



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT  
PENGHASIL SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI  
KOPI RAKYAT DALAM WADAH KARUNG PLASTIK DI  
KAWASAN PEGUNUNGAN IJEN-RAUNG BONDOWOSO**

**SKRIPSI**

Oleh

**Herinda Putri Septianti**

**NIM 151710101059**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2019**



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT  
PENGHASIL SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI  
KOPI RAKYAT DALAM WADAH KARUNG PLASTIK DI  
KAWASAN PEGUNUNGAN IJEN-RAUNG BONDOWOSO**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Herinda Putri Septianti**

**NIM 151710101059**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2019**

## PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, penulis panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang serta sholawat kepada Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini saya persembahkan sebagai rasa terima kasih yang tidak terkira kepada :

1. Mama Hermin Sulisetyowati dan Papa Hari Rubianto yang penulis sayangi dan cintai, serta terima kasih selalu saya ucapkan kepada Mama dan Papa yang selalu mendoakan, memberikan kasih sayang, selalu mendukung, memberikan nasihat dan semangat kepada anakmu ini. Penulis selalu bersyukur, bahagia dan merasa bangga karena telah hadir di antara Mama dan Papa. Sekali lagi terima kasih untuk semuanya Ma, Pa. Mama dan Papa yang terhebat, saya sayang Mama dan Papa.
2. Bangsa dan Negara Kesatuan Republik Indonesia, terima kasih untuk keistimewaan yang diberikan kepada penulis.
3. Adik-adikku, Hetrina Ramadhani Jayanti dan Hakim Catur Febrianto yang tersayang, yang selalu mendukung dan memberi semangat kepada kakakmu.
4. Dr. Ir Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku DPU dan Dr. Ir. Jayus selaku DPA yang memberi kesempatan untuk mengeksplor pengetahuan saya, serta terus membimbing dan memberi evaluasi.
5. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.
6. Wilda Mukhollida, S.TP., *partner* seminar proprosal, seminar hasil hingga ujian skripsi. Terima kasih telah bersama melewati semua proses tugas akhir ini. *I'm so lucky to have you sister.*

**MOTO**

Allah dulu, Allah lagi, dan Allah terus  
(penulis)

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)

*Man jadda wa jadda*

-(sebuah ungkapan Bahasa Arab)-

*Where there is a will there is a way*

(Barangsiapa bersungguh-sungguh pasti akan mendapatkan hasil)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Herinda Putri Septianti

NIM : 151710101059

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

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

Jember, 13 Juni 2019

Yang menyatakan,



Herinda Putri Septianti

NIM 151710101059

**SKRIPSI**


**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL  
SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI KOPI RAKYAT  
DALAM WADAH KARUNG PLASTIK DI KAWASAN PEGUNUNGAN  
IJEN-RAUNG BONDOWOSO**

Oleh

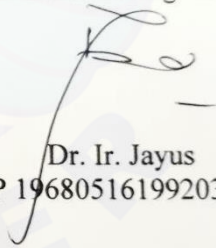
**Herinda Putri Septianti**

**NIM 151710101059**

Dosen Pembimbing Utama

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

Dosen Pembimbing Anggota

  
Dr. Ir. Jayus  
NIP 196805161992031004

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kopi Rakyat Dalam Wadah Karung Plastik di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso”** karya Herinda Putri Septianti (NIM 151710101059) telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Rabu, 3 Juli 2019

tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota



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

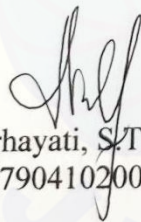


Dr. Ir. Jayus  
NIP 196805161992031004

Tim Penguji :

Penguji Utama

Penguji Anggota



Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si.  
NIP. 197904102003122004



Ir. Giyarto, M.Sc.  
NIP. 196607181993031013

Mengesahkan,  
Dekan  
Fakultas Teknologi Pertanian



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

## RINGKASAN

**Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Biji Kopi Rakyat dalam Wadah Karung Plastik di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso ; Herinda Putri Septianti, 151710101059 ; 86 halaman ; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.**

Produksi kopi Indonesia pada tahun 2016 mencapai 639.305 ton. Salah wilayah di Jawa Timur dengan produktivitas kopi cukup tinggi adalah Kabupaten Bondowoso. Pada tahun 2016 produksi kopi di Kabupaten Bondowoso mencapai 12.798 ton. Sebanyak 21 % dari total produksi kopi tersebut berasal dari perkebunan yang berada di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso. Kopi yang diolah oleh petani wilayah ini telah bersertifikat Indikasi Geografis (IG) dan telah diperdagangkan secara internasional dengan merek dagang Kopi Arabika Java Ijen-Raung. Petani-petani kopi di wilayah ini biasanya melakukan fermentasi biji kopi dalam wadah karung plastik. Kualitas kopi, utamanya bebas kontaminasi mikotoksin adalah kriteria penting yang diperhatikan pada perdagangan ekspor kopi. Kapang *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. diketahui sering ditemukan mengkontaminasi biji kopi dengan menghasilkan mikotoksin jenis okratoksin. Negara-negara importir mensyaratkan kandungan okratoksin maksimum biji kopi sebesar 5-10 ppb.

Salah satu proses yang dapat meningkatkan mutu kopi ialah fermentasi. Selama fermentasi biji kopi, terjadi reduksi lapisan lendir dan pulpa oleh mikroorganisme pendegradasi, diantaranya adalah bakteri asam laktat (BAL) genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc*, khamir dan kapang. BAL dapat menghasilkan metabolit berupa asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat dan 3-phenyllactic acid (PLA), senyawa dipeptida, dan asam lemak yang dapat menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. Namun BAL *indigenous* penghasil metabolit antikapang yang berperan selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso belum teridentifikasi pada tingkat spesies. Oleh karena itu dilakukan



penelitian ini yang bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi BAL *indigenus* potensial penghasil senyawa antikapang pada fermentasi kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.

Fermentasi kopi arabika yang diperoleh dari petani setempat dilakukan selama 48 jam dalam wadah karung plastik. Fermentasi dilakukan di Lumbung Kopi Java Ijen-Raung Bondowoso. Selama fermentasi berlangsung dilakukan pengukuran suhu, pH dan isolasi BAL dari biji kopi yang difermentasi setiap 12 jam. BAL *indigenus* yang memiliki zona bening paling luas pilih untuk diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan kapang. Setiap isolat BAL yang dapat menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* dan atau *Penicillium citrinum* diidentifikasi spesiesnya. Identifikasi BAL ini mengacu pada “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”.

Selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik terjadi perubahan suhu fermentasi yang fluktuatif sementara tingkat keasaman semakin meningkat seiring fermentasi berlangsung. Khamir dan BAL adalah mikroorganisme yang ditemukan tumbuh dominan selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik. Dari fermentasi kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso berhasil diisolasi sebanyak 20 isolat diduga BAL *indigenus* yang dapat menghambat pertumbuhan kapang *A. flavus* dan atau *P. citrinum*. Berdasarkan hasil identifikasi 5 isolat teridentifikasi bukan BAL dan 15 isolat yang diduga BAL meliputi 7 isolat diduga spesies *Lactobacillus plantarum*, 5 isolat diduga spesies *L. fermentum*, 2 isolat diduga spesies *L. kalixensis*, 2 isolat diduga spesies *Leuconostoc mesenteroides* dan 1 isolat diduga BAL genus *Streptococcus* sp. Spesies *L. plantarum* dan *L. fermentum* memiliki daya hambat kapang yang besar diantara isolat lainnya terhadap kapang *A. flavus* dan *P. citrinum*.

## SUMMARY

**Identification of Antifungal Compounds Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from from Ijen-Raung Coffee Beans Fermented in Plastic Sack ;**  
Herinda Putri Septianti, 151710101059 ; 86 pages ; Department of Agricultural Product Technolgy University of Jember .

Indonesia's coffee production reached 639,305 tons in 2016. One of the regions in East Java which had high coffee productivity is Bondowoso. Bondowoso's coffee production was quite high until 12,798 tons in 2016. Twenty-one percent of coffee total production in Bondowoso came from a plantation in Ijen-Raung Mountains Bondowoso. Coffee processed by local farmers has been certified as Indikasi Geografis (IG) in 2013. These coffee beans have been traded internationally with the Java Arabica Coffee Ijen-Raung trademark. Local Coffee farmers usually ferment coffee beans inside the plastic sack. The main requirement of coffee quality in export trading is free from mycotoxin contamination. *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. are often found contaminate coffee beans by producing mycotoxin. Importing countries require the maximum ochratoxin content of coffee beans must be 5-10 ppb.

One of the coffee processing that can improve the quality of coffee is fermentation. During fermentation, mucilage and pulp layers are degraded by bacteria, include lactic acid bacteria (LAB) (*Lactobacillus* and *Leuconostoc* genus), yeast and mold. LAB can produce metabolites such as organic acids (lactic acid, acetic acid and 3-phenyl lactic acid (PLA)), dipeptide compounds, and fatty acids which can inhibit the growth of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. However, the indigenous LAB producing antifungal metabolites which involve in coffee bean fermentation inside a plastic sack in the Bondowoso Ijen-Raung Mountains region has not been identified. This research aims to isolate and identify potential indigenous LAB producing antifungal compounds from fermented local coffee that ferment inside a plastic sack in the Bondowoso Ijen-Raung Mountains region.

The fermentation of arabica coffee bean obtained from local farmers is carried out for 48 hours in a plastic sack. The Fermentation process took place in Lumbung Kopi Java Ijen-Raung Bondowoso. Changing in temperature, pH, and isolation of microorganisms (yeast, mold, and LAB) were measured every 12 hours. Indigenous LAB which had the most extensive clear zone was selected to be tested its ability to inhibit mold growth. Each LAB which could inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and or *Penicillium citrinum* was identified its species. Identification of BAL referred to "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology".

During the fermentation of local coffee beans inside a plastic sack, the temperature of fermentation fluctuating changed while the acidity constantly increased. Yeast and LAB were the predominant microorganisms grew up during the fermentation of coffee beans in a plastic sack. As many as 20 isolates of indigenous LAB which inhibited the growth of *A. flavus* and/ or *P. citrinum* were isolated from local coffee fermentation in a plastic sack in the Bondowoso Ijen-Raung Mountains. Based on the identification, 5 isolates were identified as non-LAB and 15 isolates were thought to be LAB species of *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. kalixensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, and genus *Streptococcus* sp. *L. plantarum* and *L. fermentum* species had a large inhibitory power among other isolates against *A. flavus* and *P. citrinum*.

## PRAKATA

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah, berupa skripsi yang berjudul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang pada Fermentasi Kopi Rakyat Dalam Wadah Karung di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso”. 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. Ir. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng. selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember ;
2. Dr. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember sekaligus Dosen Pembimbing Anggota (DPA) yang telah memberikan bimbingan, koreksi, saran, dan segala bantuan yang diberikan dalam menyempurnakan karya tulis ilmiah ini ;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian guna memberikan bimbingan, koreksi, dan saran pada penyusunan skripsi ini ;
4. Kedua orang tua yang penulis sayangi dan cintai, Ibu Hermin Sulisetyowati dan Bapak Hari Rubianto serta kedua adik penulis atas kasing sayang, doa, semangat, perhatian dan doa restu selama ini ;
5. Ibu Wiwik Siti Windrati, M.P (almh) dan Bapak Ardiyan Dwi Masahid S.TP., M.P selaku Dosen Pembimbing Akademik (DPA) dan semua dosen serta staff Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember yang telah membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis sampai akhir ;
6. Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si., dan Ir. Giyarto, M.Sc., selaku dosen penguji yang telah memberikan pemahaman lebih melalui ujian skripsi serta masukan dan pengarahan demi terselesainya penyusunan karya tulis ilmiah ini ;

7. Bapak Mat Husein beserta istri selaku pemilik Lumbung Kopi Java Ijen-Raung Bondowoso atas segala bantuan yang diberikan ;
8. Nico Praditya Anandra sebagai yang selalu mendampingi, menerima segala keluh kesah dan juga memberi semangat, dukungan, serta saran kepada penulis hingga akhir penulisan skripsi ini ;
9. Wilda Mukhollida, S.TP., sebagai *partner* terbaik selama melewati semua tahap-tahap menyelesaikan tugas akhir ini ;
10. Retno Ayu Ambarwati, dan Debra Nastasya sebagai teman seperjuangan yang telah melewati waktu bersama selama melakukan penelitian dalam Tim Kopi 2018 ;
11. Sri Wulan, Ibana, Odry, Qoyyum, dan Sintya, selaku sahabat penulis sejak bangku SMP yang selalu menerima keluh kesah, memberikan semangat dan dukungan kepada penulis ;
12. Mbak Neny, Mbak Astriani, Mbak Rosavani (Osa) dan Mbak Indah yang telah meluangkan waktu dan pikiran memberikan memberikan saran, masukan dan semangat kepada penulis ;
13. Keluarga THP B 2015, keluarga HIMAGIHASTA, dan keluarga besar THP angkatan 2015 yang telah memberikan banyak cerita pengalaman senang maupun susah selama menjalani kehidupan perkuliahan dan sedang sama-sama berjuang menyelesaikan studi ;
14. Dan semua pihak yang mengenal penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas doa dan dukungannya kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah dalam bentuk skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan serta pengetahuan bagi semua pembaca.

Jember, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>PRAKATA</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xvi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xix
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Karakteristik Kopi Arabika Rakyat di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso</b> .....	5
<b>2.2 Proses Fermentasi Semi Basah Biji Kopi</b> .....	8
<b>2.3 Fermentor</b> .....	10
<b>2.4 Aktivitas Mikroorganisme Selama Fermentasi Biji Kopi</b> .....	11
<b>2.5 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat</b> .....	14
2.5.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	14
2.5.2 Identifikasi Bakteri Asam Laktat Secara Fenotipik.....	15

2.5.3	Identifikasi Bakteri Asam Laktat Secara Genotip.....	18
<b>2.6</b>	<b>Karakteristik dan Klasifikasi Bakteri Asam Laktat .....</b>	<b>19</b>
2.6.1	Bakteri Asam Laktat genus <i>Lactobacillus</i> .....	19
2.6.2	Bakteri Asam Laktat genus <i>Leuconostoc</i> .....	21
2.6.3	Bakteri Asam Laktat genus <i>Streptococcus</i> .....	21
<b>2.7</b>	<b>Pertumbuhan Kapang pada Biji Kopi.....</b>	<b>22</b>
2.7.1	<i>Aspergillus</i> sp. ....	22
2.7.2	<i>Penicillium</i> sp. ....	23
<b>2.8</b>	<b>Aktivitas Senyawa Antikapang Bakteri Asam Laktat.....</b>	<b>23</b>
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Bahan dan Alat Penelitian.....</b>	<b>25</b>
3.2.1	Bahan Penelitian.....	25
3.2.2	Alat Penelitian.....	26
<b>3.3</b>	<b>Pelaksanaan Penelitian.....</b>	<b>26</b>
3.3.1	Rancangan Penelitian.....	26
3.3.1	Rancangan Penelitian.....	26
<b>3.4</b>	<b>Parameter Pengamatan.....</b>	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b>Prosedur Analisa.....</b>	<b>32</b>
3.5.1	Analisa Perubahan Suhu, pH dan Total Mikroorganisme pada Biji Kopi Rakyat Terfermentasi Spontan dalam Wadah Karung Plastik di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	33
3.5.2	Kemampuan Kerja Antikapang oleh Bakteri Asam Laktat <i>Indigenous</i> Asal Biji Kopi Terfermentasi dalam Wadah Karung Plastik.....	34
3.5.3	Identifikasi Bakteri Asam Laktat <i>Indigenous</i> Penghasil Senyawa Antikapang yang Diisolasi dari Biji Kopi Terfermentasi dalam Wadah Karung Plastik.....	35
<b>3.6</b>	<b>Analisa Data.....</b>	<b>38</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Perubahan Mikrobiologis Selama Fermentasi Biji Kopi</b>	

dalam Karung Plastik di Kawasa Pegunungan Ijen- Raung Bondowoso.....	39
4.2 Perubahan Suhu dan pH Selama Fermentasi Biji Kopi dalam Karung Plastik di Kawasan Pegunungan Ijen- Raung Bondowoso.....	41
4.3 Isolat Bakteri Asam Laktat <i>Indigenous</i> dari dari Biji Kopi Terfermentasi dalam Karung Plastik di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	44
4.4 Kemampuan Kerja Antikapang Bakteri Asam Laktat <i>Indigenous</i> yang Diisolasi dari Biji Kopi Terfermentasi dalam Karung Plastik di Kawasan Pegunungan Ijen- Raung Bondowoso.....	46
4.5 Karakteristik Fenotip Bakteri Asam Laktat <i>Indigenous</i> Penghambat Pertumbuhan <i>A. flavus</i> dan <i>P. citrinum</i> .....	49
4.5.1 Karakteristik Morfologi.....	49
4.5.2 Karakteristik Fisiologi.....	51
4.5.3 Profil Fermentasi Bakteri Asam Laktat <i>Indigenous</i> pada Substrat Tertentu.....	55
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	63
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	63
<b>5.2 Saran</b> .....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	64
<b>LAMPIRAN</b> .....	72



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 3.1 Komposisi kimia kopi arabika dan robusta sebelum dan sesudah penyangraian.....	6
Tabel 3.2 Syarat mutu umum biji kopi menurut SNI 01-2907-2008.....	7
Tabel 4.1 Kode isolat BAL <i>indigenou</i> s terpilih yang diisolasi dari fermentasi biji kopi dalam wadah karung di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	45
Tabel 4.2 Kemampuan penghambatan isolat BAL <i>indigenou</i> s yang diisolasi dari biji kopi rakyat yang difermentasi spontan dalam wadah karung plastik terhadap kapang <i>A. flavus</i> dan <i>P. citrinum</i> .....	48
Tabel 4.3 Karakteristik morfologi isolat BAL <i>indigenou</i> s hasil fermentasi spontan biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	51
Tabel 4.4 Karakteristik fisiologi isolat BAL <i>indigenou</i> s yang diisolasi dari biji kopi yang difermentasi spontan dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	55
Tabel 4.5 Pola fermentasi isolat BAL <i>indigenou</i> s yang diisolasi dari biji kopi yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	61
Tabel 4.6 Pola fermentasi isolat BAL <i>indigenou</i> s yang diisolasi dari biji kopi yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso (Lanjutan).....	62

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Diagram alir proses fermentasi kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	27
Gambar 3.2 Diagram alir isolasi mikroorganisme yang berperan selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	30
Gambar 3.3 Diagram alir proses uji kemampuan kerja antikapang oleh BAL <i>indigenus</i> dengan metode <i>overlay</i> .....	32
Gambar 4.1 Perubahan populasi mikroorganisme selama fermentasi pada biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	39
Gambar 4.2 Perubahan suhu dan pH selama fermentasi dalam wadah karung di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	42
Gambar 4.3 Bakteri asam laktat yang terisolasi dari biji kopi rakyat difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	46
Gambar 4.4 Koloni kapang <i>A. flavus</i> (a) dan <i>P. citrinum</i> (b).....	46
Gambar 4.5 Zona penghambatan isolat BAL K3 (12) $10^{-4}$ (5) terhadap kapang <i>A. flavus</i> (a) dan <i>P. citrinum</i> (b) ; Zona penghambatan isolat BAL K3 (12) $10^{-4}$ (1) terhadap kapang <i>A. flavus</i> (a) dan <i>P. citrinum</i> (b).....	47
Gambar 4.6 Morfologi BAL sebagai bakteri gram positif dengan bentuk sel basil (a) ; kokus (b) ; bakteri pada pengamatan mikroskop perbesaran 1000x.....	50
Gambar 4.7 Hasil uji katalase pada bakteri katalase negatif.....	51
Gambar 4.8 Hasil uji kemampuan BAL produksi gas CO <sub>2</sub> dengan hasil positif (a) dan hasil negatif (b).....	52
Gambar 4.9 Hasil uji kemampuan BAL tumbuh pada suhu 15°C (a) ; suhu 37°C (b) dan suhu 45°C (c).....	53
Gambar 4.10 Hasil uji kemampuan BAL tumbuh pada konsentrasi NaCl	

0% (a) ; konsentrasi NaCl 4% (b) dan konsentrasi NaCl 6,5% (c).....	54
Gambar 4.11 Hasil pengujian kemampuan isolat memproduksi dekstran dari sukrosa dengan hasil positif (a) dan hasil negatif (b).....	56
Gambar 4.12 Hasil pengujian kemampuan isolat memproduksi amonia dari arginin dengan hasil positif (a) dan hasil negatif (b).....	57



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Dokumentasi tahapan proses fermentasi kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen Raung Bondowoso.....	72
Lampiran 4.1 Suhu dan pH fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	76
Lampiran 4.2 Jumlah mikroorganisme yang tumbuh selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	77
Lampiran 4.3 Data pengamatan uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	79
Lampiran 4.4 Data pengamatan identifikasi BAL <i>indigenous</i> yang diisolasi dari biji kopi rakyat yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.....	82
Lampiran 4.5 Karakteristik beberapa BAL berdasarkan <i>Bergey's Manual of Systemic Bacteriology</i> .....	85

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Produksi kopi di Indonesia mencapai 639.305 ton pada tahun 2016. Kopi robusta dan kopi arabika merupakan kopi yang dikembangkan di Indonesia, sebanyak 465.614 ton (72,8%) adalah kopi robusta dan 173.691 ton (27,2%) adalah kopi arabika. Tingginya produktivitas komoditi kopi berperan cukup penting dalam kegiatan perkonomian sebagai sumber penghasilan rakyat Indonesia. Pada tahun 2015 tercatat sebaran wilayah perkebunan kopi di Indonesia didominasi oleh rakyat atau disebut dengan perkebunan rakyat (PR) sebesar 96%, sementara itu perkebunan negara (PBN) dan perkebunan swasta masing-masing 2% (Direktorat Jendral Perkebunan Kementerian Pertanian, 2016).

