



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
SENYAWA ANTIKAPANG DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS
FORASTERO DI PTPN XII KEBUN KALIKEMPIT
KABUPATEN BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh
Sayi Hatiningsih
NIM 101710101010

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
SENYAWA ANTIKAPANG DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS
FORASTERO DI PTPN XII KEBUN KALIKEMPIT
KABUPATEN BANYUWANGI**

SKRIPSI

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

Oleh
Sayi Hatiningsih
NIM 101710101010

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, segala puji bagi Allah yang selama ini selalu mencintai saya;
2. Ibu tersayang Sri Purnami (almh) dan Ayah tercinta Sukirman (alm) yang selalu menyayangi dan mencintai saya;
3. Kakak saya Saiful H.P., kakak ipar Yulia E.C., keponakan saya Hadi I.I., serta keluarga dan kerabat yang telah mendoakan dan mendukung saya;
4. Bapak Sony Suwasono yang selalu memotivasi saya untuk menjadi lebih baik dan lebih baik lagi;
5. Pembimbing dan penyalur ilmuku, guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi;
6. Jajaran pimpinan PTPN XII Kebun Kalikempit, Ir. Arief Budiyanto, M.M., selaku manajer, Achmad Hendy J., S.TP. dan Juni, S.P., selaku wakil manajer, Afid Tri Prasetyo, S.TP., selaku Astekpol, Bapak Satrio Supriyadi selaku mandor besar serta staff karyawan di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi atas bimbingan, bantuan dan kesabaran selama pengerjaan skripsi ini;
7. Almamater yang kubanggakan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

MOTO

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih, Maha Penyayang (1) Segala puji bagi Allah, Tuhan seluruh alam (2) Yang Maha Pengasih, Maha Penyayang (3) Pemilik hari pembalasan (4) Hanya kepada Engkaulah kami menyembah dan hanya kepada Engkaulah kami mohon pertolongan (5) Tunjukilah kami jalan yang lurus (6) (yaitu) jalan orang-orang yang telah Engkau beri nikmat kepadanya; bukan (jalan) mereka yang dimurkai, dan bukan (pula jalan) mereka yang sesat (7).
(Terjemahan Surat Al-Fatihah ayat 1-7).^{*)}

Rahmat sering datang kepada kita dalam bentuk kesakitan, kehilangan dan kekecewaan, tetapi kalau kita sabar, kita segera akan melihat bentuk aslinya.^{**)}

Rencanakan dengan sempurna, kerjakan dengan sempurna, hasil yang sempurna maka kita dapat tertawa dan mendapat kepuasan yang sempurna.^{***)}

Buatlah semua orang yang ada di muka bumi ini tersenyum bahagia, dan Tuhanmulah nanti yang akan membuatmu selalu bahagia.^{****)}

^{*)} Tim Syaamil Al-Qur'an. 2010. *Syaamil Al-Qur'an Terjemah Tafsir Per Kata*. Bandung: Sygma Publishing.

^{**)} Joseph Addison

^{***)} Saiful Hadi Prasetyo.

^{****)} Penulis

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : SAYI HATININGSIH

NIM : 101710101010

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL SENYAWA ANTIKAPANG DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS FORASTERO DI PTPN XII KEBUN KALIKEMPIT KABUPATEN BANYUWANGI”** adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika di kemudian hari pernyataan ini benar.

Jember, 20 Mei 2015

Yang menyatakan,

Sayi Hatiningsih
NIM 101710101010

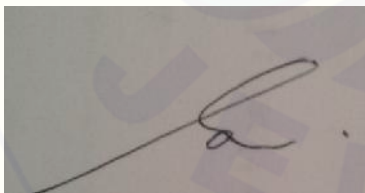
SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL
SENYAWA ANTIKAPANG DARI FERMENTASI KAKAO VARIETAS
FORASTERO DI PTPN XII KEBUN KALIKEMPIT
KABUPATEN BANYUWANGI**

Oleh :
Sayi Hatiningsih
NIM 101710101010

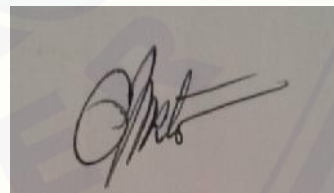
Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama



Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.
NIP. 19641109 198902 1 002

Dosen Pembimbing Anggota



Ir. Giyarto, M.Sc.
NIP. 19660718 199303 1 013

PENGESAHAN

Skripsi berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang dari Fermentasi Kakao Varietas Forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi”** telah di uji dan disahkan oleh

Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 5 Februari 2015

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua Penguji,

Anggota,

Dr. Ir. Jayus

NIP. 19680516 199203 1 004

Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P.

NIP. 19650708 199403 2 002



RINGKASAN

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang dari Fermentasi Kakao Varietas Forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi; Saiy Hatiningsih, 101710101010; 2015: 59 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Proses fermentasi biji kakao merupakan salah satu faktor yang menentukan kualitas dari biji kakao. Keberhasilan proses fermentasi kakao sangat dipengaruhi oleh jenis populasi mikroba yang tumbuh selama fermentasi biji kakao. Populasi mikroba dalam fermentasi biji kakao terdiri dari khamir, bakteri asam laktat, bakteri asam asetat dan kapang yang berperan dalam fermentasi biji kakao. Salah satu mikroba yang sangat berperan dalam proses fermentasi biji kakao adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat menghasilkan metabolit yang mampu meningkatkan kualitas (pembentukan prekursor cita rasa dan aroma khas coklat) biji kakao dan diduga metabolit tersebut juga mengandung senyawa antikapang yang mampu mencegah tumbuhnya kapang penghasil mikotoksin pada biji kakao sehingga dapat meningkatkan keamanan biji kakao. Spesies bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi biji kakao ini berbeda di tiap wilayah tanamnya. Oleh karena itu, perlu diisolasi dan identifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi biji kakao varietas forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Fermentasi biji kakao dilakukan selama 4 hari. Selama fermentasi biji kakao dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat. Setiap isolat bakteri asam laktat yang menghasilkan metabolit terbesar, dipilih untuk diuji kemampuan kerja antikapangnya. Isolat bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan kerja

antikapang terbaik diidentifikasi berdasarkan sifat morfologi dan biokimia mengacu pada “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”.

Dari fermentasi biji kakao di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebanyak 30 isolat bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang yang dominan tumbuh pada fermentasi kakao yang diduga adalah *Lactobacillus brevis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. plantarum* dan *L. fermentum*. Isolat bakteri asam laktat yang diduga *L. curvatus* dan *L. plantarum* memiliki daya penghambatan yang sangat kuat terhadap kapang *Rhizopus* sp. dan *Eurotium* sp..

SUMMARY

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria as Antifungal Compound Producer from Fermentation of Forastero Cocoa in PTPN XII Kalikempit Estate, Banyuwangi; Sayi Hatiningsih, 101710101010; 2015: 59 pages; Agricultural Product of Technology Department, Faculty of Agricultural Technology, Jember University.

The cocoa seeds fermentation process is one of the factors that influence the quality of cocoa seeds. The perfection of cocoa seeds fermentation process is influenced by microorganisms growing during the cocoa fermentation. The microorganisms during the cocoa fermentation include yeast, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, and mould which play role in the cocoa fermentation. One important microbe which play role in the cocoa fermentation is lactic acid bacteria. The lactic acid bacteria produce the metabolites which have ability to increase the quality cocoa seeds with formation of exclusive taste and flavor of cocoa and also have the ability to inhibit the mycotoxin-producing fungi in cocoa seeds which increase the safety of cocoa seeds. The species of lactic acid bacterias producing antifungal compound may be different from one to another cocoa plantation. Therefore, it is necessary to do isolation and identification of lactic acid bacteria as antifungal compound producer from cocoa fermentation in PTPN XII Kalikempit estate, Banyuwangi.

The objective of this research was to isolate and identify lactic acid bacteria as antifungal compound producer from fermentation of forastero cocoa in PTPN XII Kalikempit estate, Banyuwangi. The cocoa fermentation was conducted for 4 days. During the cocoa fermentation, lactic acid bacteria was isolated from cocoa *pulp* and the liquid of cocoa *pulp*. Each lactic acid bacteria showing the inhibition activity against fungi was isolated from cocoa fermentation and then identified based on the morphological and biochemical properties referring to "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*".

From cocoa fermentation in PTPN XII Kalikempit estate, Banyuwangi there were 30 lactic acid bacterias producing antifungal compound that had been isolated and identified. They were estimated to be *Lactobacillus brevis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. plantarum* and *L. fermentum*. Some of them such *L. curvatus* and *L. plantarum* gave strongest inhibition against *Rhizopus* sp. and *Eurotium* sp..



PRAKATA

Syukur alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah, berupa skripsi yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang dari Fermentasi Kakao Varietas Forastero di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi”. Karya tulis ilmiah ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dr. Yuli Witono, S.TP., M.P., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember sekaligus Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah memberikan bimbingan, koreksi serta segala bantuan yang diberikan dalam menyempurnakan Karya Ilmiah Tertulis ini;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang telah meluangkan waktu dan pikiran serta perhatiannya guna memberikan bimbingan pada penyusunan skripsi ini serta Dr. Ir. Jayus dan Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P., selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan pengarahan demi terselesainya penyusunan skripsi ini;
4. Kedua orang tuaku tercinta Ibu Sri Purnami (almh) dan Ayah Sukirman (alm) atas kasih sayang dan pengorbanannya selama ini;
5. Semua dosen-dosen Fakultas Teknologi Pertanian yang selama ini telah membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis sampai akhirnya saya dapat menyelesaikan studi ini;
6. Jajaran pimpinan PTPN XII Kebun Kalikempit, Ir. Arief Budiyanto, M.M., selaku manajer, Achmad Hendy J., S.TP. dan Juni, S.P., selaku wakil manajer, Afid Tri Prasetyo, S.TP., selaku Astekpol, Bapak Satrio Supriyadi

selaku mandor besar serta staff karyawan di PTPN XII Kebun Kalikempit yakni: Bapak Supanto, Bapak Sugiyanto, Bapak Imam Hanafi, Bapak Awok Efendi, Bapak Asmuni, Ibu Ponirah, Ibu Ulfi, Bapak Rizal, Bapak Yusuf, dan Bapak Rohim yang membantu pengerjaan skripsi ini;

7. Segenap teknisi Laboratorium Jurusan Teknologi Hasil Pertanian yakni Neni Novita Y., S.Si., Akhmad Mistar, SP., Ni Ketut Leseni, AMd., dan Subekah Nawa K., SP.;
8. Kakak saya Saiful Hadi P., kakak ipar Yulia Eka C., keponakan saya yang lucu Hadi Ihsan I. atas dukungannya selama ini;
9. Sahabat-sahabat saya Arsyta, Hamidah (alm), Fani, Icha, Siti, Jatu, Erna, Sielvi, Dyah, Ayu, Mia, Iga, Rika, Kak Shindy, Kak Dwi, Kak Atik, Kak Roni, Kak Pradata, Bayudi, Ahib, Indra, Adit dan teman-teman jurusan Teknologi Hasil Pertanian 2010 yang senasib dan seperjuangan;
10. Teman-teman kos Jawa 7 dan Kalimantan Kelinci 34, Jember yakni Silvia, Naylul, Kak Ima, Holip, Monic, Friska, Rina, Krisna, Yeni dan Mimin yang selalu menyemangatiku dan membawa keceriaan di kosan;
11. Semua pihak yang membantu terselesaikannya penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

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

Jember, 20 Mei 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY.....	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Ciri Makroskopis dan Mikroskopis Beberapa Kapang Penghasil Mikotoksin pada Biji Kakao	4
2.2 Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Laktat	7
2.3 Peranan Bakteri Asam Laktat pada Biji Kakao selama Fermentasi.....	8
2.4 Ciri-ciri dan Klasifikasi <i>Lactobacillus</i> sp.	10
2.5 Metode Identifikasi Bakteri Asam Laktat	11
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17

3.2 Bahan dan Alat Penelitian	17
3.2.1 Bahan Penelitian.....	17
3.2.2 Alat Penelitian	18
3.3 Metode Penelitian	18
3.3.1 Rancangan Penelitian	18
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	18
3.3.3 Analisis Data	25
3.4 Parameter Pengamatan	25
3.5 Prosedur Analisis	25
3.5.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari <i>Pulp</i> dan Cairan <i>Pulp</i> Kakao Terfermentasi	25
3.5.2 Perhitungan Luas Area Bening pada Uji Kemampuan Kerja Antikapang oleh Isolat Bakteri Asam Laktat.....	26
3.5.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat secara Fenotipik	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari <i>Pulp</i> dan Cairan <i>Pulp</i> Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi..	31
4.2 Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari <i>Pulp</i> dan Cairan <i>Pulp</i> Kakao Terfermen- tasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	34
4.3 Identifikasi BAL yang diisolasi dari <i>Pulp</i> dan Cairan <i>Pulp</i> Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi secara Fenotipik	38
BAB 5. PENUTUP	54
5.1 Kesimpulan	54
5.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN-LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Beberapa mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang	5
Tabel 2.2 Diversitas kapang merugikan pada biji kakao di Indonesia.....	6
Tabel 2.3 <i>Bergey's manual of systematic bacteriology</i>	16
Tabel 4.1 Isolat BAL terpilih yang diisolasi <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	33
Tabel 4.2 Kode isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	35
Tabel 4.3 Pengukuran luas penghambatan terhadap pertumbuhan kapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi.....	37
Tabel 4.4 Hasil uji pewarnaan gram pada isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi.....	39
Tabel 4.5 Hasil uji katalase pada isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit, Banyuwangi	41
Tabel 4.6 Produksi gas (CO ₂) oleh isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi.....	42
Tabel 4.7 Pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada suhu yang berbeda	43
Tabel 4.8 Pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda	45
Tabel 4.9 Kemampuan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dalam memproduksi asam.....	46
Tabel 4.10 Kemampuan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dalam memproduksi dekstran dari sukrosa	47
Tabel 4.11 Pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada karbohidrat yang berbeda	49
Tabel 4.12 Hasil identifikasi isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi secara fenotipik	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Ciri mikroskopis kapang <i>Fusarium</i> sp., <i>Eurotium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., dan <i>Aspergillus flavus</i>	7
Gambar 2.2 <i>Pulp</i> kakao yang menyelimuti biji kakao segar di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	9
Gambar 2.3 Pemecahan glukosa menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat	10
Gambar 3.1 Diagram alir rancangan penelitian isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	19
Gambar 3.2 Diagram alir penentuan total BAL dan isolasi BAL dari <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	22
Gambar 3.3 Diagram alir penentuan total BAL dan isolasi BAL dari cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	23
Gambar 3.4 Diagram alir uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	24
Gambar 3.5 Pengukuran diameter area hambat oleh isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap pertumbuhan kapang	27
Gambar 4.1 Hubungan antara total BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi (log cfu/ml) dan pH biji kakao selama fermentasi biji kakao di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	32
Gambar 4.2 Bakteri asam laktat yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada media MRSA-CaCO ₃ 1 % yang ditandai dengan terbentuknya area bening disekitarnya	33
Gambar 4.3 Koloni kapang diduga <i>Fusarium</i> sp. (a), kapang diduga <i>Eurotium</i> sp. dan <i>Rhizopus</i> sp. (c) pada media MEA umur 7 hari, struktur mikroskopi pada pembesaran mikroskop 400 x	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A Proses biokimia pembentukan asam laktat oleh BAL	60
Lampiran B pH biji kakao dan total BAL dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	62
Lampiran C Data pengamatan pada uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi.....	63
Lampiran D Data pengukuran pH dan total asam media pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi	77
Lampiran E Gambar zona penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari <i>pulp</i> dan cairan <i>pulp</i> kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap pertumbuhan kapang	78

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksistensi Indonesia sebagai produsen biji kakao utama di dunia cukup diperhitungkan dan berpeluang menguasai pasar global. Indonesia merupakan produsen biji kakao terbesar ketiga di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana (Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian, 2013). Jumlah realisasi ekspor komoditas ini juga hampir selalu mengalami peningkatan tiap tahunnya. Jumlah realisasi ekspornya pada periode April 2013 menempati urutan terbesar keempat yakni sebesar US\$ 77,42 juta, setelah minyak sawit US\$ 1,31 milyar, karet US\$ 638,1 juta, dan kopi sebesar US\$ 92,32 juta (BPS diolah Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian, 2013).

Jumlah realisasi ekspor biji kakao Indonesia akan terus meningkat jika diimbangi dengan perbaikan mutu. Mutu biji kakao Indonesia saat ini masih tergolong belum baik. Di Amerika Serikat, biji kakao Indonesia selalu mendapatkan penahanan. Pemberlakuan penahanan oleh *United State Food and Drug Administration* (USFDA) terhadap biji kakao Indonesia ini dikarenakan biji kakao Indonesia tidak memenuhi persyaratan *Sanitary and Phytosanitary* (SPS) di negara tersebut (Anonim, 2005). Biji kakao yang berasal dari Indonesia diklaim sebagai biji kakao yang bermutu rendah karena salah satunya disebabkan oleh sering ditemukan kapang (Rahmadi dan Fleet, 2008). Hal ini mengakibatkan terjadinya penurunan harga biji kakao Indonesia di pasar internasional. Kerugian devisa karena harga jual yang rendah tersebut diperkirakan sekitar US\$ 150 juta atau Rp 1,4 triliun per tahun (Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian, 2013).

Aspek mutu biji kakao salah satunya ditentukan oleh kandungan kapang pada biji kakao. Hal ini dikarenakan adanya kapang pada biji kakao menimbulkan perubahan-perubahan kimiawi di dalamnya, sehingga komoditi ini tidak dapat dikonsumsi atau beracun (Arul, 2009). Oleh karena itu, batas maksimal

kandungan kapang pada biji kakao untuk grade I sebesar 3 % dan untuk grade II sebesar 4 % (Rahmadi dan Fleet, 2008).

Salah satu cara untuk mencegah pencemaran biji kakao oleh kapang penghasil mikotoksin adalah dengan menggunakan pengawet alami (*biopreservative*) dari mikroorganisme maupun metabolit sekunder yang dihasilkannya untuk mencegah pencemaran dan keracunan yang diakibatkan oleh kapang (Lindgren dan Dobrogosz, 1990). Suardana *et al.* (2007) melaporkan bahwa bakteri asam laktat dapat berfungsi sebagai *biopreservative* karena kemampuannya untuk menghasilkan substansi antimikroba. Jenie *et al.* (2002) menyatakan bahwa BAL diketahui memproduksi asam organik, bakteriosin, CO₂, dan diasetil yang memiliki aktivitas antikapang.

Salah satu sumber untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat adalah dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi. Adanya bakteri asam laktat dalam *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi karena bakteri asam laktat berperan penting dalam proses fermentasi biji kakao tersebut. Selama fermentasi biji kakao, bakteri asam laktat merombak gula dalam *pulp* kakao menghasilkan metabolit yang mampu meningkatkan kualitas (pembentukan prekursor cita rasa dan aroma khas coklat) biji kakao (Wood dan Lass, 1989). Bakteri asam laktat yang paling umum diisolasi dari biji kakao terfermentasi adalah dari genus *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* dan *Lactobacillus* (Camu *et al.*, 2008).

1.2 Perumusan Masalah

Salah satu upaya untuk mencegah pencemaran biji kakao oleh kapang penghasil mikotoksin adalah dengan menggunakan bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang. Beberapa penelitian untuk mendapatkan isolat bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari *pulp* kakao terfermentasi telah dilakukan, diantaranya Atiqoh (2007) yang melaporkan bahwa bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari *pulp* kakao terfermentasi diantaranya *Streptococcus faecium*, *Leuconostoc paramesenteroides* dan *Lactobacillus brevis*.

Spesies bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi biji kakao berbeda di tiap wilayah tanamnya. Inayatin dan Muhammadan (2008)

melaporkan bahwa bakteri asam laktat yang dominan tumbuh fermentasi biji kakao di PTPN XII Kota Blater Ambulu (Jember) adalah *Leu. mesenteroides*, *Leu. dextranicum* dan *L. plantarum*. Shindy (2014) melaporkan bahwa bakteri asam laktat dominan dari fermentasi biji kakao di Yogyakarta adalah *Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *L. plantarum*, *L. fermentum* dan *L. casei*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat diketahui bahwa bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang ini dapat diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi namun spesies yang dominan tumbuh berbeda di tiap wilayah tanamnya. Hal tersebut diperkuat oleh hasil penelitian Kustyawati dan Setyani (2008) yang melaporkan bahwa ekologi mikrobial yang terlibat dalam fermentasi dipengaruhi oleh tempat fermentasi, jenis kakao, dan kondisi geografis tempat tumbuh kakao. Oleh karena itu, perlu diisolasi dan diidentifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi biji kakao di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Isolat BAL penghasil senyawa antikapang yang telah teridentifikasi dapat dikembangkan menjadi kultur starter untuk membantu proses fermentasi biji kakao basah atau membantu proses fermentasi kembali (*re-fermentation*) biji kakao kering yang terserang kapang. Hal ini nantinya akan menjadi salah satu alternatif usaha untuk mencegah kontaminasi oleh kapang penghasil mikotoksin.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi biji kakao varietas forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat diantaranya yaitu:

1. Mengembangkan senyawa antikapang dari bakteri asam laktat yang diharapkan dapat mencegah kontaminasi oleh kapang dan meminimalkan kandungan mikotoksin dan residu fungisida,
2. Meningkatkan mutu dan keamanan biji kakao sehingga dapat mempertahankan harga jual biji kakao Indonesia.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ciri Makroskopis dan Mikroskopis Beberapa Kapang Penghasil Mikotoksin pada Biji Kakao

Sebagian kapang yang tumbuh selama fermentasi biji kakao merupakan kapang yang merugikan. Titik kritis fermentasi biji kakao adalah pada flora awal dimana terjadi pencemaran biji kakao oleh kapang penghasil toksin (Rahmadi dan Fleet, 2008). Wangge *et al.* (2012) melaporkan bahwa selama fermentasi biji kakao terjadi proses yang kompleks sehingga memungkinkan biji kakao tersebut terserang kapang penghasil mikotoksin. Beberapa mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang dapat dilihat pada Tabel 2.1, sedangkan diversitas kapang merugikan pada biji kakao di Indonesia dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Varga *et al.* (2003) melaporkan bahwa mikotoksin terutama yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus* dan *Penicillium* sangat berbahaya bagi kesehatan manusia. Aflatoksin yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus* berpotensi menyebabkan *hepatocarcinogen* (kanker hati) pada manusia. Oleh karena itu, pencegahan cemaran kapang penghasil mikotoksin menggunakan senyawa antikapang yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat perlu diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao ini sebagai salah satu upaya untuk meningkatkan keamanan biji kakao.

