

LAPORAN PENELITIAN



ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT BIJI KOPI LUWAK (*Civet Coffe*)

Oleh:

Ir. Mukhammad Fauzi, MSi.

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER

2008

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian	Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Biji Kopi Luwak (<i>Civet Coffe</i>)
2. Ketua Peneliti 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 /131 865 702 Lektor Kepala Teknologi Pertanian/Teknologi Hasil Pertanian
3. Perguruan Tinggi	Universitas Jember
4. Jangka Waktu Penelitian	1(satu) tahun
5. Biaya	Rp. 10.000.000,- (sepuluh juta rupiah)
6. Sumber Dana	Beasiswa Unggulan Diknas

Mengetahui
An. Dekan Fak. Teknologi Pertanian
PD I.

Jember, 22 September 2008
Peneliti,

Dr.Ir. Iwan Taruna, M.Eng.
NIP. 132 085 975

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.
NIP. 131 865 702

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL.....	v
RINGKASAN	iv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Sejarah Tanaman Kopi.....	3
2.2 Kopi (<i>Coffea sp.</i>).....	3
2.3 Produksi dan Pasar Kopi Indonesia.....	4
2.4 Komposisi Kimia Kopi.....	6
2.5 Pengolahan Kopi.....	7
2.6 Fermentasi Biji Kopi.....	9
2.7 Kopi Luwak (<i>Civet coffee</i>).....	10
2.8 Kondisi Mikrobiologis.....	11
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	17
3.3 Pelaksanaan Penelitian.....	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1 Fermentasi Biji Kopi Luwak.....	24
4.2 Mikroorganisme yang Berperan dalam Fermentasi Biji Kopi Luwak	24
4.3 Isolasi dan Identifikasi Mikrooragnisme	26
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan ke Hadlirat Allah SWT yang telah menganugerahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga laporan penelitian Karakteristik Bakteri Asam Laktat Biji Kopi Luwak yang dibiayai dari Beasiswa Unggulan Diknas tahun anggaran 2008 telah tersusun.

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 mengikuti program penelitian Beasiswa Unggulan.
2. Ketua Jurusan THP FTP UENJ yang telah memberikan fasilitas laboratorium untuk isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat pada biji 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, September 2008

Penulis

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Untaian biji-biji kopi yang baru keluar bersama kotoran (feces) binatang luwak .	11
Gambar 4.1 Proses pemecahan gula menjadi alkohol	25

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
1	Komposisi Kimia Kopi	7
2	Bakteri Asam Laktat yang Digunakan sebagai Probiotik	13
3	Jumlah Mikroorganisme pada Biji Kopi Luwak	25
4	Sumber Isolat Bakteri	26
5	Pertumbuhan Isolat bakteri pada Media Agar Tegak	28
6	Hasil Uji Pewarnaan Gram dan adanya Katalase	30
7	Hasil Uji CO ₂	31
8	Hasil Uji Pertumbuhan Bakteri pada Variasi Suhu	33
9	Hasil Uji Produksi Asam dengan Litmus Milk	34
10	Hasil Pengujian Produksi dekstran Dari sukrosa	37
11	Produksi Amonia dari Arginin	38
12	Hasil Uji Pertumbuhan pada Variasi Konsentrasi Garam	40
13	Kemampuan memfermentasi berbagai jenis Karbohidrat	42
14	pH dan Total Asam Laktat asil Aktivitas Isolat Bakteri	44

RINGKASAN

Buah kopi yang dimakan luwak diproses dalam sistem pencernaannya, namun yang dicerna hanyalah kulit buahnya saja, sedangkan biji kopi dikeluarkan bersama kotoran luwak. Biji kopi yang telah melalui tahapan ini yang mengalami fermentasi selama dalam saluran pencernaan binatang luwak yang kemudian disebut dengan kopi luwak.

Keberadaan mikroba terutama bakteri asam laktat diduga merupakan mikroba yang berperan dalam proses fermentasi selama dalam saluran pencernaan binatang luwak. Namun demikian jenis dan kemampuan bakteri asam laktat yang berperan yang berperan dalam fermentasi buah kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak belum diketahui.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat yang berperan pada proses fermentasi buah kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak.

Manfaat penelitian yang diharapkan adalah a). penemuan bakteri asam laktat yang berperan pada proses fermentasi biji kopiluwak, dan b) alternatif pengembangan teknologi fermentasi yang secara alami relatif lebih mudah diadopsi oleh produsen kopi skala kecil (perkebunan rakyat).

Hasil isolasi bakteri biji kopi luwak telah diperoleh 42 isolat bakteri. Setelah seluruh isolat bakteri diidentifikasi, pada pewarnaan gram seluruh isolat merupakan bakteri gram positif. Pada uji katalase, terdapat 33 isolat menunjukkan katalase negatif yang berarti 33 isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat.

Seluruh isolat BAL tersebut memiliki kemampuan yang berbeda dalam serangkaian pengujian. Namun pada pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda, seluruh isolat pada umumnya mampu tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dan mampu menghasilkan asam (perubahan warna litmus menjadi merah) serta besarnya total asam dan juga pH yang ditunjukkan berkisar 3.37-4.565.

Pada uji kemampuan produksi dekstran dan amonia terdapat 16 isolat BAL yang mampu memproduksi dekstran sebagai dari genus *Leuconostoc* dan 6 isolat mampu memproduksi amonia sebagai *Streptococcus faecium*. Namun ada pula genus *Leuconostoc* yang tidak mampu memproduksi dekstran yaitu *Leuconostoc paramesenteroides*. Dari 16 isolat yang diduga *Leuconostoc*, setelah melalui pengujian ketahanan terhadap konsentrasi garam yang tinggi diperoleh 6 isolat yang diduga berasal dari *Leuconostoc mesenteroides*, sedangkan yang tidak tahan terhadap konsentrasi garam yang tinggi diperoleh 1 isolat yang diduga berasal dari *Leuconostoc dextranicum*.

Pada uji kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat diperoleh 7 isolat yang diduga sebagai *Leuconostoc paramesenteroides* yang mampu memfermentasi hampir semua jenis karbohidrat. Sedangkan pada genus *Lactobacillus* ditemukan 9 isolat dari spesies *Lactobacillus plantarum* dan 5 isolat dari spesies *Lactobacillus brevis*.

Setelah seluruh isolat dilakukan serangkaian pengujian tersebut, diperoleh 6 spesies BAL dan teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* dan *Streptococcus faecium*.

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai salah satu produsen kopi terbesar di dunia, selain Brasil, Kolombia dan Vietnam. Kopi merupakan salah satu komoditas perdagangan penting bagi Indonesia. Setiap tahun ekspor kopi Indonesia berkisar 300.000-350.000 ton. Akan tetapi, angka ekspor ini sangat fluktuatif dari tahun ke tahun (Herman, 2003; Warta Ekonomi, 2007). Ekspor kopi Indonesia baru sebatas biji kopi, bukan produk yang siap dikonsumsi. Mutu produk kopi hasil perkebunan rakyat masih sangat rendah dan sangat variatif antara produsen yang satu dengan yang lain. Salah satu penyebabnya adalah proses pengolahan biji kopi yang belum memenuhi standar.

Proses pengolahan kopi ada dua, yaitu pengolahan secara kering dan basah. Pengolahan secara kering masih sering dilakukan oleh petani, padahal kualitas hasilnya relatif lebih rendah dibanding pengolahan secara basah (Anonim, 2003). Hal ini karena petani menganggap proses pengolahan secara kering relatif lebih mudah dan lebih efisien terkait dengan kuantitas produksi yang lebih kecil dibanding dengan kopi perkebunan besar. Oleh karena itu perlu ditelaah teknologi pengolahan kopi secara semi basah atau fermentasi kering yang lebih mudah dilakukan oleh petani. Salah satu cara yang perlu dikembangkan adalah proses fermentasi alami dari sistem pencernaan binatang luwak yang telah terbukti menghasilkan biji kopi dengan kualitas dan flavor yang lebih baik.

Biji Kopi Luwak ini dikumpulkan langsung dari kotoran luwak. Buah kopi yang dimakan luwak diproses dalam sistem pencernaannya, namun yang dicerna hanyalah kulit buahnya saja, sedangkan biji kopi dikeluarkan bersama kotoran luwak. Biji kopi yang telah melalui tahapan inilah yang mengalami fermentasi selama dalam saluran pencernaan binatang luwak. Rasa kopi yang diperoleh dengan cara istimewa inilah yang menjadikan kopi luwak digemari oleh sebagian besar penikmat kopi dari luar negeri.

Keberadaan mikroba terutama bakteri asam laktat diduga merupakan mikroba yang berperan dalam proses fermentasi selama dalam saluran pencernaan binatang

luwak, sehingga perlu dilakukan isolasi untuk mengetahui karakteristik bakteri asam laktat yang berperan tersebut.

1.2 Permasalahan

Jenis dan kemampuan bakteri asam laktat yang berperan yang berperan dalam fermentasi buah kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak belum diketahui.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri asam laktat yang berperan pada proses fermentasi buah kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak. Serta teknik pengembangbiakan awal mikroba maupun uji stabilitas isolat yang dihasilkan.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian yang akan diharapkan adalah:

1. Penemuan bakteri asam laktat yang berperan pada proses fermentasi biji kopi luwak.
2. Alternatif pengembangan teknologi fermentasi yang secara alami relatif lebih mudah diadopsi oleh produsen kopi skala kecil (perkebunan rakyat).

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Tanaman Kopi

Tanaman kopi berasal dari Benua Afrika, yang dapat ditanam dan tumbuh baik di Indonesia. Jenis kopi yang tumbuh pertama kali di Indonesia adalah jenis Arabika, yang ditanam sekitar tahun 1696. Daerah penanaman pertama di pulau Jawa dan akhirnya tersebar ke berbagai tempat di Indonesia. Namun pada tahun 1876 perkembangan jenis kopi Arabika ini mengalami kemunduran akibat serangan penyakit kerat daun (*Hemileia vastatrix*). Untuk mengatasinya, pemerintah menanam jenis kopi Liberika (*Coffea liberica*), akan tetapi jenis kopi ini juga terserang penyakit karat daun dan rasa kopinya terlalu masam, sehingga akhirnya tidak ditanam lagi (Aak, 1988).

Pada tahun 1900 para pengusaha perkebunan memasukkan ke Indonesia jenis kopi Robusta (*Coffea canephora*), karena lebih tahan terhadap penyakit karat daun, syarat tumbuh serta pemeliharaannya ringan dan produksinya jauh lebih tinggi. Sehingga kopi Robusta cepat berkembang dan mampu mendesak jenis-jenis kopi lainnya.

Pada saat ini luasan tanaman kopi Robusta di Indonesia lebih dari 95%, sedangkan selebihnya adalah kopi Arabika dan jenis lain. Kopi Robusta ini semula ditanam dan diusahakan oleh perkebunan besar, namun dalam perkembangannya tanaman ini lebih banyak menjadi tanaman rakyat (Aak, 1988).

2.2 Kopi (*Coffea sp.*)

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; Warta Ekonomi, 2007).

Adapun klasifikasi tanaman kopi Robusta sebagai berikut:

Kingdom : Phylum
Divisio : Spermathophyta
Sub Divisio : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Rubiales
Genus : *Coffea*
Species : *Coffea canephora* (Darwisah et.al, 1991).

Kopi adalah spesies tanaman berbentuk pohon yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea*. Tanaman ini tumbuhnya tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 m. Daunnya bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan pada batang, cabang, dan ranting-rantingnya.

Kopi memberikan beberapa manfaat bagi manusia maupun keperluan yang lain. Pertama, kopi sebagai *stimulan agent* (Xu et al., 2005) yaitu dapat merangsang tubuh untuk tetap segar dan tahan beraktifitas, karena dapat mengusir rasa kantuk dan rasa capek. Kedua, ampas kopi dapat digunakan sebagai pupuk tanaman pot. Ketiga, bubuk kopi dapat digunakan untuk menyembuhkan luka pada hewan, karena bubuk kopi akan mempercepat proses pengeringan luka luar pada hewan, dan tidak berbahaya bila terjilat oleh hewan tersebut.

2.3 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) 26,4 hektar (2,1%). Sebagian besar areal perkebunan berlokasi di Propinsi Sumatra Selatan (272.540 hektar) dan Lampung (166.060 hektar) (Herman, 2003).

Produksi kopi nasional pada tahun 2006 mencapai 653.400 ton, naik 2,03% dari tahun sebelumnya. Perkebunan rakyat merupakan pemasok terbesar dengan volume 627.500 ton atau 96,1% dari total produksi. Sumatra Selatan merupakan produsen kopi terbesar di Indonesia dengan volume 144.360 ton pada tahun 2006. Pertumbuhan kopi di Lampung dan Sumatra Utara mencapai 14% per tahun, sementara luas areal tanah untuk dua propinsi tersebut tumbuh 9,1% dan 4,1%. Hal ini menunjukkan bahwa produktivitas dua propinsi tersebut cukup tinggi. Akan tetapi secara nasional produktivitasnya belum beranjak dari angka 600 kilogram per hektar (Warta Ekonomi, 2007).

Indonesia saat ini menjadi negara produsen kopi terbesar ke-4 di dunia, setelah Brasil, Kolombia, Vietnam. Kopi menjadi komoditas ekspor andalan Indonesia. Setiap tahun ekspor kopi Indonesia berkisar 300.000-350.000 ton. Akan tetapi, angka ekspor ini sangat fluktuatif dari tahun ke tahun (Herman, 2003; Warta Ekonomi, 2007). 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.

Beberapa hambatan pada usaha peningkatan nilai ekspor:

1. Organisasi kopi dunia menetapkan quota (jumlah yang boleh diekspor) kopi terlalu rendah yaitu 52% dari total produksi maksimal.
2. Umumnya kopi Indonesia mutunya rendah sehingga harga yang diterima oleh petani juga rendah.