Tercatat dalam Badan Pusat Statistik, Provinsi Jawa Timur sebagai penghasil kopi tertinggi di Pulau Jawa sebesar 67.200 ton pada tahun 2016. Salah satu kabupaten yang memiliki produktivitas kopi cukup tinggi adalah Kabupaten Bondowoso sebesar 12.798 ton pada tahun 2016 (BPS Jatim, 2016). Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso mencatat 21% dari total produktivitas kopi Bondowoso berasal dari perkebunan kopi di kawasan Ijen-Raung (Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso, Tanpa Tahun). Kopi arabika Bondowoso klaster Kopi Arabika Java Ijen-Raung Bondowoso yang diolah oleh rakyat telah bersertifikat Indikasi Geografis (IG) pada tahun 2013 (Direktorat Jendral Perkebunan, 2016). Sertifikasi IG menandakan bahwa kopi yang dihasilkan memiliki citarasa khas dan kualitas yang baik sehingga memberikan nilai tambah terhadap daya saing kopi Arabika Ijen-Raung dalam perdagangan internasional. Adanya sertifikasi IG juga menandakan bahwa proses pengolahan yang dilakukan oleh petani kopi telah sesuai dengan prosedur yang ada yaitu kopi arabika gelondong merah difermentasi selama 12-36 jam (Sari *et al.*, 2013). Selama fermentasi akan terjadi degradasi lapisan pulpa dan lendir (Nasanit dan Satyawut, 2012). Fermentasi yang dilakukan oleh petani di wilayah Bondowoso biasanya menggunakan wadah karung plastik. Menurut Yusianto dan Widoyotomo (2013), jenis wadah yang digunakan dapat mempengaruhi mutu biji kopi yang dihasilkan.

Mutu kopi sangat menentukan nilai ekonomis kopi dalam perdagangan internasional. Salah satu hal yang menjadi perhatian utama ialah kontaminasi okratoksin A dan aflatoksin dalam biji kopi. Kontaminasi oleh mikotoksin berbahaya bagi kesehatan karena mikotoksin bersifat karsinogen. Kontaminasi mikotoksin pada biji kopi umumnya disebabkan oleh kapang genus *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. Beberapa spesies *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. dapat menghasilkan toksin jenis okratoksin (Yani, 2007). Beberapa negara importir kopi seperti Italia, Finlandia, Yunani dan Spanyol mensyaratkan kandungan okratoksin maksimum pada biji kopi ialah sebesar 5-10 ppb (Raghuramulu dan Naidu dalam Yani, 2007).

Salah satu proses untuk meningkatkan mutu fisik biji kopi ialah melalui fermentasi. Selama fermentasi biji kopi, beberapa mikroorganisme kapang, khamir, dan bakteri asam laktat (BAL) spesies *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, dan *L. plantarum* berperan untuk menguraikan pulpa dan lendir kopi (Cortez dan Menezes, 2000; Nasanit dan Satyawut, 2015). BAL dapat tumbuh secara alami pada lingkungan tinggi kadar gula. Bakteri ini sering dimanfaatkan sebagai agen *biopreservative* karena dapat menghasilkan asam-asam organik, senyawa dipeptida dan asam lemak hidroksil yang berfungsi sebagai antikapang (Magnuson, 2003). Penggunaan BAL efektif untuk menghambat pertumbuhan kapang jenis *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. yang mengkontaminasi kopi (Waters, *et al.*, 2012). Kopi arabika rakyat yang ditanam di wilayah Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso telah diproses sesuai standar, salah satunya melalui proses fermentasi. Selama fermentasi, BAL tersebut akan tumbuh dan menghasilkan metabolit antikapang. Tetapi BAL penghasil senyawa antikapang yang berperan selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso belum teridentifikasi pada tingkat spesies.

## 1.2 Rumusan Masalah

Kopi arabika rakyat di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso telah diproses melalui fermentasi. Fermentasi diketahui merupakan salah satu upaya

untuk meningkatkan mutu biji kopi. Selama fermentasi, kelompok bakteri asam laktat (BAL) akan tumbuh secara spontan dan sebagian BAL dapat menghasilkan metabolit yang bersifat sebagai antikapang. BAL spesies *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, dan *Leuconostoc mesenteroides* yang tumbuh pada fermentasi biji kopi dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan kapang jenis *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. (Cortez dan Menezes, 2000; Gerez *et al.*, 2009; Nasanit dan Satyawut, 2015; Lee dan Chang, 2016). Bakteri-bakteri tersebut dapat menghasilkan asam-asam organik, senyawa dipeptida dan asam lemak hidroksil yang berfungsi sebagai antikapang (Magnuson, 2003). Tetapi BAL penghasil metabolit antikapang yang berperan selama fermentasi biji kopi rakyat di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso belum teridentifikasi pada tingkat spesies. BAL tersebut berpotensi untuk dimanfaatkan dalam fermentasi biji kopi yang terkontrol. Oleh karena itu, perlu adanya identifikasi BAL *indigenous* yang berperan selama fermentasi spontan biji kopi rakyat di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso yang difermentasi dalam wadah karung plastik.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat *indigenous* penghasil senyawa antikapang dalam fermentasi spontan biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat diantaranya sebagai berikut ;

1. Sumber informasi keragaman spesies BAL *indigenous* penghasil senyawa antikapang yang berperan dalam fermentasi spontan biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.
2. Menekan kontaminasi biji kopi akibat pertumbuhan kapang selama penyimpanan biji kopi melalui aplikasi BAL sebagai agen penghasil

metabolit antikapang sehingga dapat meningkatkan keamanan konsumsi biji kopi.

3. Mengembangkan starter BAL penghasil senyawa antikapang yang diharapkan dapat memperbaiki fermentasi biji kopi sehingga lebih terkontrol.





## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Karakteristik Kopi Arabika Rakyat di Kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Kopi arabika (*Coffea arabica*) merupakan kopi yang pertama kali dibawa masuk ke Indonesia oleh Belanda. Kopi jenis ini dapat tumbuh pada ketinggian optimum sekitar 1000-1200 meter di atas permukaan laut dan memiliki cita rasa terbaik. Semakin tinggi lokasi penanamannya maka cita rasa biji kopi yang dihasilkan semakin baik (Indrawanto *et al.*, 2010). Suhu tumbuh optimal yang dikehendaki untuk pertumbuhan kopi ini berkisar 16-21°C. Keunggulan lain dari kopi ini adalah memiliki biji yang berukuran besar, beraroma harum dan memiliki cita rasa lembut (*mild*), asam dan pahit (Afriliana, 2018). Secara fisik biji kopi arabika memiliki bentuk khas yaitu berbentuk agak memanjang, bidang cembungnya tidak terlalu tinggi, ujung biji mengkilap dan celah tengah bagian datarnya berlekuk (Panggabean, 2011).

Pada dasarnya *green bean* atau biji kopi beras tidak memiliki aroma dan cita rasa khas yang disukai oleh banyak orang. Aroma dan cita rasa yang khas akan muncul ketika biji kopi beras disangrai (*roasting*). Komponen-komponen kimia akan mengalami perubahan selama penyangraian sehingga dapat mempengaruhi hasil dari *roasting* biji kopi beras (Franca dan Oliveira, 2008). Komposisi kimia dari *green bean* berbeda-beda dipengaruhi oleh jenis kopi, lokasi tumbuh (tanah tempat kopi tumbuh) dan cara pengolahan kopi. Senyawa kimia utama yang terkandung dalam biji kopi adalah kafein dan *caffeol*. Kafein dapat menstimulus kerja syaraf sementara kafeol berperan dalam memberikan aroma dan *flavor* kopi yang baik (Ridwansyah, 2013). Komposisi kimia biji kopi arabika sebelum dan sesudah penyangraian pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia kopi arabika dan robusta sebelum dan sesudah penyangraian

Komponen (% bobot kering)	Arabika		Robusta	
	<i>Green Bean</i>	<i>Roasted</i>	<i>Green Bean</i>	<i>Roasted</i>
Mineral	3 – 4,2	3,5 – 4,5	4 – 4,5	4,6 – 5
Kafein	0,9 – 1,2	1	1,6 – 2,4	2
Trigonelline	1 – 1,2	0,5 – 1	0,6 – 0,75	0,3 – 0,6
Lemak	12 – 18	14,5 – 20	9 – 13	11 – 16
Total Asam	5,5 – 8	1,2 – 2,3	7 – 10	3,9 – 4,6
Klorogenat				
Asam Alifatis	1,5 – 2	1 – 1,5	1,5 – 1,2	1 – 1,5
Oilgosakarida	6 – 8	0 – 3,5	5 – 7	0 – 3,5
Polisakarida	50 – 55	24 – 39	37 – 47	-
Asam amino	2	0		0
Protein	11 – 13	13 – 15		13 – 15
Humic Acids	-	16 – 17		16 – 17

Sumber : Clarke dan Marcae (1987) dalam Ridwansyah (2013)

Kabupaten Bondowoso adalah salah satu wilayah di Jawa Timur dengan produktivitas kopi yang cukup tinggi. Produktivitas kopi di Kabupaten Bondowoso tahun 2016 mencapai 12.798 ton (BPS Jatim, 2016). Bondowoso memiliki 2 variasi kopi yang diunggulkan yaitu kopi Arabika Java Ijen-Raung dan kopi Arabika Argopuro. Daerah sebaran penanaman atau klaster kopi Arabika Java Ijen-Raung meliputi Kecamatan Cerme, Botolinggo, Sumberwringin, Tlogosari, dan wilayah Gunung Ijen dengan 44 kelompok tani, sementara itu kopi Arabika Argopuro tersebar di Kecamatan Pakem, Maesan dan Grujungan. Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso mencatat 21% dari total produktivitas kopi Bondowoso berasal dari perkebunan kopi rakyat yang diusahakan oleh petani kopi di kawasan Pegunungan Ijen-Raung (Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso, Tanpa Tahun). Kopi Arabika Ijen-Raung Bondowoso telah dikenal di pasar dunia dengan citarasa yang khas. Kekhasan citarasa kopi Arabika Ijen-Raung dipengaruhi oleh kondisi geografis pegunungan Ijen-Raung sehingga produk kopi ini telah mendapatkan sertifikasi Indikasi Geografis (IG) (Sari *et al.*, 2013).

Kopi Arabika Java Ijen-Raung merupakan kopi arabika yang ditanam di dataran tinggi Ijen dan Raung pada ketinggian >900 meter diatas permukaan laut. Kawasan ini beriklim kering dengan curah hujan rata-rata 1.514 mm per tahun dan

suhu antara 18°C-24°C. Tanaman kopi Arabika ditanam pada tanah jenis andisol yang megandung unsur hara yang cukup dan tingkat keasaman tanah (pH) cenderung netral (5,5 – 6,5) (Sari *et al.*, 2013; Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso, 2017). Kesuburan tanah yang tinggi dapat menghasilkan citarasa kopi yang baik (Sari *et al.*, 2013). Indikasi geografis kopi mempengaruhi kandungan kimia kopi, kopi Arabika Bondowoso mengandung asam klorogenat sebesar 9,10%. Kopi Arabika Bondowoso memiliki kandungan asam klorogenat paling tinggi dibandingkan dengan Kopi Arabika Malang (8,32%) dan Java Preanger Arabica (6,04%) (Kurniawan, 2017).

Kopi Arabika Java Ijen-Raung diolah mengikuti standar pengolahan kopi yang baik (*Good Manufacturing Practices*). Kopi yang diolah adalah kopi gelondong merah yang dipetik secara manual dengan proporsi minimal 95% kopi gelondong merah. Kopi hasil sortasi diolah secara basah dengan fermentasi 12-36 jam serta dikeringkan secara alami dengan bantuan sinar matahari (Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso, 2017). Biji kopi Arabika Java Ijen-Raung memiliki kualitas mutu baik, kadar air biji maksimum 12%, tidak berbau kapang, berwarna hijau keabu-abuan, dan jumlah nilai cacat fisik maksimum 11, sehingga kopi ini tergolong dalam Mutu I (*Grade 1*) sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) nomor 01-2907-2008 tentang biji kopi. Berdasarkan segi cita rasa, kopi Ijen Arabika Java-Ijen memiliki tingkat keasaman yang cukup tinggi, aroma khas dan kuat, kekentalan sedang dan memiliki cita rasa manis “*chocolaty*”, rasa tidak terlalu pahit (*bitter*) dan tidak sepat (*astringent*) (Sari *et al.*, 2013). Syarat mutu kopi arabika berdasarkan SNI terdapat Tabel 2.2

Tabel 2.2 Syarat mutu umum biji kopi menurut SNI 01-2907-2008

No	Kriteria	Satuan	Persyaratan
1.	Serangga hidup		Tidak ada
2.	Biji berbau busuk dan atau berbau kapang		Tidak ada
3.	Kadar air	% fraksi massa	Maks. 12,5
4.	Kadar kotoran	% fraksi massa	Maks. 0,5

Sumber : BSN (2008)

## 2.2 Proses Fermentasi Semi Basah Biji Kopi

Secara umum dikenal dua cara pengolahan kopi, yaitu pengolahan dengan cara pengolahan basah dan pengolahan kering. Saat ini cara pengolahan kopi telah berkembang dengan memodifikasi kedua cara tersebut, yaitu pengolahan semi basah. Pada dasarnya tujuan pengolahan kopi semi basah ialah mempercepat proses olah kopi (Afriliana, 2018). Tahapan proses pengolahan kopi cara semi basah tidak jauh berbeda dengan cara pengolah basah. Hal dasar yang membedakan dari kedua cara ini adalah pengolahan basah membutuhkan jumlah air yang lebih banyak. Tahapan proses pengolahan kopi semi basah meliputi pemanenan, sortasi buah kopi, pengupasan kulit buah merah, fermentasi biji kopi selama 36 jam, pencucian lendir, pengeringan biji kopi hingga kadar air  $\pm$  11-13%, pengupasan kulit tanduk, sortasi, pengemasan, dan penggudangan biji kopi beras (Prastowo *et al.*, 2010).

Buah yang masak sempurna memiliki warna kulit merah, daging buah lunak dan berlendir serta mengandung senyawa gula yang relatif tinggi sehingga rasanya manis (Afriliana, 2018). Buah kopi masak dipanen dengan dipetik kemudian disortasi. Musim panen buah kopi dimulai bulan Mei/Juni hingga bulan Agustus/September. Buah kopi masak hasil panen disortasi untuk memisahkan buah superior dari buah inferior dan kotoran seperti daun, ranting, tanah dan kerikil (Starfarm, 2010a dalam Prastowo *et al.*, 2010). Buah kopi hasil sortasi dikupas mesin pengupas (*pulper*) sehingga menghasilkan kopi HS. Pengupasan buah kopi umumnya dilakukan dengan menyemprotkan air ke dalam silinder bersama dengan buah yang akan dikupas. Pada proses ini biji kopi akan terpisahkan dari bagian kulit terluar (eksokarp) dan bagian kulit kopi (mesokarp). Prinsip kerja *pulping* adalah melepaskan eksokarp dan mesokarp dari buah kopi (Sulistyaningsih, 2017).

Fermentasi kopi dengan cara semi basah dilakukan dengan menumpuk buah kopi yang telah dikupas kulitnya selama 2-3 hari. Tumpukan kopi ditutup dengan goni agar tetap lembab sehingga proses fermentasi dapat berlangsung dengan baik. Setiap 5-6 jam tumpukan kopi diaduk agar fermentasi berjalan lebih merata (Afriliana, 2018). Cara lain fermentasi yang digunakan adalah dengan

memasukkan biji kopi yang telah dikupas ke dalam kantong plastik dan menyimpan secara tertutup selama 12-36 jam. Pada dasarnya fermentasi dengan cara ini adalah tanpa merendam biji kopi kedalam air (cara basah) (Prastowo *et al.*, 2010). Pada tahap akhir fermentasi biji kopi dilakukan pencucian biji kopi yang bertujuan untuk menghilangkan sisa lendir hasil fermentasi yang masih menempel pada kulit tanduk sehingga fermentasi terhenti (Prastowo *et al.*, 2010).

Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air dalam biji kopi HS yang semula 60-65% menjadi 12%. Apabila kadar air biji kopi melebihi 12% maka rentan terjadi kontaminasi oleh kapang selama masa penyimpanan. Proses pengeringan dapat dilakukan dengan cara penjemuran, mekanis atau kombinasi keduanya (Prastowo *et al.*, 2010).

Pengupasan biji HS bertujuan untuk membebaskan biji kopi dari kulit tanduk kering sehingga dihasilkan biji kopi beras. Pengupasan atau penggilingan biji kopi kering atau kopi HS dilakukan dengan menggunakan mesin *huller* (Prastowo *et al.*, 2010). Proses selanjutnya adalah sortasi biji kopi beras. Sortasi biji kopi bertujuan untuk mengelompokkan biji kopi sesuai dengan ukuran dan mutu fisiknya. Biji kopi disortasi berdasarkan ukuran, biji ukuran besar (ukuran  $> 6,5$  mm), biji ukuran medium (ukuran  $5,5$  mm  $< d < 6,5$  mm), dan ukuran kecil ( $< 5,5$  mm). Sortasi berdasarkan mutu fisik umumnya dibagi menjadi dua tahap, yaitu sortasi berdasarkan warna dan berdasarkan kondisi fisiknya. Sortasi berdasarkan warna biasanya dilakukan menggunakan mesin pembeda warna (*sortex*). Sortasi berdasarkan kondisi fisiknya dapat menentukan ada atau tidaknya cacat pada biji kopi. Contoh biji cacat adalah biji hitam, biji coklat, biji berlobang, biji pecah, pecahan biji, biji bertutul, biji muda, biji berjamur, dan lain-lain (Afriliana, 2018).

Pengemasan biji kopi beras bertujuan antara lain untuk mempertahankan mutu fisik dan citarasa, mengamankan dari serangan hama dan penyakit, mempermudah penanganan, memperindah kenampakan, mempermudah penanganan, pengangkutan, perhitungan jumlah dan identifikasi (Afriliana, 2018). Beberapa faktor penting pada penyimpanan biji kopi adalah kadar air, kelembaban relatif udara dan kebersihan gudang. Kelembaban (RH) ruangan gudang yang

aman untuk penyimpanan biji kopi kering yaitu sekitar 70%. Pada kondisi ini, kadar air keseimbangan biji kopi adalah 12 % jika kelembaban relatif udara meningkat, maka biji kopi akan mudah menyerap uap air dari udara lembab sekelilingnya sehingga kadar air meningkat (Prastowo *et al.*, 2010).

