

TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN

Teknologi fermentasi, sama halnya dengan pengeringan, merupakan teknologi tertua semenjak jaman Neolitik yang digunakan untuk pengawetan pangan. Meskipun pada awalnya fermentasi digunakan untuk mengawetkan pangan, saat ini teknologi fermentasi juga digunakan untuk memperbaiki karakteristik sensori pangan dan nilai gizi, juga meningkatkan sifat fungsional pangan. Bakteri, khamir, dan kapang merupakan mikroorganisme yang penting pada fermentasi pangan. Keragaman mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi dan bahan baku yang digunakan menentukan karakteristik produk fermentasi yang dihasilkan.

Buku ini menjelaskan prinsip-prinsip teknologi fermentasi, khususnya fermentasi pangan. Prinsip teknologi fermentasi mencakup perkembangan fermentasi, berbagai metode fermentasi, dan jenis-jenis pangan fermentasi berdasarkan bahan bakunya. Kultur starter untuk fermentasi pangan, mulai dari perkembangan, dan jenis-jenis kultur starter turut menjadi pembahasan. Berbagai produk fermentasi berdasarkan proses fermentasi utamanya, yaitu fermentasi alkohol, fermentasi asetat, fermentasi asam laktat, fermentasi kapang, serta fermentasi garam tinggi, dijabarkan secara rinci dalam buku ini baik proses pengolahan, fermentasi yang terjadi, maupun perubahan kimia. Pada buku ini dibahas juga mengenai manfaat kesehatan pangan fermentasi, mencakup mikroorganisme yang berada pada pangan fermentasi, dan metabolit yang dihasilkannya.

Buku ini dapat digunakan sebagai referensi atau rujukan bagi mahasiswa, akademisi, peneliti, serta masyarakat yang tertarik pada teknologi fermentasi pangan. Selamat membaca dan menyelami dunia fermentasi pangan.



TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN



TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN

Lilis Nuraida | Uswatun Hasanah | Dinda Rana Athaya | Krisa Refita



PT Penerbit IPB Press

Jalan Taman Kencana No. 3, Bogor 16128

Telp. 0251-8355 158 E-mail: ipbpress@apps.ipb.ac.id

IPB Press Penerbit IPB Press ipbpress.com

Teknologi

ISBN : 978-623-467-077-6



TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN

TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN

Penulis:

Lilis Nuraida
Uswatun Hasanah
Dinda Rana Athaya
Krisa Refita



Penerbit IPB Press
Jalan Taman Kencana No. 3,
Kota Bogor - Indonesia

C.01/03.2022

Judul Buku:

TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN

Penulis:

Lilis Nuraida
Uswatun Hasanah
Dinda Rana Athaya
Krisa Refita

Penyunting Bahasa:

Tania Panandita

Desain Sampul & Penata Isi:

Mokhammad Zulfatul Basith

Jumlah Halaman:

278 + 20 hal romawi

Edisi/Cetakan:

Cetakan 1, Agustus 2022

PT Penerbit IPB Press

Anggota IKAPI
Jalan Taman Kencana No. 3, Bogor 16128
Telp. 0251 - 8355 158 E-mail: ipbpress@apps.ipb.ac.id
www.ipbpress.com

ISBN: 978-623-467-077-6

Dicetak oleh Percetakan IPB, Bogor - Indonesia
Isi di Luar Tanggung Jawab Percetakan

© 2022, HAK CIPTA DILINDUNGI OLEH UNDANG-UNDANG
Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku
tanpa izin tertulis dari penerbit

KATA PENGANTAR

Teknologi fermentasi, sama halnya dengan pengeringan, merupakan teknologi tertua semenjak jaman Neolitik yang digunakan untuk pengawetan pangan. Pengetahuan mengenai peranan mikroorganisme pada bahan pangan mulai berkembang pada abad ke-18 setelah mikroskop ditemukan. Setelah diketahui bahwa mikroorganisme berperan pada proses fermentasi, teknologi fermentasi berkembang dengan cepat. Meskipun pada awalnya fermentasi digunakan untuk mengawetkan pangan, saat ini teknologi fermentasi juga digunakan untuk memperbaiki karakteristik sensori pangan, nilai gizi, dan meningkatkan sifat fungsional pangan. Mikroorganisme yang berperan pada proses fermentasi menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk dan patogen, terutama dengan dihasilkannya metabolit-metabolit yang bersifat sebagai antimikroba. Bakteri, khamir, dan kapang merupakan mikroorganisme yang penting pada fermentasi pangan. Keragaman mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi dan bahan baku yang digunakan menentukan karakteristik produk fermentasi yang dihasilkan.