Berikut ini ciri makroskopis dan mikroskopis beberapa kapang penghasil mikotoksin pada biji kakao di Indonesia:

1. Kapang *Fusarium* sp.

Ciri makroskopis kapang *Fusarium* sp. pada media PDA adalah bentuk koloni seperti menjari dan pinggirannya tidak rata, miselium berwarna putih dan terdapat lingkaran berwarna merah muda pada bagian tengahnya. Ciri mikroskopis kapang *Fusarium* sp. adalah memiliki dua jenis konidia yaitu makrokonidia yang terdiri atas tiga sel yang berbentuk sabit dan mikrokonidia yang terdiri atas satu sel yang berbentuk oval (Afriyeni *et al.*, 2013). Ciri mikroskopis kapang *Fusarium* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Tabel 2.1 Beberapa mikotoksin yang dihasilkan oleh kapang

Mikotoksin	Diproduksi oleh Kapang	Referensi
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> Link	Klich dan Cleveland (2000), Varga <i>et al.</i> (2003), Waluyo (2004), Handajani dan Setyaningsih (2006), Wangge <i>et al.</i> (2012)
	<i>A. parasiticus</i> Speare	
	<i>A. nomius</i> Kita	
	<i>A. tamarii</i> Kita	
	<i>A. pseudotamarii</i>	
Alimentary toxin aleukia	<i>A. ochraceoroseus</i>	Dube (1993)
	<i>Fusarium</i> sp.	
Asam penisilat	<i>Penicillium cyclopium</i>	Waluyo (2004)
	<i>Penicillium martensii</i>	
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	
	<i>Aspergillus melleus</i>	
Brevianamide A	<i>Penicillium</i> sp.	Tanada dan Kaya (1993)
Canescins	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Chaetoglobosin A, C	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Citreoviridin	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Communesin A, B	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Deoksinivalenol (vomitoksin)	<i>Fusarium</i> sp.	Dube (1993)
Ergotoksin	<i>Claviceps purpurea</i>	Waluyo (2004)
Eslanditoksin	<i>Penicillium islandicum</i>	Waluyo (2004)
Expansolide	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Fumonisin	<i>Fusarium</i> sp.	Febby (2008)
Meleagrinchrysogine	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Nivalenol	<i>Fusarium</i> sp.	Dube (1993)
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	
	<i>A. melleus</i>	
	<i>A. sulphureus</i>	
	<i>A. niger</i>	
Ocratoksin	<i>A. viridicatum</i>	Tanada dan Kaya (1993), Waluyo (2004), Handajani dan Setyaningsih (2006), Wangge <i>et al.</i> (2012)
	<i>Aspergillus clavatus</i>	
	<i>Penicillium patulum</i>	
Patulin	<i>Penicillium citrinum</i>	Seifert dan Frisvad (2000), Waluyo (2004) dan Handajani dan Setyaningsih (2006)
Roquefortine C	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Rugulosin	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Sitrinin	<i>Penicillium versicolor</i>	Seifert dan Frisvad (2000), Waluyo (2004), Handajani dan Setyaningsih (2006)
	<i>P. citrinum</i>	
Sterigmatosistin	<i>Apergillus versicolor</i>	Waluyo (2004)
	<i>A. citrinum</i>	
Xanthocillins	<i>Penicillium</i> sp.	Seifert dan Frisvad (2000)
Tremorgenic	<i>Penicillium</i> sp.	Handajani dan Setyaningsih (2006)
Triketesen	<i>Fusarium</i> sp.	Dube (1993), Waluyo (2004), Febby (2008)
	<i>trichichum</i>	
Yellow rice toxin	<i>Penicillium</i> sp.	Handajani dan Setyaningsih (2006)
Zearelenon	<i>Giberella zeae</i>	Dube (1993), Waluyo (2004)

Tabel 2.2 Diversitas kapang merugikan pada biji kakao di Indonesia

Asal sampel	Spesies kapang
Penajam, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Eurotium chevaleri</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Penicillium spinulosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Mucor pyriformis</i>
Malinau, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Stemphylium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.
Samarinda, Kalimantan Timur (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Geotrichum candidum</i>
Sulawesi (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. wentii</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Stemphylium</i> sp., <i>Epicoccum nigrum</i>
Irian Jaya (fermentasi alami dan spontan, kering sinar matahari)	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>P. spinulosum</i> , <i>Stemphylium</i> sp., <i>P. citrinum</i> , <i>P. corylophilum</i> .

Sumber: Rahmadi dan Fleet (2008)

2. Kapang *Rhizopus* sp.

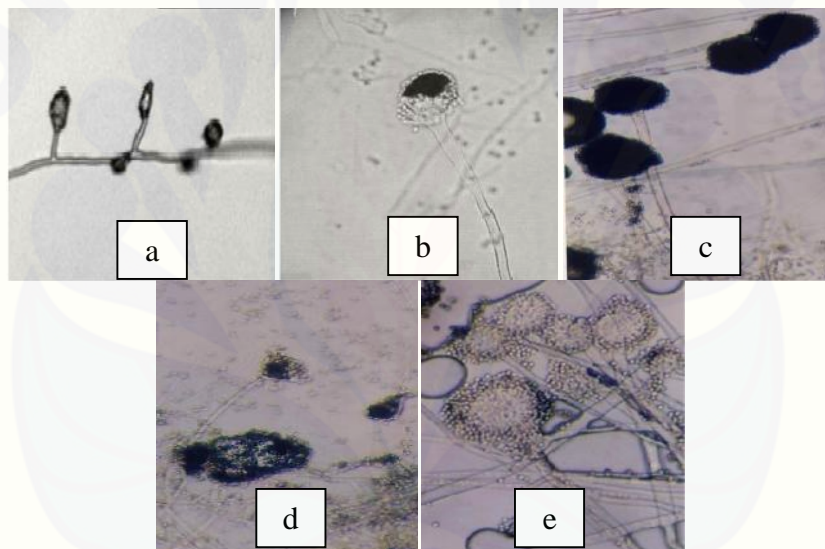
Ciri makroskopis kapang *Rhizopus* sp. pada media PDA adalah koloni berwarna coklat kehitaman. Ciri mikroskopis kapang *Rhizopus* sp. adalah terdapat banyak rhizoid, hifa tidak bersepta dan sporangia berbentuk bulat, berwarna kehitaman, sporangiofor dalam kelompok-kelompok yang panjang dan agak melengkung, pada bagian ujungnya membesar dan bulat yang disebut columella. Columella tersebut berbentuk bulat dan semi bulat, berwarna kelabu sampai kecoklatan (Melina, 2007). Ciri mikroskopis kapang *Rhizopus* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.1.

3. Kapang *Penicillium* sp.

Ciri makroskopis kapang *Penicillium* sp. pada media PDA adalah koloni berwarna hijau kebiruan. Ciri mikroskopis kapang *Penicillium* sp. adalah hifa bersepta, konidiofor tegak bercabang-cabang melingkar, konidia bulat sampai elips, berwarna kehijauan, berjumlah banyak dan tersusun dalam rangkaian-rangkaian yang terletak pada bagian ujung phialid. Phialid tersebut berbentuk seperti botol (Melina, 2007). Ciri mikroskopis kapang *Penicillium* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.1.

4. Kapang *Aspergillus flavus*

Ciri makroskopis kapang *A. flavus* pada media PDA adalah koloni berwarna hijau kekuningan, sedangkan ciri mikroskopis kapang *A. flavus* adalah konidia berbentuk bulat, tumbuh di atas phialid, konidiofor tegak dan panjang, vesikel berbentuk bulat dan dikelilingi oleh metulae yang panjang (Melina, 2007). Wangge *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa ciri makroskopis koloni *A. flavus* pada saat muda berwarna putih, dan akan berubah menjadi hijau kekuningan setelah membentuk konidia, sedangkan ciri mikroskopis kapang *A. flavus* memiliki vesikula yang berbentuk bulat hingga semi bulat dan konidia berbentuk bulat hingga semi bulat. Ciri mikroskopis kapang *A. flavus* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Ciri Mikroskopis kapang *Fusarium* sp. (Leslie dan Summerell, 2006) (a), *Eurotium* sp. (Rismawati, 2010) (b), *Rhizopus* sp. (Melina, 2007) (c), *Penicillium* sp. (Melina, 2007) (d) dan *Aspergillus flavus* (Melina, 2007) (e)

2.2 Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Laktat

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

asetaldehid, d-isomer, asam-asam amino dan bakteriosin yang bersifat antimikroba (Surono, 2004). Corsetti (2005) juga menemukan hal yang sama bahwa beberapa strain bakteri asam laktat memproduksi senyawa antikapang, diantaranya asam laktat, asam asetat, kaproat, asam format, asam fenilaktat, dan asam 4-hidroksi fenil laktat, dipeptida siklik seperti siklo (Gly-L-Leu), siklo (L-Phe-L-Pro), siklo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), asam benzoat, methyl hidantoin, mevano lakton, asam lemak berantai pendek, senyawa protein dengan BM rendah dan bakteriosin.

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

Hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan mengenai bakteri asam laktat yang menghasilkan senyawa antikapang, diantaranya Sulistyio *et al.* (2014) yang melaporkan bahwa konsentrasi *L. plantarum* NL-249 sebesar 10^7 cfu/ml mampu menurunkan koloni kapang *A. flavus* sebesar 1 log unit. Cahyaningsih (2006) juga melaporkan bahwa *L. plantarum* nl-249 yang diisolasi dari nira lontar mempunyai aktivitas antikapang terhadap kapang *A. flavus*. Ress (2006) melaporkan bahwa *L. plantarum* memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antikapang yang mampu menghambat kapang *Fusarium* sp. dan *A. niger*. Shindy (2014) juga melaporkan bahwa bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi di Yogyakarta adalah *Pediococcus* sp., *Leu. paramesenteroides*, *Leu. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum* efektif menghambat *A. ochraceus*, *Penicillium* sp. dan *A. flavus*.

2.3 Peranan Bakteri Asam Laktat pada Biji Kakao selama Fermentasi

Fermentasi biji kakao bertujuan untuk menghasilkan calon senyawa aroma khas coklat. Selama proses ini, terjadi penurunan kadar polifenol yang dapat menurunkan rasa kelat (Delfahedah *et al.*, 2013). Fermentasi biji kakao akan

menghasilkan prekursor cita rasa, mencokelat-hitamkan warna biji, mengurangi rasa-rasa pahit, asam, manis dan aroma bunga, meningkatkan aroma biji kakao (cokelat) dan kacang (*nutty*) dan mengeraskan kulit biji menjadi seperti tempurung (Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian, 2013).

Selama fermentasi biji kakao, mikrobia akan merombak *pulp* menjadi alkohol, asam dan panas. Adanya panas ini menyebabkan difusi zat-zat metabolit tersebut ke dalam biji, akibatnya biji mati dan selanjutnya terjadi reaksi enzimatik pembentukan flavor, aroma dan warna, sehingga fermentasi menentukan mutu produk akhir (Kustyawati dan Setyani, 2008). Kandungan pulp kakao meliputi glukosa (5,4 – 6,6 %), fruktosa (6,3 – 7,4 %), sukrosa (< 0,3 %), asam sitrat (0,6 – 0,7 %), serta asam asetat, asam laktat, etanol (< 0,2 %), pH terukur 3,94 – 4,12 merupakan media yang cocok untuk pertumbuhan mikrobia (Nielsen, 2006). *Pulp* kakao yang menyelimuti biji kakao segar dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 *Pulp* kakao yang menyelimuti biji kakao segar (Koleksi Penulis, 2014)

Salah satu mikroba yang berperan selama fermentasi biji kakao adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merombak gula pada *pulp* kakao menjadi asam-asam organik terutama asam laktat dan panas. Asam-asam organik yang dihasilkan tersebut akan berdifusi dari *pulp* ke dalam kotiledon dan menyebabkan kematian biji kakao (Kustyawati dan Setyani, 2008). Hansen *et al.* (1998) menyatakan bahwa asam-asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat akan terdifusi menembus kulit biji yang kemudian masuk ke dalam kotiledon menyebabkan kematian biji. Cepatnya kematian biji akan mempercepat perubahan-perubahan enzimatik dalam keping biji. Enzim-enzim tersebut akan berperan aktif dalam mengurangi rasa sepat, menghilangkan pigmen ungu, membentuk warna cokelat serta prekursor flavor dan aroma khas cokelat.

Perombakan gula menjadi asam laktat dan energi (panas) oleh bakteri asam laktat menurut Wood dan Lass (1989) dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Pemecahan glukosa menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat

Fermentasi biji kakao oleh bakteri asam laktat berlangsung secara anaerobik, dikarenakan pada awal fermentasi kandungan *pulp* biji kakao cukup tinggi mengakibatkan pengurangan difusi oksigen ke dalam tumpukan biji kakao. Bakteri asam laktat ini tumbuh dengan cepat antara waktu fermentasi 24 – 48 jam (Leal *et al.*, 2008). Kondisi yang ideal untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah dengan adanya kenaikan suhu, pembentukan oksigen dan penurunan pH yang terjadi selama fermentasi (Kustyawati dan Setyani, 2008).

Bakteri asam laktat yang umum diisolasi dari biji kakao terfermentasi di Ghana adalah *Enterococcus* sp., *E. faecium*, *E. columbae*, *L. mali*, *L. brevis*, *Weissella* sp., *W. cibaria*, *W. ghanaensis*, *W. confuse*, *W. paramesenteroides*, *W. kimchii*, *Lactococcus lactis*, *Leu. durionis*, *Leu. mesenteroides* (Camu *et al.*, 2008). Bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi di PTPN XII Kota Blater Ambulu (Jember) adalah *Leu. mesenteroides*, *Leu. dextranicum* dan *L. plantarum* (Inayatin dan Muhammadan, 2008).

2.4 Ciri-ciri dan Klasifikasi *Lactobacillus* sp.

Lactobacillus sp. adalah salah satu genus bakteri asam laktat yang tumbuh selama fermentasi biji kakao (Camu *et al.*, 2008). *Lactobacillus* sp. dapat memfermentasi gula dengan menghasilkan sejumlah asam laktat sehingga dapat digunakan dalam produksi makanan fermentasi (Buckle *et al.*, 1987).

Ciri – ciri genus *Lactobacillus* sp. adalah gram positif, bentuk batang dan katalase negatif (Susanti, 2011). Salminen dan Ouwehand (2004) menyatakan bahwa *Lactobacillus* sp. berbentuk batang pendek dengan lebar 0,9-1,2 μm dan panjang 3-8 μm dengan warna putih susu sampai abu-abu agak kuning, dapat tumbuh pada suhu 15-37 $^{\circ}\text{C}$, tidak tumbuh pada suhu 45 $^{\circ}\text{C}$ dan dapat tumbuh pada pH 3,0-4,6. Schlegel dan Schmidt (1994) menambahkan bahwa sifat khusus

yang dimiliki *Lactobacillus* sp. yaitu mampu memfermentasi glukosa menjadi laktat saja atau menjadi produk peragian lain dan karbondioksida. Berdasarkan sifat tersebut *Lactobacillus* sp. dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

1. *Lactobacillus* sp. homofermentatif adalah *Lactobacillus* sp. yang dapat membentuk asam laktat murni atau hampir (90 %) murni. Penguraian glukosa melalui alur fruktosa difosfat termasuk aldolase dan memindahkan hidrogen yang terjadi pada dehidrogenasi gliserinaldehid-3-fosfat ke piruvat. Spesies dari *Lactobacillus* sp. homofermentatif, diantaranya *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei* dan *L. plantarum*.
2. *Lactobacillus* sp. heterofermentatif adalah *Lactobacillus* sp. yang tidak mempunyai enzim utama dari alur fruktosa difosfat yaitu aldolase dan triosafosfat isomerase. Penguraian glukosa dimulai melalui alur pentosa fosfat yaitu melalui glukosa-6-fosfat, 6-fosfoglukonat dan ribulosa-5-fosfat. Spesies dari *Lactobacillus* sp. heterofermentatif, diantaranya *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* dan *L. viridescens*. Jalur metabolisme bakteri asam laktat tersebut dapat dilihat pada Lampiran A.

2.5 Metode Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi isolat bakteri asam laktat didasarkan pada karakter fenotip mengacu pada "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (Tabel 2.3). Berikut ini beberapa uji yang perlu dilakukan:

1. Pengecatan Gram

Bakteri asam laktat pada dasarnya termasuk gram positif (Wibowo dan Ristanto, 1988). Bakteri gram positif memiliki membran sel dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada gram negatif, lapisan ini dapat menyerap warna ungu hasil reaksi antara yodium dan kristal violet. Bakteri gram positif pada awal pengecatan banyak menyerap warna ungu dari kristal violet-yodium dan menahannya dalam lapisan peptidoglikan sehingga saat pencucian dengan alkohol 95 % sebagian besar warna ungu masih tertahan dan tidak hilang. Oleh karena itu, pada saat pengamatan akhir bakteri menunjukkan warna ungu. Sebaliknya, pada bakteri gram negatif, lapisan peptidoglikannya tidak mampu

mempertahankan warna ungu kristal violet-yodium saat dicuci dengan alkohol, sehingga warna sel menjadi merah setelah penambahan safranin (Fardiaz, 1992).

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

2. Uji Katalase

Bakteri asam laktat pada dasarnya termasuk katalase negatif karena ketidakmampuannya dalam menghasilkan enzim katalase (Wibowo dan Ristanto, 1988). Pengujian katalase dilakukan untuk mengetahui toleransi bakteri terhadap oksigen. Bakteri yang tidak memiliki enzim katalase yang berfungsi untuk memecah adanya H_2O_2 hasil reaksi dari flavoprotein bakteri dan oksigen termasuk dalam bakteri katalase negatif. Bakteri katalase negatif menunjukkan bahwa bakteri tersebut bersifat non-oksidatif (bakteri anaerob), sehingga reaksi tersebut tidak dapat menimbulkan gelembung pada akuades, yang merupakan salah satu ciri bakteri asam laktat. Sebaliknya, bakteri yang memiliki enzim katalase dapat menguraikan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, termasuk dalam bakteri katalase positif (bakteri aerob). Reaksi penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dapat menimbulkan gelembung pada akuades (Biehl, 1984).

3. Uji Produksi Gas (CO_2)

Berdasarkan tipe fermentasi gulanya, bakteri asam laktat dibagi atas dua kelompok yaitu bakteri yang memproduksi asam laktat murni (homofermentatif) dan bakteri yang memproduksi asam laktat, CO_2 dan produk peragian lain (heterofermentatif) (Buckle *et al.*, 1987). Bakteri asam laktat homofermentatif, diantaranya *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaris*, *L. casei*, dan *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus* dan *Pediococcus acidilactici* sedangkan bakteri asam

laktat heterofermentatif, diantaranya *L. bervis*, *L. fermentum*, *Leu. lactis* dan *W. confuse* (Yunenshi, 2011). Bakteri asam laktat homofermentatif, diantaranya *L. helveticus* dan *L. plantarum*, sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif, diantaranya *L. buchneri* dan *L. viridescens*. Oleh karena itu, uji produksi gas (CO₂) ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat (Schlegel dan Schmidt, 1994).

4. Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda

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

5. Pertumbuhan pada Konsentrasi garam NaCl yang Berbeda

Masing-masing spesies bakteri asam laktat memiliki perbedaan toleransi untuk tumbuh pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda (Vos *et al.*, 2009). Bakteri asam laktat yang mampu tumbuh dan berkembang pada fermentasi menggunakan kadar garam tinggi (6,5 % w/v) diperkirakan adalah BAL dari genus *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* (Buckle *et al.*, 1987). Genus *Pediococcus* yang tumbuh baik pada konsentrasi garam 6,5 % (w/v), diantaranya *Pediococcus cerevisiae* (Wood dan Lass, 1989). Wayan (2011) juga melaporkan bahwa genus *Pediococcus* yang tumbuh baik pada konsentrasi garam 6,5 % (w/v), diantaranya *P. halophilus* dan *P. urinae-equi*. Sebaliknya, bakteri asam laktat yang tidak dapat tumbuh baik pada media dengan konsentrasi garam tinggi (6,5 %) adalah genus *Streptococcus*, diantaranya *S. lactis*, *S. lactis subsp. diacetylactis*, *S. cremoris*, dan *S. thermophilus* (Ray, 2004). Oleh karena

itu, uji pertumbuhan bakteri pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat.

6. Kemampuan Memproduksi Asam

Bakteri asam laktat pada dasarnya menghasilkan asam-asam organik terutama asam laktat sebagai senyawa utama hasil fermentasi karbohidrat (Sudarmadji *et al.*, 1989). Pertumbuhan BAL akan menghasilkan asam laktat yang akan meningkatkan total asam (Hidayat *et al.*, 2006). Muhammadan (2008) melaporkan bahwa total asam akan menunjukkan banyaknya asam organik yang dihasilkan oleh BAL mengakibatkan penurunan keasaman (pH) pada media pertumbuhannya. Jay (1992) menyatakan bahwa penurunan pH pada media pertumbuhan oleh BAL disebabkan oleh asam laktat yang dihasilkan oleh BAL termasuk asam yang tergolong lemah dan dapat terdisosiasi dengan melepaskan ion hidrogen. Pelepasan ion hidrogen ini akan dapat mengubah keseimbangan larutan sehingga derajat keasaman (pH) pada media pertumbuhannya menjadi rendah.

Kemampuan masing-masing bakteri asam laktat dalam memproduksi asam berbeda. Genus *Streptococcus* dalam media glukosa dapat menurunkan pH hingga 4,0 (Ray, 2004). Frazier dan Westhof (1988) menyatakan bahwa genus *Pediococcus* dapat memfermentasi gula menghasilkan 0,5-0,9 % asam terutama asam laktat. Oleh karena itu, uji produksi asam oleh bakteri asam laktat ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies bakteri asam laktat.