### 2.3 Fermentor

Fermentor merupakan alat yang digunakan untuk menjamin fermentasi dapat berlangsung optimal. Fermentasi kopi yang dilakukan petani biasanya menggunakan bermacam wadah/ alat, contohnya karung plastik, bak plastik, atau bak semen. Di beberapa tempat di Afrika fermentasi kopi dilakukan menggunakan wadah ban bekas, kaleng susu, kotak kayu, karung plastik, dan drum plastik (Gitonga, 2004).

Karung plastik umumnya digunakan sebagai wadah fermentasi kopi dan kakao. Karung plastik mempunyai permukaan berpori-pori lebih besar karena terbuat dari rajutan material PP (*Polypropylene*). Karung plastik umumnya terbuat dari polyolefin film yaaitu *polyethylene*. *Polyethylene* (PE) terbuat dari ethylene polimer dan terdiri dari tiga macam yaitu *Low Density Polyethylene* (LDPE), *Medium Density Polyethylene* (MDPE), dan *High Density Polyethylene* (HDPE). Plastik dengan bahan ployethylene memiliki permeabilitas uap air dan air yang rendah, mudah dikelim panas, fleksibel, dapat digunakan untuk menyimpan pada suhu beku (-50°C), transparan sampai buram. Namun beberapa kekurangan dari plastik berbahan ini yaitu memiliki permeabilitas terhadap oksigen tinggi dan tidak tahan terhadap minyak (Syarief dan Irawati, 1988).

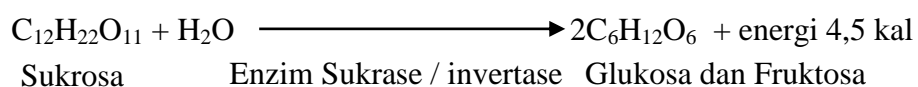
Karakteristik wadah fermentasi yang digunakan selama fermentasi dapat mempengaruhi kualitas akhir produk. Fermentasi kopi arabika di dalam wadah karung plastik pada suhu lingkungan (18-25°C) menghasilkan mutu fisik biji kopi beras lebih baik daripada penggunaan mesin fermentor, serta menghasilkan citarasa lebih baik daripada penggunaan bak plastik (fermentasi basah) untuk fermentasi kopi Arabika. Biji kopi yang difermentasi dalam wadah karung plastik memiliki citarasa khas floral yang mendominasi (Yusianto dan Widyotomo, 2013).

## 2.4 Aktivitas Mikroorganisme Selama Fermentasi Biji Kopi

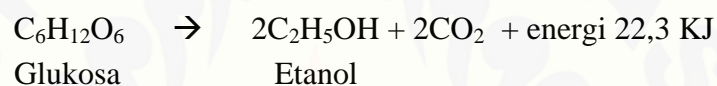
Fermentasi merupakan salah satu proses penting pada pengolahan kopi karena menentukan kualitas fisik dan citarasa dari kopi. Selama fermentasi terjadi proses kimiawi dalam pembentukan cita rasa, seperti asam organik, asam amino, dan gula reduksi (Lin, 2010 ; Huch dan Franz, 2015). Proses fermentasi kopi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah lama fermentasi, inokulum mikroorganisme yang digunakan, suhu, tingkat keasaman (pH), substrat (medium), oksigen, dan air (Usman *et al.*, 2015).

Fermentasi kopi dilakukan untuk menghilangkan lapisan lendir yang ada dipermukaan kopi. Ketebalan lapisan lendir kopi antara 0,5 – 2 mm. Lapisan lendir kopi mengandung air 84,2 %, protein 8,9%, polifenol 4,1%, gula 4,1%, asam pektat 4,1 %, dan abu 0,7% (Cflifford dan Ramirez dalam Yusianto dan Nugroho, 2014). Lendir buah kopi segar memiliki pH sekitar 6,5 kemudian selama fermentasi akan terjadi penurunan pH menjadi 4,1 – 4,3 (Yusianto dan Widyotomo, 2013). Secara alamiah mikroorganisme telah ada dipermukaan buah kopi. Jumlahnya akan semakin meningkat cepat ketika buah kopi menjadi masak. Mikroorganisme-mikroorganisme ini yang nantinya secara aktif berperan pada fermentasi kopi (FAO dalam Yusianto dan Widyotomo, 2013). Pada umumnya mikroorganisme yang berperan selama fermentasi kopi adalah kelompok khamir (*yeast*) dan bakteri (Yusianto dan Widyotomo, 2013). Mikroorganisme tersebut berperan untuk mendegradasi senyawa yang terdapat pada lapisan pulpa dan lendir biji kopi dengan menghasilkan metabolit berupa asam-asam organik dan senyawa metabolit lain kemudian berdifusi kedalam biji kopi (Silva *et al.*, 2013).

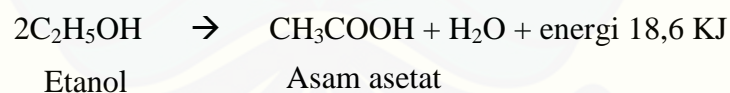
Khamir sebagai salah satu mikroorganisme yang berperan pada fermentasi kopi dapat menghasilkan enzim sukrase (invertase). Enzim invertase dapat menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, serta menghasilkan energi (4,5 kal) (Manurung dan Soelistyowati dalam Karinawantika, 2015). Reaksi kimia hidrolisis sukrosa oleh khamir sebagai berikut :



Khamir juga berperan dalam degradasi pektin pada pulpa kopi. Beberapa khamir dapat mensekresikan enzim pektinolitik (Nasanit dan Satyawut, 2015). Selama pertumbuhan khamir dapat menghasilkan enzim protopektin (enzim yang menguraikan protopektin menjadi pektin), enzim pektase (enzim yang menguraikan pektin menjadi methilalkohol dan asam pektin), serta enzim pektinase (enzim yang menguraikan asam pektin menjadi galaktosa, arabinosa, dan asam asetat) (Knapp dalam Mubarak, 2014). Pada kondisi O<sub>2</sub> terbatas, khamir juga berperan dalam memfermentasi glukosa menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub>. Reaksi ini bersifat eksotermis sehingga akan menghasilkan panas (Rohan dalam Mubarak, 2014). Reaksi kimia yang terjadi pada fermentasi glukosa menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub> sebagai berikut :



Alkohol yang hasil metabolisme khamir selanjutnya dioksidasi oleh bakteri asam asetat menjadi asam asetat pada reaksi yang bersifat eksotermis. Pembentukan asam asetat dan energi panas oleh bakteri asam asetat mengakibatkan terjadinya penurunan pH dan peningkatan suhu selama fermentasi (Rohan dalam Mubarak, 2014). Reaksi kimia pembentukan asam asetat oleh bakteri asam asetat sebagai berikut :



Beberapa genus khamir yang ditemukan tumbuh selama proses fermentasi biji kopi arabika di Thailand di antaranya adalah *Pichia* sp. (28 isolat), *Candida* sp. (25 isolat), *Kluyveromyces* sp. (23 isolat), *Saccharomyces* sp. (19 isolat), *Debaryomyces* sp. (10 isolat), *Hanseniaspora* sp. (2 isolat), dan *Schizosaccharomyces* sp. (1 isolat). Khamir juga berperan dalam degradasi pektin pada pulpa kopi. Beberapa khamir dapat mensekresikan enzim pektinolitik (Nasanit dan Satyawut, 2015). Khamir *Saccharomyces cerevisiae* yang digunakan sebagai kultur *starter* pada fermentasi kopi arabika dengan metode *semi-dry* terbukti dapat menghasilkan kualitas kopi yang lebih baik dan terkontrol (Evangelista, 2014). Khamir genus *Kloeckera* sp., *Candida* sp., dan *Cryptococcus*



sp. bertanggung jawab untuk citarasa alkohol pada kopi yang difermentasi berlebih pada seduhan kopi (Avallone *et al.*, 2001).

Bakteri asam laktat merupakan salah satu bakteri dominan selama fermentasi biji kopi yang dapat memproduksi asam laktat, asam asetat dan asam-asam organik lainnya dari gula yang tersedia pada pulpa biji kopi. Perombakan gula menjadi asam laktat menghasilkan energi panas yang dapat meningkatkan suhu fermentasi, dengan reaksi sebagai berikut (Wood dalam Mubarak, 2014) :



Asam-asam organik hasil perombakan karbohidrat terakumulasi kemudian menurunkan pH fermentasi (Atmana dalam Widagdo, 2008). Bakteri asam laktat dapat tumbuh baik pada pH rendah 3,0 – 6,0. *Leuconostoc mesenteroides* banyak ditemukan pada fermentasi kopi dengan metode basah (*wet methode*) (Avallone *et al.*, 2001). *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *Enterococcus casseliflavus* dominan pada awal fermentasi. Bakteri-bakteri tersebut dapat memproduksi asam laktat yang dapat menurunkan pH fermentasi. Kondisi asam mendukung untuk pertumbuhan khamir (Nasanit dan Satyawut, 2013). Bakteri kelompok *Bacillus* sp. seperti *B. Subtilis* dan *B. cereus* serta bakteri *Pseudomonas* sp. dapat menghasilkan enzim pektinolitik yang dapat mendegradasi pektin pada pulpa dan lendir kopi (Ouattara dalam Nasanit dan Satyawut, 2015; Franzetti dan Scarpellini dalam Nasanit dan Satyawut, 2015).

Kapang juga berperan dalam fermentasi biji kopi walaupun jumlah yang ditemukan tidak banyak. Kapang genus *Penicillium* sp., adalah genus yang paling banyak ditemukan diikuti dengan genus *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., dan *Fusarium* sp. Kapang *Penicillium* sp. diketahui memiliki aktivitas pektinolitik yang dapat mendegradasi pektin pada lapisan lendir biji kopi. Adanya kapang seperti *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., dan *Aspergillus* sp., pada fermentasi biji kopi dapat menghasilkan mikotoksin yang berbahaya bagi kesehatan (Nasanit dan Satyawut, 2015).

## 2.5 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat

### 2.5.1 Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi adalah kegiatan mengambil mikroorganisme yang terdapat di alam kemudian menumbuhkannya dalam suatu media buatan. Isolasi adalah tahap awal sebelum melakukan telaah atau identifikasi mikroorganisme. Prinsip dari isolasi adalah memisahkan satu jenis mikroorganisme dengan mikroorganisme lain yang ada di alam dengan cara menumbuhkannya di dalam media padat (Sutedjo, 1996). terdapat beberapa teknik isolasi bakteri menurut Hadioetomo (1993) yaitu :

- a. Metode cawan gores (*streak plate*). Metode ini dilakukan untuk mendapatkan koloni mikroorganisme yang benar-benar terpisah dengan koloni lain. Cara yang digunakan ialah dengan mengambil satu ose mikroorganisme kemudian menggoreskan pada media agar steril.
- b. Metode cawan sebar (*spread plate*). Metode isolasi ini dilakukan dengan teknik menuangkan stok kultur mikroorganisme diatas media agar steril kemudian diratakan. Sementara metode *pour plate* dengan menuangkan stok mikroorganisme terlebih dahulu kemudian ditambahkan media agar yang masih mencair. Dengan dua metode ini mikroorganisme yang diisolasi dapat tumbuh tersebar pada media agar.
- c. Teknik pengenceran (*dilution plate*). Teknik pengenceran dilakukan dengan mengambil isolat mikroorgansime kemudian disuspensikan ke dalam aquades steril.

Isolasi bakteri asam laktat (BAL) dilakukan menggunakan media isolasi spesifik yang disebut sebagai media selektif. Media selektif digunakan unurk menumbuhkan dan memelihara mikroorgansime tertentu dengan sifat spesifik. Media spesifik ini dapat menyeleksi mikroorgansime yang diinginkan contohnya bakteri asam laktat. Media spesifik yang digunakan untuk isolasi BAL adalah MRSA (*de Mann Rogosa Sharpe Agar*). Media MRSA mengandung sodium asetat yang berperan dalam menghambat perumbuhan bakteri lain (Oxoid dalam Syabaniar, 2017). Media MRSA mengandung faktor pertumbuhan bagi BAL genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* meliputi polisorbit, asetat, magnesium, dan mangan (Putra, 2018).

### 2.5.2 Identifikasi Bakteri Asam Laktat Secara Fenotipik

Karakter bakteri asam laktat yang diamati pada identifikasi fenotipik meliputi morfologi koloni, pengamatan makroskopis (pewarnaan gram), dan karakter fisiologis, dan karakter metabolik (biokimia) atau kemotaksonomi (Ammor *et al.*, dalam Nurhayati *et al.*, 2011).

#### a. Sifat Gram

Bakteri gram positif ialah bakteri yang dapat mengikat pewarna kristal violet, sementara bakteri gram negatif ialah bakteri hanya mengikat pewarna safranin (Hadioetomo dalam Susilawati, 2016). Bakteri asam laktat termasuk ke dalam kelompok bakteri gram positif (Vos *et al.*, 2009). Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tersusun atas peptidoglikan lebih tebal dibandingkan dengan lapisan lipida. Lapisan lipida akan terhidrasi ketika alkohol diteteskan, mengakibatkan pori-pori dinding sel akan semakin kecil sehingga zat pewarna kristal violet (kompleks CV-I) dapat dipertahankan dan sel bakteri berwarna ungu. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel tersusun atas lapisan lipida yang lebih tebal, perlakuan alkohol pada pewarnaan gram mengakibatkan lapisan lipida terekstrak sehingga bakteri gram negatif kehilangan zat pewarna kristal violet dan akhirnya mempertahankan pewarna merah, yaitu safranin (Prakash, 2014).

#### b. Sifat katalase

Pengujian sifat katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri tertentu dapat menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase dapat menetralkan efek bakteriosidal dari hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Enzim katalase dapat mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air ( $H_2O$ ) dan gelembung oksigen ( $O_2$ ). Bakteri aerob dapat tumbuh di lingkungan yang tersedia  $O_2$  sementara bakteri anaerob obligat tidak (Reiner, 2012). Bakteri asam laktat adalah bakteri anaerob fakultatif yang tidak menghasilkan enzim katalase atau katalase negatif (Vos *et al.*, 2009). Reaksi penguraian  $H_2O_2$  sebagai berikut :



#### c. Kemampuan produksi gas $CO_2$

Gas CO<sub>2</sub> merupakan salah satu metabolit bakteri asam laktat heterofermentatif selain menghasilkan asam-asam organik dan etanol. BAL heterofermentatif dapat memetabolisme gula pentosa dan heksosa. Berbeda dengan BAL heterofermentatif, BAL homofermentatif hanya mampu memetabolisme heksosa dan metabolit utamanya ialah adalah asam laktat. BAL heterofermentatif dibedakan menjadi BAL heterofermentatif fakultatif dan heterofermentatif obligat. Spesies dari *Lactobacillus* sp. homofermentatif diantaranya adalah *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. belveticus*, *L. salivarius*, dan *L. kalixensis*. BAL heterofermentatif fakultatif diantaranya *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. rhmanosus*, *L. animalis*, dan *L. sakei*. Spesies BAL yang tergolong sebagai BAL heterofermentatif obligat diantaranya *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. frumenti*, dan *L. kefir*. Genus *Leuconostoc* tergolong sebagai bakteri heterofermentatif, sementara itu genus *Enterococcus*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus* tergolong sebagai homofermentatif karena tidak dapat menghasilkan CO<sub>2</sub> dari glukosa (Vos *et al.*, 2009 ; Wright dan Axelsson, 2012).

d. Kemampuan BAL tumbuh pada suhu yang berbeda

Berdasarkan kemampuan pertumbuhan pada suhu yang berbeda, mikroorganisme dikelompokkan menjadi 3, yaitu bakteri psikrofilik, mesofilik, dan termofilik. Bakteri psikrofilik dapat tumbuh pada suhu rendah atau dingin yaitu suhu 0°C – 20°C dan optimal pada suhu 15°C, bakteri mesofilik dapat tumbuh pada rentang suhu 10°C – 45°C, sementara itu bakteri termofilik adalah bakteri yang dapat berkembang biak pada suhu tinggi atau panas. Bakteri termofilik dapat tumbuh pada suhu diatas 45°C dengan suhu optimal pertumbuhan pada suhu 60°C (Jeffrey dan Pommerville, 2010). Suhu pertumbuhan terlalu rendah dapat menghentikan pertumbuhan sel, komponen sel menjadi tidak aktif dan sel-sel BAL dapat mati (Asaminew dan Eyassu, 2011). Hal tersebut dapat menjelaskan penyebab beberapa spesies BAL hanya dapat tumbuh pada suhu tertentu.

BAL genus *Lactobacillus* kelompok bakteri termofil mampu tumbuh hingga suhu 55°C, namun tidak dapat tumbuh pada suhu 15°C. BAL genus

*Leuconostoc* seperti *L. mesenteroides* pada umumnya tumbuh optimal pada suhu 20°C-30°C, tetapi dapat tumbuh pada suhu 5°C-37°C. BAL yang termasuk genus *Streptococcus*, pada umumnya tumbuh optimal pada suhu 37°C. *Lactobacillus johnsonii*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, dan *L. pentosus*, dapat tumbuh pada suhu 15°C (Vos *et al.*, 2009). *L. plantarum*, *L. brevis*, dan *L. casei* mampu tumbuh pada suhu 15°C-35°C, sementara *L. buchneri* tumbuh optimal pada suhu 30-40°C namun tetap dapat tumbuh pada suhu 15°C. (Vos *et al.*, 2009 ; Najgebauer *et al.*, 2011 ; Raharjo, 2012).

e. Kemampuan BAL tumbuh pada konsentrasi NaCl yang berbeda

Keberadaan garam dapat mempengaruhi aktivitas air (*water activity/ a<sub>w</sub>*) dari bahan sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme (Volk dan Wheeler, 1992). Mikroorganisme halofilik adalah mikroorganisme yang membutuhkan NaCl dengan konsentrasi 2% - 5% untuk dapat tumbuh optimal. Kondisi salinitas yang terlalu tinggi dapat mempengaruhi tekanan osmotik sel. Konsentrasi cairan dalam sel (sitoplasma) lebih tinggi dari pada di luar sel, mengakibatkan cairan sel keluar sehingga terjadi plasmolisis dan mengakibatkan kematian mikroorganisme (Jeffrey dan Pommerville, 2010).

BAL spesies *L. fermentum* dapat tumbuh dengan baik pada media dengan konsentrasi NaCl 4% dan 6,5%, sedangkan *L. brevis* dan *L. plantarum* kurang dapat tumbuh dengan baik pada media dengan konsentrasi NaCl 4% dan 6,5%. Selain BAL yang tergolong dalam genus *Lactobacillus*, BAL genus *Leuconostoc* spesies *L. mesenteroides* mampu tumbuh dengan baik pada media dengan konsentrasi NaCl 3% - 6,5% dan *L. lactis* dapat tumbuh dengan baik pada media dengan konsentrasi NaCl 3%. BAL genus *Streptococcus* sp. juga bersifat toleran pada media mengandung NaCl sebanyak 6,5% (Vos *et al.*, 2009).

