus faecium*. Namun ada pula genus *Leuconostoc* yang tidak mampu memproduksi dekstran sehingga diduga sebagai *Leuconostoc paramesenteroides*. Dari enam isolat yang diduga *Leuconostoc*, kemudian dilakukan uji ketahanan terhadap konsentrasi garam yang tinggi dan diperoleh empat isolat yang diduga berasal dari *Leuconostoc mesenteroides* (Fauzi, 2008).

Fauzi (2008) mengatakan bahwa terdapat tujuh isolat yang diduga sebagai *L. paramesenteroides* karena kemampuannya dalam memfermentasi hampir semua jenis karbohidrat. Sedangkan pada genus *Lactobacillus* ditemukan lima isolat dari spesies *Lactobacillus plantarum* dan 4 isolat dari spesies *Lactobacillus brevis*. Dari seluruh isolat dikelompokkan lima spesies BAL yang

teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis*, *Leuconostocparamesenteroides* dan *L. Mesenteroides* serta *Streptococcus faecium*. Dari kelima spesies tersebut yang paling dominan berperan dalam proses fermentasi biji kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak adalah *Leuconostoc paramesenteroides*.

## 2.7 Media Glucose Yeast Peptone (GYP) Broth

GYP (Glucose Yeast Peptone) merupakan media pertumbuhan yang berfungsi untuk menumbuhkan, dan mengisolasi jenis *Lactobacillus* dari seluruh jenis bahan. GYP broth mengandung polysorbat, asetat, magnesium, dan mangan yang berfungsi sebagai faktor pertumbuhan bagi *Lactobacillus*. Sebaliknya nutrisi yang diperkaya GYP broth tidak sangat selektif, sehingga ada kemungkinan *Pediococcus* dan jenis *Leuconostoc* serta jenis bakteri lain dapat tumbuh pada GYP broth (Riani, 2005).

Media GYP broth dalam 1 liternya mengandung: glukosa 10 g, yeast ekstrak 10 g, pepton 5 g, beef ekstrak 2 g, Na-asetat.H<sub>2</sub>O 1.4 g, salt solution 5 ml (mengandung: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,1 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g; NaCl 0,1 g; dH<sub>2</sub>O 50 mL), Tween 80 0,5 g, dan dH<sub>2</sub>O 1 L (Riani, 2005).

## 2.8 Kecambah Kedelai

Dalam biji kedelai, protein cadangan akan terhidrolisis menjadi asam amino untuk membentuk jenis protein baru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan protein kotiledon semakin menurun dengan bertambahnya umur kecambah sampai dengan hari ke-12. Pada hari ke-14, kandungan protein kotiledon meningkat. Diduga setelah hari ke-12 kecambah kedelai telah memasuki fase autotrof (memproduksi makanan sendiri melalui fotosintesis) dan tidak lagi memanfaatkan cadangan makanan yang terdapat di kotiledon. Kandungan protein kotiledon pada berbagai perlakuan ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Kandungan Protein Terlarut Kotiledon pada Berbagai Umur Perkecambahan (Sumber: Miswari (2006))

## 2.9 Tetes Tebu (Molases) dan Gula Pasir

### 2.9.1 Tetes Tebu (Molases)

Tetes (molases) merupakan produk sisa (by product) pada proses pembuatan gula. Tetes diperoleh dari hasil pemisahan sirup tingkat rendah dimana gula dalam sirup tersebut tidak dapat dikristalkan lagi. Secara umum tetes yang keluar dari sentrifugal mempunyai brix 85 – 92 dengan zat kering 77 – 84 %. Sukrosa yang terdapat dalam tetes bervariasi antara 25 – 40 %, dan kadar gula reduksiantara 12 – 35%. Untuk tebu yang belum masak biasanya kadar gula reduksi tetes lebih besar daripada tebu yang sudah masak (Risvank, 2009).

Komposisi yang penting dalam tetes adalah TSAI ( Total Sugar as Inverti) yaitu gabungan dari sukrosa dan gula reduksi. Kadar TSAI dalam tetes berkisar antara 50 – 65 %. Angka TSAI ini sangat penting bagi industri fermentasi karena semakin besar TSAI akan semakin menguntungkan, sedangkan bagi pabrik gula kadar sukrosa menunjukkan banyaknya kehilangan gula dalam tetes. Semakin kecil kadar sukrosa maka penekanan kehilangan gula semakin optimum (Risvank, 2009). Secara garis besar komposisi tetes ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Komposisi Kimia Tetes Tebu (Molases)

Konstituen	Komponen	Normal Range (%)
Air		17 - 25
Gula	Sukrosa	30 - 40
	Glukosa	4 - 9
	Fruktosa	5 - 12
	Gula reduksi lain (sebagai invert)	1 - 4
	Gula reduksi total (sebagai invert)	10 - 25
Karbohidrat	Gum, kanji, pentosan	2 - 5
Abu		7 - 15
Komponen nitrogen	Protein (N x 6,25)	2,5 - 4,5
	True Protein	0,5 - 1,5
	Asam amino	0,3 - 0,5

	Takteridentifikasi	1,5 - 3,0
Komponen non- nitrogen		1,5 - 6,0
Asam-asam	Asam sitrat, malat, oksalat, dan akonitat	0,5 - 1,5
Wax, sterols dan phospatide		0,1 - 1,0 0,2
Vitamin-vitamin		bervariasi

Sumber : Cane Sugar Handbook, James J.P dalam Tetes dan Molases (Risvank, 2009)

### 2.9.2 Gula Pasir

Gula pasir (sukrosa) ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) ialah sejenis disakarida yaitu hetero disakarida yang bersifat bukan pereduksi. Pada pertumbuhan mikroba, gula pasir berfungsi sebagai sumber karbon untuk menghasilkan energi selama pertumbuhan mikroba. Komposisi gula pasir ditunjukkan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Komposisi Gula Pasir

Komponen	Jumlah per 100 gram
Energi (kkalori)	385,0
Karbohidrat (g)	99,5
Natrium (g)	1,0
Air dan Komponen lainnya (g)	0,5

Sumber : Rismana (2002)

### 2.10 Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri

Waktu generasi adalah waktu yang diperlukan oleh mikroorganisme untuk meningkatkan jumlah sel menjadi dua kali lipat jumlah semula. Kurva Pertumbuhan mikroorganisme terdiri atas empat fase yaitu fase penyesuaian (lag phase), fase eksponensial atau fase logaritmik, fase stasioner dan fase kematian (death phase). Pada fase eksponensial terjadi peningkatan jumlah sel dan digunakan untuk untuk menentukan waktu generasi (Yudhabuntara, 2003).

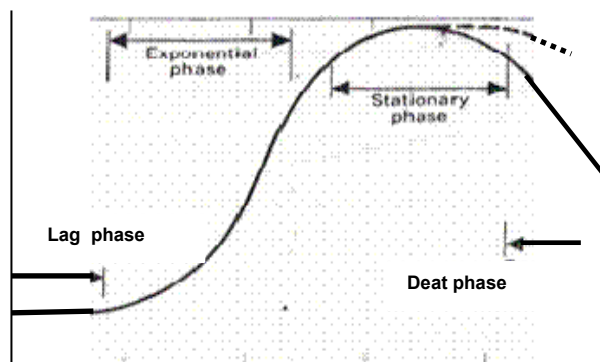
Pertumbuhan pada mikroorganisme diartikan sebagai penambahan jumlah atau total massa sel yang melebihi inokulum asalnya. Sistem reproduksi bakteri adalah dengan cara pembelahan biner melintang, satu sel membelah diri menjadi 2 sel anakan yang identik dan terpisah. Selang waktu yang dibutuhkan bagi sel

untuk membelah diri menjadi dua kali lipat disebut sebagai waktu generasi. Waktu generasi pada setiap bakteri tidak sama, ada yang hanya memerlukan 20 menit bahkan ada yang memerlukan sampai berjam-jam atau berhari-hari (Iqbalali, 2008).

Bila bakteri diinokulasikan ke dalam medium baru, pembiakan tidak segera terjadi tetapi ada periode penyesuaian pada lingkungan yang dikenal dengan pertumbuhan. Kemudian akan memperbanyak diri (replikasi) dengan laju yang konstan, sehingga akan diperoleh kurva pertumbuhan. Pada kurva pertumbuhan (Gambar 2.2) dikenal beberapa fase pertumbuhan, yaitu fase penyesuaian, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian (Anonim, 2008).

Penyesuaian, tidak ada pertumbuhan populasi karena sel mengalami perubahan komposisi kimiawi dan ukuran serta bertambahnya substansi intraseluler sehingga siap untuk membelah diri. Eksponensial Sel membelah diri dengan laju konstan, massa menjadi dua kali lipat, keadaan pertumbuhan seimbang. Stasioner Terjadinya penumpukan racun akibat metabolisme sel dan kandungan nutrient mulai habis, akibatnya terjadi kompetisi nutrisi sehingga beberapa sel mati dan lainnya tetap tumbuh. Jumlah sel menjadi konstan.

Kematian Sel menjadi mati akibat penumpukan racun dan habisnya nutrisi, menyebabkan jumlah sel yang mati lebih banyak sehingga mengalami penurunan jumlah sel secara eksponensial (Anonim, 2008).



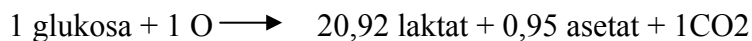
Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan Bakteri Sumber: Anonim (2008)

## 2.11 Metabolisme Gula Pada BAL

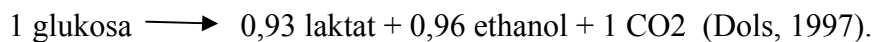
Mekanisme metabolisme gula pada BAL secara umum:

### 1. Gula reduksi (pada GYP broth dan sebagian tetes)

Selama pertumbuhan, BAL pada media glukosa (gula dengan mikroaerasi (oksigen terbatas)) mempunyai konsentrasi glukosa yang tinggi diawal proses fermentasi. Pada proses ini terjadi fermentasi heterolaktat dan dihasilkan beberapa asam yaitu asetat dan laktat sebagai substrat hasil fermentasi. Fermentasi heterolaktat mengikuti persamaan stokiometri:



Empat jam setelah awal fermentasi, media mengalami keterbatasan oksigen. Oleh karena itu, persamaan stokiometrinya menjadi:



Tetapi bila pengamatan dilakukan tiap 6 jam maka jumlah oksigen secara otomatis akan bertambah setiap 6 jam sekali. Dapat disimpulkan bahwa dalam penelitian ini proses fermentasi secara keseluruhan sebagian besar melalui persamaan stokiometri 1 yang menghasilkan substrat asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub>.

### 2. Sukrosa (pada gula dan sebagian tetes)

Pada periodeawal fermentasi, sukrosa diambil oleh sel dan dimetabolisme melalui jalur phosphoketolase yang dapat dijelaskan secara ringkas melalui persamaan stokiometri (Dols, 1997).