7. Produksi Dekstran dari Sukrosa

Ciri khas dari bakteri asam laktat dari genus *Leuconostoc* adalah memiliki kemampuan untuk memproduksi dekstran (Edward dan James, 1945). Suwasono (2005) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Leuconostoc* mampu mendegradasi sukrosa menjadi lendir dekstran, dengan bantuan enzim dekstran sukrase. Edward dan James (1945) menyatakan bahwa lendir dekstran yang dihasilkan oleh bakteri dari genus *Leuconostoc* tidak berperan dalam pertumbuhan sel, tetapi kapsul ini berperan bagi sel dalam menyesuaikan diri dengan lingkungan hidupnya, terutama pada kondisi lingkungan yang ekstrim, seperti sumber karbon yang berlebihan

dalam media pertumbuhannya (> 1 %). Ray (2004) menyatakan bahwa beberapa spesies dari genus *Leuconostoc*, diantaranya *Leu. mesenteroides*, *Leu. paramesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. carnosum* dan *Leu. gelidum*. Oleh karena itu, apabila isolat bakteri diuji produksi dekstran dalam media sukrosa agar hasilnya positif maka diduga kuat bakteri asam laktat tersebut adalah genus *Leuconostoc*

8. Pertumbuhan pada Karbohidrat yang Berbeda

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

Tabel 2.3 Bergey's manual of systematic bacteriology

Keterangan	Pewarnaan gram	Bentuk sel	Katalase	CO ₂	Dekstran	Suhu (°C)			Garam (%)			Fermentasi Karbohidrat					Asam dr Litmus milk	Amonia dr arginin	
						15	37	45	4	6,5	Glu	Man	Arb	Mnt	Fruk	Mal			Suk
<i>L. bulgaricus</i>	+	Batang	-	-	-	+	-	-	.	.	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>L. casei</i>	+	Batang	-	-	-	+	+	-	.	.	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>L. plantarum</i>	+	Batang	-	-	-	+	+	-	-	-	+	.	d	+	+	+	+	+	-
<i>L. curvatus</i>	+	Batang	-	-	-	+	+	-	.	.	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>L. brevis</i>	+	Batang	-	+	-	+	+	-	-	#	+	+	d	#	-
<i>L. fermentum</i>	+	Batang	-	-	-	-	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	d	.	
<i>S. faecium</i>	+	Kokus	-	-	-	+	+	+	+	+	.	.	+	+	+	+	+	+	+
<i>Leu. mesenteroides</i>	+	Kokus	.	+	+	.	d	.	+	d	.	+	+	d	+	+	.	+	-
<i>Leu. dextranicum</i>	+	Kokus	.	+	+	.	+	.	d	-	.	d	-	d	+	+	.	+	-
<i>Leu. paramesenteroides</i>	+	Kokus	-	-	-	+	+	+	+	+	.	.	d	d	+	+	+	+	-
<i>Leu. lactis</i>	+	Kokus	.	-	-	.	+	.	d	-	.	d	-	-	+	+	.	+	-

- Tanda (+): > 90 % positif; d: 10-90 % positif; (-): 90 % negatif; #: reaksi lemah, lambat atau negatif; (.): tidak diketahui.
- Glu: Glukosa; Man: Manosa; Arb: Arabinosa; Mnt: Manitol; Fruk: Fruktosa; Mal: Maltosa; Suk: Sukrosa.
- Sumber: Vos, *et al.* (2009)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Isolasi bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi yang dilakukan di PTPN XII Kebun Kalikempit, Desa Tulungrejo Kecamatan Glenmore, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur pada bulan Januari dan Juni 2014. Pengujian kemampuan kerja antikapang dan identifikasi oleh bakteri asam laktat yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai bulan Januari 2014 sampai September 2014.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan utama penelitian adalah isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi yang berasal dari buah kakao varietas forastero yang matang optimal, bebas dari serangan hama dan penyakit sehingga biji kakao yang dihasilkan bermutu baik. Isolat BAL tersebut diambil dari *pulp* kakao terfermentasi pada jam ke-0 sampai jam ke-88 dan cairan *pulp* kakao terfermentasi diambil pada jam ke-0 sampai jam ke-64 (tergantung ada tidaknya cairan *pulp* kakao). Biji kakao basah juga diambil selama fermentasi untuk diukur pH bijinya. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah MRS (*Malt Rigorose Sharp*) broth, MRS (*Malt Rigorose Sharp*) agar, MEA (*Malt Extract Agar*), sukrosa agar (komposisi untuk 1 liter: 10 g trypton, 5 g ekstrak khamir, 5 g K_2HPO_4 , 5 g trimonium sitrat, 50 g sukrosa dan 15 g bacto agar), PGY (*Pepton Glucose Yeast*)-agar (komposisi untuk 1 liter: 10 g ekstrak khamir; 10 g glukosa; 5 g pepton; 0,5 ml Tween 80; 0,01 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 4H_2O$; 2 g Na-asetat; 0,01 NaCl dan 14 g agar).

Selain itu, bahan kimia lainnya seperti: akuades, $CaCO_3$, NaOH, KOH, H_2O_2 , alkohol, spiritus, NaCl. Bahan untuk pengecatan gram antara lain: kristal

violet, mordan, alkohol-aseton dan safranin. Beberapa macam karbohidrat, antara lain: fruktosa, sukrosa, maltosa, manitol, glukosa dan arabinosa.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kotak fermentasi, pH meter (Trans Instrumen), *laminar air flow* (Cruma SA, Type 9005-FL, Spanyol), inkubator suhu 37 °C dan 45 °C (Heraeus Instruments, Type B-6200, Germany), neraca analitik (Ohaus, Analytical Plus), *colony counter* (Stuart Scientific, Ukraina), otoklaf sterilisasi (Hirayana Manufacturing, Model HL-36, Japan), mikroskop, alat pewarnaan gram, *sentrifuse* (Centronic Selecta, kecepatan rotasi < 5000 rpm), buret dan alat-alat gelas.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

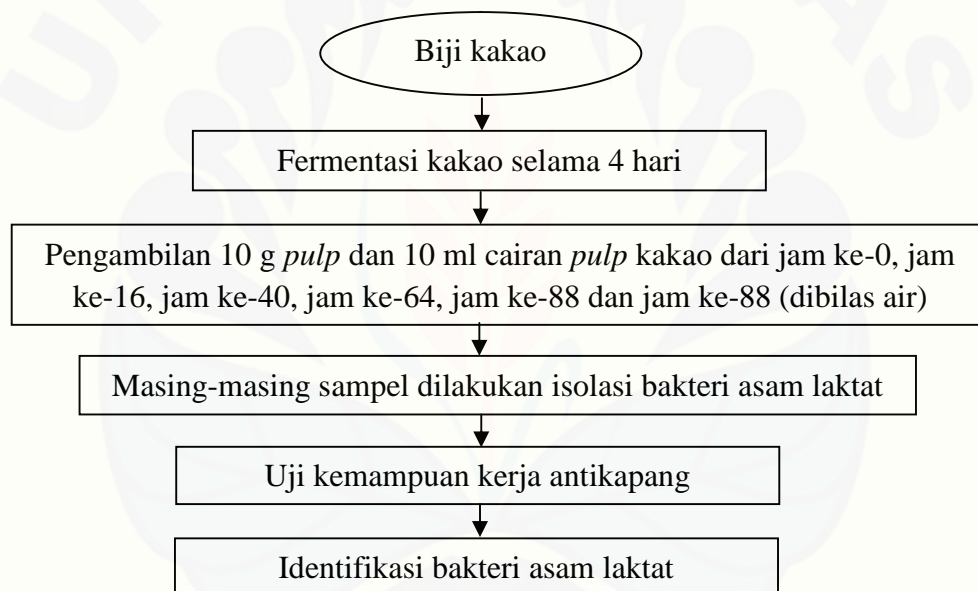
Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi kakao di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap penelitian yaitu isolasi bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi, uji kemampuan kerja antikapang dan identifikasi bakteri asam laktat yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Diagram alir rancangan penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Sebelum dilakukan isolasi bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi, terlebih dahulu ditentukan total bakteri asam laktat dan pH biji kakao selama fermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi untuk mempermudah pemilihan isolat BAL. Pengambilan sampel berupa isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi secara berturut-turut dari jam ke-0 (B 0), jam ke-16 (B 16), jam ke-40 (B 40), jam ke-64 (B 64), jam

ke-88 (B 88) dan jam ke-88 setelah biji kakao dibilas air (B 88⁺), sedangkan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi diambil jam ke-0 (L 0), jam ke-16 (L 16), jam ke-40 (L 40) dan jam ke-64 (L 64) (tergantung dari ada tidaknya cairan *pulp* kakao). Suspensi kultur bakteri asam laktat dibuat dengan cara 10 g *pulp* kakao dan 10 ml cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam sebuah erlenmeyer 250 ml berisi 90 ml akuades steril, lalu diaduk rata sampai homogen. Selanjutnya suspensi kultur bakteri asam laktat tersebut diambil 1 ml dan diencerkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran 10^{-2} , diaduk sampai homogen dan pengenceran dilanjutkan sampai 10^{-7} .



Gambar 3.1 Diagram alir rancangan penelitian isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Sampel suspensi *pulp* maupun cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dari masing-masing pengenceran (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian dituang media agar ke dalamnya (*pour plate method*). Media yang digunakan untuk menghitung total bakteri asam laktat adalah MRS agar CaCO_3 1 % dan untuk menumbuhkan kapang guna uji kemampuan kerja antikapang oleh bakteri asam laktat, sampel ditumbuhkan pada media MEA (*Malt Extract Agar*). Cawan petri

diinkubasi dalam kondisi anaerobik pada suhu 37 °C selama 48 jam setelah media agar memadat. Saat dilakukan inkubasi yang perlu diperhatikan adalah posisi cawan terbalik. Pada penentuan total bakteri asam laktat, koloni yang memberikan area yang jernih disekitarnya pada media MRSA-CaCO₃ 1 % diduga kuat adalah bakteri asam laktat (Rahayu dan Margino, 1997). Isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dipilih yang memiliki area bening terbaik untuk dimurnikan dengan cara menggoreskan kembali (*re-streaking*) isolat BAL tersebut pada media MRSA-CaCO₃ 1 % dengan goresan kuadran. Isolat BAL yang telah digores kuadran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Tahap ini dilakukan untuk mendapatkan isolat BAL tunggal.

Isolat BAL tunggal hasil pemurnian dikembangkan pada media agar tegak. Pengembangan isolat pada media agar tegak dilakukan dengan menusukkan satu ose isolat BAL ke dalam 5 ml media MRSA-CaCO₃ 1 % yang telah memadat. Inkubasi isolat tersebut pada suhu 37 °C selama 24 – 48 jam. Apabila isolat akan diuji kemampuan kerja antikapang dan identifikasi, perlu dipreservasi terlebih dahulu, gunanya untuk mengoptimalkan kondisi isolat BAL saat diujikan. Preservasi isolat ini dilakukan dengan menginokulasikan satu ose kultur dari koloni tunggal dari media agar tegak ke dalam tabung ependorf berisi 1-1,5 ml MRS broth. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24-48 jam. Diagram alir penentuan total BAL dan isolasi BAL dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dapat dilihat pada Gambar 3.2 dan Gambar 3.3.

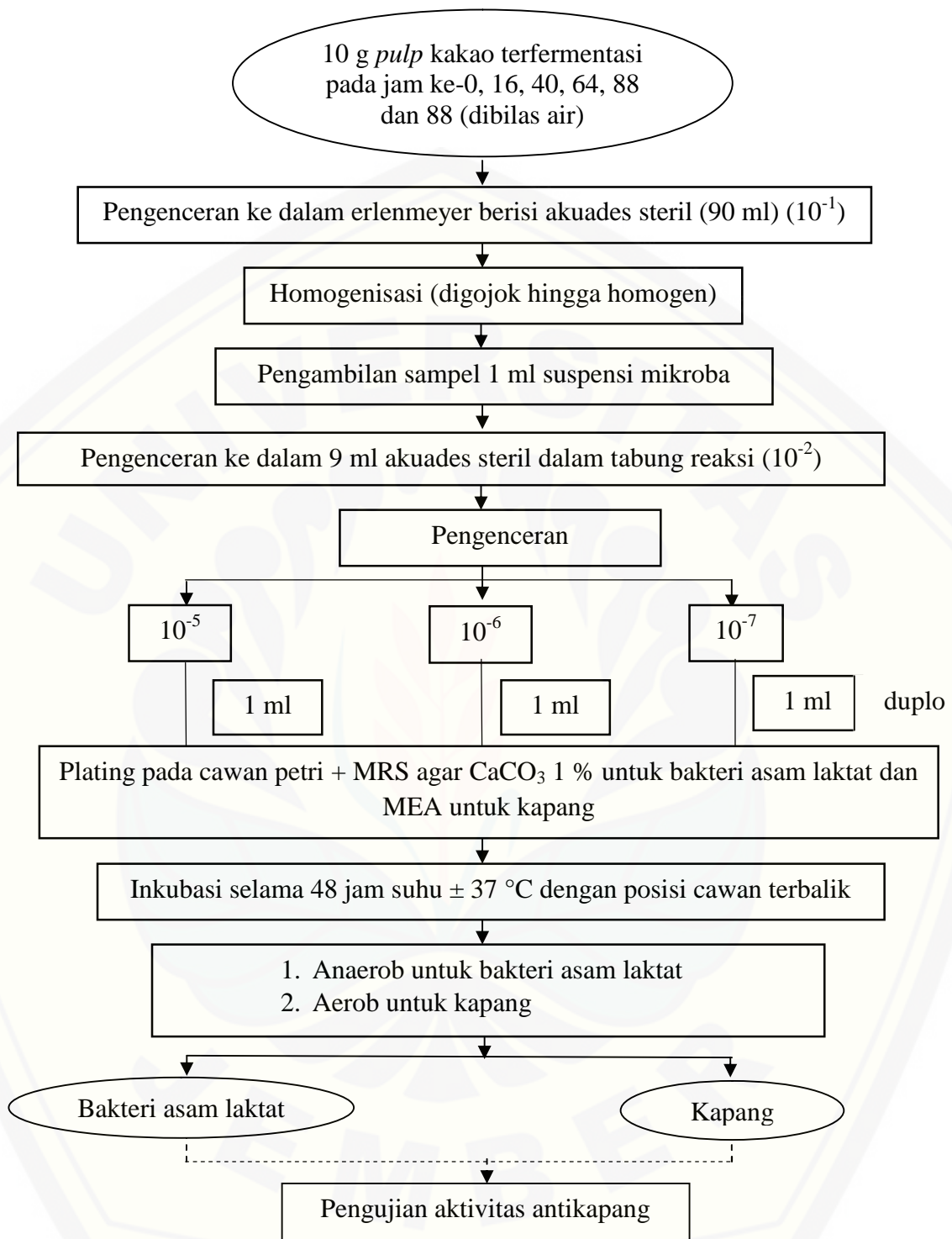
2. Kemampuan Kerja Antikapang oleh Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi, yang diidentifikasi adalah yang memiliki kemampuan kerja antikapang terbesar. Maka dari itu, diuji kemampuan kerja antikapangnya sebelum diidentifikasi. Kapang yang diujikan adalah kapang yang tumbuh dominan selama fermentasi biji kakao di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Kapang tersebut juga diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp*

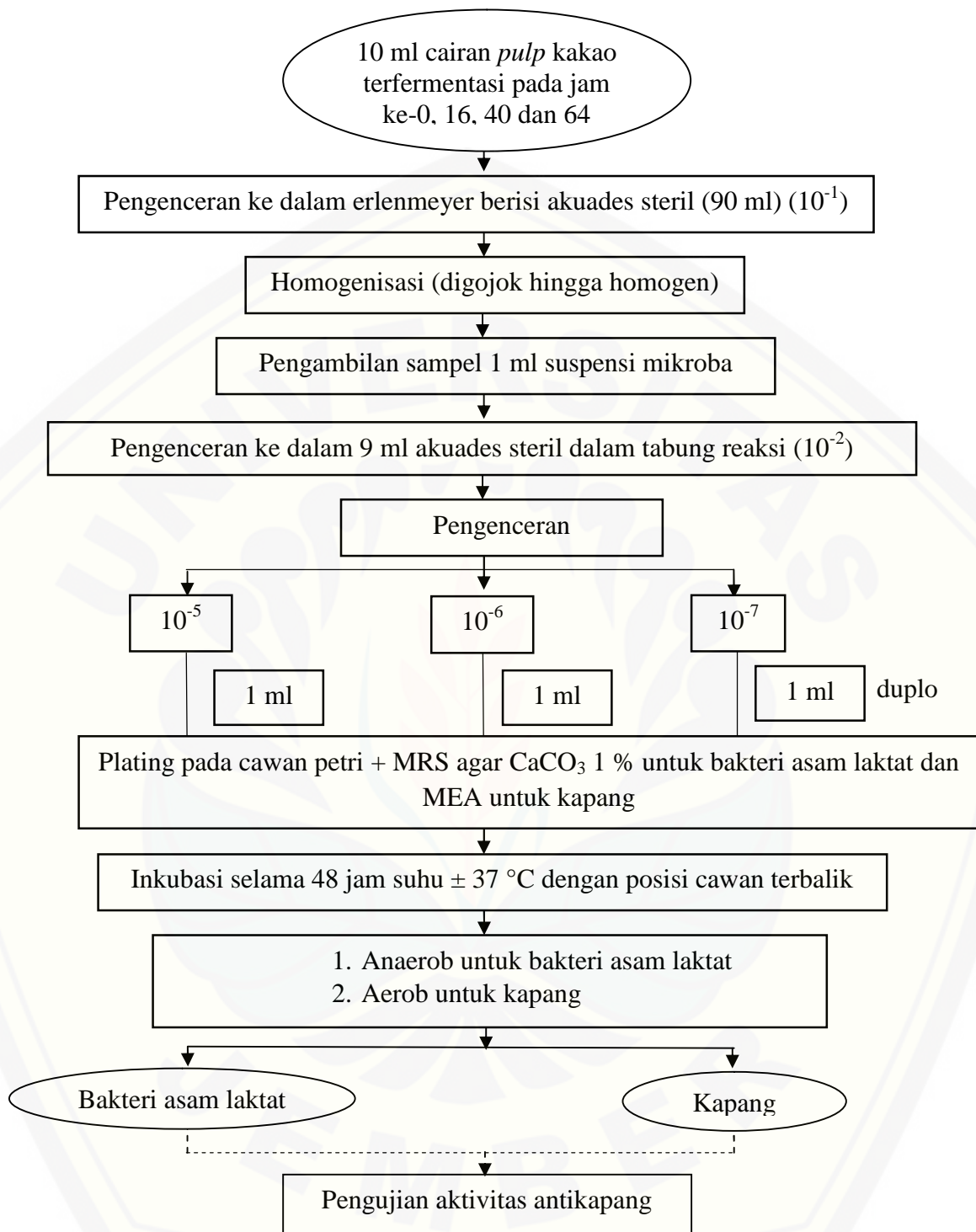
kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi, yang kemudian dimurnikan pada media MEA (*Malt Extract Agar*) dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 4-6 hari. Sebagai data pendukung, kapang tersebut diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi secara makroskopis dan mikroskopis. Isolasi kapang dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dapat dilihat pada Gambar 3.2 dan Gambar 3.3.

Pengujian kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur (*well diffusion method*) (Magnusson, 2003). Caranya adalah dengan menginokulasi 10 ose miselium kapang ke dalam 10 ml akuades steril (jumlah konidia dihitung dengan metode pengenceran yaitu 10^6 konidia/ml), lalu dimasukkan ke dalam cawan masing-masing 1 ml, kemudian ke dalam cawan dituang 15 ml MEA (*Malt Ekstrak Agar*) (duplo) yang sebelumnya sudah dicairkan, digoyang-goyangkan hingga tercampur antara media dan suspensi kapang. Biarkan sampai agar memadat (\pm 3 jam). Pembuatan sumuran dengan diameter 4-5 mm dengan menggunakan *blue tip* steril yang dipotong ujungnya, sebanyak 5 lubang (empat lubang uji dan satu sumuran sebagai kontrol) yang mengelilingi cawan petri.

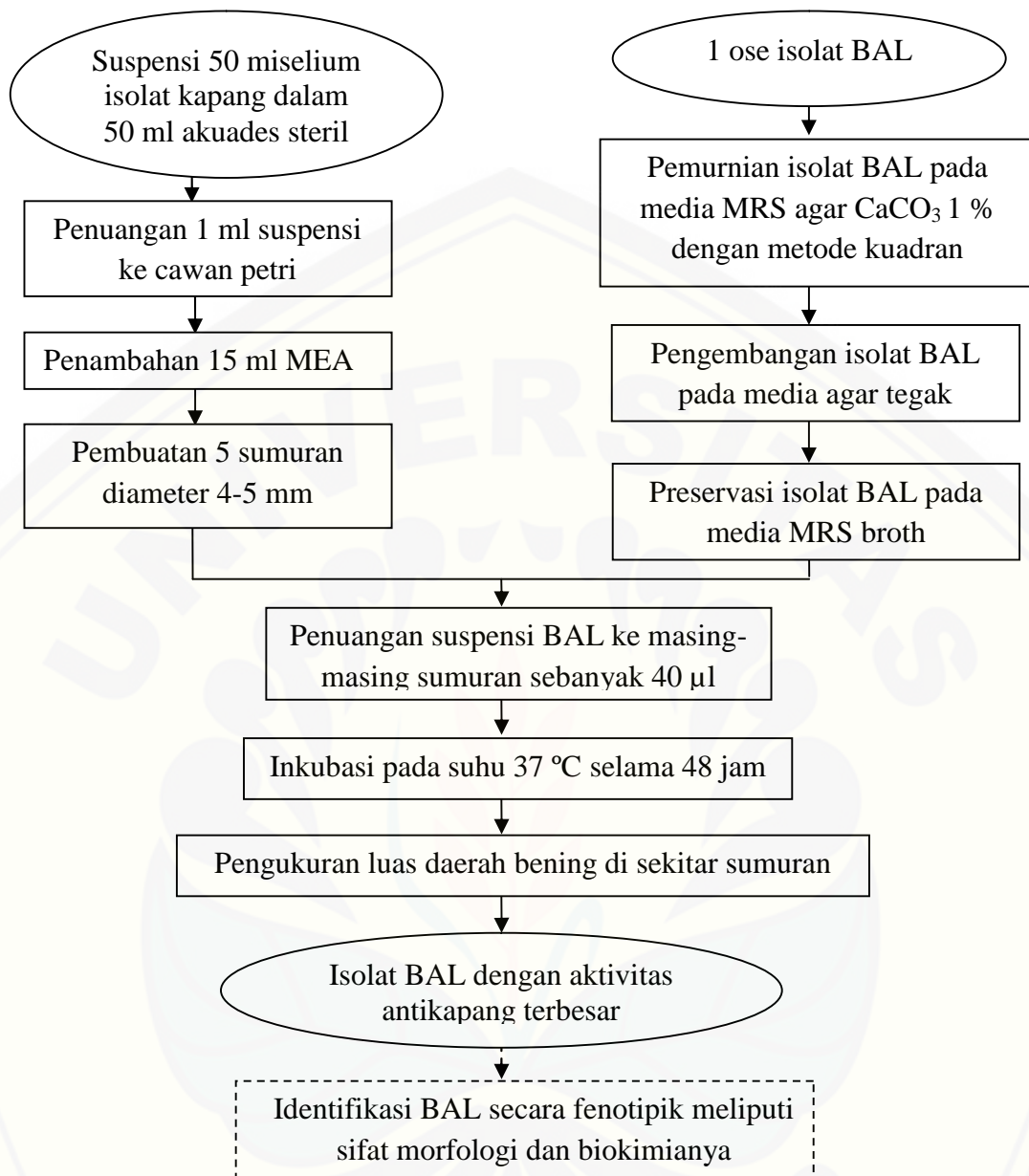
Isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi yang diuji dipreservasi terlebih dahulu. Selanjutnya sebanyak 40-50 μ l suspensi kultur BAL tersebut dituangkan ke dalam masing-masing sumur dan dibiarkan terdifusi ke dalam agar selama \pm 3-4 jam pada suhu ruang. Inkubasi secara aerobik pada suhu 37 °C selama 48 jam, tanpa dibalik. Satu sumur sebagai kontrol hanya diisi dengan 40-50 μ l media MRS broth saja. Selanjutnya diamati kemampuan kerja antikapangnya. Diagram alir uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.2 Diagram alir penentuan total bakteri asam laktat dan isolasi bakteri asam laktat serta kapang dari *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi



Gambar 3.3 Diagram alir penentuan total bakteri asam laktat sekaligus isolasi bakteri asam laktat serta kapang dari cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi



Gambar 3.4 Diagram alir uji kemampuan kerja antikapang oleh bakteri asam laktat yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

3. Identifikasi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi secara Fenotip

Identifikasi isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi didasarkan pada karakter fenotip mengacu pada “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”.