Untuk mengatasi masalah tersebut di atas pemerintah menetapkan kebijakan yang menekankan pada peningkatan mutu kopi dan membatasi meluasnya areal kopi (Djumarti, 2005).

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%) (Warta Ekonomi, 2007).

Pada saat ini di Indonesia ada 90-an produsen kopi bubuk dengan lebih dari 100 merek, yang terbesar adalah PT. Santos Jaya Abadi yang mengusung merek Kapal Api dan juga memproduksi kopi merek ABC, Santos, Bintang, dan biji kopi siap giling dengan merek Excelco. Pesaing kuat Kapal Api adalah Nescafe, Torabika, Indocafe dan Ayam Merak.

Perusahaan dengan skala menengah dan kecil ikut bermain dengan menggarap pasar masyarakat di daerah. Beberapa merek yang populer di daerah, antara lain, Tugu Luwak di Jawa Tengah. Di Jawa Timur, merek Kapal Api paling dominan. Merek-merek lain adalah Glatik, Singa, Tugu Buaya, Kapal Tanker, dan Kopi Alami. Di Jawa Barat ada Torabika, Gunung Salak, dan ABC, disamping Kapal Api (Warta Ekonomi, 2007).

2.4 Komposisi Kimia Kopi

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.

Menurut Atmawinata, dkk. (1997), dalam biji kopi mentah terdapat 180 senyawa volatil, senyawa tersebut adalah hidrokarbonatifatik, asam, alkohol, tiol, furan, pirol, piridin, quinon, phenol dan amin aromatik. Ragam senyawa-senyawa tersebut sangat dipengaruhi daerah tempat tumbuh dan juga cara pengolahannya. Warna biji kopi mentah mempunyai hubungan dengan rasa. Warna kopi Arabika hasil pengolahan basah berwarna hijau kebiru-biruan, hijau, kuning, coklat atau hitam. Zat warna dalam kopi merupakan hasil oksidasi asam klorogenat atau magnesium klorogenat atau dapat juga dari *cafestol* dan *kahweol*.

Komposisi kimia kopi dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Komposisi Kimia Kopi

Senyawa	(% basis kering)
Kahweol	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
Asam lain	2
Abu	4
Total	90-114

Sumber: Mulato, 1995.

2.5. Pengolahan Kopi

Pengolahan buah kopi bertujuan untuk memisahkan biji kopi dari kulitnya, kemudian mengeringkan biji tersebut, sehingga diperoleh kopi beras dengan kadar air tertentu yang siap dipasarkan. Kadar air kopi beras optimumnya adalah 10-13%. Bila kopi beras mempunyai kadar air lebih dari 13% akan mudah terserang cendawan, dan bila kurang dari 10% akan mudah pecah (Najiyati dan Danarti, 1999).

Pengolahan buah kopi dapat dilakukan dua cara yaitu cara basah dan cara kering. Pengolahan secara basah biasanya memerlukan modal yang lebih besar, tetapi lebih cepat dan mutu yang dihasilkan lebih baik.

Tahap-tahap pengolahan kopi cara basah adalah sebagai berikut:

1. Sortasi glondong dimaksudkan untuk memisahkan kopi merah yang berbiji dan sehat dengan kopi yang hampa dan terserang bubuk.
2. Pulping (pengupasan kulit buah), bertujuan untuk memisahkan biji dari kulit buahnya sehingga diperoleh biji kopi yang masih terbungkus oleh kulit tanduknya.

3. Fermentasi, bertujuan untuk membantu melepaskan lapisan lendir yang masih menyelimuti kopi yang keluar dari mesin pulper.
4. Pencucian, bertujuan untuk menghilangkan seluruh lapisan lendir dan kotoran-kotoran lainnya yang masih tertinggal setelah difermentasi atau setelah keluar dari mesin pulper.
5. Pengeringan, bertujuan untuk menurunkan kadar air tersebut menjadi 8-10%.
6. Hulling (pemecahan kulit tanduk), bertujuan untuk memisahkan biji kopi yang sudah kering dari kulit tanduk dan kulit arinya.
7. Sortasi biji, dimaksudkan untuk membersihkan kopi beras dari kotoran sehingga memenuhi syarat mutu, dan mengklasifikasikan kopi tersebut menurut standart mutu yang telah ditetapkan.

Tahap-tahap pengolahan kopi cara kering adalah sebagai berikut:

1. Sortasi glondong, dimaksudkan dengan cara kopi berwarna hijau, hampa dan terserang bubuk disatukan. Sedangkan yang berwarna merah dipisahkan, karena akan menghasilkan kopi bermutu baik.
2. Pengeringan, kopi yang sudah dipetik dan disortasi harus sesegera mungkin dikeringkan agar tidak mengalami proses-proses kimia yang bisa menurunkan mutu. Dapat dilakukan dengan cara alami, buatan dan kombinasi.
3. Hulling, bertujuan untuk memisahkan biji kopi dari kulit buah, kulit tanduk dan kulit arinya.
4. Sortasi biji, dimaksudkan untuk membersihkan kopi beras dari kotoran sehingga memenuhi syarat mutu, dan mengklasifikasikan kopi tersebut menurut standart mutu yang telah ditetapkan (Najiyati dan Danarti, 1999).

2.6 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 jasad renik bakteri asam laktat disebut pemeraman atau peragian. Selama fermentasi terjadi pemecahan komponen lapisan lendir yaitu protopektin dan gula dengan dihasilkan asam dan alkohol. Dengan terjadinya proses pemecahan komponen lapisan lendir tersebut maka akan terlepas dari permukaan kulit tanduk biji.

Menurut Djumarti (2005) perubahan yang terjadi selama proses fermentasi:

1. Pemecahan getah komponen mucilage

Bagian yang terpenting lapisan berlendir/getah adalah komponen protopektin yaitu suatu “*insoluble complex*” tempat terjadinya meta cellular lactice dari daging buah yaitu pectin lamella tengah pengikat sel satu dan sel yang lain. Bahan tersebut akan terurai dalam proses fermentasi oleh kegiatan enzim katalase yang memecah protopektin dalam buah kopi. Makin matang buah kopi kandungan enzim pektinase/protopektinase semakin banyak. Enzim ini sangat peka/sensitif terhadap perubahan pH. Pada pH 5,5-6,0 pemecahan getah cukup cepat, pada pH 4,0 bisa 2x lebih cepat dan pada pH 3,65 bisa 3x lebih cepat.

2. Pemecahan gula

Sukrosa merupakan komponen penting dalam daging buah kopi. Kadar gula daging buah akan meningkat dengan cepat selama proses pematangan buah sehingga rasanya manis. Gula adalah senyawa yang larut dalam air, oleh karena itu dengan adanya proses pencucian lebih dari 15 menit akan menyebabkan terjadinya banyak kehilangan konsentrasinya. Oleh karena itu kadar gula dalam daging biji akan mempengaruhi konsentrasi gula di dalam getah beberapa jam setelah fermentasi. Gula ini merupakan substrat bagi mikroorganisme. Bakteri pemecah gula ini bekerja 5 sampai 24 jam dalam proses fermentasi. Sebagai hasil proses pemecahan gula adalah asam laktat dan asetat dengan asam laktat yang lebih besar. Dengan terbentuknya asam ini maka pH turun menjadi lebih kecil dari 5,0. Akan tetapi pada akhir fermentasi asam laktat ini dikonsumsi oleh bakteri sehingga terjadi kenaikan pH lagi. Asam-asam lain yang dihasilkan dari proses fermentasi ini adalah etanol, asam butirat dan propionat. Asam terakhir ini akan memberikan “*Onion flavor*”.

3. Perubahan warna kulit ari biji kopi

Apabila biji kopi telah terpisahkan dari pulp dan parchment maka kulit ari akan berwarna coklat. Juga jaringan daging biji akan berwarna sedikit kecoklatan yang tadinya berwarna abu-abu atau abu-abu kebiruan. Warna kulit ari biji kopi demikian ini kurang menarik karena berwarna suram. Proses “*browning*” ini terjadi karena oksidasi polifenol. Peristiwa browning ini tidak terjadi bila air pencucian dengan kondisi alkali.

2.7 Kopi Luwak (*Civet Coffee*)

Kopi luwak berasal dari pulau Sumatra, sebuah pulau yang memang dikenal akan hasil kebun kopi yang berkualitas. Di Sumatra terdapat hewan yang dalam bahasa Latin disebut *Paradoxurus* atau dalam bahasa setempat Luwak. Mamalia kecil ini hidup di pepohonan dan salah satu makanan utamanya adalah biji kopi berwarna merah. Biji ini kemudian dimakan dan mengalami proses fermentasi di dalam proses pencernaan Luwak untuk kemudian dikeluarkan beserta kotorannya. Biji kopi yang masih utuh itulah yang kemudian dikumpulkan oleh petani setempat untuk kemudian dibersihkan dan diproses seperti layaknya biji kopi yang lain, karena diyakini berasal dari biji kopi terbaik dan difermentasikan secara alami. Dan menurut keyakinan, rasa kopi luwak ini memang benar-benar berbeda dan spesial dikalangan para penggemar dan penikmat kopi (Anonim, 2008).

Dari penjelasan di atas kita dapat memahami bahwa proses produksi kopi luwak bukanlah hal yang mudah. Karenanya kopi luwak dihasilkan dalam jumlah yang tidak banyak. Diperkirakan produksi tahunannya hanya sekitar 500 pounds. Karena kelangkaannya itulah, maka kopi luwak tidak dapat dinikmati di setiap tempat (Anonim, 2008).

Secara fisik kopi dari hasil ekskresi (kotoran) binatang luwak yang baru dikeluarkan berupa gerombolan (untaian) biji-biji kopi memanjang yang terangkai (terlekatkan) oleh feces lunak luwak. Feces selain biji kopi sebagian berupa serat-serat yang tidak tercerna oleh sistem pencernaan luwak dari daging (*mucilage*) kopi. Feces tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.1 berikut:



Gambar 2.1. Untaian biji-biji kopi yang baru keluar bersama kotoran (feces) binatang luwak . (Octav (2007)).

Selanjutnya bagian kotoran luwak yang lunak diambil untuk uji pendahuluan pada proses fermentasi biji kopi basah yang telah dimemarkan kulitnya. Hal ini

menunjukkan bahwa fermentasi selama 2-3 hari diperoleh biji kopi dengan flavor yang baik dan body sedang serta berat yang relatif konstan. Pada fermentasi selama 1 minggu juga diperoleh biji kopi 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 biji kopi (Anonim, 2007).

2.8 Kondisi Mikrobiologis

2.8.1 Aktivitas Mikrobiologis

Selama proses fermentasi biji kopi akan terjadi perubahan mikroba yang bekerja. Gambaran komposisi mikroba yang berperan dalam fermentasi antara lain seperti yang dikatakan oleh Forsyth dan Rombouti (1963) dalam Rohan (1963) bahwa:

Hari-1: infeksi awal secara cepat oleh khamir, dibawah kondisi anaerobik dimana merubah gula menjadi alkohol.

Hari-2: bakteri asam laktat tumbuh pada kondisi anaerobik, agar bakteri asam asetat tumbuh dan mengubah alkohol menjadi asam asetat diperlukn aerasi.

Hari-3: adanya kerjasama antara bakteri asam asetat, khamir *aerophilik* dan *Bacillus aerophilus*.

2.8.2 Khamir

Selama proses fermentasi berlangsung mikroorganisme yang diharapkan tumbuh dan berkembang adalah khamir dan bakteri, karena berguna dalam mendapatkan biji kopi yang bermutu tinggi. Jenis khamir yang sering dijumpai selama fermentasi antara lain: *Saccharomyces cerevisiae*, *S.theobromae*, *S.ellipsoideus*, *S.apiculatus*, dan *S. anomalus* (Manurung dan Soenaryo, 1978).

Khamir dapat menghasilkan alkohol, CO₂ dan panas. Aktivitas khamir merubah gula menjadi alkohol dengan reaksi eksotermis. Sedangkan panas yang dihasilkan dapat memberikan kondisi yang cocok bagi pertumbuhan bakteri.

2.8.3 Bakteri

a. Bakteri Asam Laktat (BAL)

BAL didefinisikan sebagai suatu kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang yang memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat. BAL dikelompokkan ke dalam beberapa genus antara lain *Streptococcus* (termasuk *Lactococcus*), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* (Pato, 2003). Diantar genus dan spesies BAL yang mempunyai potensi untuk digunakan sebagai probiotik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik

Genus	Spesies
Lactobacillus	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cellobiosus</i>
Streptococcus	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. alivarius subsp. thermophilus</i> , <i>S.intermedius</i>
Leuconostoc	-
Pediococcus	-

Sumber: Goldin (dalam Pato, 2003).