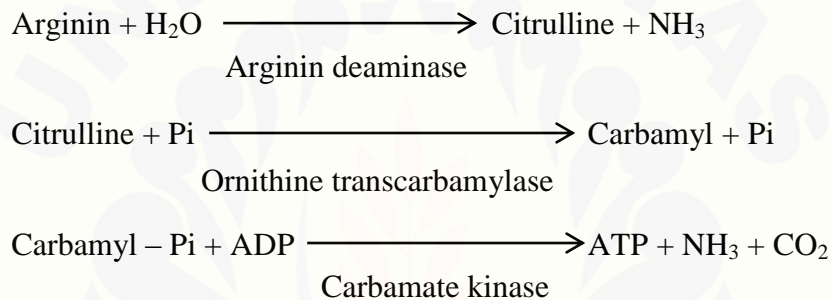
f. Kemampuan produksi dekstran

Dekstran adalah polisakarida hasil metabolisme ekstraseluler yang dihasilkan oleh BAL heterofermentatif. Dekstran termasuk ke dalam kelompok homopolisakarida. BAL *Leuconostoc* sp. dan *Streptococcus* sp. dapat memproduksi polisakarida ekstraseluler yaitu dekstran dan levans. *Lactobacillus mali*, *L. nagelii*, dan *L. satsumensis* juga dapat menghasilkan dekstran dari

sukrosa. (Vos *et al.*, 2009). *L. mesenteroides* akan mengkonversi sukrosa menjadi dekstran dengan menghasilkan enzim dekstransukrase yang (Triantarti dan Santoso, 2007).

g. Kemampuan produksi amonia dari arginin

BAL memetabolisme arginin menjadi amonia melalui jalur *arginine deiminase* (ADI) dengan melibatkan 3 enzim yaitu *arginine deiminase*, *ornithine transcarbamylase*, dan *carbamate kinase* (Arena *et al.*, 1999). Spesies BAL dengan kemampuan memetabolisme arginin menjadi amonia beberapa diantaranya ialah *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir*, *S. pyogenes*, dan *S. australis* Reaksi katabolisme arginin yaitu



### 2.5.2 Identifikasi Bakteri Asam Laktat Secara Genotip

Pendekatan genomik lebih sering digunakan untuk penentuan spesies pada prokaryota. Terdapat berbagai teknik yang digunakan dalam analisis DNA, namun teknik yang laing banyak digunakan ialah teknik RNA ribosomal sebagai penanda molekuler. 16S RNA adalah jenis RNA ribosomal yang paling sering digunakan karena susunan urutan basa tidak terlalu pendek maupun terlalu panjang. Analisis gen penyandi 16S RNA telah digunakan sebagai prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenik (Pangastuti, 2006). Pada identifikasi bakteri secara genotip pada tingkat molekuler dapat menggunakan metode molekuler dengan sekuensing gen pengkode 16S rRNA bakteri dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-sekuensing (Ammor *et al.*, dalam Nurhayati *et al.*, 2011). Hasil identifikasi kekerabatan berdasarkan sekuen DNA ditampilkan menggunakan pohon filogenik. Besaran skor kesesejarian menunjukkan tingkat kemiripan isolat dengan gen pada *gen-bank*. Identifikasi BAL secara genotip pada BAL *indigenous* penghasil senyawa antikapang pada fermentasi biji kopi di Bangli, Bali

memberikan hasil bahwa BAL tersebut memiliki kedekatan homologi gen 16S rRNA dengan *L. fermentum*, hasil identifikasi serupa dengan BAL *indigenus* yang berperan pada fermentasi kakao (Hatiningsih, 2018 ; Fitriyana, 2011). Identifikasi BAL *indigenus* secara genotip pada BAL *indigenus* yang berperan pada fermentasi spontan pisang var. Raja adalah *L. salivarius* dan *L. fructivorans* (Nurhayati *et al.*, 2011).

## 2.6 Karakteristik dan Klasifikasi Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) pada umumnya banyak ditemukan pada fermentasi bahan pangan, pencernaan dan membran mucus pada manusia serta hewan. Bakteri asam laktat secara morfologi memiliki bentuk sel batang (basil) dan kokus, dikelompokkan ke dalam bakteri gram positif dan bakteri katalase negatif. Ciri lain dari bakteri ini adalah tidak berspora (*nonsporing*) dan bersifat toleran terhadap asam (Bjorkroth dan Koort, 2011). Bakteri asam laktat terdiri atas 20 genus yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella*. Bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* sp. dan *Lactococcus* sp. adalah jenis yang banyak berperan dalam proses fermentasi pada bahan pangan (Bjorkroth dan Koort, 2011). Berikut klasifikasi bakteri asam laktat berdasarkan genusnya :

### 2.6.1 Bakteri Asam Laktat genus *Lactobacillus*

Bakteri asam laktat dengan bentuk sel basil atau batang dikelompokkan ke dalam genus *Lactobacillus*. *Lactobacillus* sp. memiliki ciri yang sama dengan bakteri asam laktat pada umumnya yaitu termasuk bakteri gram positif, bakteri katalase negatif, hidup pada lingkungan anaerob fakultatif, suhu pertumbuhan BAL berkisar pada suhu 2-53°C, namun suhu optimum pertumbuhan pada suhu 30-40°C. Metabolit utama *Lactobacillus* sp. adalah asam laktat, dan metabolit lainnya berupa asam asetat, etanol, CO<sub>2</sub>, asam format, dan asam suksinat (Vos *et al.*, 2009). Berdasarkan kemampuan dalam memetabolisme karbohidrat bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu :

a. *Lactobacillus* sp. homofermentatif obligat

*Lactobacillus* sp. homofermentatif obligat adalah bakteri dari genus *Lactobacillus* yang dapat memfermentasi monosakarida kelompok heksosa menjadi asam laktat melalui jalur Embden-Meyerhof (Vos *et al.*, 2009) dan tidak dapat memetabolisme pentosa. Produk fermentasi dari BAL homofermentatif adalah asam laktat (Pagnoncelli, 2003, dalam Roussos, 2003). Spesies dari *Lactobacillus* sp. homofermentatif, diantaranya adalah *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. belveticus*, dan *L. salivarius* (Wright dan Axelsson, 2012).

b. *Lactobacillus* sp. heterofermentatif

Produk fermentasi dari BAL heterofermentatif menghasilkan metabolit berupa asam asetat, asam propionat, asam butirat dan terkadang etanol (Pagnoncelli, 2003, dalam Roussos, 2003). Metabolisme *Lactobacillus* sp. heterofermentatif melalui jalur pentosa fosfoketolase, *heksosa monophosphate shunt*, atau jalur 6-fosfogluconat dan juga menghasilkan CO<sub>2</sub> (Wright dan Axelsson, 2012).

1. *Lactobacillus* sp. heterofermentatif fakultatif. BAL kelompok ini dapat memfermentasi heksosa dan juga pentosa. Karbohidrat kelompok heksosa difermentasi menjadi asam laktat, asam asetat, etanol, dan asam format melalui jalur metabolisme Embden-Meyerhof, sementara pentosa difermentasi menjadi asam laktat dan asam asetat dengan fosfoketolase yang diinduksi. Spesies dari *Lactobacillus* sp. heterofermentatif fakultatif, diantaranya adalah *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, dan *L. sakei* (Vos *et al.*, 2009 ; Wright dan Axelsson, 2012).

2. *Lactobacillus* sp. heterofermentatif obligat. BAL kelompok ini mampu memfermentasi heksosa menjadi asam laktat, asam asetat, etanol, dan CO<sub>2</sub> melalui jalur fosfogluconat, sementara pentosa akan difermentasi menjadi asam laktat dan asam asetat melalui pentosa fosfat yang terkait. Spesies dari *Lactobacillus* sp. heterofermentatif obligat, diantaranya *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, dan *L. reuteri* (Vos *et al.*, 2009 ; Wright dan Axelsson, 2012).

*Lactobacillus* sp. merupakan salah satu genus bakteri asam laktat yang tumbuh selama fermentasi beberapa jenis pangan, salah satunya adalah fermentasi biji kakao (Camu *et al.*, 2008). Pada fermentasi biji kopi arabika, bakteri asam



laktat spesies *L. plantarum* B1765 mampu memperbaiki karakteristik kopi (Wilujeng dan Wikandari, 2013). *L. plantarum* yang ditemukan dominan selama fermentasi kopi menghasilkan metabolit asam laktat yang tinggi (Pereire *et al.*, 2016). *Lactobacillus* sp. dapat memfermentasi gula dengan menghasilkan sejumlah asam laktat sehingga dapat digunakan dalam produksi makanan fermentasi (Buckle *et al.*, 1987).

#### 2.6.2 Bakteri Asam Laktat genus *Leuconostoc*

*Leuconostoc* merupakan salah satu genus yang dikelompokkan dalam bakteri asam laktat. *Leuconostoc* sp. termasuk ke dalam bakteri mesofilik yang tumbuh optimal pada suhu 20°C – 30°C. *Leuconostoc* sp. memiliki bentuk sel kokus, termasuk ke dalam bakteri gram positif, katalase negatif, baktetri anaerob fakultatif, non-motil, dan tumbuh pada kondisi asam. *Leuconostoc* sp. mampu memfermentasi berbagai jenis karbohidrat atau heterofermentatif namun tidak dapat memetabolisme arginin. Hasil-hasil metabolisme dari glukosa oleh *Leuconostoc* sp. diantaranya ialah asam laktat sebagai hasil utama dan CO<sub>2</sub>, etanol, serta asam asetat melalui jalur heksosa monofosfat dan fosfoketolase. *L. mesenteroides* dapat menghasilkan dekstran (polisakrida ekstraseluler) (Liu, 2016; Huys *et al.*, 2012 ; Vos *et al.*, 2009).

BAL banyak ditemukan dan dimanfaatkan dalam produksi pangan sebagai usaha preservatif dan penganekaragaman pangan, seperti halnya BAL yang diisolasi dari proses silase pada sorgum berasal dari species *L. mesenteroides* subps. *mesenteroides*. Pada umumnya *Leuconostoc* sp. ditemukan hidup pada produk susu, tanaman hijau dan silase. Pertumbuhan *Leuconostoc* sp. akan sedikit terhambat karena persaingan mendapatkan nutrisi dengan kultur BAL lain (Chahrour *et al.*, 2013). *L. mesenteroides* juga ditemukan pada fermentasi kopi arabika di Thailand (Nasanit dan Satayawut, 2015).

#### 2.6.3 Bakteri Asam Laktat genus *Streptococcus*

*Streptococcus* sp. adalah bakteri asam laktat berbentuk kokus, termasuk ke dalam bakteri gram positif, katalase negatif dan bakteri anaerobik fakultatif. Hasil utama metabolisme *Streptococcus* sp. adalah asam laktat namun tidak dapat menghasilkan gas. *Streptococcus* sp. tumbuh optimal pada suhu 37°C. Berbeda

dengan *Leuconostoc* sp., *Streptococcus* sp mampu memproduksi amonia dari arginin. Namun, *Streptococcus* sp. toleran terhadap empedu dan NaCl, dan dapat memproduksi polisakarida ekstraseluler yaitu dekstran dan levans dari sukrosa (Vos *et al.*, 2009).

## 2.7 Pertumbuhan Kapang pada Biji Kopi

Biji kopi beras atau *greenbean* adalah salah satu komoditi pertanian yang mudah terserang kapang. Di Indonesia standar untuk mensyaratkan jumlah kapang pada kopi instan juga sangat ketat yaitu  $5 \times 10^1$  koloni/g (Yuniarti *et al.*, 2014). Terdapat beberapa jenis kapang yang biasanya tumbuh pada biji kopi beras, antara lain *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Sporodonema* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., dan *Fusarium* sp. (Sheikh *et al.*, 2014). Kelompok kapang yang dominan mengkontaminasi biji kopi kering ialah *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. (Dionidio *et al.*, 2010). Kapang-kapang tersebut dapat menghasilkan mikotoksin yang berbahaya bagi kesehatan. Mikotoksin merupakan metabolit sekunder kapang yang tumbuh pada berbagai komoditas pangan dan pakan pada berbagai tahap proses produksi (Topcu *et al.*, 2010 dalam Damayanti *et al.*, 2015). Mikotoksin dapat menurunkan pembentukan glutathion sehingga menyebabkan kelebihan stres oksidatif didalam tubuh yang menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit sistemik hingga penyakit akut dan kronis (Sheikh *et al.*, 2014).

Kapang *A. ochraceus* dan *P. verrucosum* spesies yang ditemukan mengkontaminasi biji kopi selama penyimpanan dalam gudang (Yani, 2007). Kapang *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. niger* dan *P. verrucosum* menghasilkan okratoksin, *A. flavus* menghasilkan aflatoksin dan *P. citrinum* menghasilkan citrinin. Kapang-kapang tersebut menghasilkan mikotoksin yang bersifat nefrotoksin, hepatoksin, dan karsinogenik yang berbahaya untuk kesehatan (Yani, 2007; Aaraj *et al.*, 2015; Abdallah dan Talib, 2014).

### 2.7.1 *Aspergillus* sp.

*Aspergillus* adalah genus yang besar dengan 100 atau lebih spesies. Spesies *Aspergillus* banyak ditemui di lingkungan terutama di tanah dan tanaman

yang membusuk namun beberapa spesies *Aspergillus* sp ditemukan di bahan pangan serealia dan kacang-kacangan dan mengkontaminasi bahan pangan. *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, dan sebagian *A. nomius* adalah spesies penghasil aflatoksin, *A. ochraceus* menghasilkan okratoksin dan *A. versicolor* menghasilkan sterigmatoksin (Pitt, 1993; Damayanti *et al.*, 2015). Kondisi lingkungan yang paling cocok untuk pertumbuhan spesies *Aspergillus* ialah pada daerah tropis pada suhu 37°C dan aw (*Activity water*) 0,8 , sehingga jarang kelompok *Aspergillus* sp. yang dapat tumbuh pada suhu 10°C (Taniwaki *et al.*, 2018).

#### 2.7.2 *Penicillium* sp.

Secara ekologis, mayoritas kapang *Penicillium* sp. merupakan saprofit dengan pertumbuhan optimal pada suhu sedang sampai rendah dan mampu tumbuh pada aktivitas air (aw) di bawah 0,9. Spesies-spesies *Penicillium* sp adalah kapang yang hidup di vegetasi yang membusuk, sebagai agen biodeterioative dan beberapa tumbuh mengkolonisasi pada komoditas pangan biji-bijian. Pembentukan mikotoksin oleh spesies *Penicillium* bersifat kompleks. Beberapa contoh mikotoksin yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp misalnya, siklochlorotine dan islanditoxin, viomellein dan xanthomegnin, fumitremorgin B dan verruculogen (Pitt, 2002). *Penicillium verrucosum* dan *P. nordicum* mampu menghasilkan okratoksin A (OTA) yang bersifat karsinogenik dan mutagenik pada manusia dan hewan yang mengkonsumsi makanan atau pakan yang terkontaminasi toksin ini (Cabanes *et al.*, 2010). Ditemukan 11 spesies kapang *Penicillium* sp. lain yang bersifat endofit pada tanaman kopi, empat diantaranya memproduksi okratoksin A (OTA) yaitu *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. olsonii*, dan *P. oxalicum* (Vega *et al.*, 2006). Namun kapang spesies *P. citrinum* ditemukan dapat mengkonminasi biji kopi setelah dijemur (Dionidio *et al.*, 2010).

### 2.8 Aktivitas Senyawa Antikapang Bakteri Asam Laktat

Pada fermentasi biji kopi, BAL ditemukan dominan. BAL kelompok *Lactobacillus* sp, seperti *L. reuteri*, *L. brevis*, dan *L. plantarum* dapat menghasilkan asam-asam organik diantaranya asam laktat, asam asetat, asam

kaproat, *3-phenyllactic acid* (PLA) diketahui dapat bersifat sebagai antikapang (Gerez *et al.*, 2009 ; Yang dan Chang, 2010 ; Pelaez *et al.*, 2012 ; Hatiningsih, 2018). BAL juga mampu menghambat pertumbuhan kapang dengan menghasilkan metabolit antikapang spesifik berupa senyawa protein seperti bakteriosin dan senyawa dengan berat molekul rendah (kurang dari 1000 Da meliputi reuterin, asam lemak *3-hydroxylated*, asam *3-phenyllactic acid* (PLA), *4-hydroxy-phenyllactic acid*, asam benzoat, *methylhydantoin*, *mevalonolactone*, dan beberapa senyawa dipeptida siklik aktif (diketopeprazin) yaitu *cyclo* (L-Phe-L-Pro), *cyclo* (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), dan *cyclo* (L-Phe-cis-4-OH-D-Pro) (Strom, 2005 ; Yang dan Chang, 2010; Setyonova *et al.*, 2012). Dilaporkan juga bahwa *L. plantarum* MiLAB 14 menghasilkan asam 3-[R]-hidroksidodekanoid, asam 3-hidroksi-5-cis dodesanoik, dan asam 3-[R]-hidroksitetradekanoik yang bersifat antikapang (Sjogren, et al., 2003 dalam Fitriyana, 2011). Aktivitas penghambatan kapang oleh BAL berkaitan dengan sifat lipofilik membran sel mikroorganisme yang dapat dilewati oleh senyawa antikapang. Aktivitas senyawa-senyawa antikapang tersebut bergantung pada pH. Pada pH rendah bentuk asam organik tidak terdisosiasi lebih mudah untuk melewati membran sel kemudian terakumulasi dalam sitoplasma sehingga mengakibatkan hilangnya viabilitas sel kemudian menyebabkan kehancuran sel (Gerez, 2009).

Bakteri asam laktat *Leconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* dan *L. brevis* yang ada pada kopi selama fermentasi dan pengeringan mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus ochraceus*, sehingga dapat mencegah terjadinya kontaminasi okratoksin A (OTA). Penggunaan inokulum bakteri asam laktat lebih disukai untuk mendekati kondisi fermentasi alamiah, dengan proses acidifikasi sangatlah penting. BAL *L. amylovorus* dan metabolitnya (asam laktat) sangat baik sebagai bahan antagonis terhadap pertumbuhan jamur dari biji kopi, sehingga sangat potensial untuk menggantikan fungisida kimiawi (Waters dalam Yisanto dan Widyotomo, 2013).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Fermentasi spontan kopi rakyat dan isolasi mikroorganisme dari biji kopi rakyat terfermentasi dilakukan di Lumbung Kopi Java Ijen-Raung Kecamatan Sumberwringin Kabupaten Bondowoso pada bulan Juli 2018. Pengujian terhadap senyawa antikapang dan identifikasi mikroorganisme penghasil senyawa antikapang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada bulan Juli 2018 hingga Januari 2019.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah buah kopi arabika masak yang diperoleh dari kelompok tani kopi Tani Maju di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Kabupaten Bondowoso, media pertumbuhan meliputi MRSA (*deMann Rogosa Sharpe Agar*), MRSB (*deMann Rogosa Sharpe Broth*), MEA (*Malt Extract Agar*), MEB (*Malt Extract Broth*). Bahan yang digunakan untuk pengujian pada penelitian ini meliputi *Aspergillus flavus* 6109, *Penicillium citrinum*, *aquades steril*, agar, sukrosa, tripton, pepton, Tween 80, *yeast extract*, *bacto agar*, L-arginin monohidroklorida, dan D-glukosa.

Bahan kimia yang digunakan meliputi alkohol 70%, hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) cair 3%, natrium nlorida (NaCl), kalsium karbonat ( $CaCO_3$ ), kalium fosfat dibasic ( $K_2HPO_4$ ), kalium fosfat monobasic ( $KH_2PO_4$ ), natrium hidroksida (NaOH), kalium iodida (KI), higromium iodida ( $HgI_2$ ), mangan sulfat tertrahidrat ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ), magnesium sulfat heksahidrat ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), besi (II) sulfat terhidrat ( $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ ), natrium asetat ( $CH_3COONa$ ), dan bahan yang digunakan dalam pewarnaan gram meliputi kristal violet, alkohol 96%, larutan mordan, safranin, dan minyak imersi.

### 3.2.2 Alat Penelitian

Alat penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah karung plastik untuk fermentasi biji kopi, pulper buah kopi (Intan HSL-p1), pH meter (*Trans Instrumen*), laminar *air flow* (Cruma SA, Type 9005-FL, Spanyol), inkubator suhu 30°C, 37°C dan 45°C (*Heraeus Instruments*, Type B-6200, Germany), neraca analitik (*Ohaus*, Analytical Plus), *colony counter* (*Stuart Scientific*, Ukraina), autoklaf sterilisasi (*Hirayana Manufacturing*, Model HL-36, Japan), mikroskop binokuler, cawan petri, ose, tabung eppendorf, *blue tip*, *yellow tip*, *vortex*, dan alat-alat gelas.

## 3.3 Pelaksanaan Penelitian

### 3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan model eksploratif untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat (BAL) *indigenous* penghasil senyawa antikapang yang berperan selama fermentasi spontan kopi rakyat pada jam ke-0, jam ke-12, jam ke-24, jam ke-36, dan jam ke-48 di Kecamatan Sumberwringin kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso.