Isolat BAL yang telah tumbuh diidentifikasi sifat-sifat fenotipnya untuk menentukan dugaan spesies isolatnya. Pengidentifikasian meliputi sifat morfologi yaitu pewarnaan gram dan sifat biokimia meliputi: sifat katalase, produksi CO₂, produksi dekstran dari sukrosa agar, titrasi asam, serta pertumbuhan pada suhu, garam dan karbohidrat yang berbeda.

3.3.3 Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil pengamatan diolah dan dianalisa dari rata-rata 3 kali ulangan. Untuk mempermudah intepretasi data maka ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik.

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: perhitungan total BAL (Fardiaz, 1992), perhitungan tingkat keasaman (pH) biji kakao basah, perhitungan luas area bening pada uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL dan identifikasi BAL (Vos *et al.*, 2009). Pengidentifikasian BAL meliputi: pewarnaan gram (Bell *et al.*, 2005), sifat katalase (Bell *et al.*, 2005), produksi CO₂ (Cappucino dan Sherman, 2005), pertumbuhan BAL pada suhu berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005), pertumbuhan BAL pada konsentrasi garam (NaCl) berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005), produksi asam (Cahyaningsih, 2006), produksi dekstran dari sukrosa (Cappucino dan Sherman, 2005) dan fermentasi berbagai jenis karbohidrat (Cahyaningsih, 2006).

3.5 Prosedur Analisis

3.5.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

1. Perhitungan Total Bakteri Asam Laktat (*Total Plate Count*)

Cara perhitungan total bakteri asam laktat ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Fardiaz (1992). Pengamatan pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan setelah diinkubasi selama 24 – 48 jam. Ciri dari koloni bakteri asam laktat adalah berwarna putih susu dan menghasilkan area bening disekitarnya pada media MRSA-CaCO₃ 1 %. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Rahayu dan

Margino (1997) bahwa ciri dari bakteri asam laktat adalah koloninya yang memberikan area yang jernih disekitarnya pada media MRSA-CaCO₃ 1 %. Total bakteri asam laktat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Total Koloni (cfu/ml)} = \frac{\text{Total mikroba pada cawan petri}}{\frac{1}{\text{pengenceran}}}$$

2. Tingkat Keasaman (pH) Biji Kakao

Secara kimiawi, indikator berlangsungnya fermentasi dapat diketahui dari laju perubahan derajat keasaman (pH) biji kakao selama fermentasi berlangsung. Pengukuran tingkat keasaman (pH) biji kakao dilakukan dengan menggunakan pH meter. Pengukuran tingkat keasaman (pH) biji kakao ini dilakukan dengan menghancurkan 5 gram biji kakao basah yang telah dikupas kulitnya, dilarutkan dalam 5 ml akuades diaduk sampai merata dan diukur keasamannya.

3.5.2 Perhitungan Luas Area Bening pada Uji Kemampuan Kerja Antikapang oleh Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dapat diamati mengukur luas area penghambatannya terhadap kapang. Pengukuran luas area penghambatan kapang oleh isolat bakteri asam laktat (L) adalah sama dengan luas area bening (Lb) dikurangi luas sumuran (± 5 mm) (Ls). Pengukuran area hambat isolat BAL terhadap pertumbuhan kapang dapat dilihat pada Gambar 3.4. Secara matematis luas area penghambatan kapang oleh isolat BAL (L) dapat dihitung sebagai berikut:

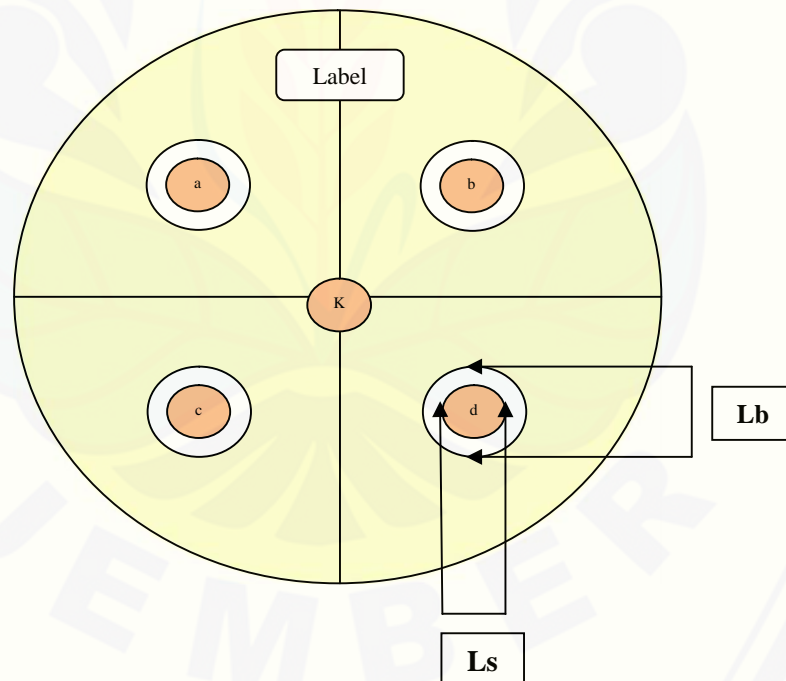
$$\text{Luas area penghambatan (L)} = \text{Luas area bening (Lb)} - \text{Luas sumuran (Ls)}$$

3.5.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat secara Fenotipik

1. Pewarnaan Gram

Cara pewarnaan gram ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Bell *et al.* (2005). Gelas objek dan gelas penutup dibersihkan dengan cara disemprot menggunakan etanol 70 % dan dikeringanginkan terlebih dahulu.

Akuades steril ditetaskan diatas gelas objek, ditambahkan 1 ose isolat berumur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas objek. Proses selanjutnya yaitu dengan memfiksasi preparat (dilewatkan diatas nyala api bunsen beberapa kali) hingga terbentuk noda. Diatas noda tersebut ditetaskan pewarna kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Langkah selanjutnya yaitu dengan ditetesi larutan mordan dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan dan ditetesi dengan alkohol-aseton sampai cat luntur tidak berwarna. Tahap terakhir dari pewarnaan gram adalah ditetesi dengan pewarna safranin selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Objek *glass* ditutup dengan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 x. Jika isolat warnanya merah berarti isolat tersebut diduga termasuk bakteri gram negatif atau bukan, dan jika warnanya ungu berarti isolat termasuk bakteri gram positif, yang merupakan ciri umum dari BAL.



Keterangan :

Lb : Luas area bening

Ls : Luas area sumuran

K : Kontrol (lubang sumuran berisi MRS broth)

a,b,c,d: Luas area bening oleh isolat BAL

Gambar 3.5 Pengukuran diameter area hambat isolat BAL terhadap pertumbuhan

2. Uji Katalase

Cara pengujian katalase ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Bell *et al.* (2005). Satu ose isolat BAL berumur 24-48 jam dioleskan pada objek *glass*, di atasnya ditetesi dengan H₂O₂ 3 % dan didiamkan selama kira-kira 1 menit. Jika terjadi gelembung, maka isolat tersebut termasuk dalam bakteri katalase positif (aerob), sedangkan jika tidak terjadi gelembung, maka isolat BAL tersebut termasuk bakteri katalase negatif (anaerob) yang merupakan ciri umum dari BAL.

3. Produksi CO₂ dengan Metode Agar Tusuk

Cara pengujian produksi CO₂ oleh bakteri dengan metode agar tusuk ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Satu isolat BAL diinokulasikan pada media MRS agar dalam tabung reaksi dengan ukuran yang seragam. Isolat tersebut ditusukkan ke media agar tegak dan disumbat kapas. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Selanjutnya, diamati ada tidaknya gas CO₂ yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Kultur BAL yang memproduksi gas dapat dilihat dari tingginya media agar tegak yang terdorong gas CO₂ yang merupakan ciri dari kelompok BAL heterofermentatif, apabila tidak memproduksi gas maka termasuk ke dalam kelompok BAL homofermentatif.

4. Produksi Dekstran dari Sukrosa

Cara pengujian produksi dekstran dari sukrosa oleh bakteri ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Inokulasi 1 ose isolat BAL dalam tabung ependorf berisi 1-1,5 ml MRS broth. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diambil 0,1 ml kultur BAL dan diinokulasikan ke dalam cawan petri steril, lalu dituangkan 10 ml sukrosa agar dan ratakan. Inkubasi isolat BAL dengan posisi cawan terbalik pada suhu 37 °C selama 5 hari setelah agar memadat. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya produksi lendir dekstran dari sukrosa pada cawan yang berarti isolat tersebut genus *Leuconostoc*. Jika tidak memproduksi dekstran maka bakteri asam laktat tersebut tidak termasuk jenis *Leuconostoc* meskipun ada sebagian dari spesies *Leuconostoc* tidak mampu memproduksi dekstran dari sukrosa, seperti *Leu. paramesenteroides*, *Leu. oenos*, *Leu. cremoris* dan *Leu. lactis*.

5. Pertumbuhan pada Suhu Berbeda

Cara pengujian pertumbuhan bakteri pada suhu berbeda ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Satu ose isolat BAL diinokulasikan pada media MRS broth sebanyak 1-1,5 ml. Inkubasi isolat tersebut selama 48 jam pada suhu yang berbeda 15 °C (lemari es), 37 °C dan 45 °C. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas.

6. Pertumbuhan pada Konsentrasi Garam (NaCl) Berbeda

Cara pengujian pertumbuhan bakteri pada konsentrasi garam (NaCl) berbeda ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cappucino dan Sherman (2005). Konsentrasi garam (NaCl) yang digunakan terdiri dari NaCl 4 % (2 g), NaCl 6,5 % (3,25 g) dan kontrol (tanpa penambahan garam). Masing-masing konsentrasi garam tersebut ditambah 50 ml MRS broth dan disterilisasi. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam tabung ependorf steril sebanyak 1 ml dan diinokulasi dengan 50 µl isolat. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas.

7. Produksi Asam

Cara pengujian produksi asam oleh bakteri ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cahyaningsih (2006). Inokulasi 1 ose isolat BAL ke dalam tabung ependorf berisi 1 – 1,5 ml MRS broth. Inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Analisis produksi asam dilakukan dengan mengambil sejumlah media MRS broth yang telah ditumbuhi oleh isolat secara aseptis, kemudian diukur tingkat keasaman (pH) menggunakan pH meter. Setelah dilakukan pengukuran tingkat keasaman (pH) menggunakan pH meter dilanjutkan dengan menggunakan metode titrasi asam-basa sebagai data pembanding. Media MRS broth yang telah ditumbuhi oleh isolat tersebut disentrifuse selama \pm 10 menit, yang bertujuan untuk memisahkan sel isolat dari hasil metabolit (padatan tidak terlarut). Sebanyak 1 ml supernatan hasil *sentrifuse* diencerkan dalam 9 ml akuades, lalu ditambah 2-3 tetes indikator fenolftalin 1 % kemudian dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,01 N sampai titik akhir titrasi tercapai, yaitu terbentuk warna merah muda dan tidak memudar lagi (tetap). Jumlah ml NaOH yang digunakan

setara dengan jumlah total asam laktat yang dihasilkan oleh isolat. Total asam dihitung sebagai persen asam laktat dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0,09 \times \text{pengenceran}}{\text{ml sampel}} \times 100 \%$$

8. Kemampuan Fermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat

Cara pengujian kemampuan fermentasi berbagai jenis karbohidrat oleh bakteri ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Cahyaningsih (2006). Sebanyak 1 ose isolat BAL diinokulasi ke dalam 1 ml media PGY broth yang dimodifikasi. Glukosa yang digunakan kedalam PGY broth diganti dengan karbohidrat yang diujikan terdiri dari: arabinosa, fruktosa, glukosa, maltosa, manitol, manosa, arabitol, galaktosa, laktosa dan sukrosa. Isolat diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C sampai menimbulkan reaksi positif ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas.

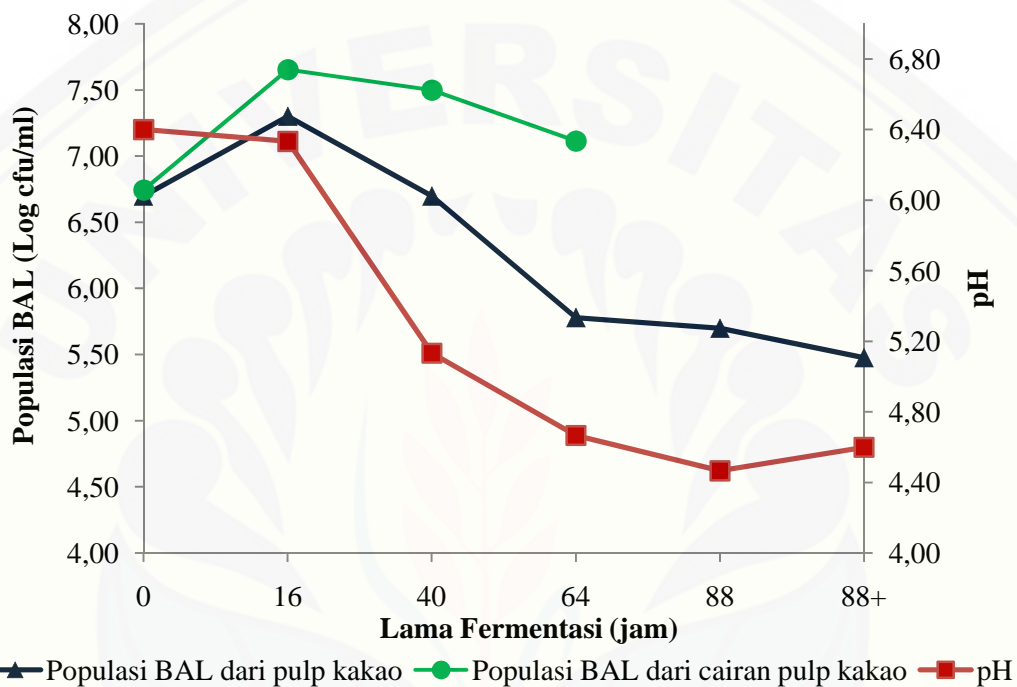
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu upaya untuk mencegah pencemaran biji kakao oleh kapang penghasil mikotoksin adalah dengan menggunakan bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang. Bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dalam penelitian ini didapatkan dari isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. BAL yang telah terisolasi dan memiliki kemampuan kerja antikapang terbesar diidentifikasi yang didasarkan pada karakter fenotipnya. Hasil pengamatan setiap parameter dan pembahasannya secara rinci diuraikan dalam sub bab berikut:

4.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

BAL merupakan salah satu mikroba yang berperan dalam fermentasi biji kakao. Hal ini ditunjukkan dengan adanya populasi BAL dalam *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi selama 88 jam, seperti terlihat pada Gambar 4.1. Populasi BAL yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi sebesar 5×10^6 (cfu/ml) pada jam ke-0, kemudian menjadi dominan sebesar 2×10^7 (cfu/ml) pada jam ke-16, selanjutnya populasi BAL menurun konstan hingga akhir fermentasi sebesar 3×10^5 (cfu/ml) pada jam ke-88. Populasi BAL yang diisolasi dari cairan *pulp* kakao terfermentasi juga tidak jauh berbeda dengan populasi BAL yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi yakni sebesar $5,5 \times 10^6$ (cfu/ml) pada jam ke-0, kemudian menjadi dominan sebesar $4,5 \times 10^7$ (cfu/ml) pada jam ke-16, selanjutnya populasi BAL menurun konstan hingga akhir fermentasi sebesar $1,3 \times 10^7$ (cfu/ml) pada jam ke-64. Populasi BAL yang cukup besar mulai awal fermentasi tersebut disebabkan karena kandungan *pulp* pada biji kakao sangat cocok untuk tumbuhnya BAL. Wood dan Lass (1989) menyebutkan bahwa pada awal fermentasi biji kakao, mikroba yang aktif dalam pemecahan substrat *pulp* kakao salah satunya adalah BAL yang dapat mengubah

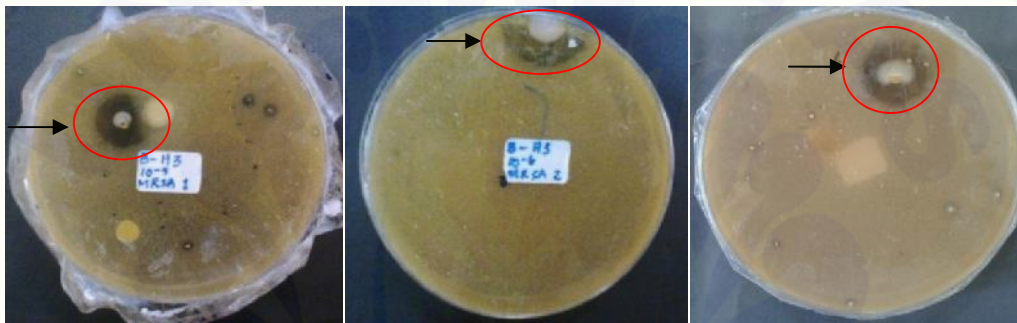
substrat gula pada *pulp* menjadi asam-asam organik terutama asam laktat dan energi berupa panas, seperti terlihat pada Gambar 2.2. Asam-asam organik dan panas yang dihasilkan oleh BAL, terbukti dari penurunan pH biji kakao (ke arah asam) yang terjadi selama fermentasi, seperti pada Gambar 4.1. Populasi BAL diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Hubungan antara populasi bakteri asam laktat diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi (log cfu/ml) dan pH biji kakao selama fermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Gambar 4.1 penting diketahui untuk mempermudah proses pemilihan isolat BAL. Isolat BAL yang dipilih adalah isolat BAL yang menghasilkan metabolit terbesar, seperti terlihat pada Gambar 4.2 dan selanjutnya isolat BAL terpilih tersebut, seperti yang terlihat pada Tabel 4.1, diuji kemampuan kerja antikapangnya. Tabel 4.1 dan Gambar 4.1 menunjukkan bahwa nilai tertinggi dari jumlah isolat BAL terpilih dan populasi BAL terjadi pada lama fermentasi yang berbeda. Populasi BAL tertinggi terjadi pada jam ke-16, sebaliknya pada jam tersebut, jumlah isolat BAL terpilih masih sedikit dan nilai tertingginya mulai terjadi pada jam ke-40 fermentasi. Perbedaan lama fermentasi untuk nilai

tertinggi dari populasi BAL dan jumlah isolat BAL terpilih ini diduga dipengaruhi oleh waktu yang dibutuhkan isolat BAL untuk menghasilkan metabolit berupa asam organik, terbukti dari penurunan pH biji kakao (ke arah asam) yang terjadi mulai pada jam ke-40 fermentasi, seperti terlihat pada Gambar 4.1. Frauendorfer dan Schieberle (2008) menyatakan bahwa selama fermentasi biji kakao, BAL menghasilkan metabolit berupa asam-asam organik melalui degradasi pulp, yang selanjutnya metabolit tersebut berdifusi ke dalam keping biji menyebabkan penurunan pH biji kakao. Oleh karena itu, nilai tertinggi dari jumlah isolat BAL terpilih dan populasi BAL terjadi pada lama fermentasi yang tidak selalu sama.



Gambar 4.2 Bakteri asam laktat diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit pada media MRSA-CaCO₃ 1 % yang produksi metabolitnya ditandai dengan terbentuknya area bening disekitarnya

Tabel 4.1 Isolat BAL terpilih yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Jam ke-	<i>Pulp</i> Kakao			Cairan <i>Pulp</i> Kakao			Jumlah
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
0	0	1	1	6	21	12	41
16	0	0	5	0	0	17	22
40	0	19	24	5	15	20	83
64	23	7	0	17	26	1	74
88	9	2	0	0	0	0	11
88+	4	0	3	0	0	0	7
							238

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa isolat BAL yang berhasil diisolasi sebanyak 238 isolat. Isolat tersebut berasal dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi dengan lama fermentasi dan tingkat pengenceran yang berbeda. Dari 238 isolat tersebut didapatkan 81 isolat yang menghasilkan metabolit berupa asam organik terbesar yang ditunjukkan dengan luasnya area bening

paling besar. Didapatkan 58 isolat dengan pertumbuhan yang bagus setelah tahap pemurnian ini. Isolat-isolat tersebut diberi kode berdasarkan asal, lama fermentasi, tingkat pengenceran, nomor urut cawan petri dan nomor urut isolat untuk mempermudah uji selanjutnya. Misal B 16 10^{-7} (2-1): isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* kakao terfermentasi sampai jam ke-16, dari hasil inokulasi suspensi pada tingkat pengenceran 10^{-7} , pada cawan petri kedua dengan nomor urut isolat ke-1. Kode isolat tersebut disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa pada waktu isolasi yang berbeda didapatkan jumlah isolat BAL terpilih yang berbeda. Jumlah isolat BAL yang didapatkan pada waktu isolasi pertama sebanyak 8 isolat, pada waktu isolasi kedua sebanyak 28 isolat dan pada waktu isolasi ketiga sebanyak 22 isolat. Adanya perbedaan jumlah isolat BAL terpilih tersebut erat kaitannya dengan perbedaan kondisi lingkungan di sekitar lokasi fermentasi biji kakao di setiap waktu isolasi. Kustyawati dan Setyani (2008) melaporkan bahwa jenis dan populasi bakteri dalam suatu fermentasi biji kakao berkaitan erat dengan kondisi ekstrinsik dan intrinsik selama fermentasi berlangsung.