Secara tradisional teknologi fermentasi mencakup fermentasi asam dan fermentasi alkohol dengan mikroorganisme yang berperan utama adalah bakteri asam laktat (BAL) dan khamir. Fermentasi susu, sereal, sayuran, dan daging melibatkan bakteri asam laktat, tanpa atau dengan ko-kultur dengan bakteri lain atau khamir atau kapang, sehingga bakteri asam laktat merupakan bakteri terpenting pada fermentasi pangan. Berdasarkan metabolismenya, BAL dikelompokkan menjadi BAL homofermentatif dan heterofermentatif. *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus* merupakan BAL yang paling sering digunakan sebagai kultur starter. Yoghurt merupakan salah satu produk fermentasi asam laktat yang telah dikenal di seluruh dunia, difermentasi dengan kultur campuran *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Selain bakteri asam laktat, bakteri asam asetat (BAA) seperti *Acetobacter*, *Gluconobacter*, dan *Gluconacetobacter* merupakan bakteri kedua setelah bakteri asam laktat yang berperan pada fermentasi pangan. Vinegar merupakan salah satu produk fermentasi asam asetat dengan

menggunakan pangan bergula sebagai substrat yang difermentasi ko-kultur BAA dan khamir. Khamir mengonversi gula menjadi alkohol, dilanjutkan dengan oksidasi alkohol menjadi asam asetat oleh BAA.

Fermentasi alkohol pada umumnya dilakukan oleh khamir dengan menggunakan gula sebagai substrat untuk menghasilkan alkohol dan karbondioksida. *Saccharomyces* merupakan khamir yang paling umum digunakan atau berperan pada pangan fermentasi, seperti pada minuman beralkohol dan tape. Khamir juga berperan pada fermentasi tauco dan kecap.

Kapang merupakan mikroorganisme penting lainnya dalam fermentasi pangan. Tempe merupakan pangan fermentasi berbahan baku kedelai dengan mikroorganisme utama kapang *Rhizopus oligosporus*. Kecap yang diproduksi terutama di negara-negara Asia menggunakan kapang sebagai starter pada fermentasi tahap 1. Pada fermentasi keju, kapang digunakan sebagai starter sekunder.

Pada mulanya fermentasi dilakukan secara spontan/alami dengan mengandalkan mikroorganisme yang terdapat pada bahan baku. Untuk memperbaiki kualitas produk, teknik *backslopping* digunakan dengan menggunakan hasil fermentasi sebelumnya sebagai kultur starter. Pada fermentasi spontan/alami, pertumbuhan mikroorganisme yang penting untuk fermentasi didukung dengan pengaturan kondisi fermentasi, seperti penambahan garam. Dengan berkembangnya pengetahuan tentang peranan mikroorganisme dalam fermentasi, teknik fermentasi berevolusi dengan menggunakan kultur starter yang terdefinisi dengan jelas, walaupun sampai saat ini masih banyak produk fermentasi yang dibuat dengan fermentasi alami.

Buku ini menjelaskan prinsip-prinsip teknologi fermentasi, khususnya fermentasi pangan, kultur *starter* untuk fermentasi pangan, fermentasi alkohol, fermentasi asetat, fermentasi laktat, dan fermentasi dengan menggunakan kapang sebagai starter, serta fermentasi dengan garam tinggi. Pada buku ini juga dibahas mengenai manfaat kesehatan pangan fermentasi yang mencakup mikroorganisme dan metabolit yang dihasilkannya. Buku ini diharapkan menjadi rujukan bagi mahasiswa atau masyarakat yang tertarik pada teknologi fermentasi pangan.

Kami mengucapkan terima kasih kepada Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor atas dukungannya untuk penyusunan dan pencetakan buku ini sebagai bagian dari Pembelajaran Berbasis Kasus (*Problem Based Learning*) melalui Program Kompetisi Kampus Merdeka tahun 2021. Semoga buku ini bermanfaat bagi pembaca dan memberikan kontribusi pada pemanfaatan ilmu pengetahuan untuk kemajuan bangsa.