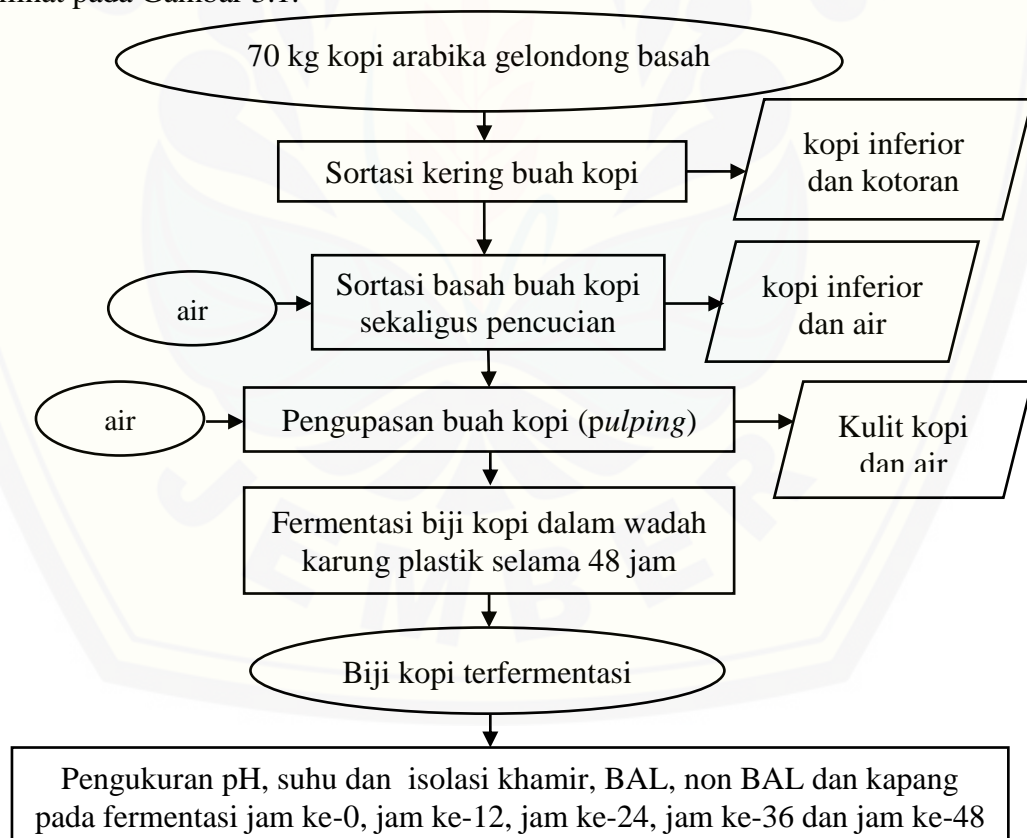
### 3.3.2 Tahapan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan fermentasi spontan biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso, dilanjutkan dengan analisa perubahan suhu, perubahan pH dan perubahan populasi mikroorganisme selama fermentasi spontan biji kopi rakyat, isolasi BAL *indigenous* pada fermentasi spontan biji kopi rakyat, *screening* isolat BAL melalui pengujian kemampuan kerja antikapang dan terakhir ialah identifikasi BAL *indigenous* penghasil senyawa antikapang.

- a. Proses fermentasi spontan dan pengukuran suhu serta pH fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Penelitian ini diawali dengan melakukan fermentasi kopi arabika yang diperoleh dari perkebunan milik petani di dalam wadah karung plastik di Kecamatan Sumberwringin kawasan Pegunungan Ijen-Raung Kabupaten

Bondowoso. Bahan yang digunakan adalah 70 kg kopi arabika gelondong merah. Kopi gelondong merah disortasi kering untuk menghilangkan kotoran dan buah kopi yang terlalu masak. Selanjutnya buah kopi disortasi basah sekaligus pencucian untuk menghilangkan buah kopi inferior, buah kopi inferior akan mengambang. Pengupasan kulit kopi menggunakan alat *pulper*, kemudian diperoleh biji kopi yang masih diselimuti dengan pulpa sebanyak 48 kg. Setelah bersih biji kopi difermentasi dalam tiga wadah karung plastik ukuran 25 kg selama 48 jam. Masing-masing karung plastik berisi 16 kg biji kopi basah. Pada fermentasi jam ke-0, jam ke-12, jam ke-24, jam ke-36 dan jam ke-48 dilakukan pengukuran suhu. Selain itu, sebanyak 5 g biji kopi terfermentasi diambil untuk diisolasi mikroorganisme yang berperan selama proses fermentasi serta dilakukan pengukuran pH. Tahapan proses fermentasi biji kopi arabika dan pengujian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir proses fermentasi kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

- b. Isolasi khamir, kapang, dan BAL *Indigenous* yang berperan selama fermentasi spontan biji kopi rakyat dalam wadah karung di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Sebanyak 5 g biji kopi rakyat terfermentasi spontan dalam wadah karung plastik dimasukkan ke dalam sebuah erlenmayer ukuran 100 ml berisi air 45 ml aquades steril, diaduk rata sampai homogen. Suspensi kultur mikroorganisme tersebut diambil 1 ml dan diencerkan dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquades steril untuk pengenceran  $10^{-1}$  dan seterusnya hingga pengenceran  $10^{-5}$ . Sebanyak 1 ml hasil pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$  lalu dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian dituangkan media MEA dan MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1% dengan metode agar tuang/ *pour plate methode*. Media MEA digunakan untuk menumbuhkan serta menentukan secara kuantitatif total koloni kapang dan khamir yang berperan pada selama fermentasi biji kopi. Sementara itu MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1% digunakan untuk menumbuhkan serta menentukan secara kuantitatif total BAL dan non BAL. Media MEA dan MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1% yang telah berisi mikroorganisme kemudian diinkubasi pada selama 48 jam. Setelah 48 jam inkubasi dapat dihitung jumlah populasi mikroorganisme yang tumbuh dalam setiap cawan. Tahapan proses analisis perubahan mikrobiologis pada fermentasi biji kopi arabika dapat dilihat pada Gambar 3.2.

- c. *Screening* isolat BAL *indigenous* terbaik yang berperan selama fermentasi spontan biji kopi rakyat dalam wadah karung di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Isolat BAL yang tumbuh setelah 48 jam inkubasi selanjutnya dipilih isolat yang paling baik dalam menghasilkan asam, yaitu BAL yang dapat membentuk zona bening paling luas. Koloni BAL terbaik dimurnikan dengan cara digoreskan kembali (*re-streaking*) pada media MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1% dengan metode goresan kuadran lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Goresan kuadran dilakukan untuk memperoleh koloni BAL tunggal/murni. Koloni BAL yang terpilih diberikan kode meliputi asal wadah fermentasi, lama fermentasi, tingkat pengenceran dan nomor urut BAL terpilih. Sebagai contoh isolat dengan kode K1

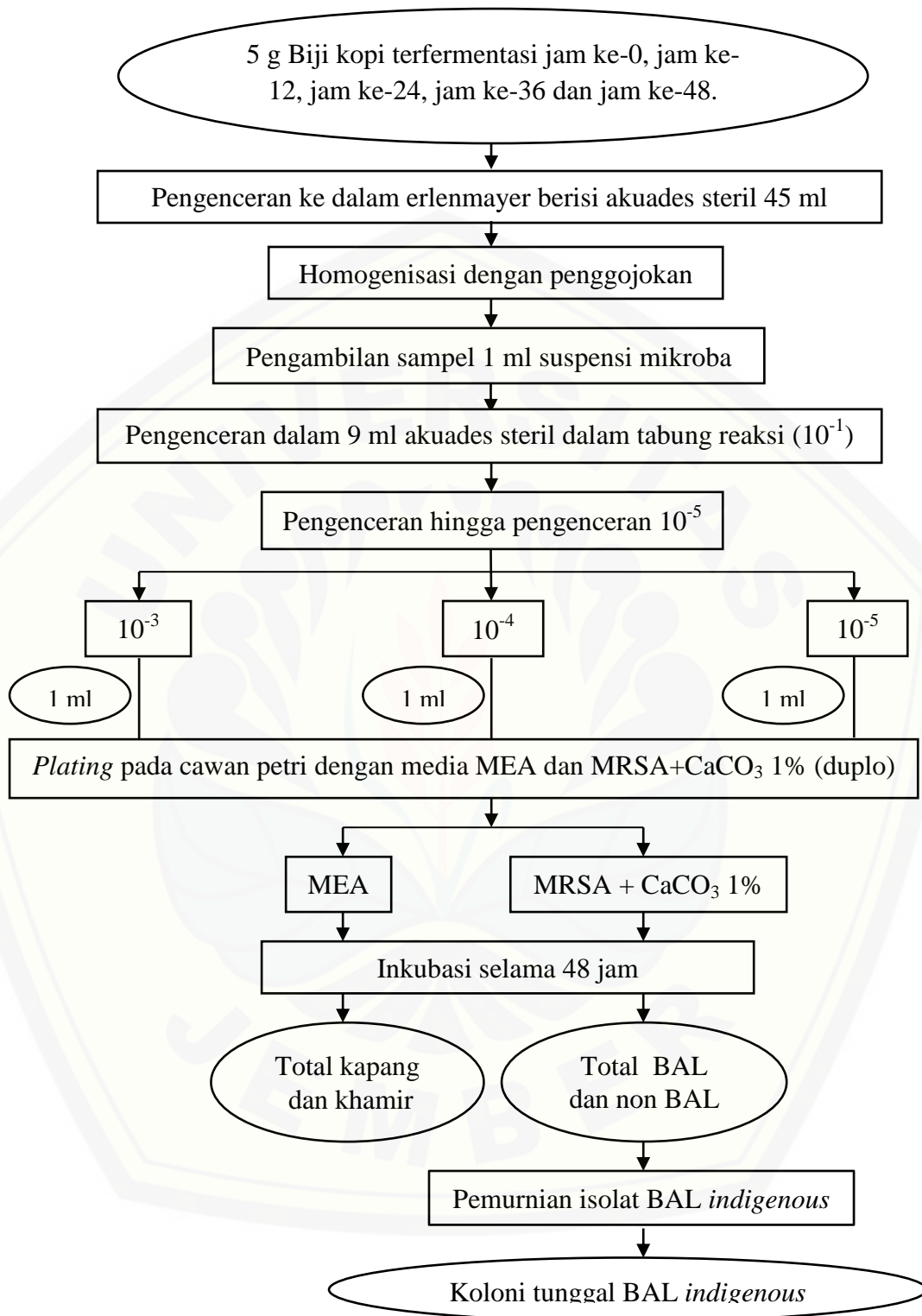


(48)  $10^{-6}$  (3) ialah BAL *indigenous* yang diisolasi dari wadah karung nomor 1 pada fermentasi jam ke-48 dan pada cawan petri pengenceran  $10^{-6}$  dengan nomor isolat BAL ke-3. Isolat BAL inilah yang selanjutnya diuji kemampuan kerjanya dalam menghambat kerja kapang.

Koloni BAL murni selanjutnya digores kembali pada media agar tegak. Media yang digunakan adalah MRS sebanyak 7 ml kemudian dipadatkan. Sebanyak 1 ose koloni BAL tunggal ditusukkan kedalam media MRS agar tegak kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam. Isolat BAL yang tumbuh pada media MRS agar tegak disimpan dalam lemari pendingin sebagai kultur stok (*stock culture*) BAL.

d. *Screening* isolat BAL *indigenous* Penghasil Senyawa Antikapang yang diisolasi dari biji kopi terfermentasi spontan dalam wadah karung plastik

Tahap seleksi atau *screening* isolat BAL *indigenous* dilakukan dengan melakukan uji kemampuan isolat BAL *indigenous* dalam menghambat pertumbuhan kapang yang pada umumnya mengkontaminasi *green bean coffee*. Kapang yang dipilih yaitu *A. flavus* dan *P. citrinum* (Dionidio *et al.*, 2010). Sebelum kapang diujikan pada BAL, kapang terlebih dahulu dilakukan *recovery* dalam media MEB. Isolat *A. flavus* 6109 dalam bentuk serbuk dilarutkan kedalam 1 ml MEB dan dihomogenisasi. Suspensi kapang diambil 0,1 ml dan dilarutkan ke dalam 10 ml MEB dan diambil 1 ml kemudian di teteskan di 3 titik yang berbeda pada media MEA lalu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 4-7 hari. Isolat *P. citrinum* dalam gliserol diambil 1 ml kemudian di teteskan di 3 titik yang berbeda pada media MEA lalu diinkubasi pada suhu  $27^{\circ}\text{C}$  selama 4-7 hari. Kapang-kapang yang telah diremajakan ini akan digunakan sebagai target pada pengujian kemampuan kerja antikapang BAL.

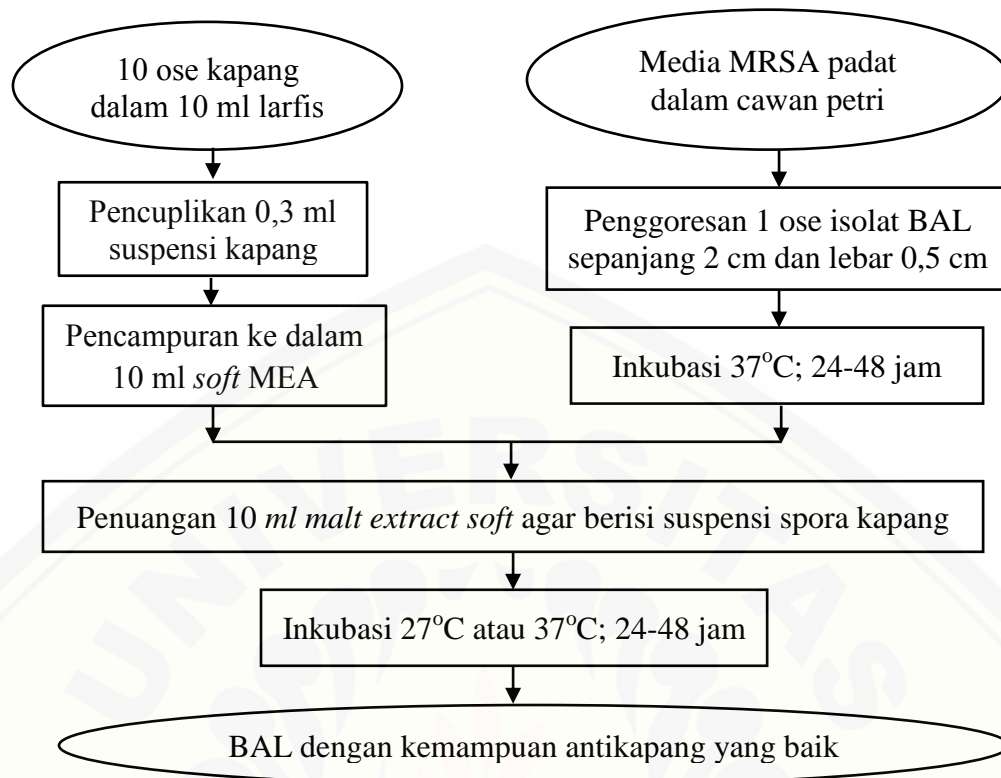


Gambar 3.2 Diagram alir isolasi mikroorganisme yang berperan selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah kaung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso (Sumber : Hatiningsih, 2017 dengan modifikasi )

Pengujian kemampuan kerja antikapang dilakukan menggunakan metode pengujian *overlay* (*overlay assay*) berdasarkan Magnuson dan Schnurer (2001) yang telah dimodifikasi. Pengujian *overlay* dilakukan dengan menggosokkan 1 ose BAL sepanjang 2 cm dengan lebar 0,5 cm pada media MRSA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya inokulasi sebanyak 10 ose kapang kedalam 10 ml larutan fisiologis (0,85% NaCl) dan dihomogenisasi. *Overlaid* (lapisi) dengan 10 ml *malt extract soft* agar (2 % *malt extract*; 0,7% agar) yang telah berisi 3% suspensi kapang dalam larutan fisiologis lalu inkubasi pada suhu yang sesuai dengan suhu pertumbuhan kapang selama 48 jam. Kemudian mengukur luas zona bening yang terbentuk sebagai besar kemampuan BAL menghambat pertumbuhan kapang. Isolat BAL *indigenus* dengan kemampuan menghambat pertumbuhan kapang selanjutnya diidentifikasi mengacu pada "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*". Tahapan proses pengujian kemampuan kerja antikapang dengan pengujian *overlay* dapat dilihat pada Gambar 3.3.

- e. Identifikasi BAL *indigenus* yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan kapang

Isolat BAL *indigenus* dengan kemampuan menghambat pertumbuhan kapang selanjutnya diidentifikasi. Identifikasi dilakukan berdasarkan karakteristik BAL yang mengacu pada "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*". Identifikasi fenotipik meliputi karakteristik morfologi, fisiologis dan pola fermentasi atau metabolik BAL (Ammor *et al.*, dalam Nurhayati, *et al.*, 2011). Identifikasi secara morfologi meliputi pengamatan bentuk sel dan sifat gram yang diamati dengan mikroskop perbesaran 1000x. Karakterisasi berdasarkan karakteristik fisiologi meliputi sifat katalase, kemampuan produksi gas CO<sub>2</sub>, pertumbuhan pada suhu dan konsentrasi NaCl yang berbeda. Karakterisasi berdasarkan pola fermentasi BAL meliputi kemampuan produksi dekstran dari sukrosa, kemampuan memproduksi amonia dari arginin dan kemampuan fermentasi berbagai jenis karbohidrat. Identifikasi BAL ini dilakukan untuk menduga spesies BAL yang berpotensi menghasilkan metabolit antikapang yang diisolasi dari biji kopi terfermentasi.



Gambar 3.3 Diagram alir uji kemampuan kerja antikapang oleh BAL *indigenus* dengan metode *overlay* (Sumber : Magnuson dan Schnurer (2001) dengan dimodifikasi)

### 3.4 Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi tingkat keasaman (pH) selama fermentasi spontan biji kopi, perubahan suhu selama fermentasi spontan biji kopi, total kapang, khamir, bakteri asam laktat dan non BAL dengan metode BAM-FDA, kemampuan kerja antikapang BAL (Magnuson dan Schnurer, 2001) dan identifikasi BAL *indigenus* penghasil senyawa antikapang. Identifikasi BAL *indigenus* berdasarkan karakteristik morfologi dilakukan menggunakan uji pewarnaan gram (Bell *et al.*, 2005). Identifikasi karakter fisiologis menggunakan pengujian sifat katalase (Bell *et al.*, 2005), uji produksi gas CO<sub>2</sub> (Cappucino dan Sherman, 2005), uji kemampuan pertumbuhan BAL pada suhu yang berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005), uji kemampuan pertumbuhan BAL pada konsentrasi NaCl yang berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005). Pengamatan karakteristik berdasarkan pola fermentasi menggunakan uji kemampuan produksi dekstran dari sukrosa (Cappucino dan Sherman, 2005), kemampuan produksi

amonias dari arginin (Kirg, 1948 dengan modifikasi), dan kemampuan BAL memfermentasi berbagai jenis karbohidrat (Cahyaningsih, 2006 dengan modifikasi).

### 3.5 Prosedur Analisa

#### 3.5.1 Analisa Perubahan Suhu, pH dan Total Mikroorganisme pada Biji Kopi Rakyat Terfermentasi Spontan dalam Wadah Karung Plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

##### a. Perubahan pH

Pengukuran pH biji kopi terfermentasi dalam wadah karung plastik dilakukan pada fermentasi jam ke-0, jam ke-12, jam ke-24, jam ke-36 dan jam ke-48 dengan pH meter. Sebanyak 5 g biji kopi terfermentasi dicampur dalam 45 ml aquades steril dan diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter.

##### b. Perubahan suhu

Pengukuran suhu pada biji kopi terfermentasi dalam wadah karung dilakukan untuk mengetahui keadaan selama fermentasi berlangsung. Suhu selama fermentasi diukur menggunakan termometer dengan menusukkan ujung termometer ke dalam tumpukan biji kopi dalam karung pada jam ke-0, jam ke-12, jam ke-24, jam ke-36 dan jam ke-48 pada tiga titik yang berbeda. Hasil pengukuran kemudian dicatat sebagai data kuantitatif perubahan suhu selama fermentasi.