Beberapa karakteristik dan metabolisme dari *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. paramesenteroides*, serta *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis* sebagai berikut:

#### 1. *Leuconostoc mesenteroides*

*L. mesenteroides* tergolong BAL hetero fermentatif, gram positif. Karakteristik bentuk sel bulat, bersifat anaerob fakultatif, sel tidak motil. Bakteri ini dikelompokkan katalase negatif, tidak membentuk spora, kemoorganotrof dan suhu optimum untuk pertumbuhannya berkisar 20 oC hingga 30 oC (Kusmiati dan Amarila, 2002). *L. mesenteroides* memiliki aktivitas enzimatis pada berbagai media gula seperti ditunjukkan pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5 Aktivitas Enzimatis *L. mesenteroides*

Enzim	Aktivitas enzim (mmol NADP.g. dari protein-1.h-1)		
	Glukosa	Fruktosa	Sukrosa
Fruktokinase	2,5	19,0	3,5
Glucokinase	38,2	51,50	22,0
Phosphoglucose isomerase	1,2	6,1	0,8
Phosphoglucomutase	7,0	TDT	23,1
Sucrose phosphorylase	0,3	0,0	40,2

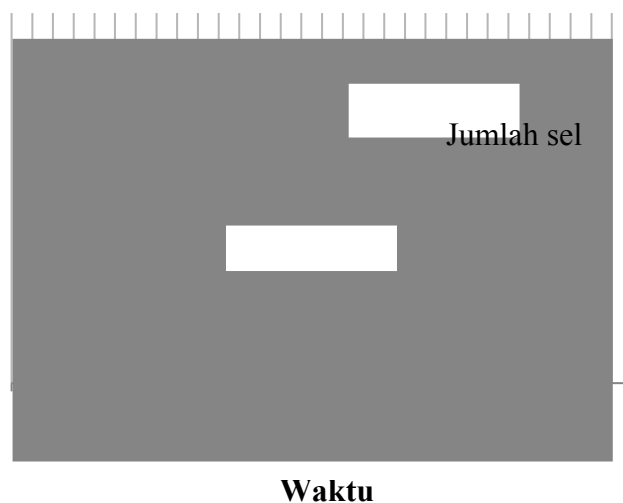
Sumber: Dols (1997)

## 2. *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* merupakan BAL homofermentatif, dapat tumbuh pada suhu 15 oC tetapi tidak pada suhu 45 oC atau 48 oC. Menurut Passos et al. (1994), metabolisme glukosa. Metabolisme dilakukan melalui bantuan enzim phospho glukomutase yang tahapannya sama dengan metabolisme BAL pada umumnya dengan hasil utama asam laktat.

Passos et al. (1994), menyatakan bahwa *L. plantarum* pada media MRS broth suhu 30 oC mencapai puncak pertumbuhan berkisar pada jam ke- 15 hingga jam ke- 20 yang ditunjukkan pada Gambar 2.5.

Menurut Christensen et al. (1958), bahwa selama proses fermentasi *L. plantarum* pada berbagai sumber karbon (glukosa, fruktosa dan sukrosa) terjadi penurunan sumber karbon dan peningkatan asam asetat serta asam laktat yang dihasilkan.



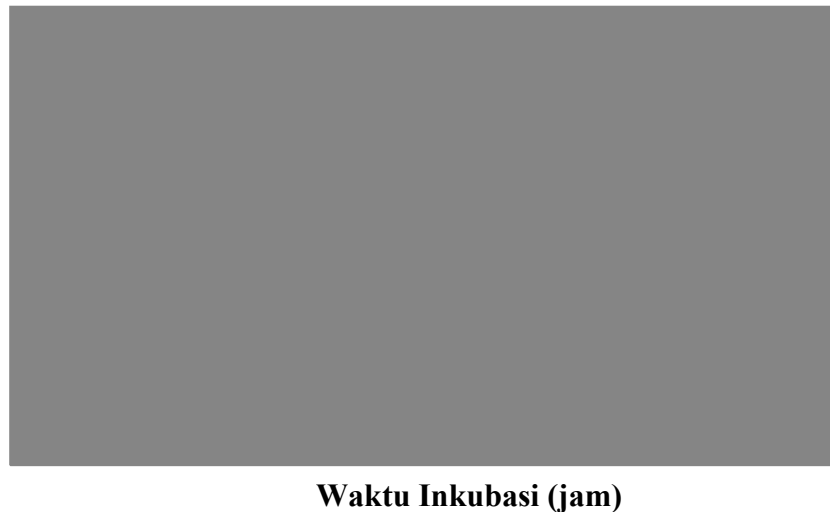
Gambar 2.3 Kurva Pertumbuhan *L. plantarum* pada Media MRS Broth Suhu

### 3. *Lactobacillus brevis*

*L. brevis* merupakan BAL gram positif, berbentuk batang, heterofermentatif, dan katalase negatif. Metabolisme dilakukan melalui bantuan enzim phosphoglukomutase yang tahapannya sama dengan metabolisme BAL pada umumnya.

### 4. *Leuconostoc paramesenteroides*

*L. paramesenteroides* merupakan BAL gram positif, berbentuk kokus, katalase negatif dan memiliki aktivitas bakteriosin. Suhu optimum pertumbuhan 30 oC dan < 45 oC (Lewus dkk, 1991). Kurva pertumbuhan *L. Paramesenteroides* pada media MRS Broth ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.4 Pertumbuhan *L. paramesenteroides* pada Media MRS Broth 37 oC  
Sumber: Shobha dan Agrawal (2006)

## **BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Bahan dan Alat Penelitian**

#### **3.1.1 Bahan Penelitian**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 spesies BAL yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis*, serta *Leuconostoc paramesenteroides* dan *L. mesenteroides*. Medium untuk pertumbuhan dan pengembangbiakan terdiri dari: GYP (*Glucose Yeast Peptone*) Agar dan Broth, tetes tebu (molases), gula pasir, ekstrak kecambah kedelai, *salt solution* (mengandung: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 0,1 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1g; NaCl 0,1 g; dH<sub>2</sub>O 50 ml), reagen Nelson, reagen Arsenomolybdat dan akuades.

#### **3.1.2 Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, *shaker* (pengaduk), *magnetic stirrer SM 24 Stuart Scientific*, *colony counter*, lemari pendingin, neraca analitik, penangas air, *vortex max type 16700*, spektrofotometer *spectronic 21D Milton*, alat-alat gelas, mikropipet, *laminair air flow*, ose, *blue tip*, ependrof, inkubator, bunsen, erlenmeyer, botol film, botol semprot, dan spatula.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember dan laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Penelitian dimulai bulan Mei 2009 sampai September 2009.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Pelaksanaan Penelitian**

Penelitian dilakukan dalam 4 tahap:

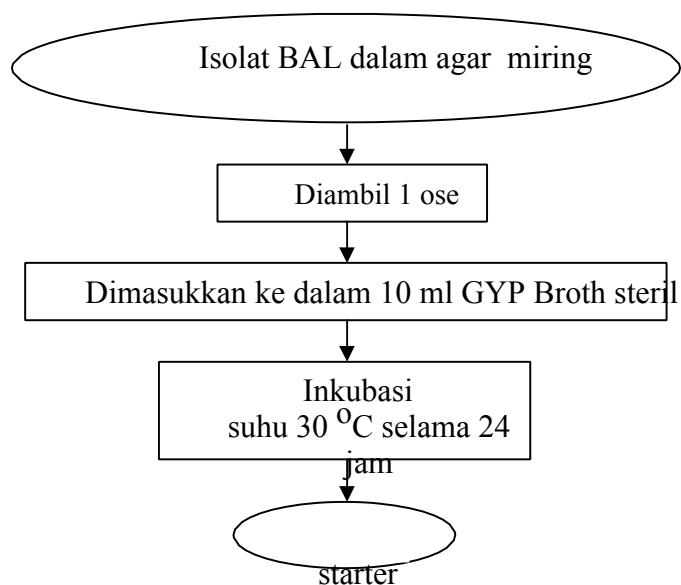
1. Peremajaan Isolat BAL

Peremajaan isolat BAL dilakukan dengan mengambil 1 ose isolat BAL

dari agar miring kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml GYP *broth* steril dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam dengan menggunakan *shaker*. Kemudian, diambil 1 ose dari suspensi mikroba yang telah terbentuk dan digoreskan pada agar miring steril. Agar miring yang telah digores mikroba diinkubasi pada suhu 30 °C selama 2-3 hari hingga tumbuh isolat BAL di permukaan agar miring.

## 2. Pembuatan Starter BAL

Pembuatan starter isolat BAL diawali dengan pengambilan 1 ose isolat BAL dari agar miring kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml GYP Broth steril dalam erlenmeyer 50 ml. Dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 30 °C selama 24 jam digojog pada shaker dengan rpm 90. Suspensi isolat BAL yang terbentuk siap digunakan sebagai starter dalam penelitian selanjutnya (Gambar 3.1).



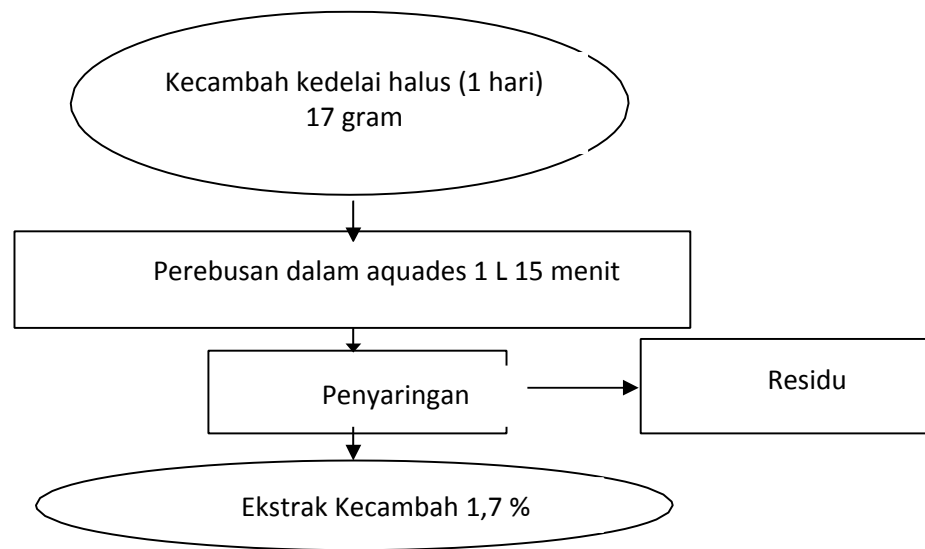
Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan Starter Isolat BAL

## 3. Pembuatan Ekstrak Kecambah Kedelai

Pembuatan ekstrak kecambah kedelai 1,7% (ekivalen 0,4 - 0,8% nitrogen terlarut) diawali dengan menimbang kecambah kedelai yang telah dihaluskan sejumlah 17 gram dan memasukkannya ke dalam 1 liter akuades. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 15 menit agar komponen nitrogen (N) dalam kecambah kedelai dapat larut dalam akuades.



Dilanjutkan dengan penyaringan larutan untuk memisahkan padatan tak larut kecambah kedelai dengan ekstrak kecambah kedelai. Larutan ekstrak kecambah kedelai yang terbentuk digunakan sebagai sumber nitrogen (N) pada pembuatan media tumbuh mikroba (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Kecambah Kedelai

#### 4. Penumbuhan BAL pada Media Cair

Penyiapan media tumbuh mikroba dilakukan dengan membuat media GYP *broth*, tetes tebu konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5% dan gula pasir konsentrasi 0,5%, 1%,1,5%. GYP *broth* dibuat dari: glukosa 10 g, yeast ekstrak 10 g, pepton 5 g, beef ekstrak 2 g, Na-asetat.H<sub>2</sub>O 1.4 g, *salt solution* 5 mL, Tween 80 0,5 g. Media tetes tebu 0,5 % terdiri dari 5 gram tetes, 0,5 ml *salt solution* dan ekstrak kecambah kedelai 1,7%. Media tetes tebu 1 % terdiri dari 10 gram tetes, 0,5 ml *salt solution* dan ekstrak kecambah kedelai 1,7% (ekivalen 0,4 - 0,8% nitrogen terlarut). Media tetes tebu 1,5 % terdiri dari 15 gram tetes, 0,5 ml *salt solution* dan ekstrak kecambah kedelai 1,7%. Media gula pasir 0,5 % terdiri dari 5 gram gula pasir, 0,5 ml *salt solution* dan ekstrak kecambah kedelai 1,7%. Media gula pasir 1% terdiri dari 10 gram gula pasir, 0,5 ml *salt solution* dan ekstrak kecambah kedelai 1,7%. Dan Media gula pasir 1,5 % terdiri dari 15 gram gula pasir, 0,5 ml *salt solution* dan ekstrak kecambah kedelai 1,7%.