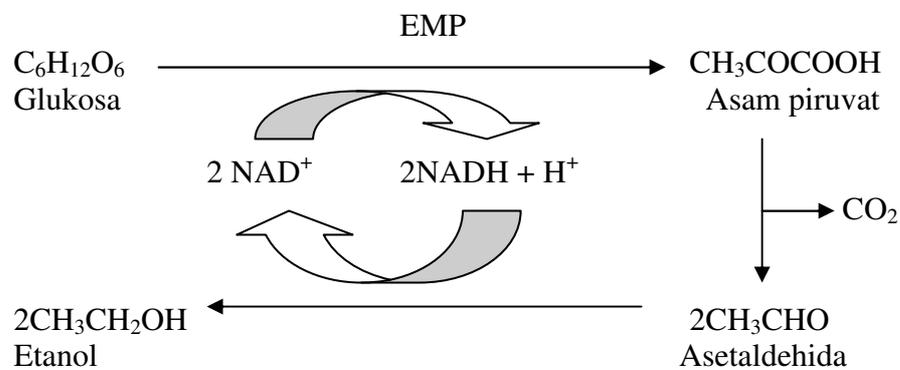
Metabolisme pokok dari bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk memfermentasi karbohidrat. Polisakarida terlebih dahulu akan dipecah menjadi gula-gula sederhana sebelum difermentasi. Fermentasi glukosa pada prinsipnya terdiri dari dua tahap yaitu:

1. Pemecahan rantai karbon dari glukosa dan pelepasan paling sedikit dua pasang atom hydrogen, menghasilkan senyawa karbon lainnya yang lebih teroksidasi daripada glukosa.
2. Senyawa yang teroksidasi tersebut direduksi kembali oleh atom hydrogen yang dilepaskan dalam tahap pertama, membentuk senyawa-senyawa lain sebagai hasil fermentasi.

Dalam tahap pertama fermentasi glukosa selalu terbentuk asam piruvat. Ada empat jalur pemecahan glukosa menjadi asam piruvat yang terjadi pada mikroorganisme:

1. Jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) atau glikolisis, ditemukan pada kapang dan kebanyakan bakteri serta pada hewan dan manusia.
2. Jalur Entner-Doudoroff (ED), hanya ditemukan pada beberapa bakteri.
3. Jalur Heksosamonofosfat (HMF), ditemukan pada beberapa bakteri.
4. Jalur Fosfoketolase (FK), hanya ditemukan pada bakteri yang tergolong laktobasili heterofermentatif.

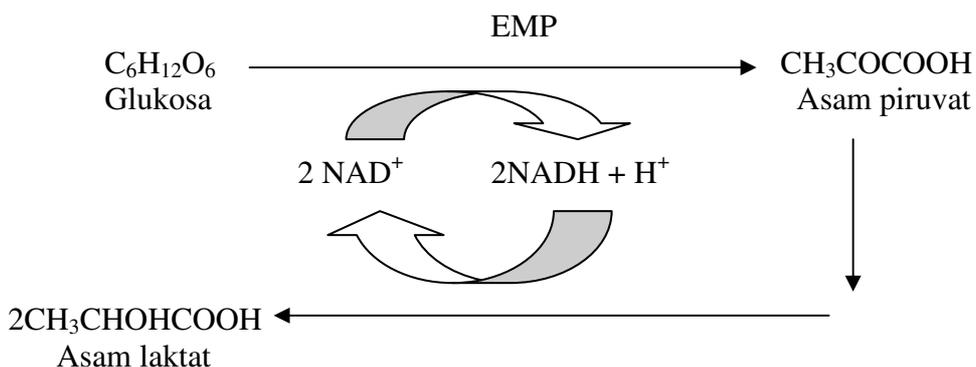
Pada tahap kedua fermentasi, asam piruvat akan diubah menjadi produk akhir yang spesifik untuk berbagai proses fermentasi. Salah satu contoh adalah fermentasi glukosa oleh khamir guna menghasilkan alkohol melalui jalur EMP.



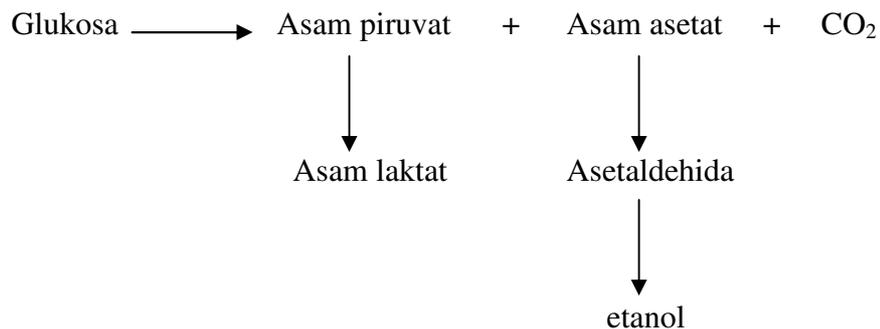
Dalam reaksi di atas, asetaldehida bertindak sebagai penerima hydrogen dalam fermentasi, dimana hasil reduksinya oleh NADH_2 menghasilkan etanol, dan NAD yang teroksidasi kemudian dapat digunakan lagi untuk menangkap hydrogen. Reaksi pembentukan etanol adalah sebagai berikut:



Pada grup bakteri asam laktat, asam piruvat dari jalur EMP bertindak sebagai penerima hydrogen, dimana reduksi asam piruvat oleh NADH_2 menghasilkan asam laktat dengan reaksi sebagai berikut:



Fermentasi asam laktat di atas disebut homolaktat, karena hanya menghasilkan satu jenis produk yaitu asam laktat, dan bakteri yang melakukan fermentasi disebut bakteri asam laktat homofermentatif. Contoh dari bakteri ini adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*. Grup bakteri asam laktat heterofermentatif, seperti *Leuconostoc* dan beberapa species *Lactobacillus*, selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan senyawa-senyawa lainnya seperti:



Dengan reaksi keseluruhan sebagai berikut:



Pada *Leuconostoc* pemecahan glukosa menjadi asam piruvat, asam asetat/etanol dan CO₂ terjadi melalui jalur HMF, sedangkan pada *Lactobasili* heterofermentatif melalui jalur FK (Suwasono, 2006).

b. Bakteri Asam Asetat

Setelah populasi khamir dan bakteri asam laktat menurun, fermentasi menjadi lebih teraerasi, dan kondisi ini cocok untuk perkembangan bakteri asam asetat. Bakteri asam asetat yang dominan yaitu *A. Xylinum*, *Bacterium xylinoides*, *Bacterium orleanense*, dan *A. Asendens*. Aktivitas utama bakteri asam asetat adalah produksi asam asetat dari etanol, bakteri tersebut juga dapat memetabolisme banyak komponen lainnya seperti gula dan asam organik.

Adanya aerasi dan kenaikan suhu hingga 37°C mendorong pertumbuhan dan aktivitas bakteri asam asetat. Bakteri asam asetat akan menurunkan konsentrasi alkohol dan asam laktat, tetapi akan meningkatkan suhu fermentasi hingga 50°C. Akibat kenaikan suhu ini menyebabkan jumlah bakteri menurun akibat bakteri akan inaktif pada suhu 40°C-45°C (Susijahadi dkk, 1998a).

Bakteri dapat tumbuh secara optimal pada pH sekitar 7 dan Aw minimal sekitar 0,9, suhu yang diperlukan tergantung dari jenis bakteri (Salle, 1961). Senyawa etanol yang diperoleh dari aktivitas khamir oleh bakteri asam asetat akan diubah menjadi asam asetat dan menghasilkan panas.

2.8.4 Kapang

Dalam proses fermentasi penggunaan kapang tidak sebanyak bakteri. Ciri khas dari kapang adalah penampilan umumnya membentuk miselium sehingga selalu mempengaruhi penampakan. Banyak kapang menghasilkan enzim yang bermanfaat bagi industri pangan, seperti enzim amilolitik (memecah pati), proteolitik (memecah protein), dan lipolitik (memecah lemak) (Suwasono, 2006).

Kapang yang tumbuh dan berkembang pada suatu bahan pangan dapat menghasilkan *mycotoxin* (mikotoksin) yang dapat terdifusi ke dalam makanan. Hal ini dilakukan kapang sebagai upaya melindungi makanannya atau sumber nutrisinya dari serangan mikroorganisme lainnya. Dengan mengeluarkan mikotoksin ke dalam makanannya atau nutrisinya, mikroorganisme lain sulit/tidak dapat tumbuh. Efek keracunan yang ditimbulkan oleh mikotoksin disebut *mycotoxicosis* (mikotoksikosis) (Maryam, 2002).

Mikotoksin bersifat sangat stabil dan berbahaya dalam jumlah kecil dengan konsentrasi dalam *part per billion* (ppb). Ada lima jenis mikotoksin yang dapat menimbulkan penyakit yaitu *aflatoksin*, *okratoksin A*, *zearalenon*, *trikotesena* (*deoksini valenol*, *toksin T2*) dan *fuminosin* (Cole and Cox, 1981). Sekali toksin ini terbentuk dalam bahan pangan, toksin ini tidak dapat dihilangkan dari komoditi melalui pengolahan atau penghilangan jamur yang tumbuh, dan tidak dapat dirusak oleh pemasakan (Quillien, 2002).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Kimia/Biokimia Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember yang dimulai dari November 2007 sampai April 2008.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi luwak yang belum diolah. Medium untuk isolasi dan identifikasi terdiri dari: MEA (Malt Ekstrakt Agar), MRS (Agar/broth), Sukrosa Agar, PGY (Pepton Glucose Broth), litmus milk, NaOH 0,1 N dan 0,01 N, aquadest, etanol 95%, lugol, kristal violet, safranin, H₂O₂ 3%, alkohol 70%, NaCl, L-arginin monohidroksida, reagen nessler, dan indikator fenolftalin 1%.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi thermometer, mikropipet, autoklaf, colony counter, lemari pendingin, neraca analitik, cawan petri, tabung reaksi, ose, *laminair air flow*, blue tip, ependrof, inkubator, petridish, bunsen, erlenmeyer, beaker glass, botol film, gelas ukur, botol semprot, pipet tetes dan spatula.

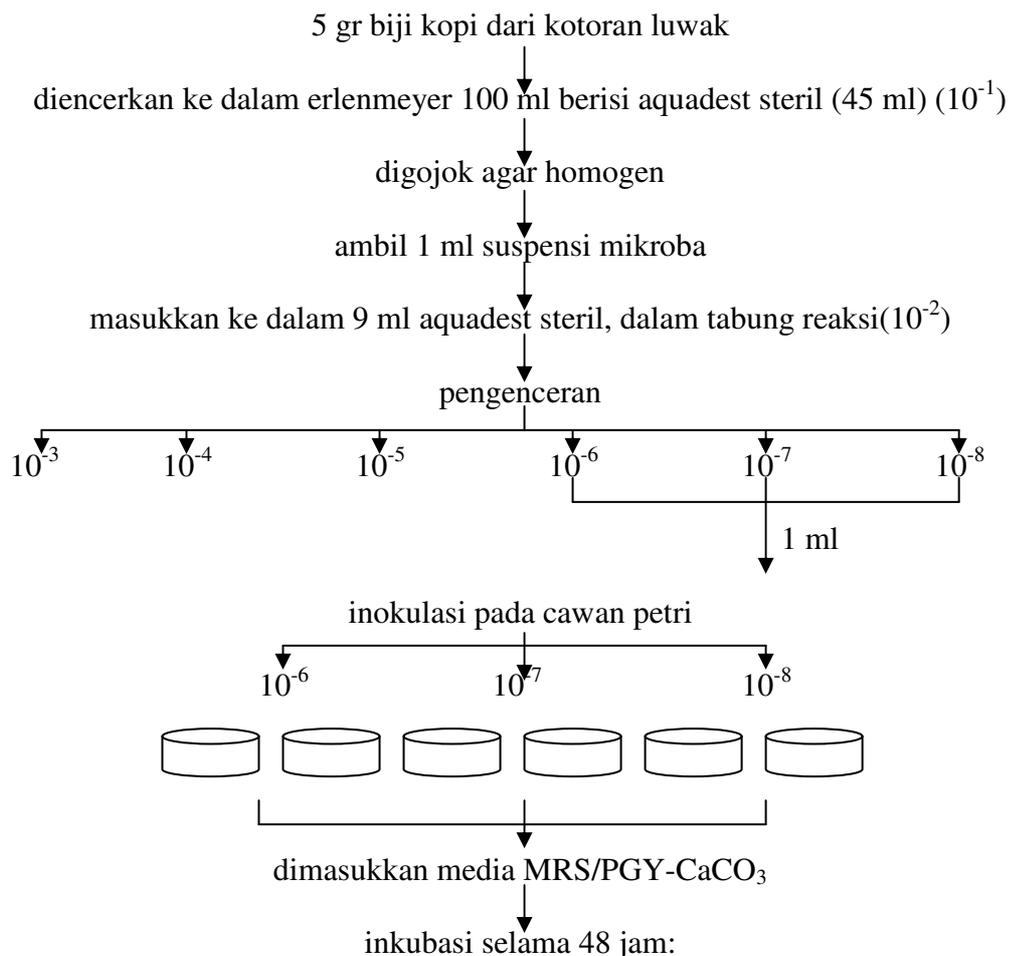
3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Isolasi Kultur Bakteri Asam Laktat

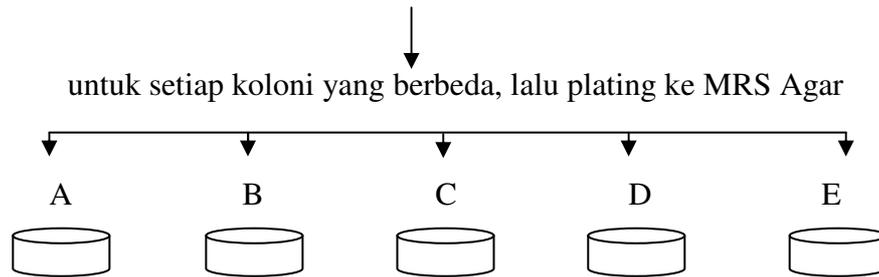
Isolasi dilakukan dengan metode pengenceran yang dilanjutkan dengan plating secara pour plate. Pengambilan sample dilakukan dengan mengambil kotoran luwak berupa biji kopi luwak. Suspensi kultur bakteri dibuat dengan cara: 5 gr kotoran luwak dimasukkan dalam sebuah erlenmeyer 100 ml berisi 45 ml aquadest steril, lalu digojok hingga homogen.