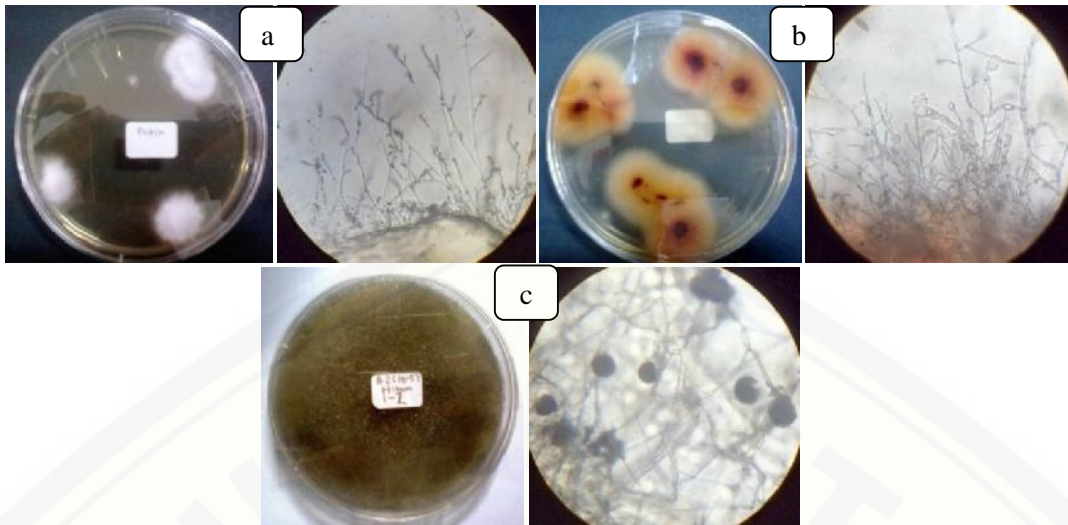
4.2 Kemampuan Kerja Antikapang oleh Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Isolat BAL yang diidentifikasi adalah isolat BAL terpilih yang memiliki kemampuan kerja antikapang terbesar terhadap 3 spesies kapang yang dominan tumbuh dalam biji kakao basah selama fermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Ketiga spesies kapang tersebut, setelah diidentifikasi diduga kuat adalah *Fusarium* sp., *Eurotium* sp. dan *Rhizopus* sp. yang bentuk koloni kapangnya dapat dilihat pada Gambar 4.3. Kapang *Rhizopus* sp. ini juga ditemukan oleh Aroyeun dan Adeyoge (2011). Selain *Rhizopus* sp., juga ditemukan *Aspergillus*, *Mucor* sp. dan *Penicillium* yang merupakan kapang yang sering mengontaminasi biji kakao. Rahmadi dan Fleet (2008) juga melaporkan bahwa kapang yang sering mengontaminasi biji kakao kering asal Indonesia, diantaranya *A. flavus*, *Eurotium chevaleri*, *Penicillium citrinum*, *P. spinulosum*, *Fusarium* sp. dan *Geotrichum candidum*.

Tabel 4.2 Kode isolat BAL terpilih yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

No	Kode Isolat BAL	Asal Isolat BAL	Lama Fermentasi	Tingkat Pengenceran	Asal Plate	No.Urut Isolat BAL
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	<i>Pulp</i> kakao	16 jam	10 ⁻⁷	2	1
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	1	1
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	1	2
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁶	2	1
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁶	2	2
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁶	2	3
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁶	2	4
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁶	2	5
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	2	55
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	2	56
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	2	39
12	B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	2	40
13	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	1	1
14	B 64 10 ⁻⁵ (2-8)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	2	8
15	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	2	9
16	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	2	11
17	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	2
18	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	3
19	B 88 10 ⁻⁵ (1-4)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	4
20	B 88 10 ⁻⁵ (1-5)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	5
21	B 88 10 ⁻⁵ (1-6)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	6
22	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁵	1	24
23	L 0 10 ⁻⁵ (1-26)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁵	1	26
24	L 0 10 ⁻⁶ (2-16)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁶	2	16
25	L 0 10 ⁻⁶ (2-17)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁶	2	17
26	L 0 10 ⁻⁶ (2-18)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁶	2	18
27	L 0 10 ⁻⁶ (2-19)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁶	2	19
28	L 0 10 ⁻⁶ (2-20)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁶	2	20
29	L 16 10 ⁻⁷ (2-51)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	16 jam	10 ⁻⁷	2	51
30	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	27
31	L 40 10 ⁻⁷ (1-28)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	28
32	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	29
33	L 40 10 ⁻⁷ (1-30)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	30
34	L 40 10 ⁻⁷ (2-42)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	42
35	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	43
36	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	1	45
37	B 0 10 ⁻⁶ (2-46)	<i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁶	2	46
38	B 16 10 ⁻⁷ (2-6)	<i>Pulp</i> kakao	16 jam	10 ⁻⁷	2	6
39	B 16 10 ⁻⁷ (2-7)	<i>Pulp</i> kakao	16 jam	10 ⁻⁷	2	7
40	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	2	116
41	B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	2	40
42	B 40 10 ⁻⁷ (2-41)	<i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁷	2	41
43	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	2	1
44	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	<i>Pulp</i> kakao	64 jam	10 ⁻⁵	2	3
45	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	13
46	B 88 10 ⁻⁵ (1-14)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	14
47	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁵	1	15
48	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁶	1	8
49	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	<i>Pulp</i> kakao	88 jam	10 ⁻⁶	1	9
50	B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-11)	<i>Pulp</i> kakao	88 ⁺ jam	10 ⁻⁷	1	11
51	B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-12)	<i>Pulp</i> kakao	88 ⁺ jam	10 ⁻⁷	1	12
52	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	0 jam	10 ⁻⁷	2	59
53	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁵	2	54
54	L 40 10 ⁻⁵ (2-55)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁵	2	55
55	L 40 10 ⁻⁶ (1-17)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	1	17
56	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	1	18
57	L 40 10 ⁻⁶ (1-78)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	1	78
58	L 40 10 ⁻⁶ (2-141)	Cairan <i>Pulp</i> kakao	40 jam	10 ⁻⁶	2	141

88⁺ = biji kakao terfermentasi selama 88 jam dan dibilas air; ulangan 1: 1-8; ulangan 2: 9-36; ulangan 3: 37-58



Gambar 4.3 Koloni kapang *Fusarium* sp. (a), kapang *Eurotium* sp. dan *Rhizopus* sp. (c) pada media MEA umur 7 hari (kiri), struktur mikroskopi pada pembesaran mikroskop 400 x (kanan)

Isolat BAL terpilih yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi memiliki kemampuan kerja menghasilkan senyawa antikapang seperti terlihat pada Tabel 4.3. sehingga mampu menghambat pertumbuhan kapang, Penghambatan kapang oleh isolat BAL ini disebabkan oleh adanya metabolit yang dihasilkan isolat tersebut berupa asam organik, terbukti terjadinya penurunan pH (ke arah asam), seperti terlihat pada Gambar 4.2 yang mampu menghambat pertumbuhan kapang.

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa kemampuan kerja antikapang tertinggi terdapat pada isolat yang nilai hurufnya “A” dengan luas penghambatan terhadap ketiga jenis kapang $0,601 \text{ cm}^2$, diikuti oleh isolat yang nilai hurufnya “B” berkisar $0,468-0,601 \text{ cm}^2$, lalu isolat yang nilai hurufnya “C” berkisar $0,334-0,467 \text{ cm}^2$, kemudian isolat yang nilai hurufnya “D” berkisar $0,200-0,333 \text{ cm}^2$, selanjutnya isolat yang nilai hurufnya “E” berkisar $0,066-0,199 \text{ cm}^2$ dan yang terakhir isolat yang nilai hurufnya “F” sebesar $0,065 \text{ cm}^2$ dan tidak diidentifikasi untuk isolat yang nilai hurufnya “F” ini. Perbedaan kemampuan kerja antikapang oleh isolat ini diduga disebabkan oleh spesies BAL yang berbeda menghasilkan senyawa antikapang yang berbeda pula. Salminen dan

Ouwehand (2004) menyatakan bahwa kemampuan isolat BAL dalam menghambat kapang berbeda-beda tergantung pada spesiesnya.

Tabel 4.3 Pengukuran luas penghambatan terhadap pertumbuhan kapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi (bersambung)

No	Kode Isolat BAL	Kapang			Rata-rata (cm ²)	Nilai Huruf
		<i>Eurotium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>		
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	0,000	0,000	0,432	0,216	D
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	0,000	0,000	0,396	0,198	E
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	0,000	0,000	0,407	0,203	D
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	0,000	0,000	0,379	0,189	E
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	0,000	0,000	0,275	0,138	E
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	0,000	0,000	0,392	0,196	E
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	0,000	0,000	0,470	0,235	D
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	0,000	0,000	0,318	0,159	E
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	0,043	0,000	0,153	0,098	E
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	0,046	0,000	0,217	0,131	E
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	0,000	0,000	0,217	0,108	E
12	B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	0,000	0,000	0,094	0,047	F
13	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
14	B 64 10 ⁻⁵ (2-8)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
15	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	0,111	0,000	0,217	0,164	E
16	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	0,000	0,000	1,257	0,628	A
17	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	0,086	0,000	0,245	0,166	E
18	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	0,086	0,000	0,094	0,090	E
19	B 88 10 ⁻⁵ (1-4)	0,055	0,000	0,188	0,122	E
20	B 88 10 ⁻⁵ (1-5)	0,000	0,000	0,094	0,047	F
21	B 88 10 ⁻⁵ (1-6)	0,000	0,000	0,094	0,047	F
22	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	0,166	0,000	0,188	0,177	E
23	L 0 10 ⁻⁵ (1-26)	0,116	0,000	0,000	0,058	F
24	L 0 10 ⁻⁶ (2-16)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
25	L 0 10 ⁻⁶ (2-17)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
26	L 0 10 ⁻⁶ (2-18)	0,000	0,000	0,094	0,047	F
27	L 0 10 ⁻⁶ (2-19)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
28	L 0 10 ⁻⁶ (2-20)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
29	L 16 10 ⁻⁷ (2-51)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
30	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	0,000	0,000	1,201	0,601	A
31	L 40 10 ⁻⁷ (1-28)	0,116	0,000	0,000	0,058	F
32	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	0,166	0,000	0,123	0,144	E
33	L 40 10 ⁻⁷ (1-30)	0,000	0,000	0,123	0,061	F
34	L 40 10 ⁻⁷ (2-42)	0,000	0,000	0,123	0,061	F
35	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	0,000	0,000	0,245	0,123	E
36	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	0,156	0,000	0,000	0,078	E
37	B 0 10 ⁻⁶ (2-46)	0,000	0,000	0,094	0,047	F
38	B 16 10 ⁻⁷ (2-6)	0,043	0,000	0,094	0,069	E
39	B 16 10 ⁻⁷ (2-7)	0,000	0,000	0,123	0,061	F
40	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	0,000	0,000	0,153	0,077	E
41	B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	0,000	0,000	0,123	0,061	F
42	B 40 10 ⁻⁷ (2-41)	0,000	0,000	0,000	0,000	F
43	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	0,086	0,000	0,217	0,152	E
44	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	0,012	0,000	0,188	0,100	E
45	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	0,000	0,000	0,188	0,094	E
46	B 88 10 ⁻⁵ (1-14)	0,000	0,000	1,310	0,655	A
47	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	0,021	0,000	0,392	0,206	D
48	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	0,111	0,000	0,094	0,103	E
49	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	0,043	0,000	0,440	0,241	D
50	B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-11)	0,101	0,000	0,000	0,050	F

Tabel 4.3 Pengukuran luas penghambatan terhadap pertumbuhan kapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi (sambungan)

No	Kode Isolat BAL	Kapang			Rata-rata (cm ²)	Nilai Huruf
		<i>Eurotium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>		
51	B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-12)	0,111	0,000	0,000	0,055	F
52	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	0,068	0,000	0,094	0,081	E
53	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	0,101	0,000	0,188	0,145	E
54	L 40 10 ⁻⁵ (2-55)	0,000	0,000	0,094	0,047	F
55	L 40 10 ⁻⁶ (1-17)	0,043	0,000	0,000	0,022	F
56	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	0,043	0,000	0,123	0,083	E
57	L 40 10 ⁻⁶ (1-78)	0,086	0,000	0,000	0,043	F
58	L 40 10 ⁻⁶ (2-141)	0,000	0,000	0,000	0,000	F

Nilai huruf antikapang berdasarkan luas daerah penghambatan (cm²)

A: L 0,601; B: 0,468-0,601; C: 0,334-0,467; D: 0,200-0,333; E: 0,066-0,199; F: L 0,065

Tabel 4.3 juga menunjukkan bahwa kemampuan kerja antikapang oleh 58 isolat BAL dalam menghambat pertumbuhan kapang berbeda untuk masing-masing jenis kapang. Sebagian besar isolat BAL memiliki kemampuan penghambatan yang terbesar pada kapang *Rhizopus sp.* dan sebagian kecil mampu menghambat kapang *Eurotium sp.*, namun seluruh isolat BAL tidak mampu menghambat kapang *Fusarium sp.*. Hal tersebut diduga karena metabolit yang dihasilkan sebagian besar isolat BAL lebih mampu menghambat kapang *Rhizopus sp.* daripada *Eurotium sp.* dan *Fusarium sp.*. Isnaini (2011) melaporkan bahwa kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL ini diduga disebabkan oleh asam-asam lemak yang dihasilkan oleh isolat tersebut diduga memiliki aktivitas seperti detergen yang akan mempengaruhi struktur membran sel kapang yaitu meningkatkan permeabilitas membran dan membebaskan elektrolit serta protein intraseluler yang mengakibatkan disintegrasi sitoplasma sel kapang. Selanjutnya, dari 58 isolat BAL ini dipilih 33 isolat BAL yang memiliki kemampuan kerja antikapang terbesar untuk diidentifikasi.

4.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari *Pulp* dan Cairan *Pulp* Kakao Terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi secara Fenotipik

Sebanyak 33 isolat BAL yang memiliki kemampuan kerja antikapang terbesar diidentifikasi. Identifikasi isolat BAL meliputi: pewarnaan gram, sifat

katalase, produksi CO₂, produksi dekstran dari sukrosa, pertumbuhan pada suhu kadar garam yang berbeda dan tipe fermentasi berbagai jenis karbohidrat.

1. Pengecatan Gram

Sebanyak 30 isolat dari 33 isolat BAL yang secara morfologi di bawah pengamatan mikroskop sel berwarna ungu (gram positif) dan 3 isolat lainnya berwarna merah (gram negatif) seperti terlihat pada Tabel 4.4. Wibowo dan Ristanto (1988) yang menyatakan bahwa BAL pada dasarnya termasuk gram positif. Oleh karena itu, 30 isolat BAL yang diuji pewarnaan gram hasilnya berwarna ungu (gram positif) diduga kuat adalah BAL, sedangkan 3 isolat bakteri dengan hasil gram negatif diduga kuat bukan merupakan BAL.

Tabel 4.4 Hasil uji pewarnaan gram pada isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

No	Kode Isolat BAL	Warna Gram dan Bentuk Sel		Gram
		Warna	Bentuk	
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	Ungu	Batang	+
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	Ungu	Batang	+
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	Ungu	Batang	+
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	Ungu	Batang	+
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	Ungu	Batang	+
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	Ungu	Batang	+
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	Ungu	Batang	+
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	Ungu	Batang	+
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	Ungu	Batang	+
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	Ungu	Batang	+
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	Ungu	Batang	+
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	Ungu	Batang	+
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	Ungu	Batang	+
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	Ungu	Batang	+
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	Ungu	Batang	+
16	B 88 10 ⁻⁵ (1-4)	Merah Muda	Batang	-
17	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	Ungu	Batang	+
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	Ungu	Batang	+
19	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	Ungu	Batang	+
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	Ungu	Batang	+
21	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	Ungu	Batang	+
22	B 16 10 ⁻⁷ (2-6)	Merah Muda	Batang	-
23	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	Ungu	Batang	+
24	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	Ungu	Batang	+
25	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	Ungu	Batang	+
26	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	Ungu	Batang	+
27	B 88 10 ⁻⁵ (1-14)	Merah Muda	Batang	-
28	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	Ungu	Batang	+
29	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	Ungu	Batang	+
30	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	Ungu	Batang	+
31	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	Ungu	Batang	+
32	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	Ungu	Batang	+
33	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	Ungu	Batang	+

Tabel 4.4 juga menunjukkan bahwa sebanyak 30 isolat BAL semuanya berbentuk batang. Diduga isolat-isolat tersebut berasal dari genus *Lactobacillus*. Brock dan Madigan (1991) menjelaskan bahwa BAL bisa berbentuk basil atau kokus. Wibowo dan Ristanto (1988) juga menyatakan bahwa BAL yang berasal dari genus *Lactobacillus*, selnya berbentuk batang dari batang yang sangat pendek sampai panjang. Oleh karena itu, 30 isolat BAL yang menunjukkan hasil gram positif dan berbentuk batang diduga kuat adalah BAL yang berasal dari genus *Lactobacillus*.

2. Uji Katalase

Sebanyak 30 isolat BAL yang diujikan hasilnya katalase negatif karena tidak menghasilkan gelembung gas seperti terlihat pada Tabel 4.5. Biehl (1984) menyatakan bahwa katalase negatif menunjukkan bahwa isolat BAL tidak memiliki enzim katalase yang berfungsi untuk memecah adanya H_2O_2 menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) yang berarti isolat bakteri tersebut bersifat non-oksidatif (bakteri anaerob), sehingga reaksi tersebut tidak dapat menimbulkan gelembung gas pada akuades, yang merupakan salah satu ciri BAL. Oleh karena itu, isolat yang diuji katalase hasilnya negatif diduga kuat adalah BAL anaerob. Reaksi pemecahan H_2O_2 oleh enzim katalase menurut Biehl (1984) adalah sebagai berikut:



Sebanyak 30 isolat memiliki bentuk batang, gram positif dan menghasilkan reaksi katalase negatif sehingga diduga merupakan BAL genus *Lactobacillus*. Seperti yang diungkapkan oleh Schlegel dan Schmidt (1994) bahwa ciri BAL dari genus *Lactobacillus* adalah berbentuk batang (ada yang berbentuk batang panjang dan pendek), gram positif dan tumbuh dalam keadaan anaerob, tetapi *aerotolerant*. Oleh karena itu, adanya uji katalase ini semakin memperkuat dugaan dari hasil pewarnaan gram sebelumnya bahwa semua isolat adalah BAL dari genus *Lactobacillus*.

Tabel 4.5 Hasil uji katalase pada isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

No	Kode Isolat BAL	Reaksi Katalase	
		Gelembung	Hasil
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	-	-
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	-	-
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	-	-
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	-	-
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	-	-
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	-	-
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	-	-
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	-	-
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	-	-
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	-	-
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	-	-
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	-	-
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	-	-
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	-	-
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	-	-
16	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	-	-
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	-	-
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	-	-
19	L 4010 ⁻⁷ (2-43)	-	-
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	-	-
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	-	-
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	-	-
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	-	-
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	-	-
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	-	-
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	-	-
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	-	-
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	-	-
29	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	-	-
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	-	-

-: tidak ada gelembung dan katalase negatif; +: terdapat gelembung dan katalase positif

3. Uji Produksi Gas (CO₂)

Sebanyak 8 isolat BAL memproduksi gas, sedangkan sebanyak 22 isolat BAL lainnya tidak memproduksi gas, seperti terlihat pada Tabel 4.6. Buckle *et al.* (1987) menyatakan bahwa berdasarkan tipe fermentasi gulanya, BAL dibagi atas dua kelompok yaitu BAL yang memproduksi asam laktat murni (homofermentatif) dan BAL yang memproduksi asam laktat, CO₂ dan produk peragian lain (heterofermentatif). Schlegel dan Schmidt (1994) menambahkan bahwa BAL homofermentatif diantaranya *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* dan *Pediococcus acidilactici* sedangkan BAL heterofermentatif diantaranya *L. brevis*, *L.*

fermentum, *L. fermentum*, *Leu. lactis*, *L. buchneri*, *L. viridescens* dan *Weissella confuse*. Oleh karena itu, adanya uji produksi gas (CO₂) ini dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk mengetahui dugaan spesies dari masing-masing isolat BAL.

Tabel 4.6 Hasil uji produksi gas (CO₂) oleh BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

No	Kode Isolat BAL	Produksi Gas (CO ₂)	
		Gelembung	Hasil
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	-	-
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	++	+
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	+	+
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	+	+
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	-	-
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	-	-
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	-	-
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	-	-
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	-	-
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	-	-
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	++++	+
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	-	-
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	-	-
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	-	-
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	-	-
16	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	-	-
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	-	-
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	-	-
19	L 4010 ⁻⁷ (2-43)	+	+
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	-	-
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	++	+
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	-	-
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	+	+
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	-	-
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	+	+
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	-	-
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	-	-
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	-	-
29	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	-	-
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	-	-

Tinggi gelembung pada tabung reaksi (cm): + : 0,50-1,00; ++ : 1,01-1,50; +++ : 1,51-2,00; ++++ : 2,01-2,50

Hasil produksi gas: - : tidak ada gelembung dan produksi gas negatif; + : terdapat gelembung dan produksi gas positif

4. Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda

Sebanyak 30 isolat BAL mampu bertahan hidup pada suhu yang berbeda dengan tingkat pertumbuhan yang berbeda, seperti terlihat pada Tabel 4.7. Seperti yang dinyatakan Vos *et al.* (2009) bahwa masing-masing spesies BAL memiliki suhu pertumbuhan optimum yang berbeda. Tabel 4.7 juga menunjukkan bahwa rata-rata sebanyak 30 isolat tersebut dapat tumbuh sangat

baik pada suhu 37 °C dan sebagian dapat tumbuh pada suhu 45 °C, tetapi kurang dapat tumbuh baik pada suhu 15 °C, sehingga diduga semua isolat tersebut berasal dari genus *Lactobacillus*. Susanti (2011) melaporkan bahwa genus *Lactobacillus* umumnya tumbuh optimum pada suhu 30-37 °C. Yuliani (2007) juga melaporkan bahwa beberapa spesies *Lactobacillus* umumnya tumbuh pada suhu 45 °C atau lebih dan tidak dapat tumbuh pada suhu 20 °C maupun 15 °C.