Penumbuhan isolat BAL diawali dari starter isolat BAL. Starter isolat BAL yang telah terbentuk dalam GYP *broth* 10 ml dimasukkan ke dalam 90 ml dari tiap-tiap media cair. Jenis media tumbuh yang akan digunakan yaitu: GYP Broth, tetes tebu 0,5 %, tetes tebu 1 %, tetes tebu 1,5 %, gula pasir 0,5%, gula pasir 1% dan gula pasir 1,5%. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 30 °C dan digojog dengan shaker rpm 70. Selama inkubasi dilakukan analisis jumlah mikroba setiap 6 jam dimulai jam ke-0, 6, 12, 18, 24, 30, dan 36. Jumlah mikroba diamati dan dihitung dengan menggunakan menggunakan colony counter pada pengenceran terakhir kemudian dihitung jumlah koloni/ml media.

### 3.3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan deskriptif dengan dua faktor yaitu: faktor A adalah jenis media dan faktor B adalah konsentrasi dan sebagai kontrol digunakan media GYP Broth. Faktor-faktor tersebut meliputi:

A = Jenis media

A1 = Media Tetes; A2= Media gula pasir; B = Konsentrasi

B1 = 0,5% ; B2= 1%; B3= 1,5%

K0 = Kontrol

### 3.4 Parameter Pengamatan

Pengamatan utama dalam penelitian ini adalah kurva pertumbuhan isolat BAL dan sebagai data penunjang adalah jumlah sel mikroorganisme, kadar gula reduksi dan total asam.

### 3.5 Prosedur Analisis

#### 3.5.1. Jumlah Sel Isolat BAL Dalam Media Cair (Broth)

Penumbuhan sejumlah 1 ml suspensi kultur isolat BAL diencerkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquadest steril, digojok hingga homogen dan dibuat pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$ . Penumbuhan bakteri dilakukan dengan inokulasi 10  $\mu$  liter suspensi kultur ke dalam cawan petri yang di dalamnya terisi GYP agar yang telah memadat. Inokulasi dilakukan secara duplo pada tiap pengenceran. Cawan yang telah berisi isolat kemudian diinkubasi secara anaerobik pada suhu 30 °C selama 24 - 48 jam dan dihitung jumlah mikroba yang tumbuh. Jumlah sel

mikroba dihitung dengan rumus:

$$\text{Jumlah Koloni} = \frac{\sum \text{Isolat BAL}}{\text{Faktor Pengenceran}} \times 10^3$$

### 3.5.2. Kadar Gula Reduksi (*Metode Nelson-Somogy*)

#### a. Pembuatan Kurva Standar

Pembuatan kurva standar diawali dengan pembuatan larutan glukosa standar (10 mg glukosa anhidrat/100 ml). Dari larutan glukosa standar tersebut dilakukan enam kalipengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 1 mg/100 ml; 2 mg/100 ml; 4 mg/100 ml; 8 mg/100 ml dan 10 mg/100 ml. Selanjutnya disiapkan tujuh tabung reaksi yang kering dan bersih (3x), 6 tabung diisi dengan 1 ml larutan glukosa standar dan diisi dengan 1 ml air suling sebagai blanko. Tambahkan ke dalam masing-masing tabung 1 ml reagensia nelson dan kemudian panaskan semua tabung dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Ambil semua tabung dan segera dinginkan bersama-sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25 °C. Setelah dingin tambahkan 1 ml reagensia Arsenomolybdat, gojok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O yang ada larut kembali. Setelah semua endapan CU<sub>2</sub>O larut sempurna, tambahkan 7 ml air suling, gojoklah sampai homogen. Teralah *optical density* (OD) masing-masing larutan tersebut pada panjang gelombang 340 nm. Kurva standar dibuat dengan menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan OD.

Persamaan kurva standar gula reduksi yang terbentuk adalah:

$y = a x + b$ , dimana:

b = intercept

y = konsentrasi glukosa (mg/ml)

x = nilai absorbansi pada panjang gelombang 340 nm

#### b. Kadar Gula Reduksi Media Cair (*Broth*)

Ambil 0,5 ml media cair dan diencerkan dengan akuades hingga volume

50 ml dan konsentrasi gula reduksi dalam media terletak antara 2 mg/100 ml –10 mg/100 ml. Ambil 1 ml media yang telah diencerkan dan masukkan dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 1 ml reagensia Nelson. Panaskan tabung dalam penangas air mendidih selama 20 menit. Ambil tabung dan segera dinginkan bersama-sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25 °C. Setelah dingin tambahkan 1 ml reagensia Arsenomolybdat, gojok sampai semua endapan Cu<sub>2</sub>O yang ada larut kembali. Setelah semua endapan Cu<sub>2</sub>O larut sempurna, tambahkan 7 ml air suling, gojoklah sampai homogen. Teralah *optical density* (OD) masing-masing larutan tersebut pada panjang gelombang 340 nm. Masukkan nilai OD ke dalam persamaan kurva standar dan hitung nilai konsentrasi gula reduksinya.

Kadar gula reduksi bahan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar Gula Reduksi} = \frac{\sum \text{Gula Reduksi (gram)}}{\text{Berat Total Bahan (gram)}} \times 100\%$$

### 3.5.3. Total Asam

0,5 ml larutan suspensi mikroba diencerkan dalam erlenmeyer 125 ml dengan aquadest hingga mencapai volume 25 ml. Tambahkan 2-3 tetes indikator fenolftalin 1% kemudian dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,01N sampai titik akhir titrasi tercapai, yaitu terbentuk warna merah muda tetap. Total asam dihitung sebagai persen asam laktat dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Asam Laktat (\%)} = \frac{A}{B} \times C \times 100\%$$

di mana:

A = ml NaOH 0,01; B= normalitas NaOH; C = bobot sampel

### 3.5.4. Kandungan Nitrogen (N) Terlarut Kecambah Kedelai

Kadar nitrogen (N) terlarut kecambah kedelai diuji menggunakan titrasi formol. Sebanyak 20 ml larutan kecambah kedelai dinetralkan dengan basa (NaOH) 3-5 tetes lalu ditambahkan 10 ml formaldehide 36% yang akan membentuk dimethylol. Dengan terbentuknya dimethylol ini berarti gugus aminonya sudah terikat dan tidak akan mempengaruhi reaksi antara asam dengan basa NaOH sehingga akhir titrasi dapat diakhiri dengan tepat. Dan sebagai blanko

digunakan air suling (aquadest) sebanyak 20 ml. Indikator yang digunakan adalah phenolphthalin (PP). Akhir titrasi ditandai terjadinya perubahan warna menjadi merah muda yang tidak hilang dalam 30 detik. Kadar protein dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Nitrogen Terlarut Kecambah Kedelai} = (p - q) \text{ ml} \times 1,7$$

Dimana:

p = banyaknya NaOH (ml) yang terpakai untuk titrasi kecambah kedelai

q = banyaknya NaOH (ml) yang terpakai untuk titrasi blanko

1,7 = faktor formol

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

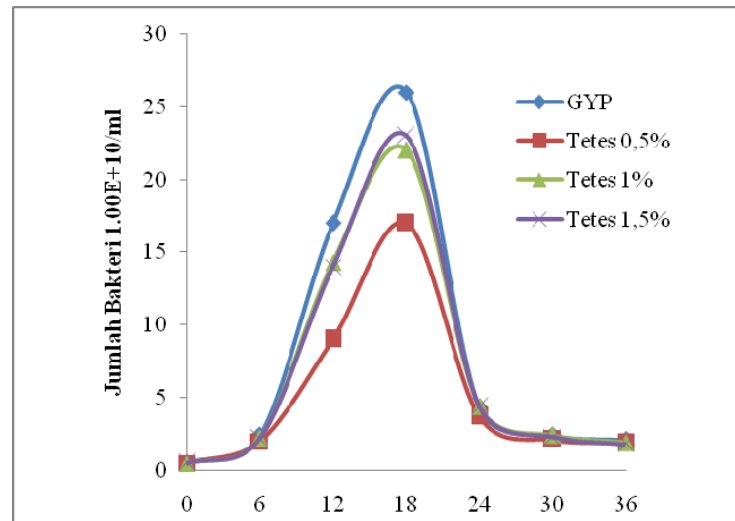
Penelitian ini bertujuan untuk menentukan media pertumbuhan bakteri substitusi GYP *broth* yang tepat bagi pertumbuhan 4 isolat BAL terpilih dari kotoran luwak yang teridentifikasi sebagai *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. Paramesen teroides*, serta *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis*. Media pertumbuhan yang digunakan adalah GYP *broth* sebagai kontrol, tetes (0,5%; 1% dan 1,5%) dan gula pasir (0,5%; 1% dan 1,5%). Sebagai data penunjang hasil penelitian dilakukan analisa gula reduksi dan total asam selama proses fermentasi bakteri pada masing-masing media.

### 4.1 Pertumbuhan *Leconostoc mesenteroides*

#### 4.1.1 Media Tetes

Pertumbuhan *L. mesenteroides* pada media cair yaitu GYP *broth* sebagai kontrol, tetes 0,5%, tetes 1%, dan tetes 1,5% menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 4.1). Pada jam ke-0 (awal inkubasi) jumlah bakteri berkisar antara  $0,48 - 0,51 \times 10^{10}$  CFU/ml. *L. mesenteroides* mencapai puncak pertumbuhan pada jam ke-18 dengan jumlah bakteri pada media GYP *broth*, tetes 0,5%, tetes 1%, dan tetes 1,5% berturut-turut  $26 \times 10^{10}$  CFU/ml,  $17 \times 10^{10}$  CFU/ml,  $22 \times 10^{10}$  CFU/ml, dan  $23 \times 10^{10}$  CFU/ml. Kusmiati dan Amarila (2002), juga menyatakan bahwa *L. mesenteroides* mencapai puncak pertumbuhan pada periode jam ke-18. Fase eksponensial berlangsung pada jam ke- 6 sampai jam ke-18. Sedangkan fase stasioner *L. mesenteroides* cukup singkat sehingga tidak terlihat dalam penelitian ini dengan periode pengamatan 6 jam sekali.

Jumlah pertumbuhan *L. mesenteroides* pada tetes 1% dan 1,5% hampir sama. Hal ini dikarenakan jumlah nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *L. mesenteroides* dalam tetes 1% telah mencukupi sehingga dengan bertambahnya konsentrasi tetes 1,5% tidak banyak berpengaruh pada jumlah bakteri. Sedangkan pada tetes 0,5% nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan isolat belum mencukupi untuk pertumbuhan optimal dan menyebabkan terjadinya penurunan jumlah bakteri jika dibandingkan dengan tetes 1 % dan 1,5 %.



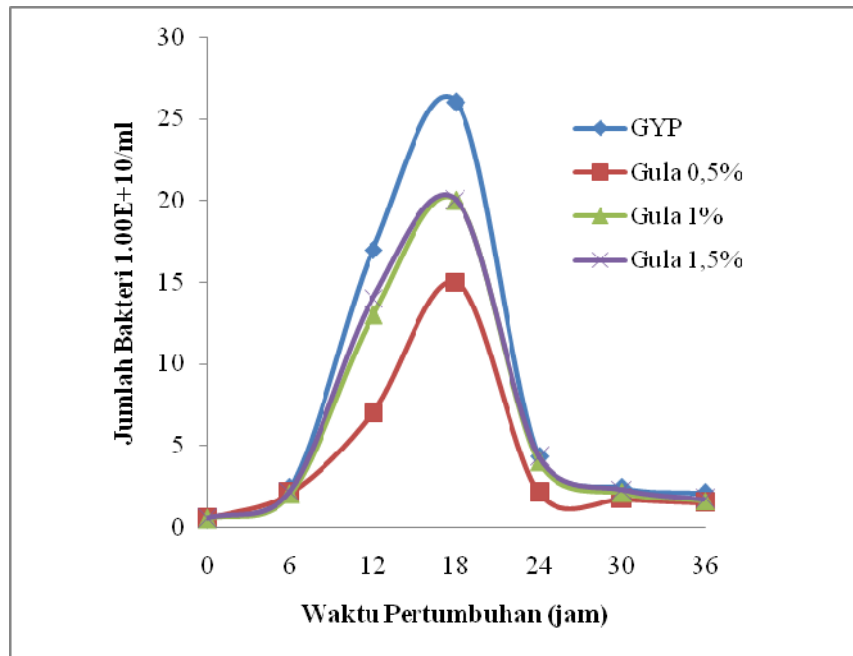
Gambar 4.1 Pertumbuhan *L. mesenteroides* pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi

#### 4.1.2 Media Gula

Pada media gula *L. mesenteroides* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama dengan media tetes, tetapi ada perbedaan dalam jumlah bakteri yang tumbuh. Dengan menggunakan rentang pengamatan 6 jam sekali tidak terlihat adanya fase penyesuaian dan fase stasioner dalam pertumbuhannya. Hal ini dikarenakan *L. mesenteroides* dalam pertumbuhannya mengalami fase penyesuaian dan fase stasioner dengan waktu singkat (kurang dari 6 jam). Fase eksponensial terjadi pada 18 jam pertama pertumbuhan yang kemudian mengalami fase kematian pada 18 jam berikutnya.