Selanjutnya 1 ml suspensi kultur tersebut diencerkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquadest steril, digojok hingga homogen dan dibuat pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-8} . Isolasi bakteri dilakukan dengan inokulasi 1 ml suspensi kultur ke dalam cawan petri steril, kemudian kedalamnya dituang agar (pour-plate method). Salah satu alternatif media yang dapat digunakan adalah peptone-glukosa-yeast ekstrak (PGY)- CaCO_3 .

Setelah agar memadat, plate diinkubasi secara anaerobik pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Pada media PGY, koloni yang berasal dari BAL akan memberikan zona atau area yang jernih di sekitarnya. Koloni mikroba yang tumbuh selanjutnya digoreskan kembali ke medium (PGY)- CaCO_3 dengan goresan kuadran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam sampai diperoleh kultur murni. Secara jelas dapat dilihat pada skema kerja di bawah ini.



1. MRS Agar PGY- CaCO_3 : 37°C , anaerob (dalam anaerobik jar) (untuk BAL)
2. MEA: 30°C , aerob (untuk khamir)



Selanjutnya dilakukan pengembangan awal isolasi pada media agar tegak:

1 ose kultur bakteri dari kotoran luwak (dari langkah point A)

ditusuk dan digoreskan pada agar tegak/miring (PGY-CaCO₃)

inkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam

3.3.2 Isolasi dan Identifikasi Khamir

Dari masing-masing pengenceran di atas, diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian kedalamnya dituang media Malt Extract Agar/MEA dan diinkubasikan secara aerobik pada suhu 30°C selama 48-72 jam. Pada media MEA koloni khamir berwarna putih. Isolasi koloni khamir yang dominan, lalu digoreskan kembali pada MEA sampai diperoleh kultur murni.

3.3.3 Pengembangbiakan Awal Isolat pada Media Agar Tegak

Satu ose penuh kultur bakteri dari kotoran luwak diambil dari langkah sebelumnya (3.3.1) dan ditusukkan lalu digoreskan pada agar tegak/miring (PGY-CaCO₃) secara aseptis, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam.

3.3.4 Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi isolat BAL didasarkan pada karakter fenotip, meliputi: (a) morfologi sel secara individu: ukuran, bentuk, rangkaian sel, reaksi terhadap pengecatan; dan morfologi koloni: bentuk koloni, bentuk tepi; (b) tipe fermentasi (homofermentatif dan heterofermentatif); (c) pertumbuhan pada suhu berbeda; (d) toleransi terhadap garam.

a. Pewarnaan Gram

Metode yang digunakan adalah metode konvensional yang dilakukan dengan cara satu ose BAL digoreskan pada objek glass, lalu difiksasi (ditambah 1 tetes aquadest, lalu dikering anginkan/dilewatkan di atas api kecil), sehingga terbentuk noda. Di atas noda tersebut kemudian diteteskan berturut-turut: pewarna kristal violet, larutan lugol, etanol 95%, dan safranin. Sebelum meneteskan larutan selanjutnya, suspensi dibiarkan ± 1 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Terakhir, objek glass ditutup dengan deg glass dan diamati di bawah mikroskop. Pengamatan dilakukan terhadap bentuk dan warna BAL. Jika warnanya yang terlihat adalah merah berarti BAL tersebut Gram negatif, sebaliknya jika warna yang terlihat adalah ungu berarti BAL tersebut termasuk Gram positif.

b. Uji CO₂

BAL sebanyak 1 ml diinokulasikan pada media MRS-Broth steril dalam tabung reaksi yang berisi tabung durham. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah 48 jam, diamati ada tidaknya gelembung udara dalam tabung durham tersebut.

c. Uji Katalase

Satu ose BAL dioleskan pada objek glass, kemudian di atasnya ditetesi dengan H₂O₂ 3% dan diamkan selama ± 1 menit. Jika timbul gelembung, berarti BAL tersebut bisa dikategorikan sebagai katalase positif. Sebaliknya, jika tidak timbul gelembung, berarti BAL tersebut bisa dikategorikan sebagai katalase negatif.

d. Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda

Mengisi tabung ependrof masing-masing 1-1,5 ml MRS-Broth sebagai media pertumbuhan BAL. Kemudian diinokulasikan 1 ose BAL dalam masing-masing ependrof tersebut. Inkubasi selama 48 jam pada suhu yang berbeda, yaitu 15°C (lemari es), 37°C dan 45°C. Setelah 48 jam, diamati pertumbuhannya yang ditandai dengan adanya endapan/gas.

e. Reaksi pada Medium Litmus Milk

Satu ose BAL diinokulasikan ke dalam endroff steril yang berisi 1-1,5 ml medium litmus milk, lalu diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2-5 hari. Warna litmus milk akan berubah menjadi merah atau tetap berwarna biru. Apabila litmus berubah menjadi merah (muda) menunjukkan telah terjadi pembentukan asam oleh BAL, sedangkan jika tidak terbentuk asam, warna litmus akan tetap berwarna biru. Perubahan lain yang mungkin terjadi adalah pemisahan whey (ditandai dengan penggumpalan susu) sebagai akibat kerja enzim proteolitik yang dihasilkan oleh BAL selama pertumbuhannya. Serta kemungkinan lain dapat terjadi pembentukan gas yang ditandai dengan adanya gelembung udara di bagian atas endroff.

f. Produksi Dekstran dari Sukrosa

Setiap BAL ditumbuhkan dalam endroff yang berisi 1-1,5 ml MRS-Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dari setiap endroff tersebut diambil 0,1 ml BAL dan dituang ke dalam cawan petri steril, lalu kedalamnya dituang sukrosa agar 10 ml. Setelah memadat, inkubasi dengan posisi cawan terbalik pada suhu 37°C selama 5 hari. Jika terjadi pertumbuhan, maka dapat dilakukan bahwa BAL tersebut termasuk jenis *Leuconostoc*. Sebaliknya, jika tidak terjadi pertumbuhan, berarti BAL tidak memproduksi dekstran dari sukrosa dan tidak termasuk jenis *Leuconostoc*.

g. Produksi Amonia dari Arginin

Uji produksi amonia 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 amonia dari arginin.

MRS Arginin Broth digunakan untuk membedakan *Lactobacillus spp* dengan menambahkan 3 gr L-arginin monohidroklorida ke dalam 1 liter MRS-B. Sedangkan untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Leuconostoc*, digunakan media Arginin broth, yang dibuat dengan melarutkan 5.0 g tripton, 2.5 g yeast ekstrak, 0.5 g D-

glukosa, 2.0 g K_2PO_4 dan 3.0 g L-arginin monoklorida dalam 1 liter air (pH 7), dan disterilisasi pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit.

Satu ose penuh isolat kultur diinokulasikan ke dalam media MRSB-Arginin/Arginin-Broth dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 2-5 hari. Setelah itu, 1 ml kultur yang tumbuh, ditambah reagen nessler dengan volume yang sama. Pembentukan ammonia ditandai dengan pembentukan warna orange kecoklatan setelah penambahan reagen nessler.

h. Pertumbuhan pada Konsentrasi Garam yang Berbeda

Daya tahan BAL terhadap garam dapat diketahui dengan menumbuhkan BAL pada media MRS-Broth yang didalamnya telah ditambahkan garam dengan konsentrasi tertentu. Konsentrasi garam (NaCl) yang digunakan terdiri dari: kontrol (tanpa penambahan garam), NaCl 4%, dan NaCl 6,5%. Sebanyak 50 μ L BAL diinokulasikan dalam 1 ml MRS-Broth + garam, lalu diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 48 jam.

i. Kemampuan Memfermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat

Sebanyak 0,1 ml kultur diinokulasikan kedalam 1 ml media PGY-Broth yang dimodifikasi, glukosa yang digunakan dalam PGY-Broth diganti dengan karbohidrat yang diujikan, seperti: arabinosa, fruktosa, glukosa, maltosa, manitol, dan sukrosa. Kemudian diinkubasi selama 2 hari. Reaksi positif ditandai dengan adanya endapan.

j. Kemampuan Memproduksi Asam

Kultur BAL berumur 24 jam, diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam medium sintetik. Medium sintetik yang digunakan terbuat dari 50 g/l glukosa, 0.4% urea, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4$, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KCl, dan 0.05% ekstrak khamir. Inkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 5 hari.

Analisa dilakukan dengan mengambil sejumlah media sintetik yang telah ditumbuhi oleh BAL secara aseptis, kemudian disentrifus selama ± 10 menit. Hal ini bertujuan untuk memisahkan sel BAL dari hasil metabolit (padatan tidak terlarut). Setelah itu 1 ml supernatan hasil sentrifus diencerkan dalam 9 ml aquadest, lalu ditambah 2-3 tetes indikator fenolftalin 1% dan kemudian dititrasi menggunakan

larutan NaOH 0,01N sampai titik akhir titrasi tercapai, yang ditandai dengan terbentuknya warna merah muda. Jumlah ml NaOH yang digunakan, setara dengan jumlah total asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri. Total asam dihitung sebagai persen asam laktat dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0.09 \times \text{pengenceran} \times 100\%}{\text{ml sample}}$$

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fermentasi Biji Kopi Luwak

Proses fermentasi biji kopi merupakan suatu proses penguraian senyawa-senyawa kompleks dalam biji kopi, menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan melibatkan beberapa mikroorganisme yang bertujuan untuk membantu melepaskan lapisan lendir yang masih menyelimuti biji kopi. Proses fermentasi ini terjadi pula pada biji kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak, yang hasilnya disebut biji kopi luwak.

Selama fermentasi terjadi pemecahan komponen lapisan lendir yaitu protopektin dan gula dengan dihasilkan asam dan alkohol. Dengan terjadinya proses pemecahan komponen lapisan lendir tersebut, maka akan terlepas dari permukaan kulit tanduk biji. Sehingga dalam sistem pencernaan binatang luwak, yang dicerna hanyalah kulit buahnya saja, sedangkan biji kopi dikeluarkan utuh bersama kotoran luwak. Biji kopi yang telah melalui tahapan inilah yang mengalami fermentasi selama dalam saluran pencernaan binatang luwak.

4.2 Mikroorganisme yang Berperan dalam Fermentasi Biji Kopi Luwak

Beberapa mikroorganisme yang berperan selama proses fermentasi biji kopi dalam sistem saluran pencernaan binatang luwak yaitu khamir dan bakteri. Untuk mengetahui adanya pertumbuhan mikroorganisme tersebut, dilakukan dengan cara isolasi. Untuk pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan media (PGY)-CaCO₃/MRS, dan untuk pertumbuhan khamir dengan media MEA. Jumlah mikroorganisme yang berperan tersebut dapat dilihat pada Tabel 3. Semakin banyak pengenceran maka jumlah koloni mikroorganisme pada pengenceran terakhir akan semakin sedikit.

Pada awal proses fermentasi dalam kondisi anaerob atau sedikit O₂, biji kopi yang matang memiliki kadar gula yang tinggi, sehingga merupakan kondisi yang cocok bagi pertumbuhan khamir. Oleh karena itu, pada awal proses fermentasi banyak ditemukan khamir.

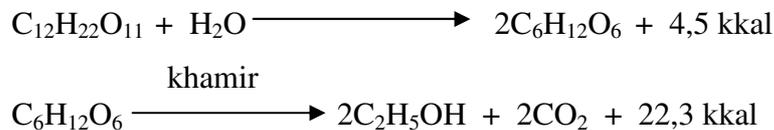
Tabel 3 Jumlah Mikroorganisme pada Biji Kopi Luwak

Pengamatan	Media	Isolat	Pengenceran					
			10 ⁻⁶ (1)	10 ⁻⁶ (2)	10 ⁻⁷ (1)	10 ⁻⁷ (2)	10 ⁻⁸ (1)	10 ⁻⁸ (2)
Bakteri	PGY-CaCO ₃	1	1,10 x 10 ⁷	8,00 x 10 ⁶	7,00 x 10 ⁷	*	-	-
		2	*	7,00 x 10 ⁶	*	4,00 x 10 ⁷	-	-
Bakteri	MRS	1	9,00 x 10 ⁶	8,00 x 10 ⁶	*	*	3,00 x 10 ⁸	-
		2	7,00 x 10 ⁶	4,00 x 10 ⁶	3,00 x 10 ⁷	-	-	-
Khamir	MEA	1	*	2,1 x 10 ⁷	9,00 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁸	3,00 x 10 ⁸	-
		2	6,00 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁷	*	5,00 x 10 ⁷	-	-

Keterangan:

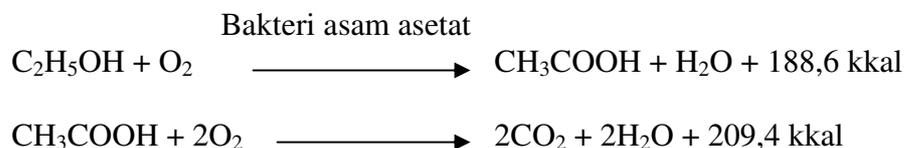
- * : Pada bakteri terdapat jenis bakteri yang tidak diinginkan
Pada khamir terdapat adanya kapang
- : Tidak terjadi pertumbuhan mikroba

Gula sebagai substrat bagi mikroorganisme akan dipecah menjadi alkohol oleh khamir. Proses pemecahan gula menjadi alkohol dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Proses Pemecahan Gula Menjadi Alkohol

Pada fermentasi selanjutnya, alkohol yang terbentuk akan dipecah menjadi asam asetat oleh aktivitas bakteri asam asetat (Gambar 4.2) (Soenaryo dan Situmorang, 1978).



Gambar 4.2 Reaksi Pemecahan Alkohol Menjadi Asam Asetat oleh Bakteri Asam Asetat.