Tabel 4.7 Hasil uji pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada suhu yang berbeda

No	Kode Isolat BAL	Pertumbuhan 48 Jam		
		15 °C	37 °C	45 °C
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	+	++++	+++
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	+	+++	++
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	+	+++++	+++
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	+	+++++	++
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	+	+++++	++
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	+	+++++	++
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	+	+++++	++
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	+	+++++	++
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	+	++	+
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	+	++	++
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	+	++	++
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	+	+++++	++++
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	+	+++	++++
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	+	+++++	++++
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	+	+++++	++++
16	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	+	+++	++
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	+	++	++
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	+	++	+
19	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	+	++	+
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	+	++	++
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	+	++	+
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	+	+++++	++
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	+	++	++
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	+	++	++
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	+	++	+++
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	+	++++	+++
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	+	+++++	++
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	+	+++	+
29	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	+	+++	++
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	+	++	+

— : Tidak ada pertumbuhan ++++ : Pertumbuhan sedang
+ : Pertumbuhan sangat sedikit +++++ : Pertumbuhan banyak
++ : Pertumbuhan sedikit ++++++ : Pertumbuhan sangat banyak

Yuliani (2007), Ardhana dan Graham (2003) dan Waluyo (2004) melaporkan bahwa BAL yang dapat tumbuh subur pada suhu 37 °C dan 45 °C dan tidak dapat tumbuh pada suhu 15 °C diduga adalah *L. lactis*, *L. bulgaricus*,

L. salivarius, *L. achidophilus* dan *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* dan *L. hilgardii*. Oleh karena itu, adanya uji pertumbuhan isolat BAL pada suhu yang berbeda ini dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk mengetahui dugaan spesies dari masing-masing isolat BAL.

5. Pertumbuhan pada Konsentrasi Garam NaCl yang Berbeda

Sebanyak 30 isolat BAL mampu bertahan hidup pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda dengan tingkat pertumbuhan yang berbeda, seperti terlihat pada Tabel 4.8. Vos *et al.* (2009) menjelaskan bahwa masing-masing spesies BAL memiliki perbedaan toleransi untuk tumbuh pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda. Buckle *et al.* (1987) juga menyatakan bahwa BAL dari genus *Lactobacillus*, *Pediococcus* dan *Leuconostoc* mampu tumbuh dan berkembang pada fermentasi menggunakan kadar garam tinggi (6,5 % w/v).

Vos *et al.* (2009) menambahkan bahwa BAL yang tumbuh sangat baik pada media dengan konsentrasi garam NaCl 4 % dan 6,5 % adalah *L. fermentum*, *Streptococcus faecium* dan *Leu. paramesenteroides*. BAL yang tumbuh sangat baik pada media dengan konsentrasi garam NaCl 4 %, tetapi sebagian dapat tumbuh pada media dengan konsentrasi garam NaCl 6,5 % adalah *Leu. mesenteroides*. BAL yang sebagian dapat tumbuh pada media dengan konsentrasi garam NaCl 4 %, tetapi kurang dapat tumbuh baik pada media dengan konsentrasi garam NaCl 6,5 % adalah *Leu. dextranicum* dan *Leu. lactis*. Sedangkan BAL yang kurang dapat tumbuh baik pada media dengan konsentrasi garam NaCl 4 % dan 6,5 % adalah *L. brevis* dan *L. plantarum*. Oleh karena itu, adanya uji pertumbuhan isolat pada media dengan konsentrasi garam NaCl berbeda ini dapat digunakan sebagai salah satu dasar untuk mengetahui dugaan spesies dari masing-masing isolat BAL.

6. Kemampuan Memproduksi Asam

Media pertumbuhan (MRS broth) yang diinokulasi dari masing-masing isolat BAL selama 48 jam fermentasi rata-rata semakin asam seperti terlihat pada Tabel 4.9. Nilai total asam pada media pertumbuhannya rata-rata

meningkat dari 0,216 % pada jam ke-0 fermentasi meningkat menjadi 1,296-2,511 % (semakin asam) pada jam ke-48 fermentasi. Hasil pH media pertumbuhan tersebut rata-rata menurun dari 5,5 menjadi berkisar 3,5-4,2 (semakin asam) selama fermentasi 48 jam.

Tabel 4.8 Uji pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada media dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda

No	Kode Isolat BAL	Tingkat Endapan dan Kekeruhan (48 Jam)		
		Kontrol	NaCl 4 %	NaCl 6,5 %
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	+++	+++	+++
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	+++	+++	+++
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	+++++	++++	++
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	++++	++++	++++
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	++++	++++	++++
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	++++	++++	++++
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	++++	++++	++++
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	++++	++++	++++
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	++	++	++
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	++	++	+
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	++	++	+++
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	++++	++++	+++
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	+++	++	++
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	+++++	++++	+++
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	+++++	+++++	+++
16	L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	+++	+++	++
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	++	++	++
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	++	+	++
19	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	++	++	+++
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	++++	++	++
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	++	++	+
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	+++++	++++	+++
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	++	++	++
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	++	++	++
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	++	++	++
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	++++	+++	++
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	++++	+++	++
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	++	++	++
29	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	++++	++	++
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	+++	+++	+++

- : Tidak ada pertumbuhan +++ : Pertumbuhan sedang
 + : Pertumbuhan sangat sedikit ++++ : Pertumbuhan banyak
 ++ : Pertumbuhan sedikit +++++ : Pertumbuhan sangat banyak

Perubahan media pertumbuhan (MRS broth) yang semakin asam, seperti pada Tabel 4.9 ini diduga karena adanya aktivitas BAL pada media pertumbuhan tersebut. Seperti yang diungkapkan Sudarmadji *et al.* (1989) bahwa BAL pada dasarnya menghasilkan asam-asam organik terutama asam laktat sebagai senyawa utama hasil fermentasi karbohidrat. Hidayat *et al.* (2006) menyebutkan

bahwa pertumbuhan BAL akan menghasilkan asam laktat yang akan meningkatkan total asam. Jay (1992) juga menambahkan bahwa terakumulasinya asam-asam organik terutama asam laktat yang dihasilkan oleh aktivitas metabolisme BAL pada media pertumbuhannya menyebabkan penurunan pH selama fermentasi. Oleh karena itu, adanya uji produksi asam ini semakin memperkuat dugaan dari identifikasi sebelumnya bahwa semua isolat adalah bakteri penghasil asam khususnya BAL.

Tabel 4.9 Kemampuan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dalam memproduksi asam

No	Kode Isolat BAL	Total Asam (%)	pH
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	1,904	3,5
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	2,142	3,7
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	1,850	3,8
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	1,868	3,7
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	1,917	3,7
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	1,985	3,6
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	1,985	3,6
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	1,908	3,6
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	1,427	4,0
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	1,679	3,7
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	1,422	4,1
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	2,241	3,7
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	2,205	3,7
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	1,998	3,7
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	1,994	3,7
16	L 40 10 ⁻⁷ (1-24)	2,309	3,6
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	2,511	3,7
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	1,193	4,2
19	L 4010 ⁻⁷ (2-43)	1,301	4,1
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	1,971	3,7
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	1,296	4,2
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	1,913	3,8
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	1,971	3,7
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	1,944	3,7
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	1,485	4,0
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	1,913	3,7
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	1,958	3,7
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	2,003	3,7
29	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	1,373	4,0
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	1,823	3,8

Total asam kontrol : 0,216 %; pH kontrol : 5,5

7. Produksi Dekstran dari Sukrosa

Sebanyak 5 isolat dari 30 isolat BAL dapat tumbuh pada media sukrosa agar (konsentrasi sukrosa sebesar 5 %), namun 5 isolat BAL yang tumbuh

tersebut tidak ada yang memproduksi dekstran, seperti terlihat pada Tabel 4.10. Kelima isolat BAL yang tumbuh pada media sukrosa agar (konsentrasi sukrosa sebesar 5 %) tersebut diduga berasal dari genus *Leuconostoc*. Suwasono (2005) menyatakan bahwa bakteri dari genus *Leuconostoc* mampu mendegradasi sukrosa menjadi dekstran dengan bantuan enzim dekstran sukrase. Vos *et al.* (2009) menambahkan bahwa beberapa spesies *Leuconostoc* ada yang tidak dapat memproduksi dekstran dari sukrosa, seperti: *Leu. paramesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. cremoris*, dan *Leu. oenos*.

Tabel 4.10 Kemampuan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dalam memproduksi dekstran dari sukrosa

No	Kode Isolat BAL	Pertumbuhan	Produksi Dekstran
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	-	-
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	-	-
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	++	-
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	-	-
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	-	-
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	-	-
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	-	-
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	-	-
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	-	-
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	-	-
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	++	-
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	-	-
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	-	-
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	-	-
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	-	-
16	L 40 10 ⁻⁷ (1-24)	-	-
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	-	-
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	+++	-
19	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	+	-
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	-	-
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	-	-
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	+	-
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	-	-
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	-	-
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	-	-
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	-	-
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	-	-
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	-	-
39	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	+	-
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	-	-

- : Tidak ada pertumbuhan/tidak ada produksi dekstran
 + : Pertumbuhan sedikit/produksi dekstran sedikit
 ++ : Pertumbuhan sedang/produksi dekstran sedang
 +++ : Pertumbuhan banyak/produksi dekstran banyak

Sebanyak 5 isolat adalah genus *Leuconostoc* masih dugaan sementara. Hal ini disebabkan oleh semua isolat BAL berbentuk batang seperti terlihat pada Tabel 4.3. Seperti yang dinyatakan Frazier dan Westhof (1988) bahwa genus *Leuconostoc* selnya berbentuk kokus berpasangan atau kokus berbentuk rantai. Oleh karena itu, isolat-isolat tersebut masih perlu diidentifikasi lebih lanjut.

8. Pertumbuhan pada Karbohidrat yang Berbeda

Kemampuan masing-masing isolat BAL berbeda-beda dalam memfermentasi berbagai karbohidrat, seperti terlihat pada Tabel 4.11. Perbedaan kemampuan memfermentasi masing-masing isolat ini diduga disebabkan oleh perbedaan spesies masing-masing isolatnya. Isnaini (2011) melaporkan bahwa setiap spesies BAL memiliki kemampuan yang berbeda dalam memfermentasi jenis karbohidrat, namun beberapa spesies BAL dapat memfermentasi semua jenis karbohidrat. Vos *et al.* (2009) menyatakan bahwa BAL yang dapat memfermentasi semua jenis karbohidrat diantaranya *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, dan *L. buchneri*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leu. lactis*, *Leu. cremoris*, dan *Leu. oenos*. Oleh karena itu, uji kemampuan memfermentasi berbagai karbohidrat ini dapat menjadi salah satu dasar untuk identifikasi spesies BAL.

Tabel 4.11 juga menunjukkan bahwa rata-rata semua isolat BAL mampu memfermentasi sukrosa. Hasil ini berbeda dengan hasil uji produksi dekstran dari sukrosa, seperti terlihat pada Tabel 4.10 yang menunjukkan bahwa hanya sebanyak 5 isolat yang mampu tumbuh pada media sukrosa agar, sedangkan isolat BAL yang lain tidak dapat tumbuh. Hal ini diduga karena kadar sukrosa yang digunakan dalam media sukrosa agar pada uji produksi dekstran terlalu tinggi (> 1 %). Edward dan James (1945) menyatakan bahwa konsentrasi sukrosa yang dibutuhkan bakteri untuk pertumbuhan dan memproduksi asam adalah sebesar 1 % karena kebutuhannya akan sumber karbon dapat terpenuhi dengan baik.

Ciri morfologi dan biokimia pada 30 isolat BAL hampir sama yaitu gram positif, berbentuk batang dan katalase negatif yang merupakan ciri dari genus

Lactobacillus, seperti terlihat pada Tabel 4.12. Susanti (2011) juga melaporkan bahwa isolat BAL yang memiliki karakteristik gram positif, bentuk batang dan katalase negatif adalah *Lactobacillus*. Oleh karena itu, semua isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit diduga kuat adalah genus *Lactobacillus*.

Tabel 4.11 Pertumbuhan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi pada karbohidrat yang berbeda

No	Kode Isolat BAL	Kemampuan Fermentasi Gula						
		Glukosa	Manosa	Manitol	Fruktosa	Maltosa	Sukrosa	Arabinosa
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	++	++	+	++	++	++	+
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	++	+	++	++	++	++	+
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	+++	++++	+	+++	++	+++	+
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	++	+++	++	++	+++	+++	+
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	+++	+++	+++	+++	++	++	+
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	+++	++	++	++	+++	+++	+
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	+	++	+	+	+++	++	+
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	++	+++	++	++	+++	+++	++
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	+++	+++	+	++	++	+++	+
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	+++	++++	++	+++	++	++++	+++
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	+++	++	+	+++	+++	+++	+
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	++++	++++	++	+++	+++	+++	++
16	L 40 10 ⁻⁷ (1-24)	+++	+++	++	+++	+++	+++	++
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	++++	+++	+	+++	+++	++++	++
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	+	++	+	+	+	++	+
19	L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	++	+++	+	++	++	+++	+
20	L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	++	+++	+	++	++	++	++
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	++	+++	+	++	++	++	+
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	+++	++	++	++	++	+++	++
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	+++	+++	+	+++	++	+++	+
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	++	++	+	++	++	++	+
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	++	+++	+	+++	+++	+++	+
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	+++	++	+	++++	++	+++	++
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	++	++	+	+++	+	+	+
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	++++	+++	++	+++	+++	++++	++
29	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	+++	++	+	+++	+++	+++	+
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	++	+++	+	++	++	++	+

— : Tidak ada pertumbuhan +++ : Pertumbuhan sedang
 + : Pertumbuhan sangat sedikit ++++ : Pertumbuhan banyak
 ++ : Pertumbuhan sedikit +++++ : Pertumbuhan sangat banyak

Pada uji produksi CO₂ sebanyak 22 isolat BAL tidak memproduksi gas CO₂ sehingga termasuk dalam *Lactobacillus* homofermentatif, sedangkan 8 isolat BAL lainnya tidak memproduksi gas CO₂ sehingga termasuk dalam *Lactobacillus* heterofermentatif. Schlegel dan Schmidt (1994) dan Vos *et al.*

(2009) menyatakan bahwa *Lactobacillus* homofermentatif diantaranya *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. casei* dan *L. plantarum*, sedangkan *Lactobacillus* heterofermentatif diantaranya *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* dan *L. viridescens*.

Tabel 4.12 menunjukkan bahwa masing-masing isolat BAL memiliki kemampuan pertumbuhan yang berbeda dalam media pertumbuhan dengan suhu, kadar garam NaCl, jenis karbohidrat yang berbeda dan dalam memproduksi asam dan memproduksi dekstran dari sukrosa sehingga memudahkan proses identifikasinya. Selanjutnya, perbedaan masing-masing spesies isolat yang diduga kuat adalah dari genus *Lactobacillus* ini lebih mudah diketahui melalui uji kemampuan memfermentasi berbagai karbohidrat, seperti terlihat pada Tabel 4.12. Isolat *Lactobacillus* yang mampu memfermentasi glukosa, manosa, fruktosa, maltosa dan sukrosa dengan baik tetapi reaksinya lemah dalam memfermentasi arabinosa dan manitol diduga kuat adalah *L. curvatus*. Isolat *Lactobacillus* yang mampu memfermentasi glukosa, manosa, fruktosa, maltosa, manitol dan sukrosa dengan baik tetapi reaksinya lemah dalam memfermentasi arabinosa diduga kuat adalah *L. plantarum*. Isolat *Lactobacillus* yang mampu memfermentasi glukosa, manosa, fruktosa, maltosa, manitol dan sukrosa dengan baik tetapi tidak mampu memfermentasi arabinosa diduga kuat adalah *L. casei*. Isolat *Lactobacillus* yang mampu memfermentasi glukosa, manosa, fruktosa, maltosa, manitol dan arabinosa dengan baik tetapi reaksinya lemah dalam memfermentasi sukrosa diduga kuat *L. fermentum*. Sedangkan isolat *Lactobacillus* yang mampu memfermentasi glukosa, manosa, fruktosa, maltosa, dan arabinosa dengan baik tetapi reaksinya lemah dalam memfermentasi sukrosa dan manitol diduga kuat *L. brevis*.

Tabel 4.12 juga menunjukkan bahwa dari fermentasi biji kakao di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi berhasil diidentifikasi lima spesies BAL penghasil senyawa antikapang yang diduga kuat adalah *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. plantarum* dan *L. fermentum*. Dari 30 isolat BAL, isolat yang paling dominan tumbuh dari fermentasi biji kakao di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi diduga *L. curvatus* yang dominan tumbuh pada lama fermentasi 40-

88 jam, diikuti oleh *L. plantarum* yang juga dominan tumbuh pada lama fermentasi 40-88 jam dan *L. brevis* yang dominan tumbuh pada lama fermentasi 40-64 jam, lalu *L. casei* yang dominan tumbuh pada lama fermentasi jam ke-64 dan terakhir *L. fermentum* yang dominan tumbuh pada lama fermentasi jam ke-64.

Hasil identifikasi ini semakin menunjukkan bahwa spesies BAL penghasil senyawa antikapang yang dominan tumbuh di tiap daerah berbeda. BAL penghasil senyawa antikapang yang dominan tumbuh dari fermentasi biji kakao di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi diduga kuat *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. plantarum* dan *L. fermentum*. Hasil penelitian sebelumnya diantaranya oleh Isnaini (2011) melaporkan bahwa BAL penghasil senyawa antikapang yang dominan tumbuh dari fermentasi biji kakao di PTPN XII Banjarsari Kabupaten Jember diduga kuat *L. fermentum*. Inayatin (2008) dan Muhammadan (2008) juga melaporkan bahwa BAL penghasil senyawa antikapang yang dominan tumbuh dari fermentasi biji kakao di PTPN XII Kota Blater Ambulu (Jember) diduga kuat *Leu. mesenteroides*, *Leu. dextranicum* dan *L. plantarum*. Shindy (2014) melaporkan bahwa BAL penghasil senyawa antikapang yang dominan tumbuh dari fermentasi biji kakao rakyat di Yogyakarta diduga kuat *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Leu. mesenteroides* dan *Leu. paramesenteroides*. Kustyawati dan Setyani (2008) melaporkan bahwa ekologi mikrobial yang terlibat dalam fermentasi biji kakao dipengaruhi oleh tempat fermentasi, jenis kakao dan kondisi geografis tempat tumbuh kakao.

Tabel 4.12 Hasil identifikasi isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi berdasarkan sifat morfologi dan biokimianya (bersambung)

Kode Isolat BAL	Pewarnaan gram	Bentuk sel	Katalase	CO ₂	Dekstran	Suhu (°C)			Garam (%)		Kemampuan Fermentasi Gula						Identifikasi BAL	
						15	37	45	4	6,5	Glu	Man	Mnt	Fruk	Mlt	Suk		Arb
B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	+	Batang	-	-	-	+	++++	+++	+++	+++	++	++	+	++	++	++	+	<i>L. curvatus</i>
B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	+	Batang	-	++	-	+	+++	++	+++	+++	++	+	++	++	++	++	+	<i>L. brevis</i>
B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	+	Batang	-	+	++	+	++++	+++	++++	++	+++	++++	+	+++	++	+++	+	<i>L. brevis, L. curvatus</i>
B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	+	Batang	-	+	-	+	++++	++	++++	++++	++	+++	++	++	+++	+++	+	<i>L. brevis, L. casei</i>
B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	<i>L. casei</i>
B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	<i>L. casei</i>
B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	<i>L. casei, L. fermentum</i>
B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++	++++	++++	+++	++	++	++	+++	+++	+	<i>L. casei</i>
B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	+	Batang	-	-	-	+	++	+	++	++	+	++	+	+++	++	+	<i>L. curvatus</i>	
B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	+	Batang	-	-	-	+	++	++	++	+	++	+++	++	++	+++	+++	++	<i>L. plantarum</i>
B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	+	Batang	-	+++	++	+	++	++	++	+++	+++	+++	+	++	++	+++	+	<i>L. brevis, L. curvatus</i>
B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++++	++++	+++	+++	++++	++	+++	++	++++	+++	<i>L. plantarum</i>
B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	+	Batang	-	-	-	+	+++	++++	++	++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	<i>L. curvatus</i>
B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++++	++++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	<i>L. plantarum</i>
B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	+	Batang	-	-	-	+	++++	++++	+	+++	++++	++++	++	+++	+++	+++	++	<i>L. plantarum</i>
L 40 10 ⁻⁷ (1-24)	+	Batang	-	-	-	+	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	<i>L. plantarum</i>
L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	+	Batang	-	-	-	+	++	++	++	++	++++	+++	+	+++	+++	++++	++	<i>L. curvatus, L. plantarum</i>
L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	+	Batang	-	-	-	+	++	++	++	++	++++	+++	+	+++	+++	++++	++	<i>L. curvatus, L. plantarum</i>
L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	+	Batang	-	-	+++	+	++	+	+	++	+	++	+	+	++	+	+	<i>L. curvatus</i>
L 4010 ⁻⁷ (1-43)	+	Batang	-	+	+	+	++	+	++	+++	++	+++	+	++	++	+++	+	<i>L. brevis, L. curvatus</i>
L 40 10 ⁻⁷ (1-45)	+	Batang	-	-	-	+	++	++	++	++	++	+++	+	++	++	++	++	<i>L. plantarum</i>
B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	+	Batang	-	++	-	+	++	+	++	+	++	+++	+	++	++	++	+	<i>L. brevis, L. curvatus</i>
B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	+	Batang	-	-	+	+	++++	++	++++	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	<i>L. plantarum</i>

Tabel 4.12 Hasil identifikasi isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi berdasarkan sifat morfologi dan biokimianya (sambungan)

Kode Isolat BAL	Pewarnaan gram	Bentuk sel	Katalase	CO ₂	Dekstran	Suhu (°C)			Garam (%)		Kemampuan Fermentasi Gula							Identifikasi BAL
						15	37	45	4	6,5	Glu	Man	Mnt	Fruk	Mlt	Suk	Arb	
B 64 10⁻⁵ (2-3)	+	Batang	-	+	-	+	++	++	++	++	+++	+++	+	+++	++	+++	+	<i>L. brevis, L. curvatus</i>
B 88 10⁻⁵ (1-13)	+	Batang	-	-	-	+	++	++	++	++	++	+	++	++	++	+	<i>L. curvatus</i>	
B 88 10⁻⁵ (1-15)	+	Batang	-	+	-	+	++	+++	++	++	++	+++	+	+++	+++	+++	+	<i>L. brevis, L. curvatus</i>
B 88 10⁻⁶ (1-8)	+	Batang	-	-	-	+	++++	+++	+++	++	+++	++	+	++++	++	+++	++	<i>L. curvatus, L. plantarum</i>
B 88 10⁻⁶ (1-9)	+	Batang	-	-	-	+	+++++	++	+++	++	++	++	+	+++	+	+	+	<i>L. curvatus</i>
L 0 10⁻⁷ (2-59)	+	Batang	-	-	-	+	+++	+	++	++	++++	+++	++	+++	+++	++++	++	<i>L. plantarum</i>
L 40 10⁻⁵ (2-54)	+	Batang	-	-	+	+	+++	++	++	++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	<i>L. curvatus</i>
L 40 10⁻⁶ (1-18)	+	Batang	-	-	-	+	++	+	+++	+++	++	+++	+	++	++	++	+	<i>L. curvatus</i>

Glu : Glukosa; Man : Manosa; Arb : Arabitol; Mani : Manitol; Fruk : Fruktosa; Gal : Galaktosa; Mal : Maltosa; Suk : Sukrosa; Lak : Laktosa.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa bakteri asam laktat yang dominan tumbuh dari fermentasi biji kakao varietas forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi yang memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antikapang diduga adalah *Lactobacillus brevis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. plantarum* dan *L. fermentum*. Isolat yang diduga *L. curvatus* dan *L. plantarum* memiliki daya penghambatan yang sangat kuat terhadap kapang *Rhizopus* sp. dan *Eurotium* sp..