Pertumbuhan *L. mesenteroides* pada media cair yaitu GYP broth sebagai kontrol, gula 0,5%, gula 1%, dan gula 1,5%, menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 4.2). Pada jam ke-0 (awal inkubasi) jumlah bakteri berkisar antara  $0,48 - 0,51 \times 10^{10}$  CFU/ml. Puncak pertumbuhan *L. mesenteroides* terjadi pada jam ke-18 dengan jumlah bakteri pada media GYP broth, tetes 0,5%, tetes 1%, dan tetes 1,5% berturut-turut  $26 \times 10^{10}$  CFU/ml,

$15 \times 10^{10}$  CFU/ml,  $20 \times 10^{10}$  CFU/ml, dan  $20 \times 10^{10}$  CFU/ml.



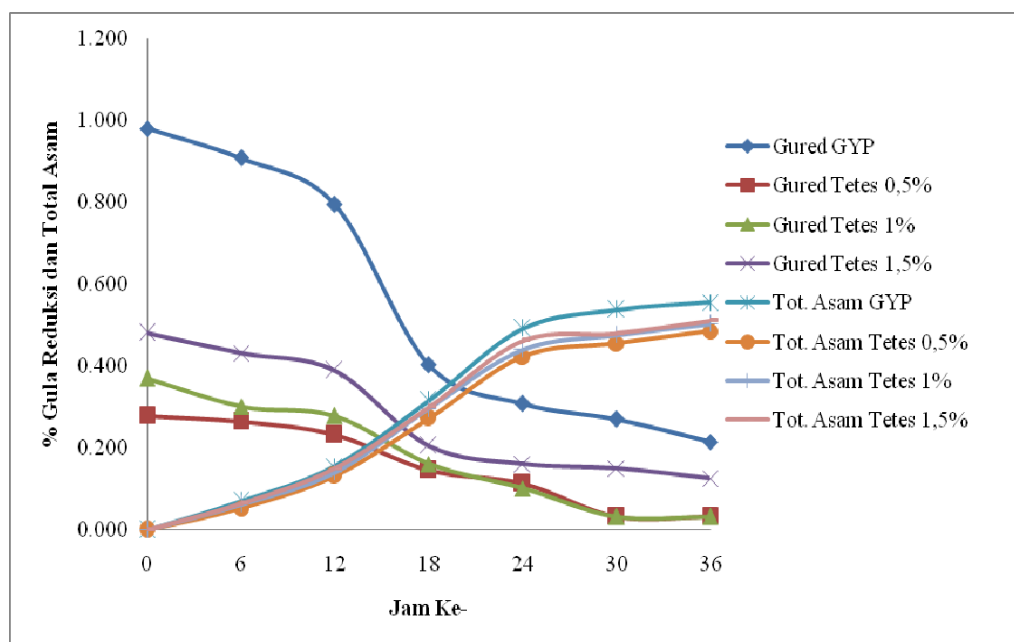
Gambar 4.2 Pertumbuhan *L. mesenteroides* pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi

Pertumbuhan isolat *L. Mesenteroides* pada media tetes lebih tinggi dibandingkan pada media gula. Tetes mengandung TSAI (*Total Sugar as Inverti*) yaitu gabungan dari sukrosa dan gula reduksi berkisar antara 50 – 65 %. Sedangkan dalam gula hanya mengandung sukrosa dan 1% natrium (Risvank, 2009). Pada pertumbuhannya, *L. mesenteroides* akan menggunakan gula yang lebih sederhana (gula reduksi) yang tersedia terlebih dahulu untuk sumber energinya. Jika jumlah gula reduksi yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya tidak mencukupi, maka *L. Mesenteroides* akan memecah gula yang lebih kompleks (misalnya sukrosa) menjadi gula sederhana yang siap dikonsumsi. Oleh karena itu, pada media tetes pertumbuhan *L. mesenteroides* lebih tinggi jika dibandingkan dengan media gula. Jadi media tetes dengan konsentrasi 1,5% dapat menjadi media substitusi GYP broth terbaik untuk perkembangbiakkan isolat *L. mesenteroides* secara massal.

#### 4.1.3 Pola Perubahan Kandungan Gula Reduksi dan Total Asam Pada Media



Aktivitas *glukokinase* dan *fruktokinase* pada metabolisme *L.mesenteroides* dalam media sukrosa menunjukkan bahwa gula (sukrosa) di phosphorilasi dan hidrolisasi oleh *phosphorylase* untuk membentuk glukosa-1-phosphat dan fruktosa didalam sel. Glukosa-1-phosphat kemudian di ubah menjadi glukosa-6-phosphat oleh *phosphoglucumutase* yang kemudian masuk ke dalam jalur *phosphoketolase*. Selama periode pertumbuhan glukosa dikonsumsi dan diubah menjadi asetat dan laktat dan sebagian lagi dikonversi menjadi energi. Sedangkan Fruktosa, asam asetat, asam laktat dan CO<sub>2</sub> sebagai produk dikeluarkan dari dalam sel. Pada saat jumlah sukrosa menjelang habis, fruktosa yang terkumpul dimetabolime menjadi manitol, laktat dan asetat melalui jalur *phosphoketolase* (Dols, 1997).



Gambar 4.3 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi *L. mesenteroides*

Gambar 4.3 menunjukkan besarnya kadar gula reduksi dan total asam (jumlah asam laktat) selama proses pertumbuhan *L. mesenteroides* pada media tetes. Pada GYP *broth* sebagai kontrol, kadar gula reduksi cenderung menurun selama proses fermentasi. Hal ini disebabkan karena GYP *broth* mengandung 1% gula reduksi yang merupakan glukosa dan tidak mengandung sumber

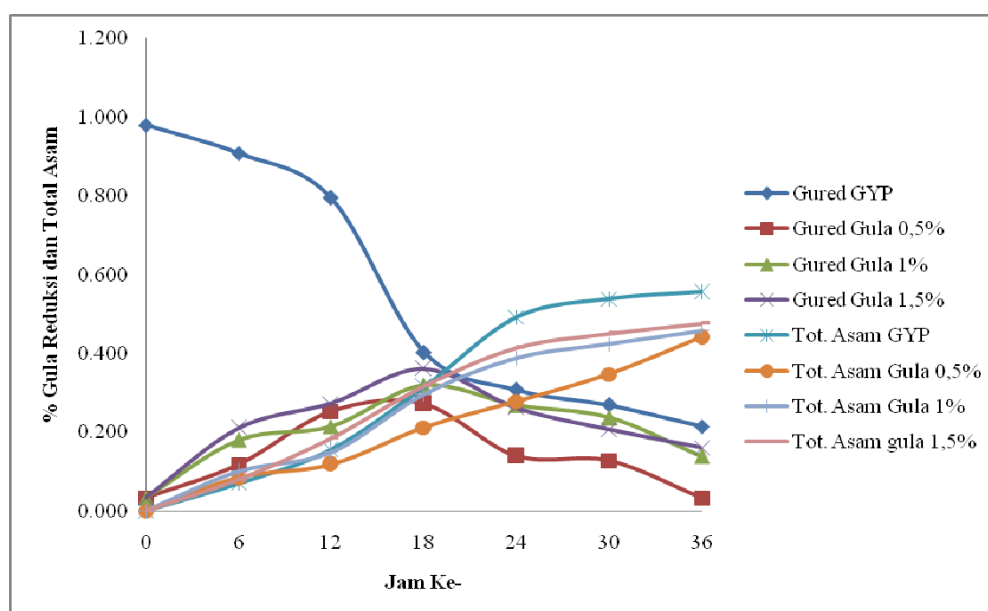
gula lainnya. Metabolisme gula reduksi selama proses fermentasi menghasilkan asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Asam laktat sebagai metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi cenderung meningkat. Kadar gula reduksi diawal proses fermentasi sebesar 0,98% dan diakhir fermentasi sebesar 0,214%, sedangkan total asam laktat pada awal fermentasi sebesar 0,013% dan diakhir fermentasi sebesar 0,556%.

Pada media tetes gula reduksi menunjukkan penurunan selama proses fermentasi. Tetapi penurunan gula reduksi yang terjadi tidak sebesar penurunan pada media *GYP broth*. Hal ini dikarenakan pada tetes mengandung gula reduksi sebesar 25,43% yang terdiri dari glukosa dan fruktosa serta sukrosa 36,32%. Kadar gula reduksi awal fermentasi merupakan jumlah gula reduksi tetes dan selama proses fermentasi, gula reduksi yang digunakan untuk pertumbuhan disuplai dari gula reduksi tetes dan pemecahan sukrosa melalui proses fosforilasi dan hidrolisis oleh *phosphorylase* untuk membentuk glukosa-1-phosphat dan fruktosa didalam sel. Glukosa-1-phosphat kemudian di ubah menjadi glukosa-6-phosphat oleh *phospho gluco mutase* yang kemudian masuk ke dalam jalur *phosphoketolase* (Dols, 1997). Selama periode pertumbuhan glukosa dikonsumsi dan diubah menjadi asam asetat dan asam laktat dan sebagian lagi dikonversi menjadi energi. Hal inilah yang menyebabkan walaupun jumlah pertumbuhan bakteri cukup banyak pada media tetes, tetapi penurunan jumlah gula reduksi tidak besar selama proses fermentasi.

Jumlah kadar gula reduksi awal fermentasi dari ketiga konsentrasi tetes 0,5%; 1% dan 1,5% berturut-turut 0,279%, 0,370%, dan 0,482%. Sedangkan di akhir fermentasi jumlahnya berturut-turut adalah 0,033%, 0,033% dan 0,126%. Jumlah asam laktat yang terbentuk menunjukkan kecenderungan meningkat dari awal hingga akhir selama proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media tetes 0,5%, 1% dan 1,5% berturut-turut 0,013%; 0,013%; dan 0,0176% dan diakhir proses fermentasi sebesar 0,485%; 0,503% dan 0,512%.

Pada media gula (Gambar 4.4), gula reduksi menunjukkan tren kenaikan pada 18 jam awal fermentasi. Hal ini dikarenakan terjadinya

pemecahan sukrosa menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui proses phosphorylasi dan hidrolisis oleh *phosphorylase* untuk membentuk glukosa-1-phosphat dan fruktosa didalam sel. Glukosa-1-phosphat kemudian diubah menjadi glukosa-6-phosphat oleh *phospho glucomutase* yang kemudian masuk ke dalam jalur *phosphoketolase* (Dols, 1997). Dari reaksi enzimatik ini dihasilkan fruktosa, asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub> yang dikeluarkan dari dalam sel. Setelah 18 jam fermentasi, terjadi penurunan jumlah gula reduksi dalam bahan karena ketersediaan sukrosa dalam media mulai habis sehingga untuk suplai energi selama pertumbuhan digunakan fruktosa yang telah tersedia dalam media.