Dalam kondisi anaerob terjadi pula fermentasi asam laktat, yang hasil akhirnya adalah asam laktat. Reaksinya sebagai berikut:

1. Glukosa $\xrightarrow{\text{enzim}}$ asam piruvat (proses Glikolisis).
- $$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \xrightarrow{\text{enzim}} 2\text{C}_2\text{H}_3\text{OCOOH} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH}_2$$

2. Dehidrogenasi asam piruvat akan terbentuk asam laktat



piruvat dehidrogenasa

4.3 Isolasi dan Identifikasi Mikroorganisme

Mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi biji kopi luwak, diisolasi dari biji kopi yang telah melalui sistem saluran pencernaan binatang luwak (kotoran luwak yang berupa biji kopi), dengan menggunakan media PGY-CaCO₃/MRS (Tabel 4).

Tabel 4. Sumber Isolat Bakteri

No	Media	Isolasi	Pengenceran	Kode
1	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (1)	BP1a1
2	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (1)	BP1a2
3	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (1)	BP1a3
4	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (1)	BP1a4
5	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (2)	BP1b1
6	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (2)	BP1b2
7	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁶ (2)	BP1b3
8	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁷ (1)	BP1c1
9	PGY-CaCO ₃	1	10 ⁻⁷ (1)	BP1c2
10	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁶ (2)	BP2b1
11	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁶ (2)	BP2b2
12	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁶ (2)	BP2b3
13	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁶ (2)	BP2b4
14	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁷ (2)	BP2d1
15	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁷ (2)	BP2d2
16	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁷ (2)	BP2d3
17	PGY-CaCO ₃	2	10 ⁻⁷ (2)	BP2d4
18	MRS	1	10 ⁻⁶ (1)	BM1a1
19	MRS	1	10 ⁻⁶ (1)	BM1a2
20	MRS	1	10 ⁻⁶ (1)	BM1a3
21	MRS	1	10 ⁻⁶ (1)	BM1a4
22	MRS	1	10 ⁻⁶ (1)	BM1a5
23	MRS	1	10 ⁻⁶ (2)	BM1b1
24	MRS	1	10 ⁻⁶ (2)	BM1b2
25	MRS	1	10 ⁻⁶ (2)	BM1b3
26	MRS	1	10 ⁻⁶ (2)	BM1b4
27	MRS	1	10 ⁻⁸ (1)	BM1e1
28	MRS	1	10 ⁻⁸ (1)	BM1e2
29	MRS	2	10 ⁻⁶ (1)	BM2a1
30	MRS	2	10 ⁻⁶ (1)	BM2a2
31	MRS	2	10 ⁻⁶ (1)	BM2a3
32	MRS	2	10 ⁻⁶ (1)	BM2a4
33	MRS	2	10 ⁻⁶ (1)	BM2a5
34	MRS	2	10 ⁻⁶ (2)	BM2b1
35	MRS	2	10 ⁻⁶ (2)	BM2b2

36	MRS	2	10 ⁻⁶ (2)	BM2b3
37	MRS	2	10 ⁻⁶ (2)	BM2b4
38	MRS	2	10 ⁻⁶ (2)	BM2b5
39	MRS	2	10 ⁻⁷ (1)	BM2c1
40	MRS	2	10 ⁻⁷ (1)	BM2c2
41	MRS	2	10 ⁻⁷ (1)	BM2c3
42	MRS	2	10 ⁻⁷ (1)	BM2c4

Keterangan:

B : Bakteri	10 ⁻⁶ (1): a
P : PGY-CaCO ₃	10 ⁻⁶ (2): b
M: MRS	10 ⁻⁷ (1): c
1 : isolasi 1	10 ⁻⁷ (2): d
2 : isolasi 2	10 ⁻⁸ (1): e
	10 ⁻⁸ (2): f

Dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa untuk pertumbuhan bakteri digunakan media PGY-CaCO₃ dan MRS, terutama untuk mengisolasi bakteri penghasil asam, yaitu bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat yang sering ditemukan dalam proses fermentasi biji kopi. Pada media PGY-CaCO₃, pertumbuhan bakteri penghasil asam ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitarnya. Zona bening tersebut terbentuk akibat reaksi yang terjadi antara CaCO₃ dengan asam yang dihasilkan bakteri. Dari hasil isolasi yang ditunjukkan pada Tabel 4.2 terdapat 17 isolat bakteri yang memberikan zona bening disekitarnya. Pada media MRS, pertumbuhan bakteri penghasil asam tampak berwarna putih. Dari hasil isolasi terdapat 25 isolat bakteri yang diduga sebagai bakteri penghasil asam.

Setiap isolat ditumbuhkan pada media agar tegak PGY-CaCO₃/MRS dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam (Tabel 5). Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa setiap isolat dapat tumbuh dengan baik pada media PGY-CaCO₃/MRS.

Tabel 5. Pertumbuhan Isolat Bakteri pada Media Agar Tegak (PGY-CaCO₃)/ MRS

No	Kode Isolat bakteri	Pertumbuhan
1	BP1a1	+++
2	BP1a2	+
3	BP1a3	+++
4	BP1a4	+++
5	BP1b1	+++
6	BP1b2	+++
7	BP1b3	++
8	BP1c1	+++

9	BP1c2	+++
10	BP2b1	+++
11	BP2b2	+++
12	BP2b3	+
13	BP2b4	+
14	BP2d1	+++
15	BP2d2	+++
16	BP2d3	+++
17	BP2d4	+++
18	BM1a1	++++
19	BM1a2	+++
20	BM1a3	++++
21	BM1a4	+++
22	BM1a5	+++
23	BM1b1	+++
24	BM1b2	++
25	BM1b3	+
26	BM1b4	++
27	BM1e1	+++
28	BM1e2	+++
29	BM2a1	+++
30	BM2a2	++
31	BM2a3	+++
32	BM2a4	+++
33	BM2a5	+++
34	BM2b1	++
35	BM2b2	+
36	BM2b3	++
37	BM2b4	+++
38	BM2b5	+++
39	BM2c1	++
40	BM2c2	++
41	BM2c3	+++
42	BM2c4	++

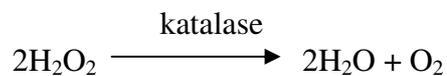
Selanjutnya seluruh isolat tersebut diidentifikasi, yang meliputi: bentuk, pewarnaan gram, uji CO₂, uji katalase, pertumbuhan pada suhu yang berbeda, reaksi dengan Litmus Milk, produksi dekstran dari sukrosa, produksi amonia dari arginin, pertumbuhan pada konsentrasi garam yang berbeda, kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat dan kemampuan memproduksi asam.

Pada uji pewarnaan Gram, dapat dibedakan sifat Gram bakteri. Bakteri Gram positif akan menunjukkan warna akhir biru/ungu, sedangkan bakteri Gram negatif menunjukkan warna merah. Hal ini karena pada bakteri Gram positif mempunyai lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan bakteri Gram negatif. Pada saat pencucian dengan alkohol, pada bakteri Gram positif karena tebalnya lapisan

peptidoglikan akan tetap mampu mempertahankan warna ungu/biru yang terbentuk dari reaksi sebelumnya, yaitu reaksi antara kristal violet dan yodium membentuk senyawa kompleks kristal violet-yodium. Sedangkan pada bakteri Gram negatif, lapisan peptidoglikannya tidak mampu mempertahankan warna biru, sehingga warna sel menjadi merah setelah penambahan safranin.

Pengamatan tersebut dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Pada saat pengamatan dibawah mikroskop dapat pula diamati bentuk dari isolat yaitu ada yang bulat (coccus) dan ada yang berbentuk batang (bacil).

Pada uji katalase, dilakukan dengan penambahan H₂O₂ 3% Isolat dapat digolongkan dalam katalase positif jika dari isolat tersebut timbul gelembung-gelembung udara setelah penambahan H₂O₂. Gelembung-gelembung udara tersebut terjadi karena dibebaskannya oksigen, yang mengindikasikan adanya enzim katalase dalam diri isolat. Enzim ini mampu memecah H₂O₂ (hidrogen peroksida) menjadi H₂O dan O₂ (gelembung udara). Reaksinya dapat digambarkan sebagai berikut: (Alcamo, 1983)



Hasil pengamatan uji pewarnaan Gram dan uji katalase dapat dilihat pada Tabel 6 sebagai berikut:

Tabel 6. Hasil Uji Pewarnaan Gram dan Adanya Katalase

No	Kode Isolat Bakteri	Bentuk	Pewarnaan Gram			Katalase
			Metode Konvensional		Menggunakan KOH 3%	
			Warna Gram	Gram		
1	BP1a1	kokus	ungu	+	+	-
2	BP1a2	kokus	biru	+	+	-
3	BP1a3	kokus	biru	+	+	+++
4	BP1a4	kokus	biru	+	+	-
5	BP1b1	batang	biru	+	-	-
6	BP1b2	kokus	ungu	+	+	++
7	BP1b3	batang	ungu	+	-	-
8	BP1c1	kokus	biru	+	+	+
9	BP1c2	kokus	ungu	+	+	+++

10	BP2b1	kokus	biru	+	+	++
11	BP2b2	kokus	ungu	+	+	+
12	BP2b3	batang	ungu	+	+	-
13	BP2b4	kokus	ungu	+	+	-
14	BP2d1	kokus	biru	+	+	+
15	BP2d2	batang	ungu	+	+	-
16	BP2d3	batang	ungu	+	+	-
17	BP2d4	kokus	biru	+	-	-
18	BM1a1	kokus	ungu	+	+	-
19	BM1a2	kokus	ungu	+	+	-
20	BM1a3	batang	ungu	+	+	-
21	BM1a4	kokus	biru	+	+	-
22	BM1a5	batang	biru	+	+	-
23	BM1b1	kokus	ungu	+	+	-
24	BM1b2	kokus	biru	+	+	-
25	BM1b3	kokus	biru	+	+	-
26	BM1b4	batang	ungu	+	+	-
27	BM1e1	batang	ungu	+	+	-
28	BM1e2	kokus	biru	+	+	-
29	BM2a1	kokus	ungu	+	+	-
30	BM2a2	kokus	ungu	+	+	-
31	BM2a3	kokus	ungu	+	+	+
32	BM2a4	kokus	ungu	+	+	-
33	BM2a5	kokus	ungu	+	+	-
34	BM2b1	batang	biru	+	+	-
35	BM2b2	batang	ungu	+	+	-
36	BM2b3	batang	ungu	+	+	-
37	BM2b4	kokus	ungu	+	+	-
38	BM2b5	kokus	ungu	+	+	+
39	BM2c1	batang	ungu	+	+	-
40	BM2c2	kokus	biru	+	+	-
41	BM2c3	batang	biru	+	+	-
42	BM2c4	kokus	ungu	+	+	-

Pada uji pewarnaan Gram, seluruh isolat bakteri yang diuji menunjukkan reaksi Gram positif. Sedangkan pada uji katalase, ada 33 isolat dari 42 isolat yang menunjukkan reaksi katalase negatif. Hal ini menunjukkan bahwa 33 isolat tersebut tidak memiliki enzim katalase yang berfungsi memecah H₂O₂. Isolat dengan reaksi Gram positif dan katalase negatif tersebut, diduga sebagai bakteri asam laktat. Sedangkan 9 isolat dengan reaksi Gram positif dan katalase positif, diduga sebagai bakteri dari famili Micrococcaceae, meliputi: *Micrococcus*, *Staphilococcus*, dan *Planacoccus* (Gibbons dan Buchanan, 1974).

Pada pengamatan bentuk isolat, menurut Sneath et al (1986), dalam Rahayu et al., 2000a) bahwa kelompok BAL yang berbentuk batang, Gram positif, dan katalase negatif merupakan BAL dari genus *Lactobacillus*. Dari isolat yang diuji

tersebut ada 14 isolat yang sesuai dengan karakteristik tersebut. Bakteri ini mempunyai ciri khas pertumbuhan berwarna putih susu, baik pada media agar MRS maupun PGY. Sedangkan isolat BAL yang berbentuk kokus, diduga sebagai bakteri asam laktat dari genus *Streptococcus*, *Lactococcus*, atau *Leuconostoc* (Gibbons dan Buchanan, 1974).

Pada uji CO₂, isolat yang mampu membentuk gas CO₂ hanya ada 5 isolat, yang ditunjukkan dengan adanya gelembung udara pada tabung durham. Hasil uji CO₂ dapat dilihat pada Tabel 7 sebagai berikut:

Tabel 7. Hasil Uji CO₂

No	Kode Isolat bakteri	Gas CO ₂
1	BP1a1	-
2	BP1a2	-
3	BP1a3	-
4	BP1a4	-
5	BP1b1	-
6	BP1b2	-
7	BP1b3	-
8	BP1c1	-
9	BP1c2	-
10	BP2b1	-
11	BP2b2	-
12	BP2b3	-
13	BP2b4	-
14	BP2d1	-
15	BP2d2	-
16	BP2d3	-
17	BP2d4	-
18	BM1a1	-
19	BM1a2	-
20	BM1a3	-
21	BM1a4	-
22	BM1a5	-
23	BM1b1	-
24	BM1b2	-
25	BM1b3	-
26	BM1b4	-
27	BM1e1	-
28	BM1e2	-
29	BM2a1	-
30	BM2a2	-
31	BM2a3	-
32	BM2a4	-
33	BM2a5	-
34	BM2b1	CO ₂
35	BM2b2	-
36	BM2b3	CO ₂
37	BM2b4	-

38	BM2b5	-
39	BM2c1	CO ₂
40	BM2c2	-
41	BM2c3	CO ₂
42	BM2c4	CO ₂

Dari Tabel 7 dapat diketahui bahwa sebagian isolat tersebut menghasilkan suatu produk yaitu CO₂. Suatu bakteri selain menghasilkan CO₂ pada umumnya juga dapat memproduksi asam laktat, etanol, asam asetat, dan senyawa-senyawa lainnya. Kelompok BAL tersebut disebut bakteri asam laktat heterofermentatif, seperti *Leuconostoc* dan beberapa species *Lactobacillus*. Sedangkan BAL yang hanya menghasilkan satu jenis produk (asam laktat) disebut BAL homofermentatif. Contoh dari bakteri ini adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*.