5.2 Saran

Isolat yang diduga *L. curvatus* dan *L. plantarum* perlu diaplikasikan sebagai kultur starter untuk membantu proses fermentasi biji kakao basah atau membantu proses fermentasi kembali (*re-fermentation*) biji kakao kering yang terserang kapang. Hal ini nantinya akan menjadi salah satu alternatif usaha untuk mencegah kontaminasi kapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriyeni, Y., Nasir, N., Periadnadi dan Jumjunidang. 2013. Jenis-jenis Jamur pada Pembusukan Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) di Sumatera Barat. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. Vol. 2 (2): 124-129.
- Anonim. 2005. *Kiat-kiat Menanggulangi Automatic Detention*. Balai Karantina Tumbuhan Kelas I Makassar. Makalah dalam Seminar Manajemen Pengendalian Hama Gudang dalam Rangka Peningkatan Mutu Komoditi Andalan Wilayah Sulawesi. Makassar 30 September 2005.
- Ardhana, M.M. dan Graham, H.F. 2003. The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentation in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 86: 87-99.
- Aroyeun, S.O. dan Adegoke, G.O. 2011. Potential of *Aframomum danielli* Spice Powder in Reducing Ochratoxin A in Cocoa Powder. *Afr. American Journal Food and Nutrition*. Vol. 1 (4): 155-165.
- Atiqoh, I. 2007. "Isolasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kakao". Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Bell, C., Neaves, P., dan Williams A.P. 2005. *Food Microbiology: Laboratory Practice*. USA: Blackwell Publishing.
- Biehl, B.T. 1984. *Cocoa Fermentation and Problem of Acidity*. New York dan Bassel: Marcel Dekker Inc.
- Brock, T.D. dan Madigan, M.T. 1991. *Biology of Microbiologism*. New Jersey: Prentice Hall, Inc.
- Buckle, K.A., Edward, R.A., Fleet, G.H. dan Wootton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Terjemahan oleh Purnomo, H. dan Adiono. Jakarta: UI-Press.
- Cahyaningsih, H. 2006. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar serta Aplikasinya dalam Mereduksi *Salmonella thypimurium* dan *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao. *Journal Agriculture*. Vol. 48: 3806-3816.
- Camu, N., Gonzalez, A., Winter, T.D., Schoor, A.V., Bruyne, K.D., Vandamme, P., Takrama, J.S., Addo, S.K. dan Vuyst, L.D. 2008. Dynamics Dan Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74 (1): 86-98.

- Cappucino, J.G. dan Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual, Dary, The Benjamin or Cummings*. New York: Pulb. Co. Inc.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Angelis, M.D. dan Cagno, R.D. 2005. Biochemistry and physiology of Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Journal Food Science and Technology*. Vol. 16: 57-69.
- Delfahedah, Y., Syukur S. dan Jamsari. 2013. Isolasi Karakterisasi dan Identifikasi dan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi sebagai Antimikroba dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid (Trinitario). *Jurnal Kimia Unud*. Vol. 2 (2): 92-102.
- Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian. 2013. *Pedoman Teknis Pengembangan Mutu Kakao*. Jakarta: Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian.
- Dube, H.C. 1993. *An Introduction to Fungi*. Vikas Publishing House PVT LTD.
- Edward dan James. 1945. *Formation of Serologically Reactive Dextrans By Streptococci from Subacute Bacterial Endocarditis*. New York: Cornell University Medical College
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama
- Febby, I. 2008. "Potensi *Rhizobakteria* sebagai Agen Biofungisida untuk Pengendalian Jamur Fitopatogen *Fusarium* sp.". Skripsi. [26 Oktober 2014].
- Frauendorfer, F. dan Schieberle, P. 2008. Changes in Key Aroma Compounds of *Criollo* Cocoa Beans during Roasting. *Journal of The Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56 (21): 10244-10251.
- Frazier, W.C. dan Westhof, D.C. 1988. *Food Microbiology*. Singapore: Mc Graw Hill Book Company.
- Hidayat, N., Padaga, M.C. dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: C.V. Andi Offset.
- Inayatin, N. 2008. "Aplikasi Bakteri Penghasil Asam Laktat dalam Penghambatan Jamur pada Biji Kakao *Underfermented* dengan Metode Perendaman". Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Isnaini, N.F. 2011. "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat *Indigenous* dengan Potensi Antikapang dari Fermentasi Kakao di PTPN XII Kebun Banjarsari, Jember". Tesis. Malang: Universitas Brawijaya.

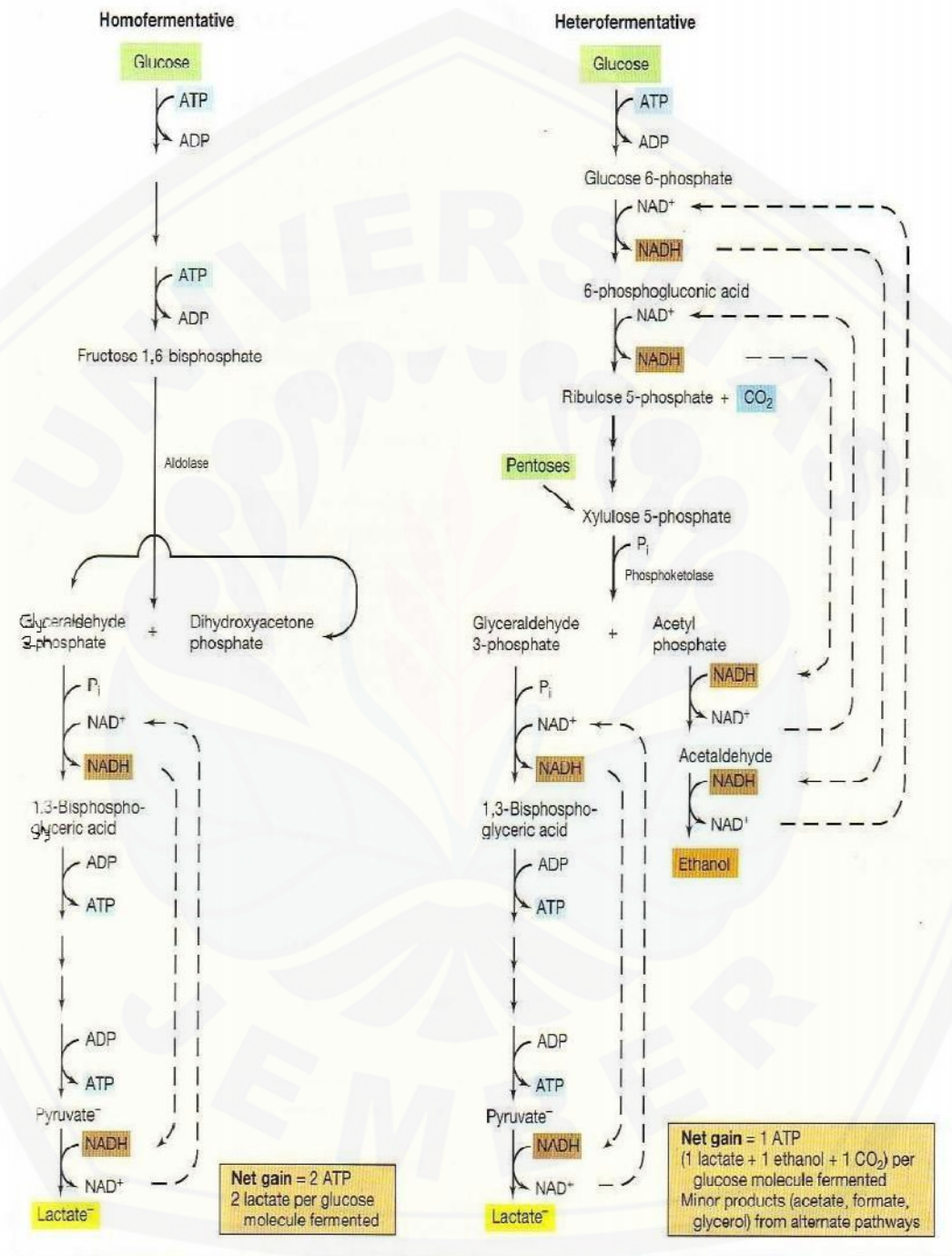
- Jay, J.M. 1992. *Modern Food Microbiology*. New York: An AVI Book Van Nostrand Reinhold.
- Jenie B.S.L., Apriyantono A. dan Dharmaputra, O.K. 2002. Peningkatan Keamanan Makanan Tradisional Berbasis Kacang Tanah melalui Pemanfaatan Bakteri Laktat yang Bersifat Antimikotik dan Antimikotoksigenik. Laporan RUT VIII Bidang Teknologi Hasil Pertanian.
- Klich, M.A. dan Cleveland, T.E. 2000. *Aspergillus Systematics and The Molecular Genetics of Mycotoxin Biosynthesis*. Amsterdam: Harwood Academic Publisher.
- Kustyawati, M.E. dan Setyani, S. 2008. Pengaruh Penambahan Inokulum Campuran terhadap Perubahan Kimia dan Mikrobiologi selama Fermentasi Coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Vol. 13 (2): 73-84.
- Leal, G.A., Gomes, L.H., Efraim, P., Almeida, F.C.T. dan Figueira, A. 2008. Fermentation of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Seeds with A Hybrid *Kluyveromyces marxianus* Strain Improved Product Quality Attributes. *Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research*. Vol. 8: 788-798.
- Leslie, J.F. dan Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. USA: Blackwell Publishing.
- Madigan, M.T. dan Martinko, J.M. 1997. *Brock: Biology of Microorganisms*. New York: Prentice Hall International, Inc.
- Magnusson, J. 2003. "Antifungal Activity of Lactid Acid Bacteria". Disertasi. Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Melina. 2007. Identifikasi Cendawan Pascapanen pada Biji Kakao dari Beberapa Kabupaten. Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan PEI dan PFI XVII Komda Sulawesi Selatan UNHAS.
- Muhammadan. 2008. "Pemanfaatan Isolat Bakteri dari Fermentasi Kakao di Kebun Kota Blater, Jember sebagai Produsen Antikapang dalam Fermentasi Biji Kakao". Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Nielsen, D.S. 2006. *The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations*. Denmark: Department of Food Science, Food Microbiology The Royal Veterinary and Agricultural University.
- Rahayu, E.S. dan Margino, S. 1997. *Lactic Acid Bacteria: Isolation dan Identification*. Yogyakarta: Food and Nutrition, UGM.

- Rahmadi, A. dan Fleet, G.H. 2008. *Isolation of Potential Mycotoxigenic Moulds in Fermented and Dried Cocoa Beans from Indonesia*. Proceeding of International Seminar on Food Science, Universitas of Soegiyapranata, Semarang Indonesia.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. Florida: CRC Press LLC.
- Ress, T.J. 2006. *Development of a Novel Antifungal Silage Inoculant*. <http://www.Brington73.freeserve.co.uk/tomsplace/scientific/phd/phd-fram.html>. [15 September 2014].
- Salminen, S. dan Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Schlegel, H.G dan Schmidt, K. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Terjemahan oleh Tedjo Baskoro. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Seifert, K.A. dan Frisvad, J.C. 2000. *Penicillium on Solid Wood Products*. In R. A. Samson and J. I. Pitt (eds.). *Integration of Modern Taxonomic, Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Shindy, B.P. 2014. "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat sebagai Antikapang dari Fermentasi Kakao Rakyat di Gunung Kidul, Yogyakarta". Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian. 2013. *Buletin Bulanan Indikator Makro Sektor Pertanian*. Jakarta: Kantor Kementerian Pertanian.
- Suardana, I.W., Suarsana, I.N., Sujaya, I.N. dan Wiryawan, K.G. 2007. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif. *Jurnal Veteriner*. Vol. 8 (4): 155-159.
- Sudarmadji, S., Kasmidjo, R., Sardjono, Wibowo, D., Margino, S. dan Rahayu, E.S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Sulistyo, J., Cahyaningsih, H.E. dan Sri., B.L.J. 2014. Application of Lactic Acid Bacteria to Control Microbial Contaminants during Fermentation of Cocoa Beans. *International Journal of Research in Agriculture and Food Science*. Vol. 2 (5): 16-24.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Jakarta: Tri Cipta Karya.

- Susanti, S. 2011."Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Fermentasi Semi Basah Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)". Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Suwasono, S. 2005. *Prinsip Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian (Mikrobiologi Pengolahan I)*. Jember: Universitas Jember.
- Tanada, Y. dan Kaya, H.K. 1993. *Insect Pathogens*. New York: Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich.
- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. dan Kozakiewicz, Z. 2003. Evolutionary Relationship among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. *Journal Food Technology and Biotechnology*. Vol. 41 (1).
- Vos, D.P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., dan Whitman, W.B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Waluyo, A.W. 2004. *Penelitian Fermentasi Biji Kakao dan Penerapannya*. <http://www.kompas.co.id/kesehatan/news/senior/gizi/0304/24/gizi3.htm>. [20 September 2014].
- Wangge, E.S.A., Suprpta, D.N. dan Alit, G.N. 2012. Isolasi dan Identifikasi Jamur Penghasil Mikotoksin pada Biji Kakao Kering yang dihasilkan di Flores. *Journal Agriculture Science and Biotechnology*. Vol. 1 (1): 39-47.
- Wayan, S.I. 2011."Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat *Indigenous* dari Kecap Ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) selama Fermentasi". Tesis. Denpasar: Universitas Udayana.
- Wibowo dan Ristanto, D. 1988. *Petunjuk Khusus Deteksi Mikroba Pangan*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Wood, G. dan Lass. 1989. *Cocoa*. Singapura: Longman Singapore Publisher (Ptc) Ltd.
- Yunenshi, F. 2011."Pengaruh Pemberian Probiotik *Pediococcus pentosaceus* Asal Fermentasi Kakao Hibrid terhadap Penurunan Kolesterol Telur Itik Pitalah". Tesis. Padang: Universitas Andalas.

Lampiran A. Proses biokimia pembentukan asam laktat oleh bakteri asam laktat

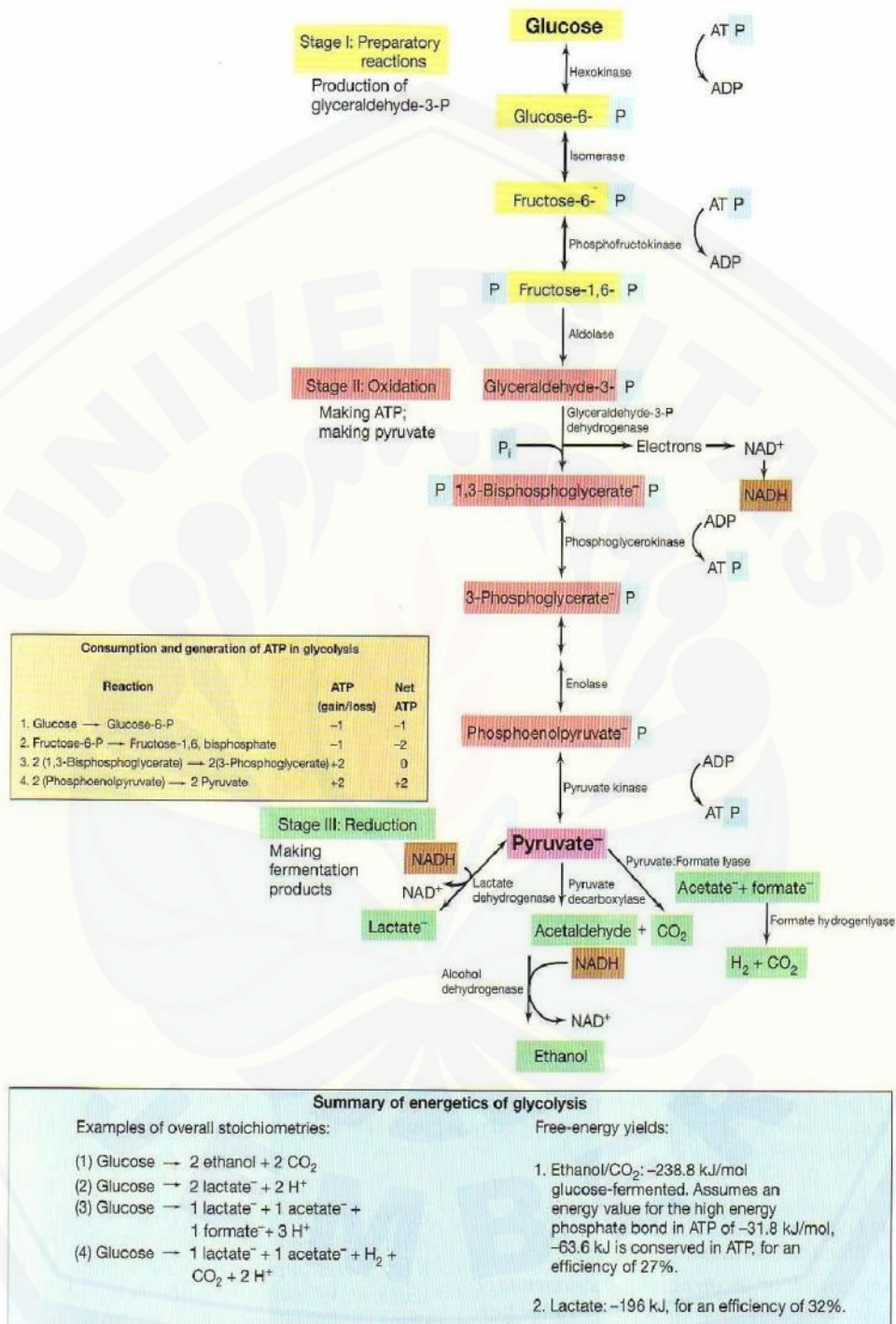
A.1 Proses biokimia pembentukan asam laktat pada bakteri homofermentatif dan heterofermentatif



The fermentation of glucose in homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. Note that no ATP is made in reactions leading to ethanol formation.

Sumber: Madigan dan Martinko (1997)

A.2 Embden Meyerhoff Pathway



Embden-Meyerhoff pathway (glycolysis), the sequence of enzymatic reactions in the conversion of glucose to pyruvate and then to fermentation products (enzymes are shown in small type). Note that when fructose bisphosphate is split, two molecules of glyceraldehyde 3-P are formed, although for simplicity, only one molecule is shown in the figure. Also note that pyruvate is the central "hub" of glycolysis—all fermentation products are made from pyruvate and just a few common examples are given.