Gambar 4.4 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi *L. mesenteroides*

Jumlah gula reduksi di awal fermentasi pada media gula 0,5%, gula 1% dan gula 1,5% sebesar 0,033%, sedangkan di akhir fermentasi sebesar 0,033%; 0,139% dan 0,161%. Jumlah asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi cenderung meningkat. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media gula 0,5%, 1% dan 1,5% berturut-turut 0,004%; 0,009% dan 0,013% dan di akhir proses fermentasi sebesar 0,445%; 0,463% dan 0,476%.

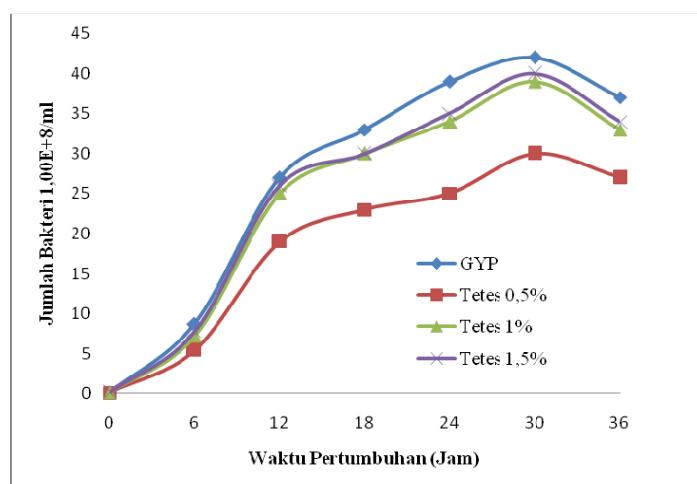
Christensen *et al.* (1958), juga menyatakan selama fermentasi *L. Mesenteroides* terjadi peningkatan jumlah asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan diikuti penurunan sumber karbon. Semakin tinggi jumlah sumber karbon dalam

media maka jumlah asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan akan semakin tinggi. Pada konsentrasi glukosa 40 mg/100 mg sumber karbon akan dihasilkan asam asetat sebesar 13 mg/100 mg sumber karbon dan asam laktat sebesar 28 mg/100 mg sumber karbon. Sedangkan pada konsentrasi glukosa yang lebih tinggi 320 mg/100 mg sumber karbon akan dihasilkan asam asetat sebesar 23 mg/100 mg sumber karbon dan asam laktat sebesar 131 mg/100 mg sumber karbon.

## 4.2 Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

### 4.2.1 Media Tetes

Pertumbuhan *L. plantarum* pada media cair yaitu GYP broth sebagai kontrol, tetes 0,5%, tetes 1%, dan tetes 1,5%, menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 4.5). Pada jam ke-0 (awal inkubasi) jumlah bakteri berkisar antara  $0,12 - 0,15 \times 10^8$  CFU/ml. *L. plantarum* mencapai puncak pertumbuhan pada jam ke-30 dengan jumlah bakteri pada media GYP broth, tetes 0,5%, tetes 1%, dan tetes 1,5% berturut-turut  $42 \times 10^8$  CFU/ml,  $30 \times 10^8$  CFU/ml,  $39 \times 10^8$  CFU/ml, dan  $40 \times 10^8$  CFU/ml. Sedangkan menurut Passos *et al.* (1994), pertumbuhan *L. plantarum* pada media MRS broth suhu  $30^\circ\text{C}$  mencapai puncak pertumbuhan berkisar pada jam ke 15-20. Fase eksponensial berlangsung pada jam ke 6-30. Sedangkan fase stasioner *L. plantarum* cukup pendek sehingga tidak terlihat secara jelas dalam penelitian, tetapi dapat diperkirakan dari grafik fase stasioner terjadi pada rentang waktu jam ke 30 dan jam ke 36.



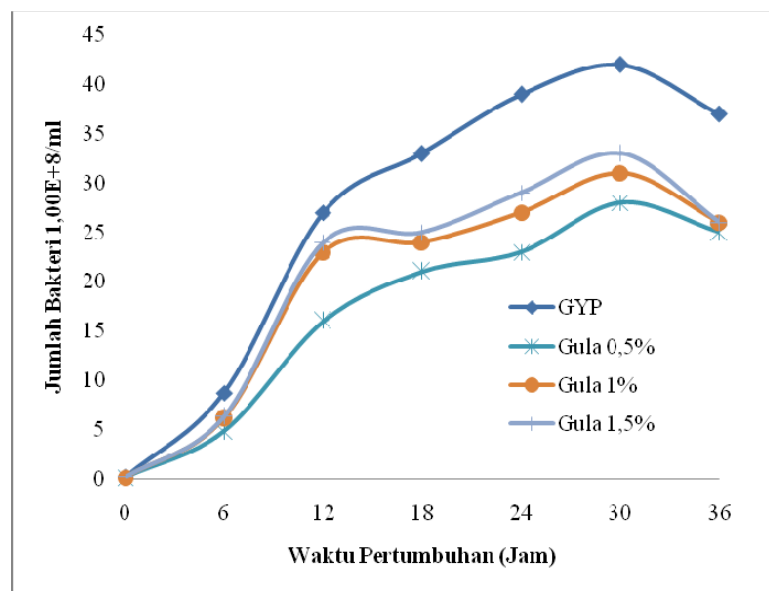
Gambar 4.5 Pertumbuhan *L. plantarum* pada Media GYP broth dan tetes

dengan berbagai Konsentrasi

Pertumbuhan *L. plantarum* pada konsentrasi tetes 1% hampir sama dengan tetes 1,5%. Hal ini dikarenakan jumlah nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *L. plantarum* dalam tetes 1% telah mencukupi sehingga dengan bertambahnya konsentrasi tetes 1,5% tidak banyak berpengaruh pada jumlah bakteri. Sedangkan pada tetes 0,5% nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan isolat belum mencukupi untuk pertumbuhan optimal sehingga terjadi penurunan pada jumlah bakteri jika dibandingkan dengan tetes 1% dan 1,5%.

#### 4.2.2 Media Gula

Pada media gula *L. plantarum* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama dengan media tetes, tetapi ada perbedaan dalam jumlah bakteri yang tumbuh (Gambar 4.6). Pada jam ke-0 (awal inkubasi) jumlah selnya berkisar antara  $0,12 - 0,13 \times 10^8$  CFU/ml. *L. plantarum* mengalami puncak pertumbuhan pada jam ke-30 dengan jumlah bakteri pada media GYP broth, gula 0,5%, gula 1%, dan gula 1,5% berturut-turut  $42 \times 10^8$  CFU/ml,  $28 \times 10^8$  CFU/ml,  $31 \times 10^8$  CFU/ml, dan  $33 \times 10^8$  CFU/ml.

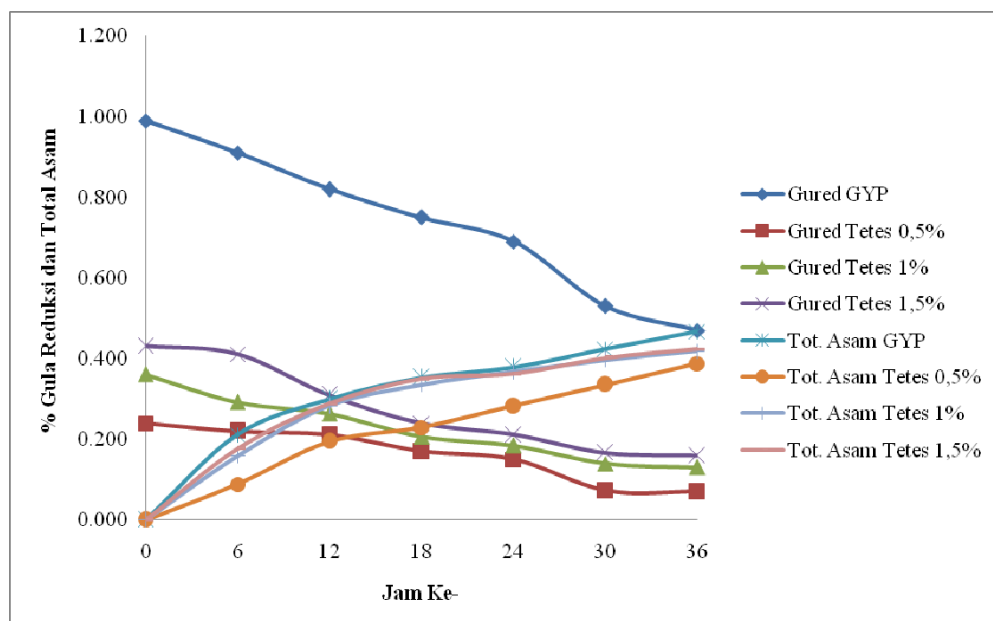


Gambar 4.6 Pertumbuhan *L. plantarum* pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi

Pertumbuhan isolat *L. plantarum* pada media tetes lebih tinggi dibandingkan pada media gula. Jadi dapat diketahui bahwa media tetes dengan konsentrasi 1,5% dapat menjadi media substitusi GYP *broth* terbaik untuk perkembangbiakkan isolat *L. plantarum* secara massal.

#### 4.2.3 Pola Perubahan Kandungan Gula Reduksi dan Total Asam pada Media

Gambar 4.7 menunjukkan besarnya kadar gula reduksi dan total asam (jumlah asam laktat) selama proses pertumbuhan. Pada GYP *broth* kadar gula reduksi cenderung menurun selama proses fermentasi. Hal ini disebabkan karena GYP *broth* mengandung 1% gula reduksi yang bersumber dari glukosa dan tidak mengandung sumber gula lainnya. Metabolisme gula reduksi selama proses fermentasi menghasilkan asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Asam laktat sebagai metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi cenderung meningkat. Kadar gula reduksi diawal proses fermentasi sebesar 0,98% dan diakhir fermentasi sebesar 0,470%, sedangkan total asam laktat pada awal fermentasi sebesar 0,022% dan diakhir fermentasi sebesar 0,459%.



Gambar 4.7 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi *L. plantarum*

Pada media tetes gula reduksi menunjukkan penurunan selama proses fermentasi. Tetapi penurunan gula reduksi yang terjadi tidak sebesar penurunan pada media GYP *broth*. Hal ini dikarenakan pada tetes mengandung TSAI ( *Total Sugar as Inverti*) yaitu gabungan dari sukrosa dan gula reduksi berkisar antara 50 – 65 % (Risvank, 2009). Kadar gula reduksi awal fermentasi merupakan jumlah gula reduksi tetes dan selama proses fermentasi, gula reduksi yang digunakan untuk pertumbuhan disuplai dari gula reduksi tetes dan pemecahan sukrosa melalui proses phosphorylasi dan hidrolisis oleh *phosphorylase* untuk membentuk glukosa-1-phosphat dan fruktosa didalam sel. Glukosa-1-phosphat kemudian di ubah menjadi glukosa-6-phosphat oleh *phosphoglucomutase* yang kemudian masuk ke dalam jalur *phosphoketolase* (Dols, 1997).