##### c. Perhitungan Total Kapang, Khamir, Bakteri Asam Laktat dan non BAL

Analisis total mikroba digunakan untuk menentukan secara kuantitatif koloni kapang dan khamir yang tumbuh pada media MEA dan BAL serta non BAL yang tumbuh pada media MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1%. Prosedur analisis total mikroba dilakukan dengan mengambil 5 g sampel yang diencerkan ke dalam 45 ml aquades steril, lalu digojok. Kemudian suspensi dicuplik 1 ml dan diencerkan kedalam 10 ml aquades, lalu dicuplik lagi 1 ml dan diencerkan kedalam 10 ml aquades, pencuplikan dilakukan hingga pengenceran 10<sup>-5</sup>. Sebanyak 1 ml suspensi mikroorganisme dari pengenceran 10<sup>-3</sup> sampai pengenceran 10<sup>-5</sup>, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri lalu ditambahkan sebanyak ±12 ml

media MEA dan MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1%. Suspsi mikroorganisme dalam sebuah kotak kemudian diinkubasi selama 48 jam. Jumlah koloni mikroorganisme yang tumbuh pada cawan petri dihitung setelah masa inkubasi berakhir. Total mikroba dihitung sesuai dengan metode *Bacteriological Analytical Manual* (BAM)-FDA :

Langkah perhitungan :

1. Memilih cawan dengan jumlah koloni 25-250 atau 30-300 koloni.
2. Melakukan perhitungan dengan rumus :

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

Keterangan :

- $\Sigma C$  = Jumlah total koloni dari semua cawan yang dihitung
- $N$  = Jumlah koloni per cfu/ml
- $n_1$  = Jumlah cawan pada pengenceran pertama
- $n_2$  = Jumlah cawan pada pengenceran kedua
- $d$  = Tingkat pengeceran yang diperoleh dari cawan yang pertama dihitung

### 3.5.2 Kemampuan Kerja Antikapang Bakteri Asam Laktat Asal *Indigenous* Biji Kopi Terfermentasi dalam Wadah Karung Plastik

Pengujian aktivitas antikapang BAL dilakukan dengan metode *overlay* yang telah dimodifikasi. Aktivitas antikapang dapat diamati dengan mengukur luas daerah bening di sekitar bakteri asam laktat menggunakan penggaris. Luas daerah bening ditentukan sebagai efek penghambatan BAL terhadap kapang yang diujikan (Magnuson dan Schnurer, 2001). Luas zona bening dihitung menggunakan rumus luas oval.

$$\text{Luas zona hambat} = \text{Luas oval} - \text{luas BAL}$$

$$\text{Luas zona hambat} = (\pi \times a \times b) - (0,5 \text{ cm} \times 2 \text{ cm})$$

Keterangan :

- $\pi$  = ketetapan hitung senilai 3,14 atau  $\frac{22}{7}$
- $a$  = jari-jari samping elips
- $b$  = jari-jari bawah elips

### 3.5.3 Identifikasi Bakteri Asam Laktat *Indigenous* Penghasil Senyawa Antikaping yang Diisolasi dari Biji Kopi Terfermentasi dalam Wadah Karung Plastik

#### a. Uji Perwarnaan Gram

Pengujian pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui morfologi bakteri beserta reaksinya terhadap senyawa pewarnaan gram yaitu kristal violet, alkohol dan safranin serta bentuk sel. Pertama gelas objek dan gelas penutup disemprot menggunakan etanol 70 % dan dikering anginkan. Biakan BAL dalam MRSA diambil dengan jarum ose dan dipindahkan di atas gelas objek yang telah berisi setetes akuades steril, diratakan pada permukaan atas gelas objek dan difiksasi di atas bunsen sampai terbentuk noda. Noda tersebut ditetesi 2-3 tetes kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Selanjutnya, noda ditetesi 2-3 tetes larutan mordan dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan lalu ditetesi lagi dengan 20 tetes alkohol 96% untuk pemucatan. Setelah itu, noda ditetesi dengan 2-3 tetes pewarna safranin selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Setelah noda kering kemudian ditutup dengan *d-glass* dan ditetesi dengan sedikit minyak emersi diatas *d-glass* untuk memperjelas hasil pengamatan (Bell *et al.*, 2005). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 1000×, bila bakteri yang diamati memiliki warna sel ungu maka tergolong sebagai bakteri gram positif, namun bila sel berwarna merah maka termasuk bakteri gram negatif. Bakteri asam laktat adalah bakteri gram positif, sedangkan BAA (bakteri asam asetat) adalah gram negatif. Melalui uji pewarnaan gram ini juga dapat diketahui bentuk sel bakteri apakah berbentuk basil atau kokus (Hoog, 2005).

#### b. Uji Katalase

Uji ini bertujuan untuk menentukan kemampuan bakteri untuk mendegradasi  $H_2O_2$  melalui produksi enzim katalase. Prosedur kerjanya, pertama diambil satu ose isolat BAL berumur 24 jam dioleskan pada objek glass, diatasnya ditetesi dengan  $H_2O_2$  3% dan didiamkan selama kira-kira 1 menit. Bakteri katalase positif (aerob) jika terjadi pembentukan gelembung udara, jika

tidak terjadi gelembung, maka isolat BAL tersebut termasuk bakteri katalase negatif (anaerob) (Bell *et al.*, 2005).

c. Uji Produksi Gas CO<sub>2</sub> dalam MRS-Broth

Uji ini bertujuan untuk menentukan kelompok BAL (heterofermentatif atau homofermentatif). Prosedur kerja pengujian ini mengambil 1 ml isolat BAL berumur 24-48 jam lalu diinokulasikan ke dalam 5 ml media MRSB steril dalam tabung reaksi yang berisi tabung durham dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Bila terdapat gelembung udara dalam tabung durham setelah inkubasi 48 jam, maka BAL termasuk kelompok heterofermentatif, jika tidak memproduksi gas maka BAL termasuk kelompok homofermentatif (Cappucino dan Sherman, 2005).

d. Uji Pertumbuhan BAL pada Suhu yang Berbeda

Satu ose isolat BAL diinokulasikan ke dalam 1,5 ml MRSB dalam ependrof steril dan diinkubasi pada suhu 15°C (lemari es), 37°C dan 45°C selama 48 jam. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas (Cappucino dan Sherman, 2005)

e. Uji Pertumbuhan BAL pada Konsentrasi NaCl yang Berbeda

Pertama, dibuat media MRSB dengan konsentrasi NaCl yang berbeda yaitu 4 %; 6,5 % dan kontrol (tanpa penambahan NaCl) dan disterilisasi. Selanjutnya sebanyak 1 ml media tersebut dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* steril dan diinokulasi dengan 50 µl isolat BAL. Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas (Cappucino dan Sherman, 2005).

f. Uji Produksi Dekstran dari Sukrosa

Pengujian ini dilakukan untuk membedakan kelompok *Lactobacillus* sp. dengan *Leuconostoc* sp. Inokulasi 1 ose isolat BAL dalam tabung *eppendorf* berisi 1,5 ml MRSB steril dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, diambil 0,1 ml kultur BAL dan diinokulasikan ke dalam cawan petri steril, lalu dituangkan 10 ml media sukrosa agar, ratakan dan biarkan hingga memadat. Inkubasi isolat BAL dengan posisi cawan terbalik pada suhu 37°C selama 5 hari. Pertumbuhan isolat BAL ditandai dengan adanya produksi lendir berupa cairan



berwarna putih/ dekstran dari sukrosa yang menunjukkan isolat BAL tersebut genus *Leuconostoc*. Jika tidak memproduksi dekstran maka BAL tersebut tidak termasuk genus *Leuconostoc* (Cappucino dan Sherman, 2005).

g. Uji Produksi Amonia dari Arginin

Pengujian kemampuan produksi amonia dari arginin dilakukan untuk membedakan genus *Lactobacillus* kelompok heterofermentatif dengan homofermentatif serta untuk membedakan genus *Streptococcus* dengan genus *Leuconostoc*. *Lactobacillus* heterofermentatif dan BAL genus *Streptococcus* mampu menghidrolisis arginin menjadi amonia, sementara *Lactobacillus* homofermentatif tidak.

Pembedaan *Lactobacillus* kelompok heterofermentatif dengan homofermentatif dengan menginokulasikan 1 ose BAL ke dalam media MRS Arginin Broth. Media MRS Arginin Broth dibuat dengan menambahkan 3 g L-arginin monohidroklorida ke dalam 1 L MRSB. Sementara itu untuk membedakan genus *Streptococcus* dengan genus *Leuconostoc*, 1 ose BAL diinokulasi ke dalam media arginin broth. Media arginin broth dibuat dengan melarutkan 5 g tripton, 2,5 g yeast extract, 0,5 g D-glukosa, 2 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dan 3 g L-arginin monoklorida ke dalam 1 L air. Kedua media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pengujian dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose BAL ke dalam masing-masing media (MRS Arginin Broth dan Arginin Broth) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-5 hari. Setelah inkubasi selama 5 hari media ditambahkan dengan reagen nessler dengan perbandingan 1:1. Terbentuknya amonia ditandai perubahan warna menjadi orange kecoklatan setelah ditambahkan dengan reagen nessler (Kirg, 1984 dengan modifikasi).

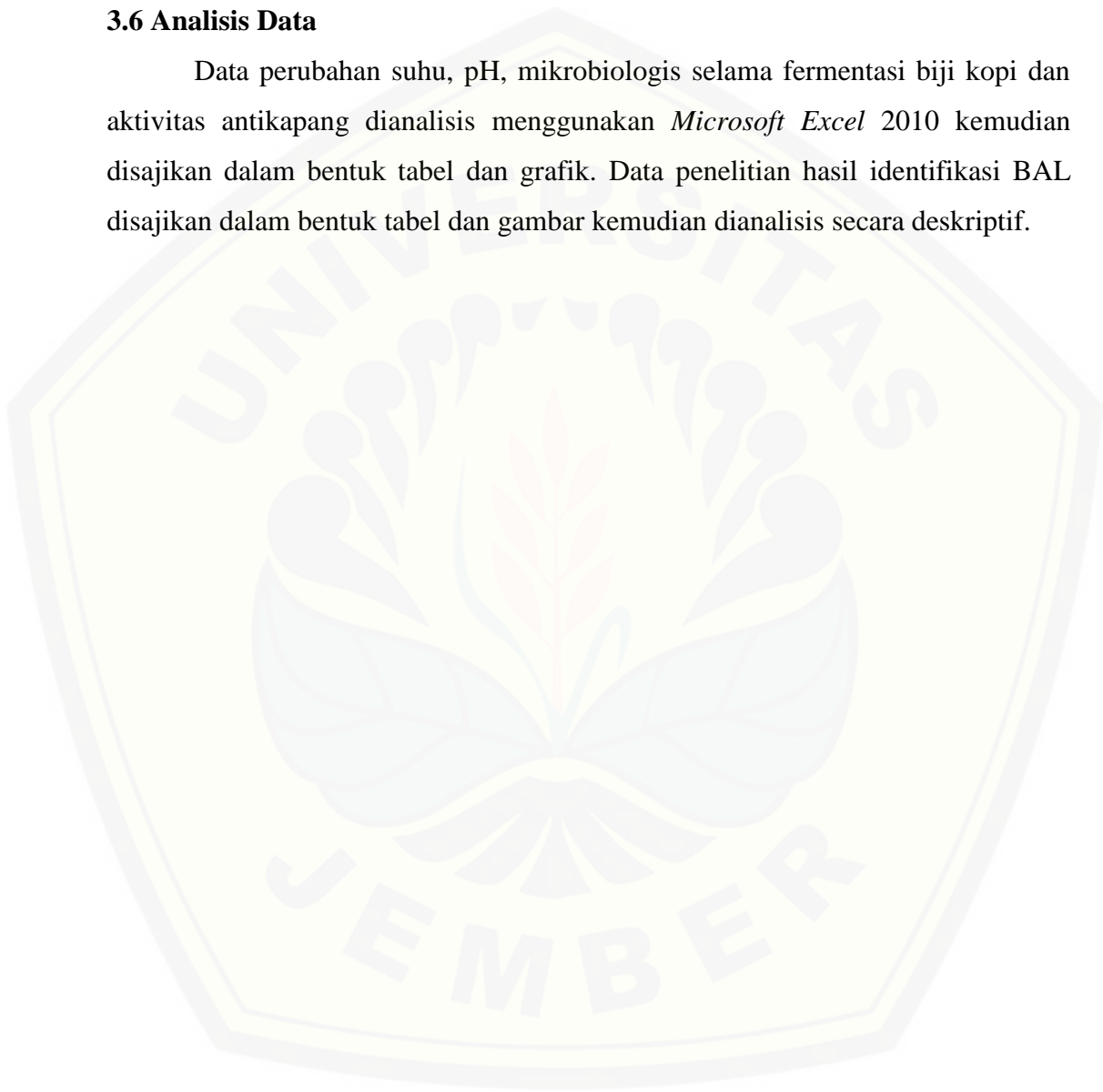
h. Uji Fermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat

Identifikasi BAL tingkat spesies dapat dilakukan berdasarkan kemampuan BAL memfermentasi karbohidrat. Sebanyak 0,1 ml kultur BAL diinokulasikan ke dalam 1 ml media PGY broth yang dimodifikasi. Glukosa yang digunakan dalam media PGY diganti dengan karbohidrat yang diujikan meliputi galaktosa, fruktosa, maltosa, laktosa, sukrosa, xilosa, threhalosa, manosa, arabinosa, manitol dan arabitol. Kultur yang telah diinokulasikan ke dalam 1 ml PGY broth

termodifikasi kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan adanya kekeruhan dan endapan pada media (Cahyaningsih, 2006 dengan modifikasi).

### **3.6 Analisis Data**

Data perubahan suhu, pH, mikrobiologis selama fermentasi biji kopi dan aktivitas antikapang dianalisis menggunakan *Microsoft Excel 2010* kemudian disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data penelitian hasil identifikasi BAL disajikan dalam bentuk tabel dan gambar kemudian dianalisis secara deskriptif.



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa sebanyak 20 isolat diduga bakteri asam laktat *indigenous* potensial menghasilkan senyawa antikapang yang diisolasi dari fermentasi spontan biji kopi arabika rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso. Berdasarkan hasil identifikasi 5 isolat bukan kelompok BAL sementara 15 isolat teridentifikasi sebagai BAL *indigenous*. Isolat BAL *indigenous* yang teridentifikasi meliputi 2 isolat diduga spesies *L. kalixensis*, 7 isolat diduga spesies *L. plantarum*, 5 isolat diduga spesies *L. fermentum*, 2 isolat diduga spesies *L. mesenteroides*, dan 1 isolat diduga dari genus *Streptococcus* sp. Isolat yang diduga *L. plantarum* dan diduga *L. fermentum* memiliki kemampuan menghambat *A. flavus* dan *P. citrinum*.

### 5.2 Saran

Isolat bakteri asam laktat *indigenous* yang diduga *L. kalixensis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides*, dan *Streptococcus* sp. perlu dilakukan identifikasi tingkat DNA untuk meningkat kepastian spesies BAL yang berpotensi sebagai penghasil senyawa antikapang yang terlibat pada fermentasi biji kopi arabika rakyat yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso. Selanjutnya isolat tersebut agar dapat diaplikasikan sebagai kultur starter untuk membantu proses fermentasi biji kopi arabika menjadi lebih optimal serta menjadi salah satu alternatif untuk mencegah kontaminasi kapang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aaraj, C. E., M. Bakkali, A. Infantino, A. Arakrak, dan A. Laglaoil. 2015. Mycotoxigenic Fungi in Cereals Grains and Coffee from the North of Morocco. *American Journal of Research Communication* 3(2).
- Abdallah, A, H, A, dan A. A. Talib. 2014. Aflatoxin and Ochratoxin Production in Ground Coffee During Storage. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences* 8(2) : 2825 – 2836.
- Afriliana, A. 2018. *Teknologi Pengolahan Kopi Terkini*. Yogyakarta : Deepublish.
- Arena, M. E., F. M. Saguir, M. C. Manca, dan Nadra. 1999. Arginine, Citrulline and Ornithine Metabolism by Lactic Acid Bacteria from Wine. *International Journal of Food Microbiology* 52 : 155–161.
- Aryani, N, L, P, N A., N, L, Yulianti., dan G, Arda. 2018. Karakteristik Biji Kakao Hasil Fermentasi Kapasitas Kecil dengan Jenis Wadah dan Lama Fermentasi yang Berbeda. *Jurnal Beta (Biosistem dan Teknik Pertanian)* 6(1) : 17-24.
- Asaminew, T. dan S. Eyassu. 2011. Microbial Quality of Raw Cow's Milk Collected from Farmers and Dairy Cooperatives in Bahir Dar Zuria and Mecha District, Ethiopia. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2(1) : 29-33.
- Astriani, A., N. Diniyah., J. Jayus., dan N. Nurhayati. 2018. Phenotypic Identification of Indigenous Fungi and Lactic Acid Bacteria Isolated from 'Gatot' an Indonesian Fermented Food. *BIODIVERSITAS* 19(3) : 947 – 954.
- Avallone, S., B. Guyot., J. Brillouet., E. Olguin., dan J. Guiraud. 2001. Microbiological and Biochemical Study of Coffee Fermentation. *CURRENT MICROBIOLOGY* 42 : 252–256.
- Badan Pusat Statistik Jawa Timur. 2016. Produksi Perkebunan Kopi di Jawa Timur. <https://jatim.bps.go.id> [Diakses pada 17 Mei 2018]
- Badan Pusat Statistik. 2015. *Statistik Daerah Kecamatan Sumber Wringin 2015*. Bondowoso : Badan Pusat Statistik Bondowoso.
- Bell, C., P. Neaves, dan A. P. Williams. 2005. *Food Microbiology: Laboratory Practice*. USA: Blackwell Publishing.
- Bjorkroth, J., dan J. Koort. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences – Lactic Acid Bacteria : Taxonomy and Biodiversity*. Finlandia : Universitas Helsinkl.
- BSN. 2008. *SNI 01-2907-2008-Biji Kopi*. Jakarta : BSN.

- Buckle, K. A., R. A. Edward, G. H Fleet, dan M. Wootton. 1987. *Ilmu Pangan*. Jakarta : UI-Press.
- Cabanes, F.J., M, R. Bragulat., and G. Castellá. 2010. Ochratoxin A Producing Species in The Genus *Penicillium*. *Journal of Toxins*. 2 ; 1111-1120.
- Cahyaningsih, H. 2006. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar serta Aplikasinya dalam Mereduksi *Salmonella thypimurium* dan *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao. *Journal Agriculture*. 48 : 3806-3816.
- Camu, N., A. Gonzalez, T. D. Winter, A. V. Schoor, K. D. Bruyne, P. Vandamme, J. S. Takrama, S. K. Addo, dan L. D. Vuyst. 2008. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Applied and Enviromental Microbiology*. 74(1) : 86-98.
- Cappucino, J.G. dan N. Sherman. 2005. *Microbiology: A Laboratory Manual, Dary, The Benjamin or Cummings*. New York : Pulb. Co. Inc.
- Damayanti, E., A, E, Suryani, A. Sofyan, M. F. Karimy, dan H. Julendra. 2015. Seleksi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Anti Jamur yang Diisolasi dari Silase dan Saluran Cerna Ternak. *AGRITECH* 35(2) : 164-169.
- Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso. 2017. Kopi Arabika Java Ijen-Raung. <http://bondowosorepublikkopi.com> [Diakses pada 22 Juni 2018]
- Dinas Pertanian Kabupaten Bondowoso. Tanpa Tahun. Kopi Arabika Java Ijen-Raung Bondowoso. <http://bondowosorepublikkopi.com>[Diakses pada 17 Mei 2018].
- Dionidio, D., Alvindia, dan M. A. Acda. 2010. Mycoflora of Coffee Beans in The Philippines. *Journal ISSAAS*. 16(2) : 116 -125
- Direktorat Jendral Perkebunan Kementerian Pertanian. 2016. *Statistik Perkebunan Indonesia 2015-2017*. Jakarta ; Direktorat Jendral Perkebunan Kementerian Pertanian.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2016. Tiga Puluh Produk Perkebunan Indikasi Geografis. <http://ditjenbun.pertanian.go.id> [Diakses pada 14 Mei 2018]
- Djide dan Sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*. Makassar : Lephass.
- Evangelista, S, R., M, G, C, P, Miguel., C, S, Cordeiro., C, F, Silva., A, C, M, Pinheiro, dan R, F, Schwan. 2014. Inoculation of Starter Cultures In A Semi-Dry Coffee (*Coffea Arabica*) Fermentation Process. *Journal of Food Microbiology* 44 : 87 – 95.
- Feng, X., H, Dong., P, Yang., R, Yang., J, Lu., J, Lv., dan J, Sheng. 2016. Culture-Dependent and -Independent Methods to Investigate the

- Predominant Microorganisms Associated with Wet Processed Coffee. *Journal of Current Microbiology* 73(2) : 190 – 195.
- Fitri., A. B. Tawali., dan A. Laga. 2019. Luwak Coffee In Vitro Fermentation. *International Conference on Green Agro-industry and Bioeconomy* 230 : 1 – 5.
- Fitriyana, N, I. 2011. "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat *Indigenous* dengan Potensi Antikapang dari Fermentasi Kakao di PTPN XII Kebun Banjarsari, Jember". *Tesis*. Malang : Universitas Brawijaya.
- Franca, A S., dan L. S. Oliveira. 2008. *Chapter 4 : Chemistry Of Defective Coffee Beans. Food Chemistry Research Developments* : 105-138 ISBN: 978-1-60456-303-0.
- Gerez, C, L., M. I. Torino, G. Rollan, dan G. F. Vladez. 2009. Prevention of Bread Mould Spoilage by Using Lactic Acid Bacteria With Antifungal Properties. *Journal of Food Control* 20 : 144-148.
- Gitonga, K.T.K. 2004. *An Assessment of The Primary Coffee Processing Practices In The North Rift Valley Region of Kenya*. Socio-Economics Component-OTA PROJECT : Kenya Report.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta : PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hadipernata, M., dan S. Nugraha. 2017. Process Technology of Luwak Coffee Through Bioreactor Utilization. *International Symposium on Food and Agro-biodiversity* 102 : 1 – 6.
- Hatiningsih, S. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang Dari Fermentasi Kopi Rakyat Asal Kintamani Kabupaten Bangli. *Tesis*. Denpasar : Universitas Udayana.
- Holland, R, dan S. Q. Liu. 2011. *Lactic Acid Bacteria : Leuconostoc spp.* Dalam *Encyclopedia of Dairy Sciences* Finlandia : Universitas Helsinkl.
- Hoog, S. 2005. *Essential Microbiology (Second Edition)*. United Kingdom : Universitas Glamorgan, UK. .
- Huch, M., dan C. M. A. P. Franz. 2015. Chapter 21 : Coffee: Fermentation And Microbiota. *Advances in Fermented Foods and Beverages* : 502-513.
- Huys, G., J. Leinser., dan J. Bjorkroth. 2012. Chapter 6 : The Lesser LAB Gods : *Pediococcus, Leuconostoc, Weissella, Carnobacterium, and Affiliated Genera* – Microbiological and Functional Aspect Fourth Edition. Editor S. Lahtinen., A, C. Ouwehand, S. Salminen, A, V. Wright. London : CRC Press.