Sumber: Madigan dan Martinko (1997)

Lampiran B. pH biji kakao dan total bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

B.1 Data pengukuran pH biji kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Hari ke-	Jam	pH (Keasaman)			Rata-rata
		1	2	3	
0	0	6,20	6,50	6,50	6,40
1	16	6,25	6,30	6,45	6,33
	28	5,70	6,08	5,75	5,84
2	40	4,65	5,30	5,45	5,13
	52	4,40	5,38	4,70	4,83
3	64	4,50	4,85	4,65	4,67
	76	4,50	4,43	4,55	4,49
4	88	4,30	4,50	4,60	4,47
	88 ⁺	4,60	4,50	4,70	4,60

B.2 Total bakteri asam laktat dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

Jam	Diisolasi dari	
	<i>Pulp</i> Kakao	Cairan <i>Pulp</i> Kakao
0	$0,50 \times 10^7$	$0,55 \times 10^7$
16	$2,00 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7$
40	$0,50 \times 10^7$	$3,15 \times 10^7$
64	$0,60 \times 10^6$	$1,30 \times 10^7$
88	$0,50 \times 10^6$	Td
88 ⁺	$0,30 \times 10^6$	Td

88⁺ : terfermentasi sampai jam ke-88 dan dibilas air

Td : tidak diukur karena cairan *pulp* kakao habis

Lampiran C. Data pengamatan pada uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

C.1 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (bersambung)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	1	0	9,50	8,50	8,50	8,00	8,63	5,00	4,31	2,50	58,40	19,63	38,77	0,388	0,432
	2	0	9,00	9,50	9,00	9,50	9,25	5,00	4,63	2,50	67,17	19,63	47,54	0,475	
B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	1	0	9,00	8,00	9,00	8,50	8,63	5,00	4,31	2,50	58,40	19,63	38,77	0,388	0,396
	2	0	8,00	9,00	9,00	9,00	8,75	5,00	4,38	2,50	60,10	19,63	40,48	0,405	
B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	1	0	9,00	9,00	9,50	9,50	9,25	5,00	4,63	2,50	67,17	19,63	47,54	0,475	0,407
	2	0	8,00	8,50	9,00	7,50	8,25	5,00	4,13	2,50	53,43	19,63	33,80	0,338	
B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	1	0	9,50	9,50	10,00	9,00	9,50	5,00	4,75	2,50	70,85	19,63	51,22	0,512	0,379
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	1	0	8,00	7,50	7,50	7,50	7,63	5,00	3,81	2,50	45,64	19,63	26,02	0,260	0,275
	2	0	8,00	8,00	8,00	7,50	7,88	5,00	3,94	2,50	48,68	19,63	29,06	0,291	
B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	1	0	8,00	7,50	8,00	8,00	7,88	5,00	3,94	2,50	48,68	19,63	29,06	0,291	0,392
	2	0	9,50	9,00	10,00	9,00	9,38	5,00	4,69	2,50	68,99	19,63	49,37	0,494	
B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	1	0	10,00	10,50	10,00	9,00	9,88	5,00	4,94	2,50	76,55	19,63	56,92	0,569	0,470
	2	0	8,00	8,50	9,00	8,50	8,50	5,00	4,25	2,50	56,72	19,63	37,09	0,371	
B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	1	0	8,25	8,00	8,00	8,50	8,19	5,00	4,09	2,50	52,62	19,63	33,00	0,330	0,318
	2	0	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	4,00	2,50	50,24	19,63	30,62	0,306	

C.2 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (sambungan 1)

Kode Isolat	Cawan Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
		1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,153
	2	0	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	4,00	2,50	50,24	19,63	30,62	0,306	
B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,217
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,217
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,094
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (2-8)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,217
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	1	0	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	4,00	2,50	50,24	19,63	30,62	0,306	1,257
	2	0	17,50	17,50	17,50	17,50	5,00	8,75	2,50	240,41	19,63	220,78	2,208	
B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,245
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	

C.3 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (sambungan 2)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,094
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 88 10 ⁻⁵ (1-4)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,188
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 88 10 ⁻⁵ (1-5)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,094
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 88 10 ⁻⁵ (1-6)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,094
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,188
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
L 0 10 ⁻⁵ (1-26)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-16)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-17)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-18)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,094
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.4 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (sambungan 3)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
L 0 10 ⁻⁶ (2-19)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-20)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 16 10 ⁻⁷ (2-51)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	1	0	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	5,00	5,00	2,50	78,50	19,63	58,88	0,589	1,201
	2	0	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	5,00	8,00	2,50	200,96	19,63	181,34	1,813	
L 40 10 ⁻⁷ (1-28)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,123
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
L 40 10 ⁻⁷ (1-30)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,123
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
L 40 10 ⁻⁷ (2-42)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,123
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,245
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	

C.5 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (sambungan 4)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 0 10 ⁻⁶ (2-46)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,094
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 16 10 ⁻⁷ (2-6)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,094
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
B 16 10 ⁻⁷ (2-7)	1	0	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	4,00	2,50	50,24	19,63	30,62	0,306	0,123
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,153
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,123
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁷ (2-41)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,000
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,217
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,188
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.6 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (sambungan 5)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,188
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 88 10 ⁻⁵ (1-14)	1	0	18,10	18,10	18,10	18,10	18,10	5,00	9,05	2,50	257,17	19,63	237,55	2,375	1,310
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	1	0	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	5,00	4,50	2,50	63,59	19,63	43,96	0,440	0,392
	2	0	8,30	8,30	8,30	8,30	8,30	5,00	4,15	2,50	54,08	19,63	34,45	0,345	
B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,094
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	1	0	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	5,00	4,50	2,50	63,59	19,63	43,96	0,440	0,440
	2	0	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	5,00	4,50	2,50	63,59	19,63	43,96	0,440	
B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-11)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-12)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,094
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	
L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,188
	2	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	

C.7 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp. (sambungan 6)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
L 40 10 ⁻⁵ (2-55)	1	0	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00	5,00	3,50	2,50	38,47	19,63	18,84	0,188	0,094
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁶ (1-17)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,123
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 64 10 ⁻⁶ (1-78)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 64 10 ⁻⁶ (2-141)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.8 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (bersambung)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.9 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 1)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,043
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	1	0	5,80	5,80	5,80	5,80	5,80	5,00	2,90	2,50	26,41	19,63	6,78	0,068	0,046
	2	0	5,30	5,30	5,30	5,30	5,30	5,00	2,65	2,50	22,05	19,63	2,43	0,024	
B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.10 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 2)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (2-8)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,111
	2	0	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	5,00	3,25	2,50	33,17	19,63	13,54	0,135	
B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,086
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,086
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
B 88 10 ⁻⁵ (1-4)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,055
	2	0	5,30	5,30	5,30	5,30	5,30	5,00	2,65	2,50	22,05	19,63	2,43	0,024	
B 88 10 ⁻⁵ (1-5)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.11 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 3)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 88 10 ⁻⁵ (1-6)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁵ (1-24)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,166
	2	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	
L 0 10 ⁻⁵ (1-26)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,116
	2	0	6,60	6,60	6,60	6,60	6,60	5,00	3,30	2,50	34,19	19,63	14,57	0,146	
L 0 10 ⁻⁶ (2-16)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-17)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-18)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-19)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 0 10 ⁻⁶ (2-20)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 16 10 ⁻⁷ (2-51)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.12 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 4)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁷ (1-28)	1	0	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	5,00	3,05	2,50	29,21	19,63	9,58	0,096	0,116
	2	0	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	5,00	3,25	2,50	33,17	19,63	13,54	0,135	
L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	1	0	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	5,00	3,75	2,50	44,16	19,63	24,53	0,245	0,166
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
L 40 10 ⁻⁷ (1-30)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁷ (2-42)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁷ (2-43)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁷ (2-45)	1	0	6,80	6,80	6,80	6,80	6,80	5,00	3,40	2,50	36,30	19,63	16,67	0,167	0,156
	2	0	6,60	6,60	6,60	6,60	6,60	5,00	3,30	2,50	34,19	19,63	14,57	0,146	
B 0 10 ⁻⁶ (2-46)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 16 10 ⁻⁷ (2-6)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,043
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.13 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 5)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 16 10 ⁻⁷ (2-7)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁷ (2-40)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 40 10 ⁻⁷ (2-41)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,086
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	1	0	5,30	5,30	5,30	5,30	5,30	5,00	2,65	2,50	22,05	19,63	2,43	0,024	0,012
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 88 10 ⁻⁵ (1-14)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	1	0	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,00	2,75	2,50	23,75	19,63	4,12	0,041	0,021
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.14 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 6)

Kode Isolat	Cawan	Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
			1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	1	0	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	5,00	3,25	2,50	33,17	19,63	13,54	0,135	0,111
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,043
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-11)	1	0	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	5,00	3,15	2,50	31,16	19,63	11,53	0,115	0,101
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
B 88 ⁺ 10 ⁻⁷ (1-12)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,111
	2	0	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	5,00	3,25	2,50	33,17	19,63	13,54	0,135	
L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	1	0	6,50	6,50	6,50	6,50	6,50	5,00	3,25	2,50	33,17	19,63	13,54	0,135	0,068
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,101
	2	0	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	5,00	3,15	2,50	31,16	19,63	11,53	0,115	
L 40 10 ⁻⁵ (2-55)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁶ (1-17)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,043
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	
L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,043
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

C.15 Daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp. (sambungan 7)

Kode Isolat	Cawan Kontrol	D Luar (mm)				D Luar Rata-rata (mm)	D Dalam (mm)	r (mm)		L (mm ²)		L (mm ²)	L (cm ²)	L Rata-rata (cm ²)
		1	2	3	4			Luar	Dalam	Luar	Dalam			
L 64 10 ⁻⁶ (1-78)	1	0	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	0,086
	2	0	6,00	6,00	6,00	6,00	5,00	3,00	2,50	28,26	19,63	8,64	0,086	
L 64 10 ⁻⁶ (2-141)	1	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	0,000
	2	0	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,50	2,50	19,63	19,63	0,00	0,000	

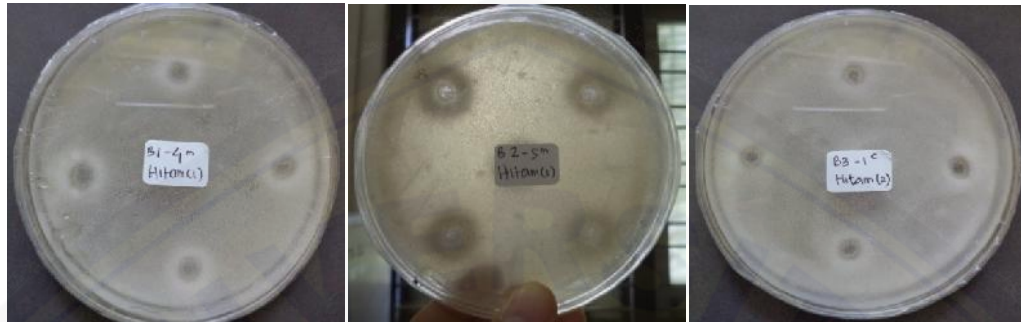
Tidak disajikan daya penghambatan isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Fusarium* sp. disebabkan oleh semua isolat BAL tersebut tidak bisa menghambat kapang *Fusarium* sp. tersebut.

Lampiran D. Data pengukuran pH dan total asam media pertumbuhan (MRS broth) oleh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi

No	Kode Isolat	ml NaOH		Total Asam (%)		Rata-rata Total Asam (%)	pH
		1	2	1	2		
1	B 16 10 ⁻⁷ (2-1)	22,400	19,900	2,016	1,791	1,904	3,500
2	B 64 10 ⁻⁵ (1-1)	24,300	23,300	2,187	2,097	2,142	3,700
3	B 64 10 ⁻⁵ (1-2)	20,900	20,200	1,881	1,818	1,850	3,800
4	B 64 10 ⁻⁶ (2-1)	20,200	21,300	1,818	1,917	1,868	3,700
5	B 64 10 ⁻⁶ (2-2)	20,600	22,000	1,854	1,980	1,917	3,700
6	B 64 10 ⁻⁶ (2-3)	22,100	22,000	1,989	1,980	1,985	3,600
7	B 64 10 ⁻⁶ (2-4)	22,800	21,300	2,052	1,917	1,985	3,600
8	B 64 10 ⁻⁶ (2-5)	20,400	22,000	1,836	1,980	1,908	3,600
9	B 40 10 ⁻⁶ (2-55)	16,000	15,700	1,440	1,413	1,427	4,000
10	B 40 10 ⁻⁶ (2-56)	17,500	19,800	1,575	1,782	1,679	3,700
11	B 40 10 ⁻⁷ (2-39)	16,200	15,400	1,458	1,386	1,422	4,100
12	B 64 10 ⁻⁵ (2-9)	24,000	25,800	2,160	2,322	2,241	3,700
13	B 64 10 ⁻⁵ (2-11)	24,900	24,100	2,241	2,169	2,205	3,700
14	B 88 10 ⁻⁵ (1-2)	22,100	22,300	1,989	2,007	1,998	3,700
15	B 88 10 ⁻⁵ (1-3)	22,400	21,900	2,016	1,971	1,994	3,700
16	L 40 10 ⁻⁷ (1-24)	25,600	25,700	2,304	2,313	2,309	3,600
17	L 40 10 ⁻⁷ (1-27)	28,800	27,000	2,592	2,430	2,511	3,700
18	L 40 10 ⁻⁷ (1-29)	13,900	12,600	1,251	1,134	1,193	4,200
19	L 40 10 ⁻⁷ (1-43)	14,000	14,900	1,260	1,341	1,301	4,100
20	L 40 10 ⁻⁷ (1-45)	21,700	22,100	1,953	1,989	1,971	3,700
21	B 40 10 ⁻⁶ (2-116)	14,000	14,800	1,260	1,332	1,296	4,200
22	B 64 10 ⁻⁵ (2-1)	21,200	21,300	1,908	1,917	1,913	3,800
23	B 64 10 ⁻⁵ (2-3)	21,900	21,900	1,971	1,971	1,971	3,700
24	B 88 10 ⁻⁵ (1-13)	21,600	21,600	1,944	1,944	1,944	3,700
25	B 88 10 ⁻⁵ (1-15)	17,200	15,800	1,548	1,422	1,485	4,000
26	B 88 10 ⁻⁶ (1-8)	20,600	21,900	1,854	1,971	1,913	3,700
27	B 88 10 ⁻⁶ (1-9)	21,700	21,800	1,953	1,962	1,958	3,700
28	L 0 10 ⁻⁷ (2-59)	22,000	22,500	1,980	2,025	2,003	3,700
39	L 40 10 ⁻⁵ (2-54)	14,700	15,800	1,323	1,422	1,373	4,000
30	L 40 10 ⁻⁶ (1-18)	20,500	20,000	1,845	1,800	1,823	3,800

Lampiran E. Gambar zona penghambatan isolat BAL terhadap aktivitas kapang

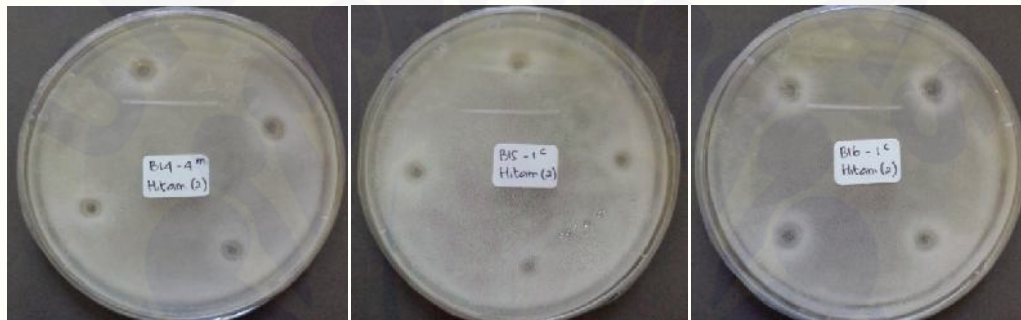
E.1 Penghambatan 35 isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Rhizopus* sp.



B 16 10^{-7} (2-1)

B 64 10^{-5} (1-1)

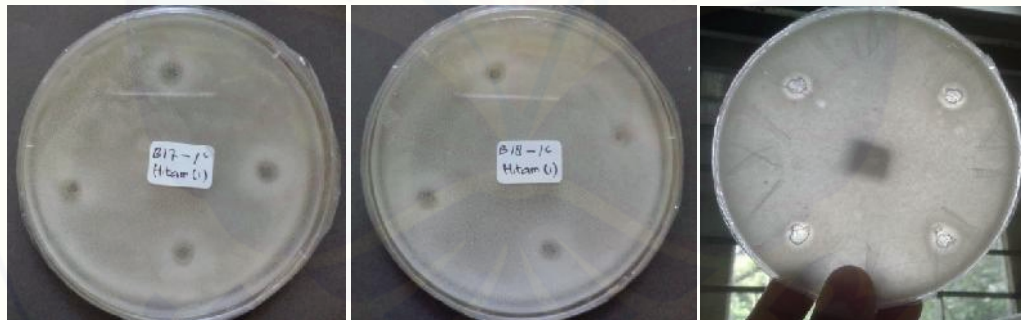
B 64 10^{-5} (1-2)



B 64 10^{-6} (2-1)

B 64 10^{-6} (2-2)

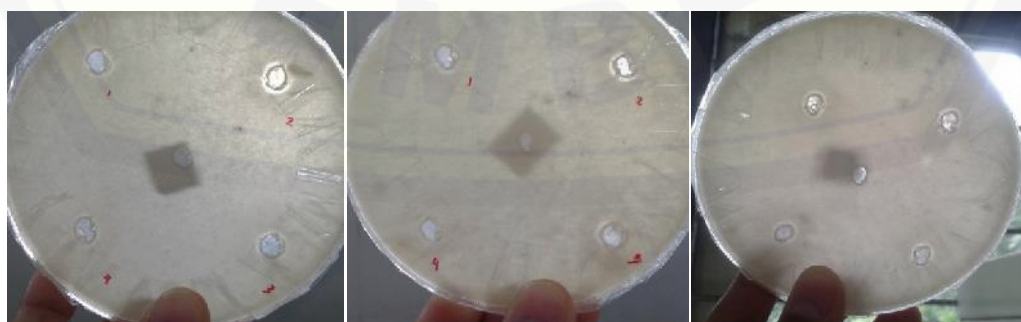
B 64 10^{-6} (2-3)



B 64 10^{-6} (2-4)

B 64 10^{-6} (2-5)

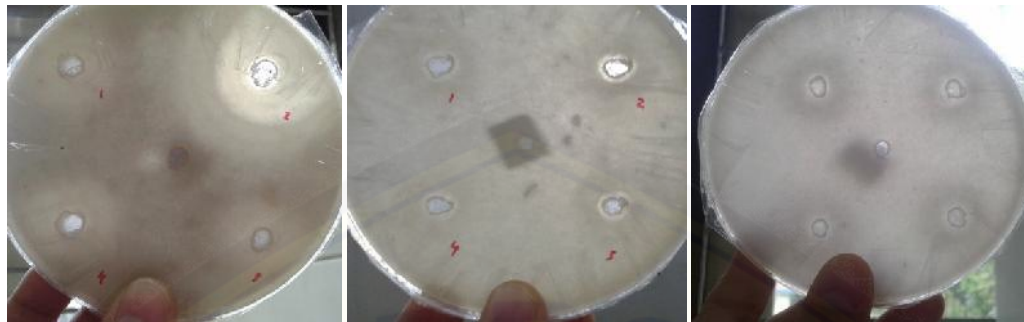
B 40 10^{-6} (2-55)



B 40 10^{-6} (2-56)

B 40 10^{-7} (2-39)

B 64 10^{-5} (2-9)



B 64 10^{-5} (2-11)

B 88 10^{-5} (1-2)

B 88 10^{-5} (1-3)



B 88 10^{-5} (1-4)

L 0 10^{-5} (1-24)

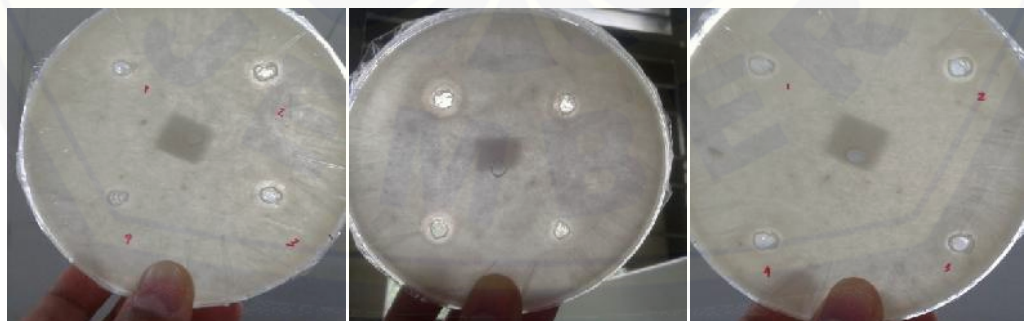
L 40 10^{-7} (1-27)



L 40 10^{-7} (1-29)

L 40 10^{-7} (2-43)

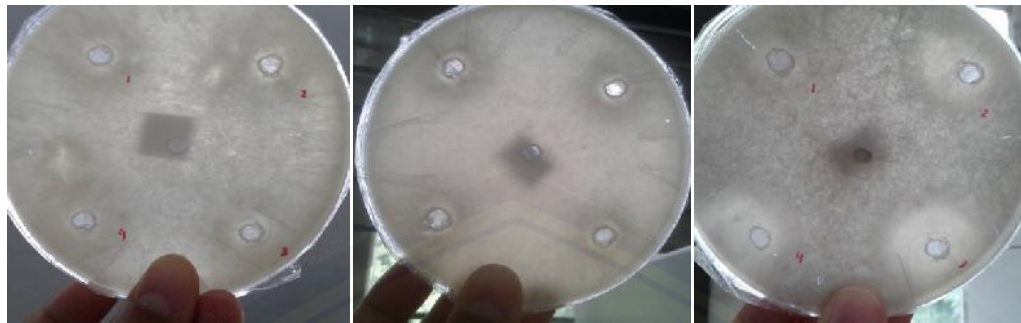
L 40 10^{-7} (2-45)



B 16 10^{-7} (2-6)

B 40 10^{-6} (2-116)

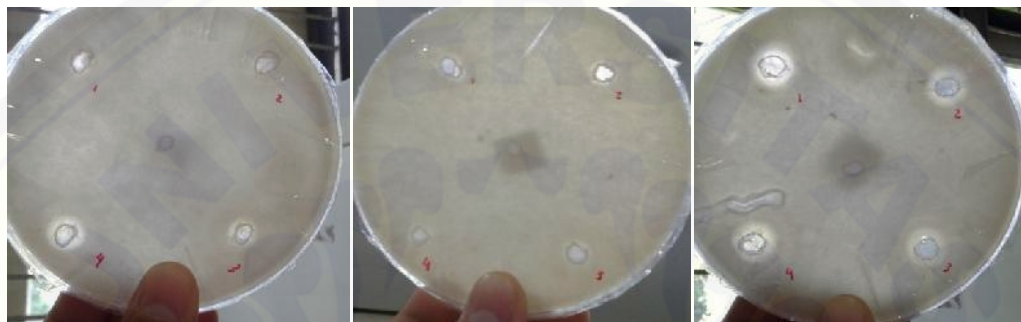
B 64 10^{-5} (2-1)



B 64 10^{-5} (2-3)

B 88 10^{-5} (1-13)

B 88 10^{-5} (1-14)



B 88 10^{-5} (1-15)

B 88 10^{-6} (1-8)

B 88 10^{-6} (1-9)



L 0 10^{-7} (2-59)

L 40 10^{-5} (2-54)

L 40 10^{-6} (1-18)

E.2 Penghambatan 18 isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi terhadap *Eurotium* sp.



B 40 10^{-6} (2-55)

B 40 10^{-6} (2-56)

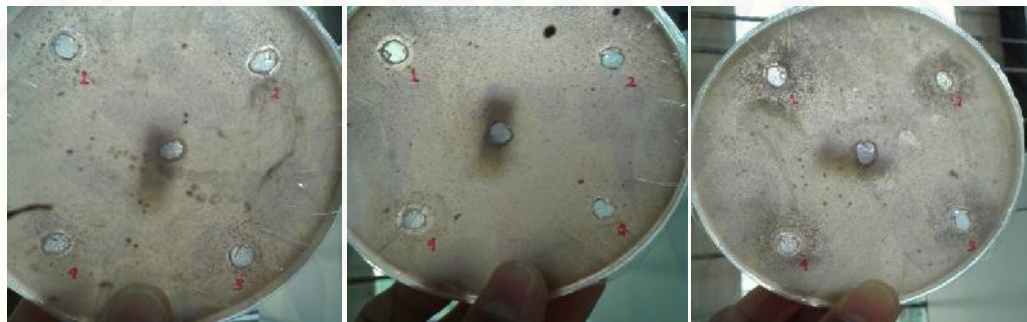
B 64 10^{-5} (2-9)



B 88 10⁻⁵ (1-2)

B 88 10⁻⁵ (1-3)

B 88 10⁻⁵ (1-4)



L 0 10⁻⁵ (1-24)

L 40 10⁻⁷ (1-29)

L 40 10⁻⁷ (2-45)



B 16 10⁻⁷ (2-6)

B 64 10⁻⁵ (2-1)

B 64 10⁻⁵ (2-3)



B 88 10⁻⁵ (1-15)

B 88 10⁻⁶ (1-8)

B 88 10⁻⁶ (1-9)



L 0 10⁻⁷ (2-59)

L 40 10⁻⁵ (2-54)

L 40 10⁻⁶ (1-18)

E.3 Beberapa contoh isolat BAL yang diisolasi dari *pulp* dan cairan *pulp* kakao terfermentasi di Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi yang tidak mampu menghambat kapang *Fusarium* sp.