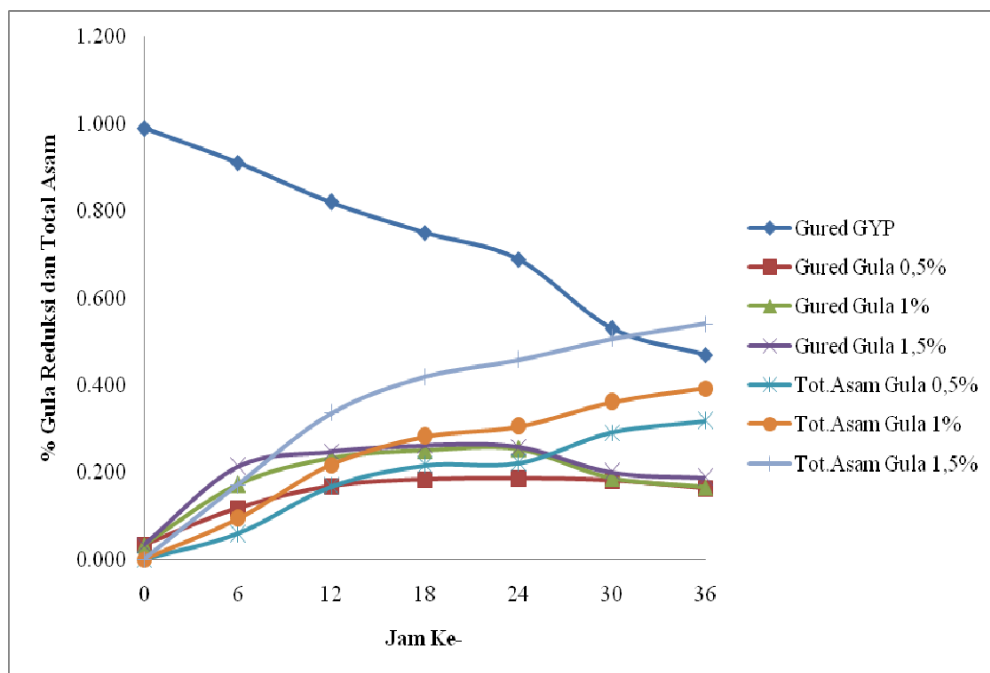
Jumlah kadar gula reduksi awal fermentasi dari ketiga konsentrasi tetes 0,5%; 1% dan 1,5% berturut-turut 0,239%; 0,361%, dan 0,430%. Sedangkan di akhir fermentasi jumlahnya berturut-turut adalah 0,070%, 0,130% dan 0,159%. Jumlah asam laktat yang terbentuk meningkat selama proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media tetes 0,5%; 1% dan 1,5% berturut-turut 0,013%; 0,013% dan 0,009% dan diakhir proses fermentasi sebesar 0,384%; 0,415% dan 0,423%.

Christensen *et al.* (1958), juga menyatakan selama fermentasi *L. plantarum* terjadi peningkatan jumlah asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan dan penurunan sumber karbon. Semakin tinggi jumlah sumber karbon dalam media maka jumlah asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan akan semakin tinggi. Pada konsentarsi glukosa 20 mg/100 mg sumber karbon akan dihasilkan asam asetat sebesar 15 mg/100 mg sumber karbon dan asam laktat 20 mg/100 mg sumber karbon. Sedangkan pada konsentarsi glukosa 240 mg/100 mg sumber karbon akan dihasilkan asam asetat sebesar 19 mg/100 mg sumber karbon dan asam laktat sebesar 163 mg/100 mg sumber karbon.

Pada media gula (Gambar 4.8) jumlah gula reduksi menunjukkan kenaikan pada 24 jam awal fermentasi. Hal ini dikarenakan terjadinya pemecahan sukrosa menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui proses phosphorylasi dan hidrolisis oleh *phosphorylase* untuk membentuk glukosa-1-phosphat dan fruktosa didalam sel. Glukosa-1-phosphat kemudian diubah menjadi glukosa-6-

phosphat oleh *phospho glucomutase* yang kemudian masuk ke dalam jalur *phosphoketolase*. Dari reaksi enzimatik ini dihasilkan fruktosa, asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub> yang dikeluarkan dari dalam sel (Dols, 1997). Setelah 24 jam fermentasi, terjadi penurunan jumlah gula reduksi dalam bahan karena ketersediaan sukrosa dalam media mulai habis sehingga untuk suplai energi selama pertumbuhan digunakan fruktosa yang telah tersedia dalam media.

Jumlah gula reduksi di awal fermentasi pada media gula 0,5%; 1% dan 1,5% sebesar 0,033%, sedangkan di akhir fermentasi sebesar 0,163%; 0,166%, dan 0,168%. Jumlah asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi mengalami tren kenaikan sepanjang proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media gula 0,5%, 1% dan 1,5% adalah 0,013% dan diakhir proses fermentasi berturut-turut sebesar 0,318%, 0,392% dan 0,406%.



Gambar 4.8 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi *L. plantarum*

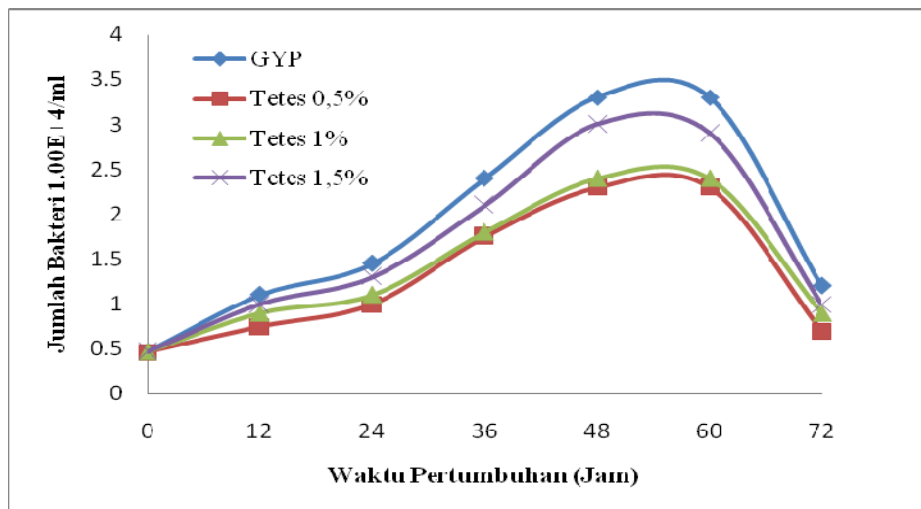
### 4.3 Pertumbuhan *Lactobacillus brevis*

#### 4.3.1 Media Tetes

Pertumbuhan *L. brevis* pada media cair yaitu *GYP broth* sebagai kontrol, tetes 0,5%; 1%, dan 1,5%, menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 4.9). Pada jam ke-0 (awal inkubasi) jumlah bakteri berkisar



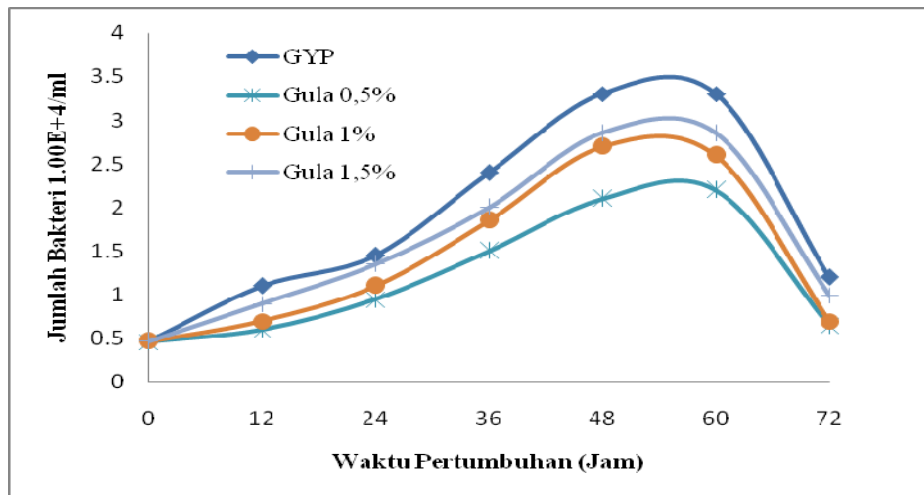
antara  $0,46 - 0,47 \times 10^4$  CFU/ml. *L. brevis* mencapai puncak pertumbuhan pada jam ke- 48 dengan jumlah bakteri pada media GYP broth, tetes 0,5%; 1%, dan 1,5% berturut-turut  $3,3 \times 10^4$  CFU/ml,  $2,3 \times 10^4$  CFU/ml,  $2,4 \times 10^4$  CFU/ml, dan  $3,0 \times 10^4$  CFU/ml. Fase eksponensial berlangsung pada jam ke- 12 sampai jam ke- 48. Sedangkan fase stasioner *L. brevis* terjadi pada rentang waktu jam ke- 48 sampai jam ke- 60.



Gambar 4.9 Pertumbuhan *L. brevis* pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi

#### 4.3.2 Media Gula

Pada media gula *L. brevis* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama dengan media tetes, tetapi ada perbedaan dalam jumlah bakteri yang tumbuh (Gambar 4.10). Pada jam ke- 0 (awal inkubasi) jumlah bakteri berkisar antara  $0,46 - 0,47 \times 10^4$  CFU/ml. *L. brevis* mengalami puncak pertumbuhan pada jam ke- 48 dengan jumlah bakteri pada media GYP broth, gula 0,5%; 1%, dan 1,5% berturut-turut  $3,3 \times 10^4$  CFU/ml,  $2,1 \times 10^4$  CFU/ml,  $2,7 \times 10^4$  CFU/ml, dan  $2,85 \times 10^4$  CFU/ml.

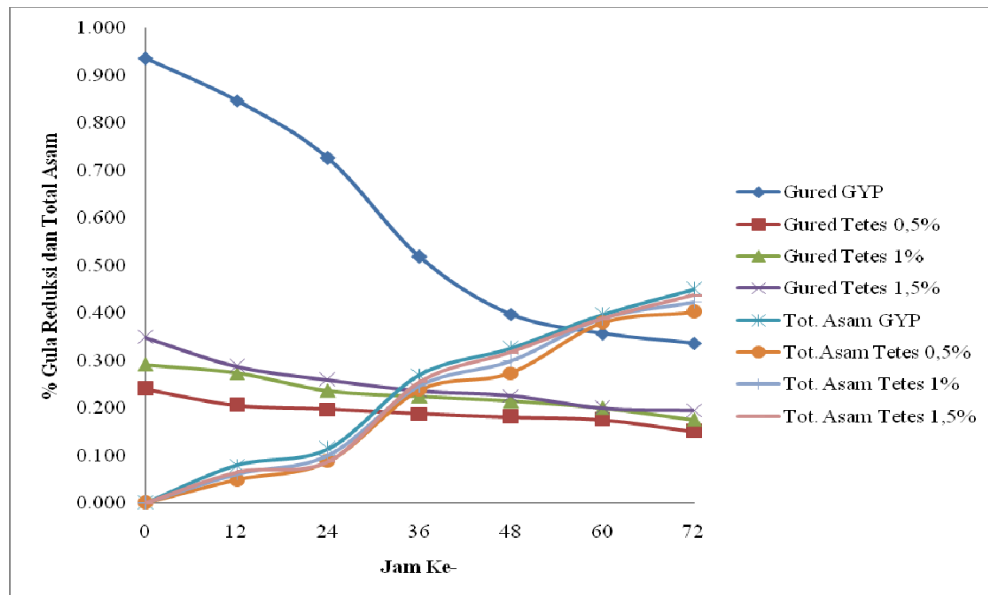


Gambar 4.10 Pertumbuhan *L. brevis* pada Media GYP Broth dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi

Pertumbuhan isolat *L. brevis* pada media tetes lebih tinggi dibandingkan pada media gula. Jadi dapat diketahui bahwa media tetes dengan konsentrasi 1,5% dapat menjadi media substitusi GYP broth terbaik untuk perkebangbiakkan isolat *L. brevis* secara massal.