Bogor, Agustus 2022

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xix
1. PRINSIP TEKNOLOGI FERMENTASI.....	1
1.1 Perkembangan Fermentasi	1
1.1.1 Produksi Biomassa Mikroorganisme.....	3
1.1.2 Produksi Enzim Mikroorganisme	3
1.1.3 Produksi Metabolit Mikroorganisme	3
1.1.4 Produksi Produk Rekombinan	4
1.1.5 Produk Biotransformasi.....	4
1.2 Metode Fermentasi	5
1.2.1 Fermentasi Padat (<i>Solid-state fermentation</i>)	6
1.2.2 Fermentasi Terendam	7
1.2.3 Fermentasi Alami atau Fermentasi Spontan	7
1.2.4 <i>Backslopping</i>	8
1.2.5 Fermentasi dengan Kultur Terkontrol.....	8
1.3 Fermentasi Pangan	9
1.4 Jenis-jenis Pangan Fermentasi	10
1.4.1 Produk Fermentasi berbasis Biji-bijian/Kacang-kacangan dan Sereal.....	10
1.4.2 Produk Pangan Fermentasi Berbasis Buah dan Sayur.....	11
1.4.3 Produk Pangan Fermentasi Berbasis Susu	12

1.4.4	Produk Fermentasi Berbasis Ikan	13
1.4.5	Produk Fermentasi Berbasis Daging	14
1.4.6	Produk Fermentasi Berbasis Umbi-umbian	15
1.5	Manfaat Fermentasi terhadap Pengawetan Pangan	16
1.5.1	Pengawetan oleh Fermentasi Laktat	17
1.5.2	Pengawetan oleh Fermentasi Asetat	20
	Daftar Pustaka	20
2.	KULTUR <i>STARTER</i>	27
2.1	Perkembangan Kultur <i>Starter</i>	27
2.2	Teknik Isolasi Mikroba untuk Pengembangan Kultur <i>Starter</i>	29
2.3	Pengawetan Kultur <i>Starter</i>	31
2.3.1	Pengawetan Kultur dengan Pendinginan.	32
2.3.2	Pengawetan Kultur dengan Pembekuan.....	32
2.3.3	Pengawetan Kultur dengan Pengeringan.....	33
2.3.4	Pengawetan Kultur dengan Pengering Semprot	34
2.3.5	Pengawetan Kultur dengan Pengeringan Beku.....	35
2.4	Jenis Kultur <i>Starter</i>	36
2.4.1	Kultur <i>Starter</i> Tradisional/Alami.....	36
2.4.2	Kultur <i>Starter</i> dengan Galur Campuran (<i>Mixed Strain Starter</i> /MSS)	37
2.4.3	Kultur <i>Starter</i> dengan Galur Terdefinisi (<i>Defined Strain Starter</i> /DSS).....	37
2.5	Kultur <i>Starter</i> Bakteri Asam Laktat (BAL)	38
2.5.1	Kultur <i>Starter</i> Yoghurt	40
2.5.2	Mikrobiologi <i>Starter</i> Yoghurt.....	41
2.6	Kultur <i>Starter</i> Khamir	43
2.6.1	Ragi Roti (<i>Baker Yeast</i>)	44

2.7	Kultur <i>Starter</i> Kapang.....	45
2.7.1	Kultur <i>Starter</i> Tempe.....	47
2.8	Kultur <i>Starter</i> Bakteri Asam Asetat.....	51
2.8.1	Kultur <i>Starter Nata de coco</i>	52
2.9	Kultur <i>Starter</i> Campuran	53
2.9.1	Ragi Tape	53
2.9.2	Kultur <i>Starter</i> Kefir.....	56
2.9.3	Kultur <i>Starter</i> Kombucha	58
	Daftar Pustaka	60
3.	FERMENTASI ALKOHOL.....	69
3.1	Khamir dalam Fermentasi Pangan.....	69
3.1.1	Metabolisme Khamir.....	72
3.2	Tape	73
3.2.1	Deskripsi Tape.....	73
3.2.2	Fermentasi Tape	74
3.2.3	Mikrobiologi Tape.....	77
3.2.4	Perubahan Kimia.....	79
3.3	Brem dan Sake.....	80
3.3.1	Deskripsi Brem Bali dan Sake.....	80
3.3.2	Fermentasi Brem Bali dan Sake	81
3.3.3	Brem Padat.....	82
3.4	Tuak	84
3.4.1	Deskripsi Tuak	84
3.4.2	Fermentasi dan Mikrobiologi Tuak.....	85