Pada uji pertumbuhan pada variasi suhu (15°C, 37°C, 45°C), hal ini karena setiap mikroorganisme memiliki suhu pertumbuhan optimum yang berbeda. Seperti yang diketahui bahwa ada tiga kelompok suhu yang dibutuhkan mikroorganisme untuk tumbuh yaitu psikofilik (7°C-30°C), mesofilik (30°C-40°C) dan termofilik (45°C-30°C) (Suwasono dan Jayus, 2006). Untuk mengetahui kemampuan isolat BAL tumbuh pada suhu yang berbeda, maka seluruh isolat ditumbuhkan pada media MRS Broth, kemudian diinkubasi pada suhu 15°C, 37°C dan 45°C selama 48 jam. Pertumbuhan BAL ditandai dengan adanya endapan pada ependrof (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil Uji Pertumbuhan Bakteri pada Variasi Suhu

No	Kode Isolat bakteri	Suhu (°C)		
		15	37	45
1	BP1a1	+	+	+
2	BP1a2	++	+++	++
3	BP1a3	-	+++	+
4	BP1a4	-	++	-
5	BP1b1	++	+	+
6	BP1b2	++	+	+
7	BP1b3	++	++	++
8	BP1c1	+	+	-
9	BP1c2	-	+	+
10	BP2b1	-	+	-
11	BP2b2	++	++++	-
12	BP2b3	++	+++	++
13	BP2b4	++	++++	+
14	BP2d1	++	++	+
15	BP2d2	++	+	++
16	BP2d3	-	+	+
17	BP2d4	-	+	-
18	BM1a1	-	+++	++

19	BM1a2	+	++++	++
20	BM1a3	+	++++	++
21	BM1a4	+	++++	++
22	BM1a5	-	+++	++
23	BM1b1	+	+++	+++
24	BM1b2	-	++	+
25	BM1b3	+	++	++
26	BM1b4	++	++++	+
27	BM1e1	+	+++	+
28	BM1e2	+	++++	+
29	BM2a1	++	++++	++
30	BM2a2	-	++++	+
31	BM2a3	+	+++	+
32	BM2a4	+	++++	+++
33	BM2a5	+	++++	++
34	BM2b1	-	+++	-
35	BM2b2	+	++	+
36	BM2b3	-	++	++
37	BM2b4	+	+++	+++
38	BM2b5	-	++++	+++
39	BM2c1	-	+++	+
40	BM2c2	+	+++	+
41	BM2c3	-	++++	++
42	BM2c4	-	+++	+

Dari tabel 8 dapat diketahui bahwa seluruh isolat dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37°C. Hal ini karena suhu 37°C merupakan suhu optimum bagi pertumbuhan hampir sebagian besar mikroorganisme, termasuk bakteri asam laktat. Pada suhu 15°C ada 17 isolat yang tidak tumbuh dan pada suhu 45°C ada 6 isolat yang tidak tumbuh.

Menurut Budiyanto (2002), spesies *Lactobacillus* yang umumnya tumbuh pada suhu 45°C atau lebih, dan tidak dapat tumbuh pada suhu 20°C maupun suhu 15°C adalah *L.lactis*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. achidhopilus* dan *L. fermentum*. Sedangkan spesies *Lactobacillus* yang dapat tumbuh pada suhu 45°C serta pada suhu 15°C yaitu *L. xylosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. cellobiosus* dan *L. homohiochii*. Spesies yang dapat tumbuh pada suhu 15°C tetapi tidak dapat tumbuh pada suhu 45°C adalah *L. brevis*, *L. buchneri*, dan *L. coprophilus*.

Menurut Suwasono dan Jayus (2006), salah satu bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus* merupakan bakteri psikofilik yang dapat tumbuh baik pada suhu penyimpanan lemari pendingin, dan hampir semua mikroorganisme termofilik dalam bahan pangan adalah genus *Bacillus* dan *Clostridium*.

Kemampuan produksi asam dapat dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium Litmus Milk. Pada uji reaksi dengan Litmus Milk akan terjadi fenomena, yaitu: (a) pemisahan whey atau penggumpalan susu karena adanya enzim proteolitik, dengan tanpa pembentukan asam sehingga warna litmus tetap biru, (b) pembentukan asam dengan atau tanpa penggumpalan susu yang ditandai dengan perubahan warna litmus menjadi merah muda, dan (c) pembentukan gas yang ditandai dengan adanya gelembung-gelembung. Dari reaksi dengan Litmus Milk, diketahui bahwa seluruh isolat bakteri dapat menghasilkan asam, yang ditandai dengan perubahan warna litmus menjadi merah muda (Tabel 9).

Tabel 9. Hasil Uji Produksi Asam dengan Litmus Milk

No	Kode Isolat bakteri	Pertumbuhan	Endapan	Hasil
1	BP1a1	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
2	BP1a2	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+	++
3	BP1a3	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	++	+
4	BP1a4	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
5	BP1b1	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
6	BP1b2	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	+
7	BP1b3	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	++	++
8	BP1c1	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
9	BP1c2	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
10	BP2b1	Pemisahan/enggumpalan susu,atas merah muda jernih, bawah merah muda keruh	+++	+++
11	BP2b2	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
12	BP2b3	Pemisahan/enggumpalan susu,atas merah muda jernih, bawah merah muda keruh	++	+++
13	BP2b4	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda	+	++
14	BP2d1	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
15	BP2d2	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
16	BP2d3	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
17	BP2d4	Pemisahan/enggumpalan susu, atas biru, bawah merah muda/kecoklatan	+++	++
18	BM1a1	Pemisahan/enggumpalan susu, merah muda/kecoklatan	+++	++++
19	BM1a2	Pemisahan/enggumpalan susu, atas merah muda, bawah merah muda keruh	+++	+++
20	BM1a3	Pemisahan/enggumpalan susu, merah muda	+++	++++

21	BM1a4	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
22	BM1a5	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
23	BM1b1	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
24	BM1b2	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	+
25	BM1b3	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
26	BM1b4	Pemisahan/penggumpalan susu, atas merah muda, bawah merah muda keruh	++++	+++
27	BM1e1	Pemisahan/penggumpalan susu, merah muda jernih, bawah merah muda keruh	+++	+++
28	BM1e2	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++++	++
29	BM2a1	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	+
30	BM2a2	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++++	+
31	BM2a3	Pemisahan/penggumpalan susu, merah muda jernih, bawah merah muda keruh	+++	+++
32	BM2a4	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++++	++
33	BM2a5	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+	++
34	BM2b1	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
35	BM2b2	Pemisahan/penggumpalan susu, atas merah muda, bawah merah muda keruh	+++	+++
36	BM2b3	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++++	+
37	BM2b4	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
38	BM2b5	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
39	BM2c1	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	+++	++
40	BM2c2	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++++	++
41	BM2c3	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++	++
42	BM2c4	Pemisahan/penggumpalan susu, atas ungu, bawah merah muda	++++	++

Keterangan: + —————> +++: semakin banyak gumpalan/endapan semakin besar kemampuan produksi asam

Pada Tabel 9 diketahui bahwa isolat BP1a2, BP1b2, BM1b2, BM2a1, dan BM2a2 memiliki kemampuan produksi asam yang kurang kuat. Hal ini dilihat dari medium litmus yang tidak sepenuhnya berubah menjadi warna merah atau perbandingan warna biru/ungu masih lebih banyak dari isolat yang lain. Sedangkan isolat yang memiliki kemampuan produksi asam yang paling kuat yaitu pada isolat

BP2b1, BP2b3, BM1a1, BM1a2, BM1a3, BM1b4, BM1e1, BM2a3, dan BM2b2. Hal ini terlihat karena medium litmus yang sepenuhnya berubah menjadi warna merah.

Pada uji produksi dekstran dari sukrosa, yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan isolat BAL dari genus *Leuconostoc*, seluruh isolat ditumbuhkan pada media sukrosa agar. Jika terjadi pertumbuhan, BAL termasuk dalam jenis *Leuconostoc*. Bakteri dari Genus *Leuconostoc* mampu mendegradasi sukrosa menjadi dekstran, dengan bantuan enzim dekstran sukrase. Suatu bakteri yang tumbuh akan membentuk kapsul/lendir dekstran jika ditumbuhkan pada medium yang mengandung sukrosa, karena enzim dekstran sukrase menggunakan sukrosa sebagai substrat. Kapsul/lendir tersebut terdiri atas polisakarida, polipeptida atau kompleks polisakarida-protein (Suwasono, 2005). Kapsul/lendir tersebut tidak berperan dalam pertumbuhan sel, tetapi dapat berperan bagi sel dalam menyesuaikan diri terhadap lingkungan hidupnya, terutama pada kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti sumber karbon yang berlebihan dalam media pertumbuhannya.

Menurut Edward dan James (1945), bahwa konsentrasi sukrosa yang dibutuhkan bakteri untuk pertumbuhan dan memproduksi asam adalah sebesar 1%. Sedangkan pada media sukrosa agar, konsentrasi sukrosa yang digunakan sebesar 5%. Hal ini menyebabkan bakteri yang ditumbuhkan pada media sukrosa agar tersebut harus dapat menyesuaikan diri pada lingkungan yang kadar sukrosanya tinggi dengan membentuk kapsul/lendir dekstran. Produksi dekstran ditandai dengan adanya pertumbuhan atau terbentuknya lendir pada cawan (Tabel 10).

Tabel 10. Hasil Pengujian Produksi Dekstran dari Sukrosa

No	Kode Isolat bakteri	Produksi Dekstran
1	BP1a1	++
2	BP1a2	+++
3	BP1a3	++
4	BP1a4	+++
5	BP1b1	-
6	BP1b2	-
7	BP1b3	-
8	BP1c1	+
9	BP1c2	++
10	BP2b1	+
11	BP2b2	-
12	BP2b3	-
13	BP2b4	++
14	BP2d1	+
15	BP2d2	-

16	BP2d3	-
17	BP2d4	+++
18	BM1a1	-
19	BM1a2	-
20	BM1a3	-
21	BM1a4	-
22	BM1a5	-
23	BM1b1	-
24	BM1b2	-
25	BM1b3	-
26	BM1b4	-
27	BM1e1	-
28	BM1e2	-
29	BM2a1	+
30	BM2a2	-
31	BM2a3	-
32	BM2a4	-
33	BM2a5	++
34	BM2b1	+
35	BM2b2	+
36	BM2b3	-
37	BM2b4	-
38	BM2b5	-
39	BM2c1	-
40	BM2c2	+
41	BM2c3	-
42	BM2c4	+

Dari Tabel 10 terdapat 16 isolat BAL yang diduga berasal dari genus *Leuconostoc* yaitu BP1a1, BP1a2, BP1a3, BP1a4, BP1c1, BP1c2, BP2b1, BP2b4, BP2d1, BP2d4, BM2a1, BM2a5, BM2b1, BM2b2, BM2c2 dan BM2c4. Menurut Budiyanto (2002), spesies *Leuconostoc* yang tahan terhadap konsentrasi gula tinggi (55-60%) yaitu *Leuconostoc mesenteroides*. Namun adapula spesies *Leuconostoc* yang tidak mampu memproduksi dekstran dari sukrosa, seperti *Leuconostoc paramesenteroides*, *L. Lactis*, *L. cremoris*, dan *L. oenos*.

Pada pengujian selanjutnya yaitu untuk membedakan genus *Streptococcus* dengan *Leuconostoc*. Hal ini dilakukan dengan menumbuhkan isolat BAL pada media Arginin Broth. Jika isolat BAL mampu menghidrolisis arginin, maka dapat digolongkan dalam genus *Streptococcus*, sebaliknya jika isolat BAL tidak mampu menghidrolisis arginin digolongkan dalam genus *Leuconostoc*.

Sedangkan untuk membedakan *Lactobacillus homofermentatif* dengan *Lactobacillus heterofermentatif*, isolat BAL ditumbuhkan pada media MRS Arginin

Broth. Jika mampu memproduksi amonia dari arginin maka termasuk dalam *Lactobacillus heterofermentatif*, sebaliknya jika tidak mampu memproduksi amonia dari arginin termasuk dalam *Lactobacillua homofermentatif*. Kemampuan isolat BA1 dalam memproduksi amonia dari arginin dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Produksi Amonia dari Arginin

No	Kode Isolat bakteri	Produksi Amonia dari Arginin	
		MRS Arg-B	Arg-Broth
1	BP1a1	-	-
2	BP1a2	-	+
3	BP1a3	+	+
4	BP1a4	-	-
5	BP1b1	-	-
6	BP1b2	-	-
7	BP1b3	-	-
8	BP1c1	-	-
9	BP1c2	-	-
10	BP2b1	-	-
11	BP2b2	-	-
12	BP2b3	+	-
13	BP2b4	-	+
14	BP2d1	-	-
15	BP2d2	-	-
16	BP2d3	-	-
17	BP2d4	+	-
18	BM1a1	-	-
19	BM1a2	-	-
20	BM1a3	-	-
21	BM1a4	-	+
22	BM1a5	-	-
23	BM1b1	-	-
24	BM1b2	-	+
25	BM1b3	-	+
26	BM1b4	-	-
27	BM1e1	-	-
28	BM1e2	-	-
29	BM2a1	-	-
30	BM2a2	-	-
31	BM2a3	-	-
32	BM2a4	-	-
33	BM2a5	-	-
34	BM2b1	+	-
35	BM2b2	-	+
36	BM2b3	+	-
37	BM2b4	-	-
38	BM2b5	-	-
39	BM2c1	+	-
40	BM2c2	+	-
41	BM2c3	+	-
42	BM2c4	+	-

Keterangan: + → mampu memproduksi amonia dari arginin

Dari Tabel 11, isolat yang menggunakan media MRS Arginin Broth sebagian mampu memproduksi amonia dari arginin. Namun sesuai dugaan sebelumnya jika dilihat dari bentuk sel yang termasuk dalam bentuk batang, karena *Lactobacillus* merupakan sel yang berbentuk batang, maka yang termasuk *Lactobacillus homofermentatif* yaitu BP1b1, BP1b3, BP2d2, BP2d3, BM1a3, BM1a5, BM1b4, BM1e1 dan BM2b2, sedangkan yang termasuk *Lactobacillus heterofermentatif* yaitu BP2b3, BM2b1, BM2b3, BM2c1, dan BM2c3.