#### 4.3.3 Pola Perubahan Kandungan Gula Reduksi dan Total Asam pada Media

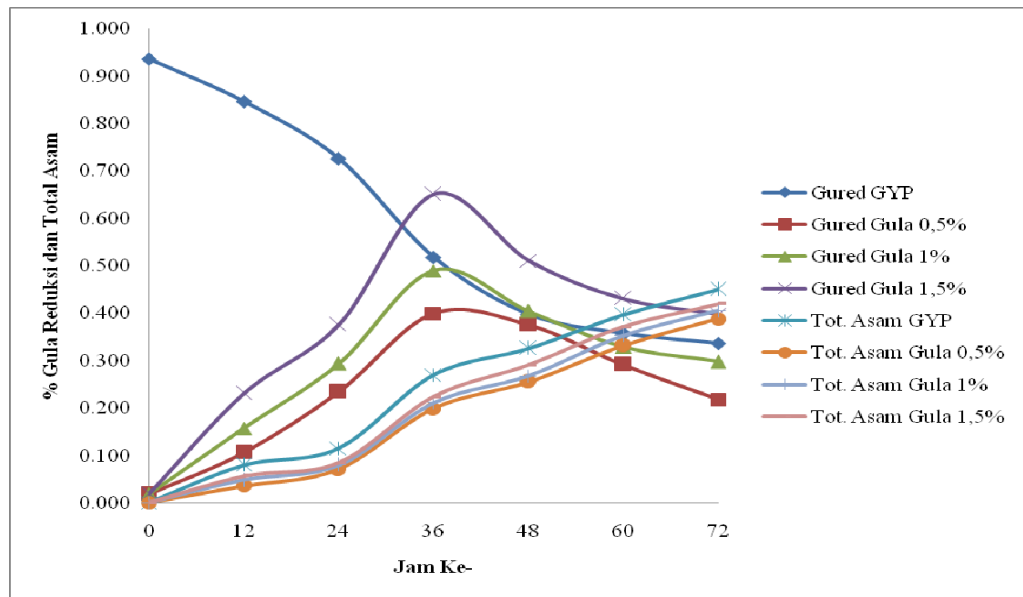
Gambar 4.11 menunjukkan besarnya kadar gula reduksi dan total asam (jumlah asam laktat) selama proses pertumbuhan. Pada GYP broth, kadar gula reduksi cenderung menurun selama proses fermentasi. Hal ini disebabkan karena GYP broth mengandung 1% gula reduksi yang bersumber dari glukosa dan tidak mengandung sumber gula lainnya. Metabolisme gula reduksi selama proses fermentasi menghasilkan asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Asam laktat sebagai metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi cenderung meningkat. Kadar gula reduksi diawal proses fermentasi sebesar 0,937% dan diakhir fermentasi sebesar 0,337%, Sedangkan total asam laktat pada awal fermentasi sebesar 0,014% dan diakhir fermentasi sebesar 0,459%.



Gambar 4.11 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi *L. Brevis*.

Pada media tetes (Gambar 4.11) jumlah gula reduksi menunjukkan penurunan selama proses fermentasi. Tetapi penurunan gula reduksi yang terjadi tidak sebesar penurunan pada media GYP *broth*. Selama periode pertumbuhan glukosa dikonsumsi dan diubah menjadi asam asetat dan asam laktat dan sebagian lagi dikonversi menjadi energi. Hal inilah yang menyebabkan walaupun jumlah pertumbuhan bakteri cukup banyak pada media ini, tetapi penurunan jumlah gula reduksi tidak begitu besar selama proses fermentasi.

Jumlah kadar gula reduksi awal fermentasi dari ketiga konsentrasi tetes 0,5%; 1% dan 1,5% berturut-turut 0,241%, 0,292%, dan 0,349%. Sedangkan di akhir fermentasi jumlahnya berturut-turut adalah 0,151%; 0,176% dan 0,196%. Jumlah asam laktat yang terbentuk menunjukkan peningkatan selama proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media tetes 0,5%, 1% dan 1,5% berturut-turut 0,013%; 0,013% dan 0,009% dan diakhir proses fermentasi sebesar 0,384%; 0,415% dan 0,437%.



Gambar 4.12 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi *L. brevis*

Pada media gula (Gambar 4.12), jumlah gula reduksi cenderung meningkat pada 24 jam awal fermentasi. Hal ini dikarenakan terjadinya pemecahan sukrosa menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui proses fosforilasi dan hidrolisis oleh *phosphorylase* untuk membentuk glukosa-1-phosphat dan fruktosa didalam sel. Glukosa-1-phosphat kemudian diubah menjadi glukosa-6-phosphat oleh *phospho glucomutase* yang kemudian masuk ke dalam jalur *phosphoketolase*. Dari reaksi enzimatik ini dihasilkan fruktosa, asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub> yang dikeluarkan dari dalam sel (Dols, 1997). Setelah 24 jam fermentasi, terjadi penurunan jumlah gula reduksi dalam bahan. Hal ini dikarenakan ketersediaan sukrosa dalam media mulai habis sehingga untuk suplai energi selama pertumbuhan digunakan fruktosa yang telah tersedia dalam media. Jumlah gula reduksi di awal fermentasi pada media gula 0,5%, gula 1% dan gula 1,5% sebesar 0,033%, sedangkan di akhir fermentasi sebesar 0,163%; 0,166% dan 0,168%.

Jumlah asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi mengalami kenaikan selama proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media gula 0,5%, 1% dan 1,5% adalah 0,013% dan diakhir proses fermentasi berturut-turut sebesar 0,318%; 0,392% dan 0,406%.

Christensen *et al.* (1958), juga menyatakan selama fermentasi *L.*

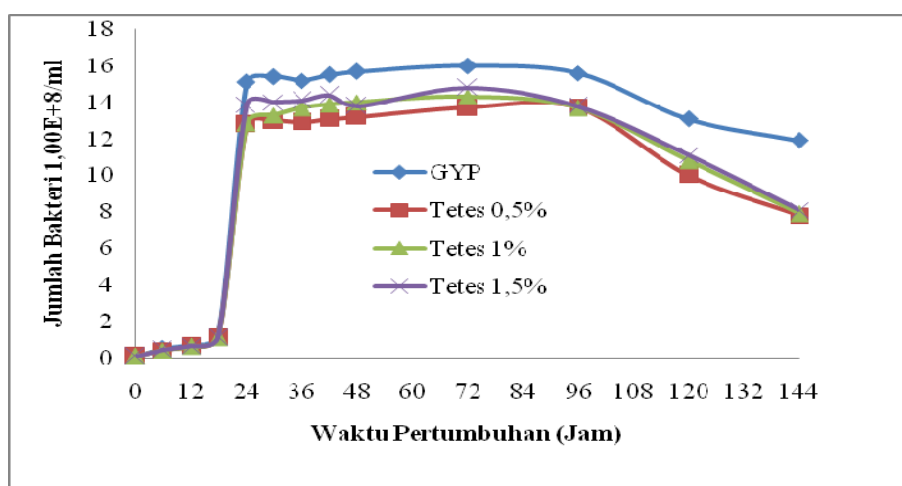
*brevis* terjadi peningkatan jumlah asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan dan penurunan sumber karbon. Semakin tinggi jumlah sumber karbon dalam media maka jumlah asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan akan semakin tinggi. Pada konsentrasi glukosa 20 mg/100 mg sumber karbon akan dihasilkan asam asetat sebesar 20 mg/100 mg sumber karbon dan asam

laktat sebesar 9 mg/100 mg sumber karbon. Sedangkan pada konsentrasi glukosa yang lebih tinggi 400 mg/100 karbon akan dihasilkan asam asetat 49 mg/100 mg sumber karbon dan asam laktat sebesar 186 mg/100 karbon.

#### 4.4 Pertumbuhan *Leuconostoc paramesenteroides*

##### 4.4.1 Media Tetes

Pertumbuhan *L. paramesenteroides* pada media cair yaitu GYP broth sebagai kontrol, tetes 0,5%, tetes 1%, dan tetes 1,5%, menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 4.13). Pada jam ke- 0 (awal inkubasi) jumlah bakteri  $0,08 \times 10^8$  CFU/ml. Pada *Leuconostoc paramesenteroides* memiliki fase penyesuaian dalam pertumbuhannya pada kurun waktu 0 - 24 jam. Sedangkan pada jam ke- 24 hingga jam ke- 36 terjadi fase eksponensial dimana jumlah bakteri mengalami peningkatan yang signifikan. Pada jam ke- 36 hingga jam ke- 72 terjadi fase stasioner dimana jumlah bakteri secara umum stagnan (panambahan jumlah bakteri kecil) dan setelah jam ke- 72 terjadi fase kematian.

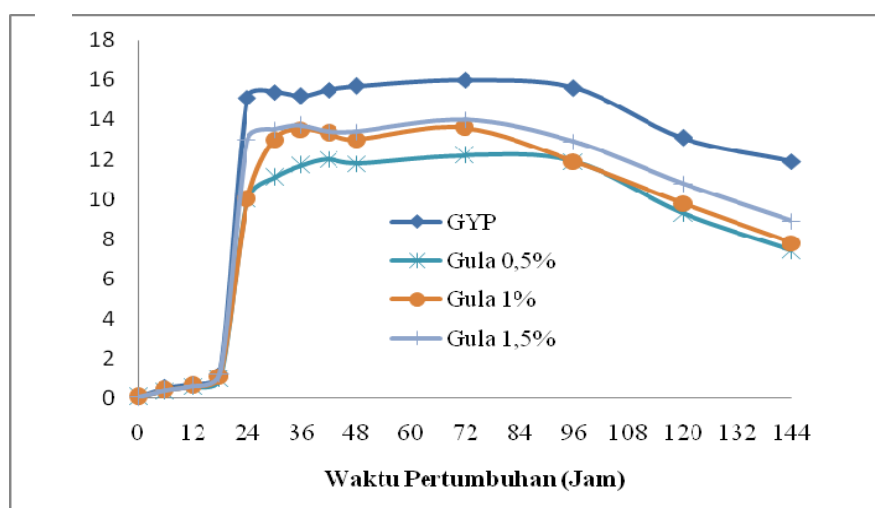


Gambar 4.13 Pertumbuhan *L. paramesenteroides* pada Media GYP Broth dan Tetes dengan Berbagai Konsentrasi

Dari Gambar 4.13 diketahui bahwa *L. paramesenteroides* mencapai puncak pertumbuhan pada jam ke-72 dengan jumlah bakteri pada media GYP *broth*, tetes 0,5%; 1%, dan 1,5% berturut-turut  $16 \times 10^8$  CFU/ml,  $13,7 \times 10^8$  CFU/ml,  $14,3 \times 10^8$  CFU/ml, dan  $14,8 \times 10^8$  CFU/ml. Shobha dan Agrawal (2006), juga menyatakan bahwa pertumbuhan *L. paramesenteroides* pada media MRS *broth* suhu  $30^\circ\text{C}$  mencapai puncak pertumbuhan pada hari ke- 4 (jam ke- 72).

### 4.3.2 Media Gula

Pada media gula (Gambar 4.14) *L. paramesenteroides* menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama dengan media tetes, tetapi ada perbedaan dalam jumlah bakteri yang tumbuh . Pada jam ke- 0 (awal inkubasi) jumlah bakteri sebesar  $0,08 \times 10^8$  CFU/ml. Mengalami mengalami puncak pertumbuhan pada jam ke- 72 dengan jumlah bakteri pada GYP *broth*, gula 0,5%, gula 1%, dan gula 1,5% berturut- turut  $16 \times 10^8$  CFU/ml,  $12,2 \times 10^8$  CFU/ml,  $13,6 \times 10^8$  CFU/ml, dan  $14 \times 10^8$  CFU/ml. Pertumbuhan isolat *L. paramesenteroides* pada media tetes lebih tinggi dibandingkan pada media gula. Jadi dapat diketahui bahwa media tetes dengan konsentrasi 1,5% dapat menjadi media substitusi GYP *broth* terbaik untuk perkembangbiakkan isolat *L. paramesenteroides* secara massal.