3.5 Roti yang Dikembangkan dengan Khamir	88
3.5.1 Deskripsi.....	88
3.5.2 Fermentasi, Perubahan Kimia, dan Mikroorganisme yang Terlibat	88
Daftar Pustaka	91
4. FERMENTASI ASETAT	97
4.1 Bakteri Asam Asetat dalam Fermentasi Pangan	97
4.2 Metabolisme Asam Asetat	100
4.3 Vinegar (Cuka Fermentasi)	101
4.3.1 Deskripsi.....	101
4.3.2 Fermentasi Vinegar	102
4.3.3 Mikroorganisme yang Terlibat dalam Produksi Vinegar.....	105
4.3.4 Manfaat Vinegar bagi Kesehatan	106
4.4 Kombucha	106
4.4.1 Deskripsi.....	106
4.4.2 Fermentasi Kombucha	107
4.4.3 Mikroorganisme yang Terlibat dalam Produksi Kombucha..	109
4.4.4 Perubahan Kimia Selama Fermentasi Kombucha.....	110
4.4.5 Manfaat Kombucha bagi Kesehatan	111
4.5 <i>Nata de Coco</i>	111
4.5.1 Deskripsi produk.....	111
4.5.2 Fermentasi <i>Nata de coco</i>	113
4.5.3 Mikroorganisme dan Pembentukan Selulosa	116
4.5.4 Manfaat <i>Nata de coco</i> bagi Kesehatan.....	117
Daftar Pustaka	117

5. FERMENTASI ASAM LAKTAT	123
5.1 Bakteri Asam Laktat dalam Fermentasi Pangan	123
5.1.1 Metabolisme Asam Laktat	127
5.2 Susu Fermentasi Asam Laktat	128
5.2.1 Yoghurt	130
5.2.2 Kefir	134
5.2.3 Keju	139
5.3 Sayuran Fermentasi	142
5.3.1 <i>Sauerkraut</i>	143
5.3.2 Tempoyak	147
5.3.3 Mandai	151
5.3.4 Kimci	154
5.3.5 Sawi Asin	158
5.4 Daging Fermentasi	161
5.4.1 Deskripsi Produk	161
5.4.2 Proses Fermentasi	162
5.4.3 Mikrobiologi Fermentasi Sosis	163
5.4.4 Perubahan Kimia	164
5.4.5 Manfaat Kesehatan	165
Daftar Pustaka	165
6. FERMENTASI KAPANG	175
6.1 Kapang pada Fermentasi Pangan	175
6.1.1 Karakteristik Kapang	176
6.2 Tempe	179
6.2.1 Deskripsi	179
6.2.2 Fermentasi	181
6.2.3 Mikrobiologi	184

6.2.4	Perubahan Kimia.....	186
6.2.5	Manfaat Kesehatan.....	186
6.3	Tempe Non-Kedelai.....	188
6.3.1	Tempe Koro Benguk.....	189
6.3.2	Tempe Koro Pedang.....	191
6.3.3	Tempe Gembus.....	192
6.4	Oncom.....	193
6.4.1	Deskripsi.....	193
6.4.2	Fermentasi Oncom dan Mikroorganisme yang Berperan.....	194
6.4.3	Perubahan Kimia.....	196
6.4.4	Manfaat Kesehatan.....	196
6.5	Kecap.....	197
6.5.1	Deskripsi.....	197
6.5.2	Fermentasi.....	199
6.5.3	Mikrobiologi.....	200
6.5.4	Perubahan Kimia.....	201
6.6	Tauco.....	202
6.6.1	Deskripsi.....	202
6.6.2	Fermentasi dan Mikroorganisme.....	203
6.6.3	Perubahan Kimia.....	204
6.6.4	Manfaat Kesehatan.....	205
6.7	Angkak.....	205
6.7.1	Deskripsi.....	205
6.7.2	Fermentasi dan Mikroorganisme yang Berperan.....	206
6.7.3	Manfaat Kesehatan.....	209