Pada isolat yang menggunakan media Arginin Broth terdapat 7 isolat yang mampu memproduksi amonia dari arginin, dan bila ditinjau dari bentuknya ada 6 isolat yang berbentuk kokus yaitu BP1a2, BP1a3, BP2b4, BM1a4, BM1b2 dan BM1b3. Maka ke-6 isolat tersebut termasuk dalam genus *Streptococcus*. Menurut Bergey's, genus *Streptococcus* yang mampu tumbuh pada suhu 15°C dan 45°C, diduga sebagai *Streptococcus faecium*. Jadi isolat yang diduga sebagai *Streptococcus faecium* yaitu BP1a2, BP2b4, BM1a4, BM1b2 dan BM1b3. Sedangkan isolat lainnya dengan bentuk kokus diduga termasuk dalam genus *Leuconostoc*.

Pada pengujian selanjutnya yaitu uji pertumbuhan pada konsentrasi garam yang berbeda. Hal ini karena setiap mikroorganisme memiliki resistensi yang berbeda terhadap kadar garam. Pengujian ini dilakukan dengan menumbuhkan isolat BAL pada media MRS-Broth yang didalamnya telah ditambahkan garam (NaCl) dengan konsentrasi 4% dan 6,5%, sebagai kontrol digunakan media MRS-Broth tanpa garam (Tabel 12).

Tabel 12. Hasil Uji Pertumbuhan pada Variasi Konsentrasi Garam

No	Kode Isolat bakteri	Kadar Garam		
		Kontrol (0%)	4%	6,5%
1	BP1a1	+++	+++	++
2	BP1a2	+++	+++	+
3	BP1a3	+++	++	-
4	BP1a4	+++	+++	-
5	BP1b1	+++	+++	+
6	BP1b2	+++	++	+
7	BP1b3	+++	+++	++
8	BP1c1	+++	++	+
9	BP1c2	+++	+++	+
10	BP2b1	+++	+++	+
11	BP2b2	+++	++	+
12	BP2b3	+++	+++	+
13	BP2b4	+++	+++	+

14	BP2d1	+++	++	+
15	BP2d2	+++	+++	+
16	BP2d3	+++	++	+
17	BP2d4	+++	+++	+
18	BM1a1	++++	+++	++
19	BM1a2	++++	++++	+++
20	BM1a3	+++	++++	+++
21	BM1a4	+++	++++	+++
22	BM1a5	++++	+++	++
23	BM1b1	+++	+++	++
24	BM1b2	+++	++	+
25	BM1b3	+++	+++	+
26	BM1b4	++++	++++	+++
27	BM1e1	+++	++++	+++
28	BM1e2	+++	+++	++
29	BM2a1	++++	++++	+++
30	BM2a2	++++	+++	+++
31	BM2a3	+++	++++	++
32	BM2a4	+++	+++	+
33	BM2a5	++	+	+
34	BM2b1	+++	+++	+
35	BM2b2	+++	+++	+
36	BM2b3	+++	++	+
37	BM2b4	++++	+++	+++
38	BM2b5	++++	+++	+
39	BM2c1	+++	++	+
40	BM2c2	+++	+++	+
41	BM2c3	+++	++	+
42	BM2c4	++++	+++	++

Dari Tabel 12 diketahui bahwa pada kontrol dan konsentrasi garam 4% pertumbuhan isolat BAL dapat tumbuh dengan baik, namun pada konsentrasi garam 6,5% sebagian besar tidak dapat tumbuh dengan baik. Hal ini karena dengan konsentrasi garam yang rendah memberikan kondisi yang isotonik dan juga fisiologis bagi mikroorganisme, karena jumlah NaCl dan air sama pada kedua sisi membran sel, sehingga air bergerak melalui membran sel bersamaan dari kedua arah. Namun jika isolat ditumbuhkan pada konsentrasi garam yang tinggi, maka konsentrasi air dalam sel jauh lebih besar dibandingkan di luar sel, sehingga terjadi plasmolisis dimana air sel keluar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme sampai kematian (Suwasono dan Jayus, 2006). Bakteri asam laktat dari genus *Leuconostoc* yang mempunyai sifat tahan garam yaitu *Leuconostoc mesenteroides*. Isolat BAL BP1a1, BP2d4, BM2a1, BM2a5, BM2c2 dan BM2c4 diduga sebagai *Leuconostoc*

mesenteroides. Sedangkan *Leuconostoc* yang tidak tahan terhadap garam yaitu *Leuconostoc dextranicum*, dan isolat BAL yang diduga yaitu BP1a4.

Setiap mikroorganisme membutuhkan nutrisi yang berbeda untuk pertumbuhannya, dan tidak semua mikroorganisme mampu memfermentasi setiap jenis karbohidrat. Oleh karena itu dapat dilakukan uji kemampuan memfermentasi karbohidrat dengan menumbuhkan isolat BAL pada media PGY-Broth yang masing-masing dimodifikasi dengan penambahan glukosa, arabinosa, manitol, sukrosa, fruktosa dan maltosa. Hasil uji kemampuan isolat dalam memfermentasi berbagai jenis karbohidrat dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Kemampuan Memfermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat

No	Kode Isolat bakteri	Arabinosa	Manitol	Sukrosa	Fruktosa	Glukosa	Maltosa
1	BP1a1	+	+	+	+	++	+
2	BP1a2	+	+	+	+	+	+
3	BP1a3	+	+	+	++	++	+
4	BP1a4	+	+	+	++	++	+
5	BP1b1	+	++	+	+	+++	+
6	BP1b2	+	+	+	+	+	+
7	BP1b3	+	+	+	++	++	+
8	BP1c1	+	++	+	++	+	+
9	BP1c2	+	++	+	++	+	+
10	BP2b1	+	+	+	++	+	+
11	BP2b2	+	+	++	+	++	+
12	BP2b3	+	+	+	++	+	+
13	BP2b4	+	+	+	+++	++	++
14	BP2d1	+	+	+	++	++	+
15	BP2d2	+	+	+	+	++	+
16	BP2d3	++	+	++	++	+	+
17	BP2d4	++	+	+	+	++	+
18	BM1a1	++	+	+	+++	+++	++
19	BM1a2	++	++	+++	++	+++	+++
20	BM1a3	++	+	+++	+	++	++
21	BM1a4	+	+	++	++	+	++
22	BM1a5	++	++	+++	+++	++	+++
23	BM1b1	++	+	++	+++	++	+++
24	BM1b2	+	+	+	+	++	+
25	BM1b3	+	+	++	++	++	++
26	BM1b4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
27	BM1e1	++	++	++	+++	++	++
28	BM1e2	++	++	++	++	++	++
29	BM2a1	++	++	+++	+++	+++	+++
30	BM2a2	+	+	++	++	++	++
31	BM2a3	+	++	++	++	+++	++
32	BM2a4	+	+	+	++	++	++
33	BM2a5	+	+	++	+++	+++	++
34	BM2b1	+	+	++	+++	+++	+++
35	BM2b2	+	+	++	++	++	++

36	BM2b3	++	+	++	+++	++	++
37	BM2b4	+	+	+	++	++	+
38	BM2b5	++	++	+++	+++	+++	+++
39	BM2c1	++	+	+	+++	+++	+++
40	BM2c2	++	++	++	+++	++	++
41	BM2c3	++	++	++	+++	++	+++
42	BM2c4	++	++	+	+++	+++	+++

Dari Tabel 13 dapat diketahui bahwa seluruh isolat BAL mampu memfermentasi semua jenis karbohidrat. Namun sebagian besar isolat mampu memfermentasi dengan baik pada jenis karbohidrat glukosa dan fruktosa. Sedangkan tidak mampu memfermentasi dengan baik pada jenis karbohidrat arabinosa dan manitol.

Pada uji sebelumnya, terdapat isolat yang tidak mampu memproduksi dekstran dari sukrosa sehingga diduga termasuk dalam spesies *Leuconostoc paramesenteroides*, *L. Lactis*, *L. cremoris*, dan *L. oenos*. Menurut Gibbons dan Buchanan (1974) dalam Bergey's Manual, bahwa diantara keempat spesies *Leuconostoc* tersebut yang dapat memfermentasi hampir semua jenis karbohidrat adalah *Leuconostoc paramesenteroides*. Maka diduga isolat BAL BM1a1, BM1a2, BM1b1, BM1e2, BM2a2, BM2a4, dan BM2b4 merupakan *Leuconostoc paramesenteroides*.

Sedangkan untuk spesies *Lactobacillus* yang mampu memfermentasi semua jenis karbohidrat yaitu *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, dan *L. buchneri*. Dari ketiga spesies *Lactobacillus* tersebut yang termasuk dalam *Lactobacillus* homofermentatif adalah *Lactobacillus plantarum*. Maka sesuai pengujian sebelumnya dalam membedakan *Lactobacillus* homofermentatif dan heterofermentatif, isolat BAL BP1b1, BP1b3, BP2d2, BP2d3, BM1a3, BM1a5, BM1b4, BM1e1 dan BM2b2, yang termasuk dalam *Lactobacillus* homofermentatif diduga sebagai *Lactobacillus plantarum*. Sedangkan isolat BAL BP2b3, BM2b1, BM2b3, BM2c1, dan BM2c3 yang merupakan *Lactobacillus* heterofermentatif diduga sebagai *Lactobacillus brevis*.

Berdasarkan produk fermentasi yang dihasilkan menurut Salminen dan Wright (1998), bakteri asam laktat digolongkan menjadi dua yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok BAL homofermentatif, produk utamanya <90%

yang dihasilkan adalah asam laktat. Bakteri asam laktat yang termasuk dalam kelompok ini adalah *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Lactobacillus*. Sedangkan kelompok BAL heterofermentatif seperti *Leuconostoc*, akan memecah glukosa menghasilkan $\pm 50\%$ asam laktat dan sisanya dapat berupa etanol, asam asetat, asetaldehid, diasetil, dan CO₂ (Salminen dan Wright, 1998).

Untuk mengetahui kemampuan isolat dalam memproduksi asam laktat dan besarnya total asam yang dihasilkan serta besarnya pH asam maka dilakukan uji kemampuan memproduksi asam yaitu dengan cara isolat ditumbuhkan dalam media sintetik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 hari. Hasil produksi total asam laktat dan besarnya pH dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14 pH dan Total Asam Laktat hasil aktivitas Isolat Bakteri

No	Isolat bakteri	Rerata pH	Rerata Total Asam (%)	No	Isolat bakteri	Rerata pH	Rerata Total Asam (%)
1	BP1a1	3.74	6.35	23	BM1b1	3.56	10.71
2	BP1a2	3.61	6.98	24	BM1b2	4.57	7.16
3	BP1a3	3.72	6.84	25	BM1b3	4.54	6.75
4	BP1a4	3.92	6.93	26	BM1b4	3.48	13.23
5	BP1b1	4.02	6.80	27	BM1e1	3.98	10.40
6	BP1b2	3.97	6.53	28	BM1e2	3.96	6.80
7	BP1b3	3.76	6.84	29	BM2a1	3.52	13.32
8	BP1c1	4.055	6.30	30	BM2a2	3.37	10.04
9	BP1c2	3.91	6.75	31	BM2a3	3.73	11.25
10	BP2b1	4.32	6.62	32	BM2a4	3.61	13.68
11	BP2b2	4.27	6.98	33	BM2a5	3.77	6.08
12	BP2b3	4.06	6.80	34	BM2b1	4.17	8.60
13	BP2b4	4.10	6.98	35	BM2b2	3.37	8.46
14	BP2d1	4.15	6.80	36	BM2b3	3.77	8.64
15	BP2d2	3.75	8.10	37	BM2b4	4.29	6.84
16	BP2d3	4.04	7.20	38	BM2b5	3.74	13.77
17	BP2d4	4.13	6.80	39	BM2c1	3.86	8.33
18	BM1a1	3.38	10.62	40	BM2c2	3.67	8.73
19	BM1a2	3.56	10.35	41	BM2c3	3.94	9.72
20	BM1a3	3.51	11.61	42	BM2c4	3.76	7.92
21	BM1a4	3.44	11.07	43	Kontrol	8.14	0
22	BM1a5	3.45	11.07				

Keterangan: kontrol = media tanpa BAL

Dari Tabel 14 dapat diketahui bahwa total asam berkisar antara 6,3%-13,77%. Hasil yang diperoleh mengenai kadar keasaman ini berbeda-beda pada berbagai macam penelitian karena berbagai faktor yang mempengaruhinya antara lain umur kultur yang digunakan, waktu dan suhu inkubasi. Sedangkan pada pengukuran pH diketahui bahwa pH rata-rata isolat BAL berkisar antara 3.37-4.565.

Rendahnya nilai pH ini menunjukkan tingkat keasaman yang tinggi dari media, sebagai akibat produksi asam oleh isolat selama pertumbuhannya.