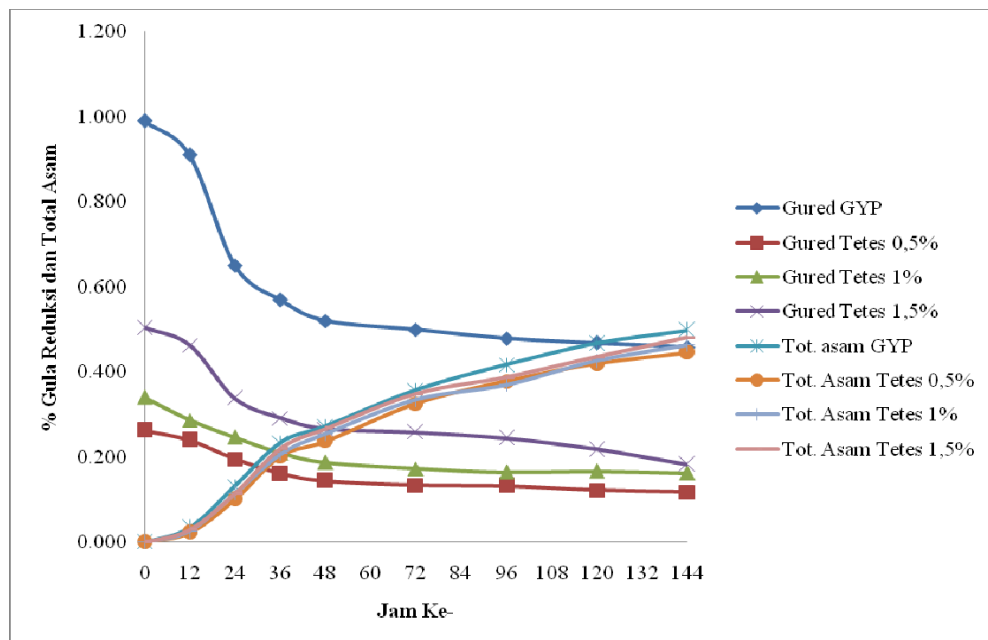


Gambar 4.14 Pertumbuhan *L. paramesenteroides* pada Media GYP *Broth* dan Gula dengan Berbagai Konsentrasi

#### 4.4.3 Pola Perubahan Kandungan Gula Reduksi dan Total Asam Pada Media

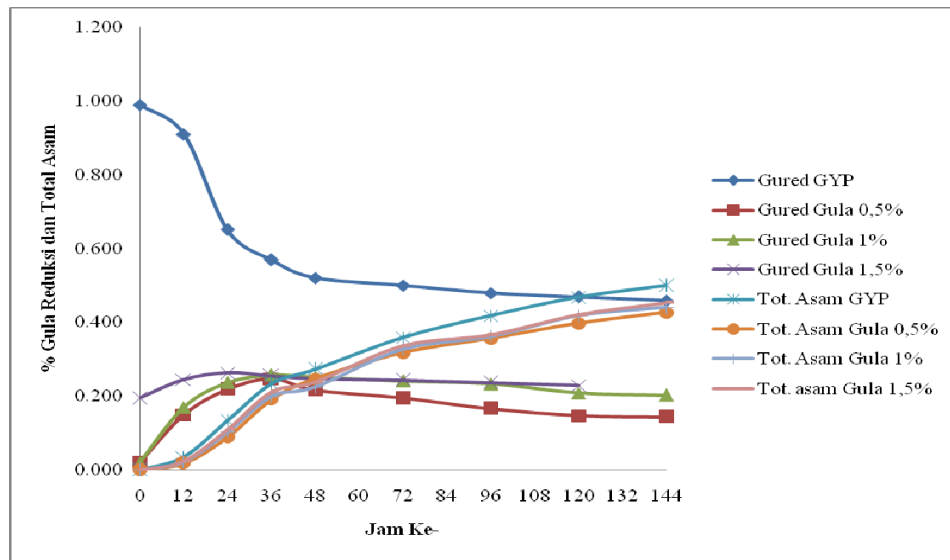
Gambar 4.15 menunjukkan besarnya kadar gula reduksi dan total asam (jumlah asam laktat) selama proses pertumbuhan. Pada GYP *broth*, kadar gula reduksi menunjukkan penurunan selama proses fermentasi. Hal ini disebabkan karena GYP *broth* mengandung 1% gula reduksi yang bersumber dari glukosa dan tidak mengandung sumber gula lainnya. Metabolisme gula reduksi selama proses fermentasi menghasilkan asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Asam laktat sebagai metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi mengalami kenaikan. Kadar gula reduksi diawal proses fermentasi sebesar 0,990% dan diakhir fermentasi sebesar 0,459%. Sedangkan total asam laktat pada awal fermentasi sebesar 0,014% dan diakhir fermentasi sebesar 0,509%.

Pada media tetes (Gambar 4.15), jumlah gula reduksi menunjukkan penurunan selama proses fermentasi. Diawal fermentasi jumlah kadar gula reduksi dari media tetes 0,5%; 1% dan 1,5% berturut-turut adalah 0,263%; 0,341% dan 0,504%. Dan diakhir fermentasi kadar gula reduksi turun menjadi 0,118%; 0,163% dan 0,184%.



Gambar 4.15 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Tetes Selama Proses Fermentasi *L. paramesenteroides*

Jumlah asam laktat yang terbentuk menunjukkan peningkatan selama proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat yang terbentuk pada media tetes 0,5%; 1% dan 1,5% sebesar 0,014% dan diakhir proses fermentasi sebesar 0,455%; 0,473% dan 0,491%.



Gambar 4.16 Kadar Gula Reduksi dan Total Asam pada Media Gula Selama Proses Fermentasi *L. Paramesenteroides*

Pada media gula (Gambar 4.16), jumlah gula reduksi menunjukkan kenaikan pada 48 jam awal fermentasi. Hal ini dikarenakan terjadinya pemecahan sukrosa menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui serangkaian reaksi enzimatik. Dari reaksi enzimatik ini dihasilkan fruktosa, asam laktat, asam asetat dan CO<sub>2</sub> yang dikeluarkan dari dalam sel. Fruktosa yang dihasilkan merupakan gula reduksi teridentifikasi dalam penelitian ini. Setelah 24 jam fermentasi, terjadi penurunan jumlah gula reduksi dalam bahan. Hal ini dikarenakan ketersediaan sukrosa dalam media mulai habis sehingga untuk suplai energi selama pertumbuhan digunakan fruktosa yang telah tersedia dalam media.

Jumlah gula reduksi di awal fermentasi pada media gula 0,5%, gula 1% dan gula 1,5% sebesar 0,018%, sedangkan di akhir fermentasi sebesar 0,143%; 0,202% dan 0,229%. Jumlah asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi mengalami kenaikan selama proses fermentasi. Pada awal fermentasi jumlah asam laktat



yang terbentuk pada media gula 0,5%, 1% dan 1,5% adalah 0,014% dan diakhir proses fermentasi berturut-turut sebesar 0,437%; 0,450% dan 0,464%.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Media pengganti GYP *broth* yang tepat untuk pertumbuhan *Leuconostoc mesenteroides* dan *L. paramesenteroides* serta *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis* adalah tetes 1,5%.
2. Waktu panen yang tepat untuk *Leuconostoc mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis* pada media tetes 1,5% berturut-turut adalah pada jam ke- 18 sampai dengan jam ke- 24, pada jam ke- 24 sampai dengan jam ke- 96, pada jam ke- 30 sampai dengan jam ke- 36 dan pada jam ke- 48 sampai dengan jam ke- 60.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang perubahan kandungan gula dan teknis pembuatan ragi kultur tunggal isolat BAL dan ragi polikultur BAL Luwak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2007a. Kopi, Sedap rasanya, Sedap Bisnisnya. Warta Ekonomi.
- . 2007b. *Produksi Isolat dari Kotoran Luwak sebagai Agen Fermentasi Biji Kopi*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- . 2008. *Permintaan Kopi*. [http://www.Analisadaily.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=31198:permintaan-kopi-luwak-meningkat-hingga-ke-pasar-internasional&catid=31:umum&Itemid=143](http://www.Analisadaily.com/index.php?option=com_content&view=article&id=31198:permintaan-kopi-luwak-meningkat-hingga-ke-pasar-internasional&catid=31:umum&Itemid=143) (17 Oktober 2009).
- . 2009a. Kopi dan Kesehatan. <http://dokterkecil.wordpress.com/2009/02/24/kopi-kesehatan>.
- . 2009b. *Permintaan Kopi*. [http://www.analisadaily.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=31198:permintaan-kopi-luwak-meningkat-hingga-ke-pasar-internasional&catid=31:umum&Itemid=143](http://www.analisadaily.com/index.php?option=com_content&view=article&id=31198:permintaan-kopi-luwak-meningkat-hingga-ke-pasar-internasional&catid=31:umum&Itemid=143).
- Christensen, M. D., Albury, M. N. dan Pederson, C. S . 1958 Variation in the Acetic Acid-Lactic Acid Ratio Among the Lactic Acid Bacterial New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389108/pdf/hw0301.pdf>.
- Djumarti, 2005. *Teknologi Pengolahan Kopi*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- Dols. M, Chraibi W, Remaud M, Lindley N, Monsan P. 1997. Growth and Energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during Metabolism of Various Sugars and Their Consequences for Dextranucrase Production. *American Society for Microbiology journal*. Vol. 63, No. 6. Hal: 2159 –2165. <http://aem.asm.org/cgi/reprint/63/6/2159.pdf>.
- Fauzi, M, 2008, *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam laktat Biji Kopi Luwak (Civet Coffee)*, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Faakultas Teknologi Pertanian, UNEJ.
- Harahap, H., 1981. *Pedoman Sistem Kerja Pengolahan Coklat-Kopi*. Surabaya: PTPN XII.
- Herman. 2003. *Membangkitkan Kembali Peran Komoditas Kopi bagi Perekonomian Indonesia*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- ICCRI. 2006. *Pengolahan Sekunder Kopi*. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Iqbalali. 2008, *Pertumbuhan Bakteri*. <http://iqbalali.com/PertumbuhanBakteriDanSuhu.mht>.
- James, J. S. 1990. *Komoditi Kopi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Kartasaputra. 1988. *Teknologi Budidaya Tanaman Pangan di Daerah Tropis*.

Jakarta: Bina Aksara

- Kusmiati dan Amarila. 2002. Akitivitas Bakteriosin dari Bakteri *Leuconostoc mesenteroides* P bac1 Pada Berbagai Media. *Makara Kesehatan*, VOL. 6, NO. 1, JUNI 2002. Hal: 16. [http://journal.ui.ac.id/upload/artikel /NEW\\_Aktivitas\\_Kusmiati\\_Convert.pdf](http://journal.ui.ac.id/upload/artikel /NEW_Aktivitas_Kusmiati_Convert.pdf).
- Miswari. 2006. Isolasi dan Purifikasi Fitase dari Kotiledon Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.) Hasil Perkecambahan. *Jurnal Elektronik Unud*.<http://ejournal.Unud.ac.id /abstrak/miswar%20090202006.pdf>.
- Mulato, S. 1995: *Pengolahan Kopi, Pelatihan Uji Cita Rasa Kopi*. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao.
- Muljana. 1982. *Pengolahan Kopi*. Jember: Balai Penelitian Perkebunan.
- Najiyati, S dan Danarti. 1990. *Kopi Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Passos P, Fleming H, Ollis D, Felder R, McFeeters R. 1994. Kinetics and Modeling of Lactic Acid Production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental Microbiology*. Vol 60 No 7. Hal: 2627-636 <http://aem.asm.org/cgi/reprint/60/7/2627.pdf>.
- Riani, — 2005. Komposisi GYP. <http://www.unsjournals.com/ D/D0701 /D070105.pdf> gyp.
- Rismana, 2002 ugar. <http://www.food-info.net/id/products/sugar/types>. htm.
- Risvank, 2009. Tetes (Molases). <http://www.risvank.com /2009/04/tetes-molasses>.
- Shobha R dan Agrawal R. 2006. Volatile Compounds of Therapeutic Importance Produced by *Leuconostoc paramesenteroides*, a Native Laboratory Isolate. *Turk J Biol Journal*, Hal 35-40.<http://journal.tubitak.gov.tr /biology/issues/ biy-07-31-1/biy-31-1-6-0606-12.pdf>.
- Yudhabuntara.2003. Pengendalian. [www geocities com ./kesmavetugm /PENGEN DALIA .doc](http://www.geocities.com ./kesmavetugm /PENGEN DALIA .doc).