- Indrawanto, C., E. Kamawati, Munarso, S. J. Prastowo, B. Rubijo, dan Siswanto. 2010. *Budidaya dan Pascapanen Kopi*. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Bogor.
- International Coffee Organization. 2017. Total Production by All Exporting Countries. <http://www.ico.org> [Diakses pada 27 Agustus 2018]
- Jeffrey, C. dan J. C. Pommerville. 2010. *Microbial Growth and Nutrition*. Sudbury MA : Jones & Bartlett Learning Publisher.
- Karinawantika, E, I. 2015. Karakteristik Fisik dan Kimia Biji Kakao Hasil Fermentasi dalam Wadah Karung Plastik di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- Kementerian Pertanian RI. 2017. Luas Areal, Produksi dan Produktivitas Perkebunan di Indonesia. [www.pertanian.go.id](http://www.pertanian.go.id) [Diakses pada 11 Mei 2018]
- Kirg, I. 1984. *Testing Methodes in Food Microbiology*. New York : Elsevier.
- Kurniawan, F. 2017. Karakteristik dan Klasifikasi Biji Kopi Java Arabika Berdasarkan Indikasi Geografis Menggunakan Metode NIR Spectroscopy dan Analisis Diskriminan. *Tesis*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Kustyawati, M. E. dan S. Setyani. 2008. Pengaruh Penambahan Inokulum Campuran Terhadap Perubahan Kimia dan Mikrobiologi Selama Fermentasi Coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 13(2) : 73 – 84.
- Lee, S, H., dan H. C. Chang. 2016. Isolation of Antifungal Activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from Kimchi and Characterization of Its Antifungal Compounds. *Journal of Food Science Biotechnology*. 25(1) : 213 – 219.
- Lee, W, L., M. W. Cheong., P. Curran., B, Yu., dan S. Q. Liu. 2015. Coffee Fermentation and flavor – An Intricate And Delicate Relationship. *Food Chemistry* 185 : 182–191.
- Lin, C,C. 2010. Approach of Improving Coffee Industry in Taiwan-Promote Quality of Coffee Bean by Fermentation. *The Journal of International Management Studies*. 5(1) : 154 – 159.
- Magnuson, J. 2003. *Antifungal Activity Of Lactic Acid Bacteria*. *Disertasi Doktor* ISBN 91-576-6405-6. Swedia ; University of Agricultural Sciences.
- Magnuson, J., dan J. Schnurerm. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(1) : 1–5

- Mardalena. 2016. Fase Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Tempoyak Asal Jambi yang Disimpan Pada Suhu Kamar. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia* 11(1) : 58 – 66.
- Martinez, A, E, P., A, D, Z, Zapata., dan D, L, D, Restrepo. 2018. Performance Of Different Fermentation Methods and The Effect on Coffee Quality (*Coffea arabica* L.). *Coffee Science*. 13(4) : 465 – 476
- Mubarok, F. 2014. Perubahan Kadar Kafein Biji Kopi Arabika Hasil Pengolahan Semi Basah dengan Perlakuan Variasi Jenis Wadah dan Lama Fermentasi. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- Najgebauer-Lejko, D., M. Sady, T. Grega, dan M. Walczycka. 2011. The Impact of Tea Supplementation on Microflora, pH and Antioxidant Capacity of Yoghurt. *Intern. Dairy. J.* 21 : 568-574.
- Nasanit, R, dan K. Satyawut. 2015. Microbiological Study During Coffee Fermentation of *Coffea Arabica* Var. Chiangmai 80 in Thailand. *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)*. 49 : 32 – 42.
- Nurhayati, B.S. L. Jenie., H. D. Kusumaningrum, dan S. Widowati. 2011. Identifikasi Fenotipik dan Genotipik Bakteri Asam Laktat Asal Fermentasi Spontan Pisang var. Agung Semeru (*Musa paradisiaca formatypica*). *Jurnal Ilmu Dasar* 12(2) : 210 – 225.
- Pangastuti, A. 2006. Definisi Spesies Prokaryota Berdasarkan Urutan Basa Gen Penyandi 16s rRNA dan Gen Penyandi Protein. *BIODIVERSITAS* 7(3) : 292 – 296.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta : Agro Meida Pustaka
- Pelaez, A. M. L., C. A. S. Catano, E. A. Q. Yepes, R. R. G. Villarroel, G. L. D. Antoni, dan L. Giannuzzi. 2012. Inhibitory Activity of Lactic and Acetic Acid on *Aspergillus flavus* Growth for Food Preservation. *Food Control* 24 : 177-183.
- Pereire, G. V. M., D. P. C. Neto., A. B. P. Medeiros., V. T. Soccol., E. Neto., A. L. Woiciechowski., dan C. R. 2016. Soccol. Potential of Lactic Acid Bacteria to Improve The Fermentation and Quality of Coffee During On-Farm Processing. *International Journal of Food Science and Technology* 51 : 1689–1695.
- Pitt, J, I. 2002. Biology And Ecology Of Toxigenic *Penicillium* Species. Mycotoxins And Food Safety. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504 : 29 – 41.
- Pitt, J, J. 1993. Toxigenic *Aspergillus* And *Penicillium* Species. <http://www.fao.org> [Diakses pada 28 Mei 2018].



- Poltronieri, P., dan F. Rossi. 2016. Challenges in Specialty Coffee Processing and Quality Assurance. *Review Challenges* 7(19) : 1 – 22.
- Prakash, B.S., 2014. *Microbes in Practice – Chapter : Microbial Staining*. New Delhi : IK International.
- Prastowo, B., E. Karmawati, Rubijo, Siswanto, C. Indawanto, dan S. J. Munarso. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Ebook. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Putra, T, F., H. Suprpto, W. Tjahjaningsih, dan H. Pramono. 2018. The Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Pedas, an Indonesian Traditional Fermented Fish. *ASEAN-FEN International Fisheries Symposium*. 2017. ION Publishing Ltd.
- Putri W. D.R., D.W. Haryadi, Marseno, dan M. N. Cahyanto. 2012. Isolation And Characterization Of Amyolytic Lactic Acid Bacteria During Growol Fermentation, An Indonesian Traditional Food. *Jurnal Teknologi Pertanian* 13 : 52 – 60.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budi Daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Raharjo, S. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Usus Halus Itik Mojokari (*Anas platyrhynchos*). *Skripsi*. Malang : Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Maulana Malik Ibrahim.
- Ramanda, E., A. I. Hasyim., dan D. A. H. Lestari. 2016. Analisis Daya Saing dan Mutu Kopi di Kecamatan Sumberjaya Kabupaten Lampung Barat. *Jurnal IIA* 4(3) : 253 – 261.
- Reiner, K. 2010. *Catalase Test Protocol : American Society For Microbiology*. <https://www.asm.org/getattachment/72a871fc-ba92-4128-a194-6f1bab5c3ab7/Catalase-Test-Protocol.pdf> . [Diakses pada 9 April 2019].
- Ridwansyah. 2013. *Pengolahan Kopi*. Medan : Universitas Sumatera Utara.
- Sari, N, P., T. I. Santoso, Yusianto, dan S. Mawardi. 2013. *Mengenal Kopi Arabika Jawa Ijen-Raung (Kopi Bersertifikat Indikasi Geografis Pertama di Jawa Timur)*. Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia hlm 13-16. Jember ; Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Schwan, R, F., C, F, Silva., dan L, R, Batista. 2012. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology – Chapter 42 : Coffee Fermentation*. Brazil : Universitas Federal de Lavras.
- Sheikh-Ali, S., A. Ahmad, S. Mohd-Setapar, Z. A. Zakaria, N. Abdul-Talib, A. K. Khamis, dan M. E. Hoque. 2014. The Potential Hazards of *Aspergillus* sp.

- In Foods and Feeds, and The Role of Biological Treatment: A Review. *The Journal Of Microbiology*. 52(10) : 807-818.
- Silva, C, F., D. Vilela, C. C., Cordeiro, W. Duarte, D. Dias, dan R. Schwan. 2013. Evaluation of A Potential Starter Culture fo Enhanced Quality of Coffee Fermentation. *World Journal Microbial Biotechnol*. 29 : 235-247
- Silva, C, F., L, R, Batista., L, M, Abreu., E, S, Dias., dan R, F, Schwan. 2008. Succession of Bacterial and Fungal Communities during Natural Coffee (*Coffea arabica*) Fermentation. *Journal of Food Microbiology* 25 : 951 – 957.
- Strom, K. 2005. Fungal Inhibitory Lactic Acid Bacteria : Characterization and Application of *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393. *Doctoral Thesis*. Uppsala : Universitas Swedia – Ilmu Pertanian.
- Subagiyo, S. Margino, Triyanto, dan W. A. Setyati. 2014. Pengaruh pH, Suhu Dan Salinitas Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam Organik Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi Dari Intestinum Udang Penaeid. *Ilmu Kelautan* 20(4) : 187-194
- Susilawati, S. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Air Cucian Beras. *Skripsi*. Universitas Islam Jakarta.
- Sutedjo, M, M. 1996. *Mikrobiologi Tanah*. Jakarta : PT. Rineke Cipta.
- Sya'baniar, L., Erina, dan A. Sayuti. 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat (BAL) Genus *Lactobacillus* dari Feses Orangutan Sumatera (*Pango abelii*) di Kebun Binatang Kasang Kulim Bangkinang Riau. *JUMVET* 1(3) : 351 – 359.
- Syarief, R., dan A. Irawati. 1988. *Pengetahuan Bahan untuk Industri Pertanian*. Jakarta : Media Sarana Perkasa.
- Taniwaki, M, H., J. I. Pitt, dan N. Magan. 2018. *Aspergillus* Species And Mycotoxins: Occurrence And Importance In Major Food Commodities. *Current Opinion in Food Science*. 23 : 38–43.
- Triantarti dan H. Santoso. 2007. Pengaruh Substitusi Terhadap Sukrosa Murni Oleh Nira Tebu Sebagai Sumber Karbon pada Fermentasi Produksi Dekstran. *Jurnal Ilmu Dasar*. 8(2) : 193-198
- Usman, D., A. Supriyadi., dan E. Kusdiyanti. Fermentasi Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Isolat Bakteri Asam Laktat Dari Feces Luwak Dengan Perlakuan Lama Waktu Inkubasi. *Jurnal Biologi* 4(3) : 31-40.
- Vega, F, E., F. Posadara, S. W. Peterson, T. J. Gianfagna, dan F. Chaves. 2006. *Penicillium* Species Endophytic in Coffee Plants and Ochratoxin A Production. *Mycologia*. 98(1) : 31–42

- Volk, Wesley A dan Wheeler. 1992. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid 2. Edisi Kelima. Jakarta : Erlangga.
- Vos, D.V., G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, dan W. B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Three The Firmicutes – Second Edition*. New York : Springer Dordrecht Heidelberg.
- Waters, D.M., C. Parlet, A. Moroni., dan E.K. Arendt. 2012. Identification Of The Fungal Microflora Of Coffee Beans From Different Origins And Evaluation Of Different Decontamination Concepts. *Proceeding 24th International Conference on Coffee Science* : 148 – 152.
- Widagdo, A. 2008. Aplikasi Bakteri Asam Laktat Pada Fermentasi Kakao Penghambat Kapang *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao *Underfermented* dengan Metode Semprot. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- Wilujeng, A, A, T., dan P. R. Wikandari. 2013. Pengaruh Lama Fermentasi Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Dengan Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* B1765 Terhadap Mutu Produk. *UNESA Journal of Chemistry*. 2(3) : 1-10.
- Wright, A, V., dan L. Axelsson. 2012. *Chapter 1 : Lactic Acid Bacteria : An Introduction*. Dalam *Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspect Fourth Edition*. Editor S. Lahtinen., A, C. Ouwehand, S. Salminen=, A, V. Wright. London : CRC Press.
- Yang, E. J., dan H. C. Chang. 2010. Purification of A New Antifungal Compound Produced by *Lactobacillus Plantarum* AF1 Isolated from Kimchi. *International Journal of Food Microbiology* 139 : 56-63.
- Yani, A. 2007. Cendawan Penghasil Okratoksin Pada Kopi Dan Cara Pencegahannya. *Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian*. 3 : 9-15.
- Yuniarti, M.P., H. R. Dewanti, dan W. P. Rahayu. 2014. Kajian Standar Cemaran Mikroba dalam Pangan di Indonesia. *Jurnal Standardisasi*. 16(2) : 113-124.
- Yusianto dan D. Nugroho. 2014. Mutu Fisik dan Citarasa Kopi Arabika yang Disimpan Buahnya Sebelum di-Pulping. *Pelita Perkebunan*. 30(2) : 137 – 158.
- Yusianto, dan S. Widyotomo. 2013. Mutu dan Citarasa Kopi Arabika Hasil Beberapa Perlakuan Fermentasi: Suhu, Jenis Wadah, dan Penambahan Agens Fermentasi. *Pelita Perkebunan*. 29(3) : 220-239.

## LAMPIRAN

**Lampiran 3.1.** Dokumentasi tahapan proses fermentasi kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen Raung Bondowoso

Buah kopi arabika matang



Buah kopi setelah dikupas atau sebelum difermentasi



Sortasi buah kopi masak



Sortasi Basah / Perembengan buah kopi

Proses pengupasan (*pulping*) buah kopiMesin *pulper* biji kopi

Fermentasi biji kopi dalam karung plastik

Pencucian biji kopi setelah fermentasi



Penjemuran biji kopi



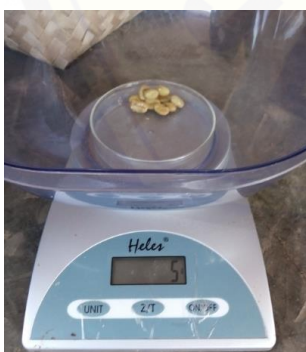
Karung plastik untuk wadah fermentasi kopi



Pengukuran suhu fermentasi



Pengukuran pH fermentasi



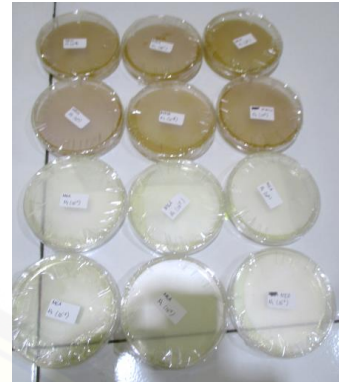
Penimbangan sampel biji kopi sebanyak 5 gr



Proses isolasi mikroorganisme dari fermentasi biji kopi



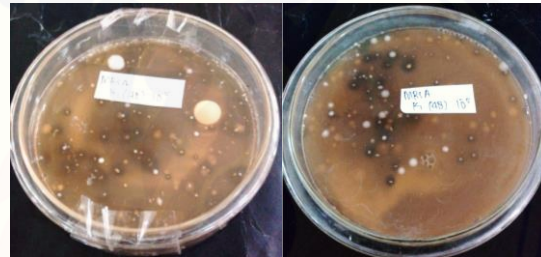
Proses isolasi dilakukan secara aseptis



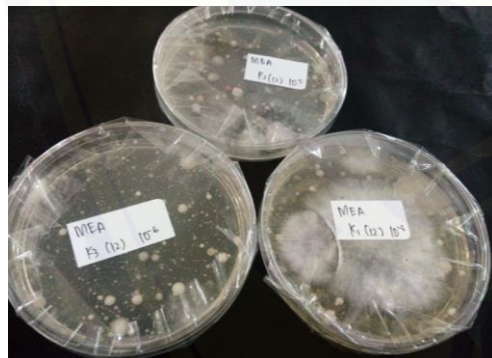
Plating mikroorganisme dalam media MRSA dan MEA



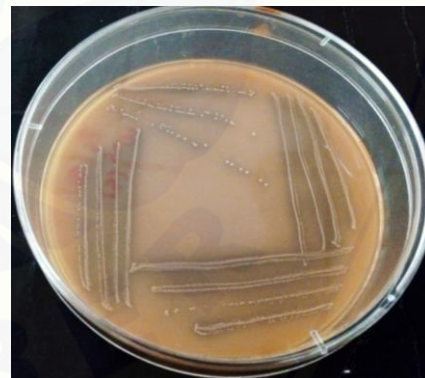
Inkubasi dalam kotak *styrofoam*



Hasil isolasi BAL dalam media MRSA



Hasil isolasi kapang dan khamir pada media MEA



Hasil goresan kuadran isolat BAL



Hasil goresan isolat BAL pada agar tusuk



Proses peremajaan bakteri asam laktat yang dilakukan didalam *laminar airflow*



Perhitungan mikroba dengan menggunakan *colony counter*



Media MRSA dan MEA

**Lampiran 4.1.** Suhu dan pH fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

1. Data hasil pengukuran suhu fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Jam ke-	Suhu Fermentasi (°C)			Rata-rata	STDEV
	Karung 1	Karung 2	Karung 3		
0	27	26	27	26,22	0,96
	25	25	27		
	25	26	28		
12	28	27	28	27,72	0,51
	28	28	28		
	29	27	28		
24	29	28	27	27,50	0,58
	28	27	28		
	28	27	27		
36	24	22	23	23,00	0,67
	23	23	24		
	22	22	24		
48	23	22	22	22,33	0,33
	22	22	23		
	22	22	23		

2. Data hasil pengukuran pH fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Jam ke-	pH Fermentasi			Rata-rata	STDEV
	Karung 1	Karung 2	Karung 3		
0	4,80	4,80	4,70	4,77	0,06
12	3,30	3,40	3,50	3,40	0,10
24	3,40	3,40	3,40	3,40	0,00
36	3,40	3,30	3,40	3,37	0,06
48	3,20	3,20	3,20	3,20	0,00