Menurut hasil identifikasi yang telah dilakukan, dapat diketahui beberapa karakteristik dari seluruh isolat (Tabel 15, terlampir). Berdasarkan hasil pengujian morfologi, biokimia, fisiologi, dan tipe fermentasi yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa isolat BAL BP1b1, BP1b3, BP2d2, BP2d3, BM1a3, BM1a5, BM1b4, BM1e1 dan BM2b2 diduga sebagai *Lactobacillus plantarum*. Isolat BAL BP2b3, BM2b1, BM2b3, BM2c1, dan BM2c3 diduga sebagai *Lactobacillus brevis*. Isolat BAL BM1a1, BM1a2, BM1b1, BM1e2, BM2a2, BM2a4, dan BM2b4 diduga sebagai *Leuconostoc paramesenteroides*. Isolat BAL BP1a1, BP2d4, BM2a1, BM2a5, BM2c2 dan BM2c4 diduga sebagai *Leuconostoc mesenteroides*, sedangkan isolat BAL BP1a4 diduga sebagai *Leuconostoc dextranicum*, dan isolat BAL BP1a2, BP2b4, BM1a4, BM1b2 dan BM1b3 diduga sebagai *Streptococcus faecium*.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil isolasi bakteri biji kopi luwak telah diperoleh 42 isolat bakteri. Setelah seluruh isolat bakteri diidentifikasi, pada pewarnaan gram seluruh isolat merupakan bakteri gram positif. Pada uji katalase, terdapat 33 isolat menunjukkan katalase negatif yang berarti 33 isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat.

Seluruh isolat BAL tersebut memiliki kemampuan yang berbeda dalam serangkaian pengujian. Namun pada pengujian pertumbuhan pada suhu yang berbeda, seluruh isolat pada umumnya mampu tumbuh dengan baik pada suhu 37°C dan mampu menghasilkan asam (perubahan warna litmus menjadi merah) serta besarnya total asam dan juga pH yang ditunjukkan berkisar 3.37-4.565.

Pada uji kemampuan produksi dekstran dan amonia terdapat 16 isolat BAL yang mampu memproduksi dekstran sebagai dari genus *Leuconostoc* dan 6 isolat mampu memproduksi amonia sebagai *Streptococcus faecium*. Namun ada pula genus *Leuconostoc* yang tidak mampu memproduksi dekstran yaitu *Leuconostoc paramesenteroides*. Dari 16 isolat yang diduga *Leuconostoc*, setelah melalui pengujian ketahanan terhadap konsentrasi garam yang tinggi diperoleh 6 isolat yang diduga berasal dari *Leuconostoc mesenteroides*, sedangkan yang tidak tahan terhadap konsentrasi garam yang tinggi diperoleh 1 isolat yang diduga berasal dari *Leuconostoc dextranicum*.

Pada uji kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat diperoleh 7 isolat yang diduga sebagai *Leuconostoc paramesenteroides* karena kemampuannya dalam memfermentasi hampir semua jenis karbohidrat. Sedangkan pada genus *Lactobacillus* ditemukan 9 isolat dari spesies *Lactobacillus plantarum* dan 5 isolat dari spesies *Lactobacillus brevis*.

Setelah seluruh isolat melakukan serangkaian ujian tersebut maka diperoleh 6 spesies BAL dan teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* dan *Streptococcus faecium*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui lebih mendalam kemampuan dari spesies tersebut, dan juga kemungkinan hal lain seperti adanya enzim yang berperan sebagai agen fermentasi pada biji kopi dalam sistem pencernaan binatang luwak.

DAFTAR PUSTAKA

- Aak. 1988. *Budidaya Tanaman Kopi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Alcama, I. Edward. 1983. *Laboratory Fundamentals of Microbiology*. New York: Addison-Wesley Publishing Company.
- Anonim. 2003. *Mendongkrak Harga Kopi Domestik Melalui Diversifikasi dan Peningkatan Kualitas*. Jakarta: Pusat Standarisasi dan Akreditasi-Deptan.
- Anonim. 2007. *Produksi Isolat dari Kotoran Luwak sebagai Agen Fermentasi Biji Kopi*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- Anonim. 2008. *Nikmatnya Kopi Luwak*. www.malkelapagading.com/fooddetail.asp?ArticleID=1000537&Category=1000-201-22k. [20 Januari 2008].
- Atmawinata, O. Yusianto. 1997. *Perancangan dan Pengujian Model Sentralisasi Pengolahan Kopi Rakyat Skala Besar*. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Asosiasi Penelitian Perkebunan Indonesia.
- Budyanto, A. 2002. *Mikrobiologi Umum*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Cole, R. J. dan Cox, R. H. 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Academic Press.
- Djumarti. 2005. *Teknologi Pengolahan Kopi*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- 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.
- Gibbons, N.E. dan R.E. Buchanan. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Herman. 2003. *Membangkitkan Kembali Peran Komoditas Kopi bagi Perekonomian Indonesia*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- James, J. Spallance. 1990. *Komoditi Kopi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Manurung, Z. N. dan Soenaryo. 1978. *Pengolahan Coklat pada Perkebunan Besar*. Bogor: Balai Penelitian Perkebunan Bogor.
- Maryam, R. 2002. *Mewaspada Bahaya Kontaminasi Mikotoksin pada Makanan*. <http://www.google.com/mikotoksin.html>. [20 Januari 2008].

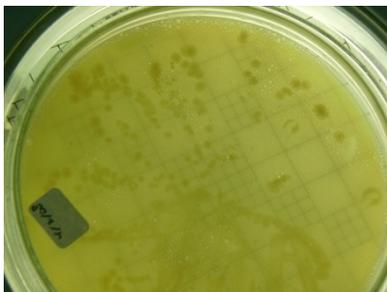
- Mulato, Sri. 1995: *Pengolahan Kopi, Pelatihan Uji Cita Rasa Kopi*. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao.
- Najiyati dan Danarti. 1999. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Octav. 2007. *Jual Kopi Luwak*. www.baliadvertising.net/detail.php?id=486-12k. [20 Januari 2008].
- Pato, Usman. 2003. *Artikel Ulas Balik, Potensi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih untuk Menurunkan Resiko Penyakit Kanker*. [http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol5\(2\)/usman.pdf](http://www.unri.ac.id/jurnal/jurnal_natur/vol5(2)/usman.pdf). [20 Januari 2008].
- Quillien, J. F. 2002. *Mycotoxins*. France: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Rahayu, E.S., S.N. Purwandhani, dan E. Harmayani. 2000a. *Isolasi Lactobacillus yang Berpotensi sebagai Kandidat Probiotik*. Yogyakarta: Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Widya Mataram dan UGM.
- Rohan, A. T. 1963. *Processing of Raw Cocoa for Market*. Rome: Food, and Agriculture, Organization, UNO.
- Salle, A. J. 1961. *Fundamental Principles of Bacteriology*. Tokyo: Kogakusha Company Ltd.
- Salminen, S and A.V. Wright. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Fungsional Aspect*, Edisi Kedua. New York: Marcel Dekker Inc.
- Susijahadi dan Jinap S. 1998. *Isolation of khamir in Alcohol Fermentation from Fermented Cocoa Beans (Theobroma Cocoa L.)*. Tenggara Darul Imam, Malaysia: Proceeding Malaysia Science & Technology Congress.
- Suwasono, Sony. 2005. *Prinsip Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian (Mikrobiologi Pengolahan I)*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- Suwasono, Sony. 2006. *Teknologi Fermentasi*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- Suwasono, Sony dan Jayus. 2006. *Buku Ajar Mikrobiologi Industri Pangan*. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, UNEJ.
- Warta Ekonomi, Selasa 17 April 2007. *Kopi, Sedap rasanya, Sedap Bisnisnya*.

Xu, C. C., Cai, Y. M., Zhang, J. G. and Ogawa, M. 2005. *Fermentation Quality and Nurtritive Value of Total Mixed Ration Silage Containing Coffee Grounds at 10 or 20% of Dry Matter*. <http://jas.fass.org/cgi/content/short/jas.2005-628v1>. [20 Januari 2008].

Lampiran-Lampiran:



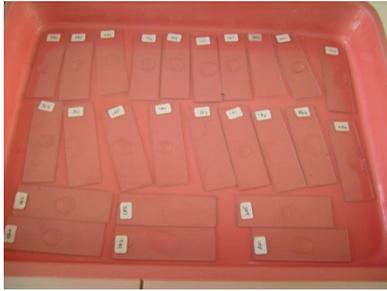
Inkubasi pada kondisi anaerobik



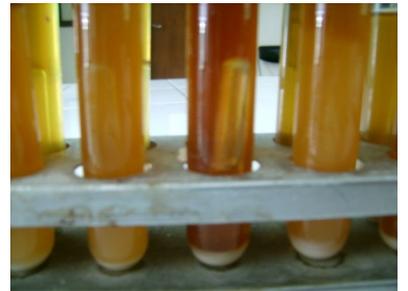
BAL pada media PGY-CaCO₃



BAL pada media MRS



Uji katalase



Uji CO₂



Pertumbuhan BAL pada media agar tegak



Produksi Amonia (warna orange)



Kemampuan memfermentasi berbagai jenis karbohidrat



Kemampuan pembentukan asam dengan perubahan warna litmus

Tabel 15 Identifikasi Isolat BAL

	Kode isolate BAL											Bergey's Manual			
	BP1a1	BP1a2	BP1a3	BP1a4	BP1b1	BP1b2	BP1b3	BP1c1	BP1c2	BP2b1	BP2b2	S. faecium	Le. paramesenteroides	L. plant	L. brevis
Bentuk	kokus	kokus	kokus	kokus	batang	kokus	batang	kokus	kokus	kokus	kokus	kokus	kokus	batang	batang
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Asam dari Litmus milk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	#
Dekstran dari sukrosa	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	*	*
Produksi CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	+
NH ₃ dari arginin:															
MRs-Arg	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Arg-Broth	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Pertumbuhan pada:															
• garam 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• garam 6,5%	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• suhu 15°C	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
• suhu 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• suhu 45°C	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Asam dari:															
• arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
• sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• fruktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	#
• glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+
(dugaan) spesies	Le. mesenteroides	S. faecium	Micrococcaceae	Le. dextraninum	L. plant.	Micrococcaceae	L. plant.	Micrococcaceae	Micrococcaceae	Micrococcaceae	Micrococcaceae	Micrococcaceae			

	Kode isolate BAL											Bergey's Manual			
	BP2b3	BP2b4	BP2d1	BP2d2	BP2d3	BP2d4	BM1a1	BM1a2	BM1a3	BM1a4	BM1a5	S. faecium	Le. paramesen teroides	L. plant	L. brevis
Bentuk	batang	kokus	kokus	batang	batang	kokus	kokus	kokus	batang	kokus	batang	kokus	kokus	batang	batang
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asam dari Litmus milk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	#
Dekstran dari sukrosa	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	*	*
Produksi CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	+
NH ₃ dari arginin:															
MRs-Arg	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Arg-Broth	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Pertumbuhan pada:															
• garam 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• garam 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• suhu 15°C	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
• suhu 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• suhu 45°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Asam dari:															
• arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
• sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• fruktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	#
• glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+
(dugaan) spesies	L. brevis	S. faecium	Micrococcaceae	L. plant.	L. plant.	Le. mesenteroides	Le. paramesenteroides	Le. paramesenteroides	L. plant.	S. faecium	L. plant.				

Kode isolate BAL												Bergey's Manual			
	BM1b1	BM1b2	BM1b3	BM1b4	BM1e1	BM1e2	BM2a1	BM2a2	BM2a3	BM2a4	BM2a5	S. faecium	Le. paramesenteroides	L. plant	L. brevis
Bentuk	kokus	kokus	kokus	batang	batang	kokus	kokus	kokus	kokus	kokus	kokus	kokus	kokus	batang	batang
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Asam dari Litmus milk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	#
Dekstran dari sukrosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	*	*
Produksi CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	-	+
NH ₃ dari arginin:															
MRs-Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Arg-Broth	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Pertumbuhan pada:															
• garam 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• garam 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• suhu 15°C	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
• suhu 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• suhu 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Asam dari:															
• arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
• sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• fruktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	#
• glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+
(dugaan) spesies	Le. paramesenteroides	S. faecium	S. faecium	L. plant.	L. plant.	Le. paramesenteroides	Le. mesenteroides	Le. paramesenteroides	Micrococcaceae	Le. paramesenteroides	Le. mesenteroides				

	Kode isolate BAL									Bergey's Manual					
	BM2b1	BM2b2	BM2b3	BM2b4	BM2b5	BM2c1	BM2c2	BM2c3	BM2c4	S. faecium	Le. paramesenteroides	L. plant	L. brevis	Le. mesenteroides	Le. dextranum
Bentuk	batang	batang	batang	kokus	kokus	batang	kokus	batang	kokus	kokus	kokus	batang	batang	kokus	kokus
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asam dari Litmus milk	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	#	+	+
Dekstran dari sukrosa	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	*	*	+	+
Produksi CO ₂	+	-	+	-	-	+	-	+	+	*	*	-	+	*	*
NH ₃ dari arginin:															
MRs-Arg	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	*	*
Arg-Broth	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	*	*
Pertumbuhan pada:															
• garam 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	+	d
• garam 6,5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	d	-
• suhu 15°C	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	*	*
• suhu 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+
• suhu 45°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	*	*
Asam dari:															
• arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
• manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	d
• sukrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
• fruktosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	#	+	+
• glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*
• maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+
(dugaan) spesies	L. brevis	L. plant.	L. brevis	Le. paramesenteroides	Micrococcaeae	L. brevis	Le. mesenteroides	L. brevis	Le. mesenteroides						

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