**Lampiran 4.2.** Jumlah mikroorganisme yang tumbuh selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

1. Data pertumbuhan BAL selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Fermentasi Jam ke-	Jumlah BAL (cfu/ml)			Rata-rata
	Karung 1	Karung 2	Karung 3	
0	$2,00 \times 10^4$	$2,55 \times 10^4$	$3,75 \times 10^4$	$2,77 \times 10^4$
12	$1,71 \times 10^5$	$2,17 \times 10^5$	$1,62 \times 10^5$	$1,83 \times 10^5$
24	$2,84 \times 10^6$	$3,21 \times 10^6$	$3,39 \times 10^6$	$3,14 \times 10^6$
36	$1,07 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6$
48	$3,62 \times 10^5$	$3,39 \times 10^5$	$3,12 \times 10^5$	$3,38 \times 10^5$

2. Data pertumbuhan bakteri non BAL selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

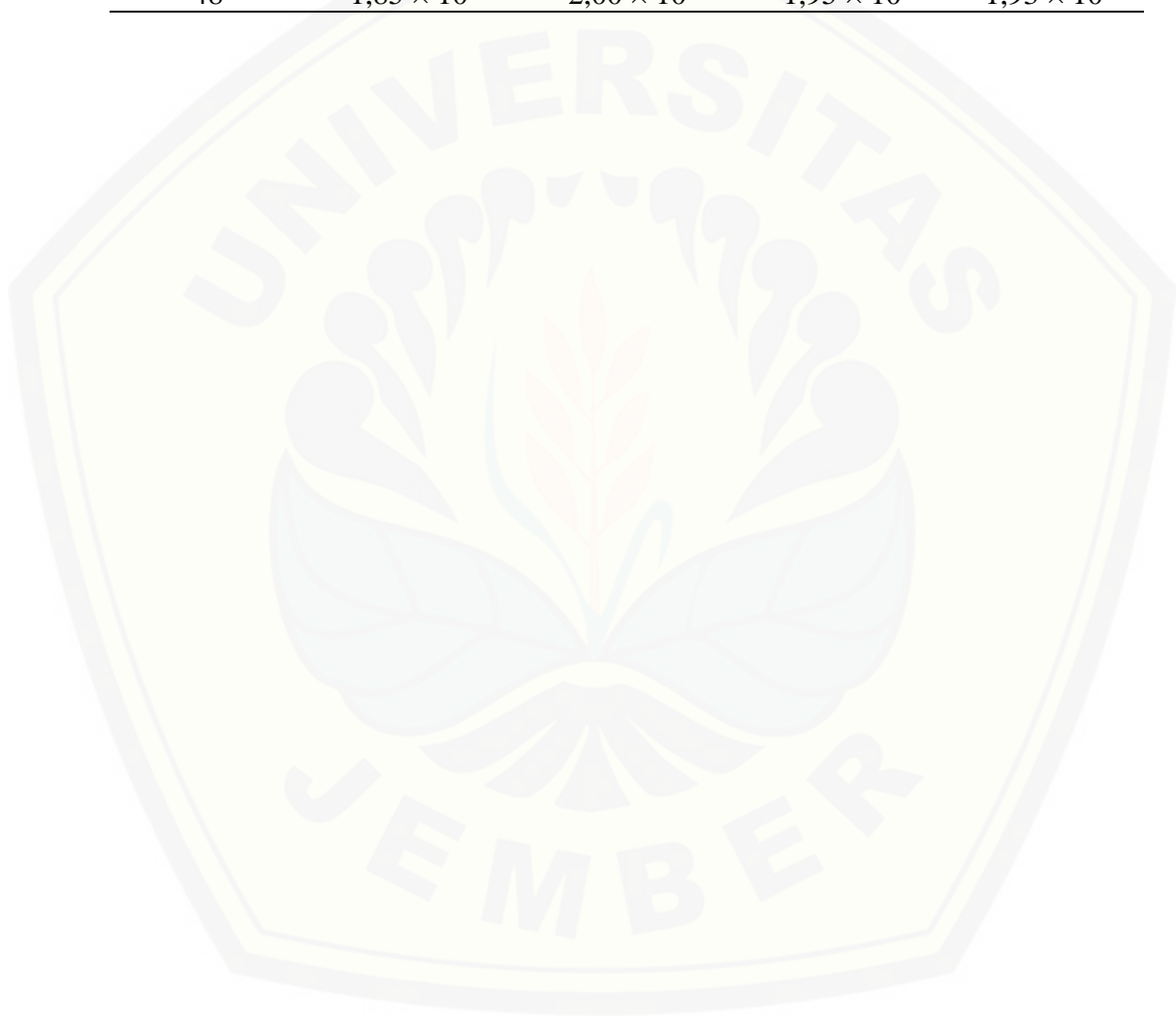
Fermentasi Jam ke-	Jumlah bakteri non BAL (cfu/ml)			Rata-rata
	Karung 1	Karung 2	Karung 3	
0	$1,40 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$1,65 \times 10^4$	$1,43 \times 10^4$
12	$9,35 \times 10^4$	$9,65 \times 10^4$	$9,75 \times 10^4$	$9,58 \times 10^4$
24	$2,13 \times 10^5$	$2,39 \times 10^5$	$2,52 \times 10^5$	$2,35 \times 10^5$
36	$1,83 \times 10^5$	$1,93 \times 10^5$	$1,94 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$
48	$1,15 \times 10^5$	$1,06 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$

3. Data pertumbuhan khamir selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Fermentasi Jam ke-	Jumlah khamir (cfu/ml)			Rata-rata
	Karung 1	Karung 2	Karung 3	
0	$5,05 \times 10^4$	$5,05 \times 10^4$	$5,35 \times 10^4$	$5,30 \times 10^4$
12	$2,28 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$1,85 \times 10^6$	$2,04 \times 10^6$
24	$2,01 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$	$1,69 \times 10^6$	$1,73 \times 10^6$
36	$3,64 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$	$2,65 \times 10^5$	$3,09 \times 10^5$
48	$1,72 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$	$1,92 \times 10^5$	$1,84 \times 10^5$

4. Data pertumbuhan kapang selama fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

Fermentasi Jam ke-	Jumlah kapang (cfu/ml)			Rata-rata
	Karung 1	Karung 2	Karung 3	
0	$6,50 \times 10^3$	$6,00 \times 10^3$	$6,50 \times 10^3$	$6,33 \times 10^3$
12	$1,25 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$
24	$1,65 \times 10^4$	$1,75 \times 10^4$	$1,75 \times 10^4$	$1,72 \times 10^4$
36	$1,90 \times 10^4$	$1,60 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$
48	$1,85 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	$1,93 \times 10^4$



**Lampiran 4.3.** Data pengamatan uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL yang diisolasi pada fermentasi biji kopi arabika rakyat dalam wadah karung karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

1. Data pengamatan kemampuan kerja antikapang isolat BAL yang diisolasi pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso terhadap *A. flavus*

No.	Kode Isolat	No BAL	Hasil Pengukuran		Luas Zona Bening (cm <sup>2</sup> )	Luas BAL (cm <sup>2</sup> )	Luas Penghambatan (cm <sup>2</sup> )	Rata-rata (cm <sup>2</sup> )	STDEV
			a (cm)	b (cm)					
1.	K1 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	1	0,900	1,300	3,674 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	2,674	4,546	2,648
		2	1,350	1,750	7,418 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	6,418		
2.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	1	1,300	2,000	8,164 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	7,164	5,293	2,647
		2	0,800	1,760	4,421 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	3,421		
3.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (1a)	1	0,000	0,000	0,000 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,000	3,322	4,698
		2	1,575	1,950	7,644 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	6,644		
4.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (3)	1	0,300	0,300	0,0314 cm <sup>2</sup>	0,0314 cm <sup>2</sup>	0,251	0,251	0,000
		2	0,300	0,300	0,0314 cm <sup>2</sup>	0,0314 cm <sup>2</sup>	0,251		
5.	K2 (48) 10 <sup>-5</sup> (8)	1	1,100	1,750	6,045 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	5,045	3,690	1,915
		2	0,850	1,250	3,336 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	2,336		
6.	K2 (48) 10 <sup>-5</sup> (6)	1	2,050	2,325	14,966 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	13,966	14,443	0,674
		2	1,950	2,600	15,920 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	14,920		
7.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (1)	1	1,000	1,500	4,710 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	3,710	4,495	1,110
		2	1,250	1,600	6,280 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	5,280		
8.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (3)	1	0,450	1,250	1,566 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,566	0,468	0,139
		2	0,400	1,250	1,370 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,370		
9.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (5)	1	0,950	1,500	4,475 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	3,475	2,415	1,499
		2	0,500	1,500	2,355 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	1,355		

2. Data pengamatan kemampuan kerja antikapang isolat BAL yang diisolasi pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso terhadap *P. citrinum*

No.	Kode Isolat	No BAL	Hasil Pengukuran		Luas Zona Bening (cm <sup>2</sup> )	Luas BAL (cm <sup>2</sup> )	Luas Penghambata n (cm <sup>2</sup> )	Rata-rata (cm <sup>2</sup> )	STDEV
			a (cm)	b (cm)					
1.	K1 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	1	0,900	1,250	3,533 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	2,533	3,710	1,665
		2	1,250	1,500	5,888 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	4,888		
2.	K1 (0) 10 <sup>-6</sup> (1)	1	0,400	1,250	1,570 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,570	0,727	1,665
		2	0,500	1,200	1,884 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,884		
3.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (1a)	1	0,450	1,300	1,837 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,837	1,861	1,449
		2	0,750	1,650	3,888 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	2,888		
4.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (1b)	1	0,000	0,000	0,000 cm <sup>2</sup>	0,000 cm <sup>2</sup>	0,000	0,214	0,303
		2	0,350	1,300	1,429 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,429		
5.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (2a)	1	0,750	1,050	2,473 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	1,473	0,825	0,916
		2	0,300	1,250	1,178 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,178		
6.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	1	0,400	1,200	1,507 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,507	0,319	0,266
		2	0,300	1,200	1,130 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,130		
7.	K3 (0) 10 <sup>-5</sup> (1)	1	0,450	1,200	1,696 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,696	0,570	0,178
		2	0,400	1,150	1,444 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,444		
8.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (1b)	1	0,000	0,000	0,000 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,000	0,022	0,031
		2	0,350	0,950	1,044 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,044		
9.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (5)	1	0,400	1,000	1,256 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,256	0,492	0,333
		2	0,500	1,100	1,727 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,727		
10.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (1)	1	0,400	1,400	1,758 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,758	2,580	2,576
		2	0,400	4,300	5,401 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	4,401		
11.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (2)	1	0,450	1,250	1,766 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,766	0,751	0,022
		2	0,425	1,300	1,736 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,736		

3. Data pengamatan kemampuan kerja antikapang isolat BAL yang diisolasi pada fermentasi biji kopi rakyat dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso terhadap *P. citrinum* (Lanjutan)

No.	Kode Isolat BAL	No BAL	Hasil Pengukuran		Luas Zona Bening (cm <sup>2</sup> )	Luas BAL (cm <sup>2</sup> )	Luas Zona Hambat (cm <sup>2</sup> )	Rata-rata (cm <sup>2</sup> )	STDEV
			a (cm)	b (cm)					
12.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (4)	1	0,400	1,650	1,444 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,444	0,821	0,533
		2	0,500	1,400	2,198 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	1,198		
13.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (5)	1	0,350	1,050	1,154 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,154	0,331	0,250
		2	0,400	1,200	1,507 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,507		
14.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (6)	1	0,650	1,050	2,143 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	1,143	1,155	0,017
		2	0,600	1,650	1,167 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	1,167		
15.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (7)	1	0,300	0,550	1,018 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	0,018	2,940	4,131
		2	1,150	1,900	6,861 cm <sup>2</sup>	1 cm <sup>2</sup>	5,861		

**Lampiran 4.4** Data pengamatan identifikasi BAL *indigenus* yang diisolasi dari biji kopi rakyat yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

1. Karakteristik morfologi dan fisiologi isolat BAL yang diisolasi dari biji kopi rakyat yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

No	Kode Isolat BAL	Morfologi			Fisiologi						
		Sifat gram	Bentuk Sel	Sifat Katalase	Hasil CO <sub>2</sub>	Petumbuhan Suhu (°C)			Pertumbuhan NaCl (%)		
						15	37	45	0	4	6
1.	K1 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	Negatif	Batang	Negatif	++++	-	++	+++	++	+	-
2.	K1 (0) 10 <sup>-6</sup> (1)	Positif	Batang	Negatif	+++	-	++	+++	++	++	+
3.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (1a)	Positif	Batang	Negatif	+++	-	++++	+++	++	+	-
4.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (1b)	Positif	Batang	Negatif	+++	-	++	+++	+	+	+
5.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (2a)	Positif	Batang	Negatif	+++	-	++	++	+	+	-
6.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	Positif	Batang	Negatif	++++	+	++	+++	+	+	+
7.	K3 (0) 10 <sup>-5</sup> (1)	Negatif	Batang	Negatif	++++	-	+++	++	+	+	-
8.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (1a)	Positif	Batang	Negatif	++++	+	+++	+	+++	++	+
9.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (1b)	Positif	Batang	Negatif	++++	-	+++	+	+++	++	+
10.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (3)	Positif	Batang	Negatif	-	+	++++	++	++++	++++	++
11.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (5)	Negatif	Batang	Negatif	+++	-	+++	-	+++	++	+
12.	K2 (48) 10 <sup>-5</sup> (6)	Positif	Batang	Negatif	+++	-	+++	+	+++	+	+
13.	K2 (48) 10 <sup>-5</sup> (8)	Negatif	Batang	Negatif	-	-	++++	+++	++++	++++	+++
14.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (1)	Positif	Kokus	Negatif	-	-	++++	++++	++++	+++	++++
15.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (2)	Positif	Batang	Negatif	-	-	++++	++++	++++	++++	++
16.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (3)	Positif	Batang	Negatif	-	+	++++	++	++	+++	+
17.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (4)	Positif	Kokus	Negatif	++++	-	++++	++	++	++	-
18.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (5)	Positif	Batang	Negatif	++++	-	+++	++++	+++	++	++
19.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (6)	Positif	Kokus	Negatif	++++	-	+++	+++	++++	++	+
20.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (7)	Negatif	Batang	Negatif	-	-	+++	+++	+++	++	+

2. Pola fermentasi isolat BAL yang diisolasi dari biji kopi rakyat yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso

No	Kode Isolat BAL	Hasil Dekstran	Produksi amonia		Kemampuan Fermentasi Gula										Dugaan Spesies BAL	
			MRS arginin broth	Arginin broth	Gal	Fruk	Mal	Lak	Suk	Xil	Thre	Man	Arb	Mant		Arbt
1.	K1 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	-	+	+	++++	++++	++++	++++	++++	+	++++	++++	+	+++	+	Non BAL
2.	K1 (0) 10 <sup>-6</sup> (1)	-	-	+	+++	++	++	+	++	+	++	+++	+	-	+	<i>L. fermentum</i>
3.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (1a)	-	-	-	+	++	+++	++++	+++	+	+	++	+	+++	+	<i>L. plantarum</i>
4.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (1b)	-	-	+	+	++	++	+	++	+	++	+	+	-	+	<i>L. fermentum</i>
5.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (2a)	-	-	-	++++	+++	+++	+++	+++	++	++++	++++	+	+++	+	<i>L. plantarum</i>
6.	K2 (0) 10 <sup>-4</sup> (3)	-	-	-	++++	++++	++++	+++	++++	++	++++	++++	+	+++	+	<i>L. plantarum</i>
7.	K3 (0) 10 <sup>-5</sup> (1)	-	-	+	+++	+++	+++	++++	+++	+	+++	++++	+	+++	+	Non BAL
8.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (1a)	-	+	-	++++	+++	+++	+++	+++	-	++++	+++	+	+++	++	<i>L. fermentum</i>
9.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (1b)	-	-	-	++++	+++	+++	++++	+++	+	++++	+++	++	+++	+	<i>L. plantarum</i>
10.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (3)	-	-	-	+++	+++	++++	++++	+++	+	++++	+++	++	+++	+	<i>L. plantarum</i>
11.	K1 (48) 10 <sup>-6</sup> (5)	-	-	-	+++	++++	++++	++++	+++	+	++++	+++	++	+++	+	Non BAL
12.	K2 (48) 10 <sup>-5</sup> (6)	-	-	-	++++	+++	+++	++++	+++	-	++++	+++	+	+++	+	<i>L. plantarum</i>
13.	K2 (48) 10 <sup>-5</sup> (8)	-	-	-	+++	+++	++++	++++	+++	+	++++	++++	++	+++	+	Non BAL

Keterangan :

- : tidak ada endapan/ gelembung

+ : sedikit endapan/ gelembung

++ : cukup banyak endapan/ gelembung

+++ : banyak endapan/ gelembung

++++ : sangat banyak edapan/ gelembung

3. Pola fermentasi isolat BAL yang diisolasi dari biji kopi rakyat yang difermentasi dalam wadah karung plastik di kawasan Pegunungan Ijen-Raung Bondowoso (Lanjutan)

No	Kode Isolat BAL	Hasil Dekstran	Produksi Amonia		Kemampuan Fermentasi Gula											Dugaan Spesies BAL
			MRS arginin broth	Arginin broth	Gal	Fruk	Mal	Lak	Suk	Xil	Thre	Man	Arb	Mant	Arbt	
14.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (1)	++++	-	-	++++	++	++++	++++	+++	+	++++	+++	+	+++	+	<i>L. mesenteroides</i>
15.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (2)	-	-	-	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++	++++	++	++++	++	<i>L. plantarum</i>
16.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (3)	-	-	+	+++	++++	+++	+++	++++	+	+++	+++	+	++++	++	<i>L. fermentum</i>
17.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (4)	++++	-	-	+++	+++	++++	+++	++++	+	+++	+++	+	++++	++	<i>L. mesenteroides</i>
18.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (5)	-	+	+	++++	+++	++++	+++	++++	+	++++	++++	++	+++	+	<i>L. fermentum</i>
19.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (6)	++++	-	+	+	++	++++	+	++++	+	+	+++	+	++++	+	<i>Streptococcus sp.</i>
20.	K3 (12) 10 <sup>-4</sup> (7)	-	-	-	++++	++++	++++	++++	+++	+	++++	++++	++	+++	+	Non BAL

Keterangan :

Gal = Galaktosa ; Fruk = Fruktosa; Mal = Maltosa ; Lak = Laktosa ; Suk = Sukrosa ; Xil = Xilitol ; Thre = Threhalosa ; Man = Manosa ; Arb = Arabinosa ; Mant = Manitol ; Arbt = Arabitol

- : tidak ada endapan/ dekstran/ reaksi negatif
- + : sedikit endapan/ dekstran / reaksi positif
- ++ : cukup banyak endapan/ gelembung
- +++ : banyak endapan/ dekstran
- ++++ : sangat banyak endapan/ dekstran



**Lampiran 4.5** Karakteristik beberapa BAL berdasarkan *Bergey's Manual of Systemtic Bacteriology*

Karakteristik BAL	Spesies BAL				
	<i>L. kalixensis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
Pewarnaan gram	+	+	+	+	+
Bentuk sel	Basil / batang	Basil / batang	Basil / batang	Kokus	Kokus
Katalase	-	-	-	-	-
Kelompok BAL	Homofermentatif obligat	Heterofermentatif	Heterofermentatif obligat	Heterofermentatif	Homofermentatif
Tumbuh pada :					
15°C	-	+	-	+	-
45°C	+	-	+	nd	v
NaCl 6,5%	nd	nd	nd	+	+
Dekstran dari sukrosa	-	-	-	+	v
NH <sub>3</sub> dari arginin	-	-	+	-	+
Fermentasi karbohidrat:					
Galaktosa	+	d	+	+	v
Fruktosa	d	+	d	+	v
Maltosa	+	+	+	+	nd

Karakteristik beberapa bakteri asam laktat berdasarkan *Bergey's Manual of Systemtic Bacteriology* (Lanjutan)

Karakteristik BAL	Spesies BAL				
	<i>L. kalixensis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>L. kalixensis</i>
Laktosa	+	nd	nd	d	nd
Sukrosa	+	+	+	+	+
Xilosa	-	d	d	d	-
Threhalosa	+	nd	d	+	nd
Manosa	+	+	w	d	d
Manitol	d	+	nd	d	nd
Arabinosa	-	+	+	+	-

Keterangan :

- + : ≤ 90% hasil positif
- : ≤ 90% hasil negatif
- d : 11-89% hasil positif
- w : hasil positif namun lemah
- nd : tidak ditemukan data
- v : *variable* (bergantung pada spesies)

(Sumber : Vos *et al.*, 2009)