6.8	Kapang pada Fermentasi Keju.....	210
6.8.1	Keju Camembert.....	212
6.8.2	Mikrobiologi.....	213
	Daftar Pustaka	215
7.	FERMENTASI GARAM.....	225
7.1	Mikroorganisme Halofilik dalam Fermentasi Pangan	225
7.2	Mikrobiologi Fermentasi Ikan dengan Garam Tinggi.....	227
7.3	Terasi.....	229
7.3.1	Deskripsi.....	229
7.3.2	Fermentasi Terasi.....	230
7.3.3	Mikroorganisme.....	232
7.3.4	Perubahan Kimia.....	233
7.4	Kecap Ikan.....	234
7.4.1	Deskripsi.....	234
7.4.2	Fermentasi.....	235
7.4.3	Mikroorganisme.....	236
7.4.4	Perubahan Kimia.....	237
7.5	Peda.....	238
7.5.1	Deskripsi.....	238
7.5.2	Perubahan Kimia dan Mikroba yang Terlibat Selama Proses Fermentasi.....	239
	Daftar Pustaka	241
8.	FERMENTASI UNTUK MENINGKATKAN MANFAAT KESEHATAN.....	247
8.1	Manfaat Kesehatan Pangan Fermentasi	247
8.2	Peran Mikroorganisme dalam Peningkatan Bioaktivitas Komponen Pangan	249

TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN

8.3	Probiotik dalam Pangan Fermentasi	251
8.3.1	Probiotik dan Manfaatnya.....	251
8.3.2	Biokonversi oleh Bakteri Saluran Cerna dan Probiotik dalam Meningkatkan Fungsi Senyawa Bioaktif.....	254
8.3.3	Pengembangan Pangan Fermentasi Probiotik	257
8.4	Komponen Bioaktif pada Pangan Fermentasi.....	260
8.4.1	Komponen Bioaktif pada Tempe	260
8.4.2	Komponen Bioaktif pada Susu Fermentasi	263
8.4.3	Pangan Fermentasi Lainnya.....	267
	Daftar Pustaka	269
	BIODATA PENULIS BUKU	277

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Laru tempe dengan substrat onggok dan nasi	49
Gambar 2.2	Usar dengan substrat kacang kedelai.....	51
Gambar 2.3	Proses pembuatan ragi tape secara tradisional (Nuraida dan Krusong 2014)	55
Gambar 3.1	Proses fermentasi alkohol	73
Gambar 3.2	Tape ketan (kiri) dan tape singkong (kanan).....	74
Gambar 3.3	Proses pembuatan tape ketan.....	76
Gambar 3.4	Proses pembuatan tape singkong	77
Gambar 3.5	Brem cair khas Bali	81
Gambar 3.6	Brem padat	83
Gambar 3.7	Proses pembuatan brem padat (Steinkraus 1983)	84
Gambar 3.8	Fermentasi alami pada proses pembuatan tuak	86
Gambar 4.1	Fermentasi asam asetat	100
Gambar 4.2	Diagram alir produksi vinegar (Budak <i>et al.</i> 2014)	104
Gambar 4.3	Kombucha dalam wadah toples kaca	107
Gambar 4.4	Diagram alir proses pembuatan kombucha (Purnami <i>et al.</i> 2018)	109
Gambar 4.5	Lapisan selulosa produk <i>Nata de coco</i>	112
Gambar 4.6	Diagram alir proses pembuatan <i>nata de coco</i> (Layuk <i>et al.</i> 2012)	113
Gambar 5.1	Jalur fermentasi glukosa pada bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif (Caplice dan Fitzgerald 1999).....	127
Gambar 5.2	Alur proses fermentasi <i>set yoghurt</i> dan <i>stirred yoghurt</i>	131

Gambar 5.3	Kefir dan granula kefir	136
Gambar 5.4	Alur produksi <i>sauerkraut</i> (Penas <i>et al.</i> 2017)	144
Gambar 6.1	Tempe kedelai	180
Gambar 6.2	Proses pembuatan tempe dengan dua kali perebusan	182
Gambar 6.3	Tempe koro benguk	190
Gambar 6.4	Tempe Canavalia.....	191
Gambar 6.5	Tempe gembus.....	193
Gambar 6.6	Oncom merah.....	195
Gambar 6.7	Oncom Hitam	195
Gambar 6.8	Diagram alir pembuatan kecap manis kedelai (Meutia 2015).....	199
Gambar 6.9	Tauco	204
Gambar 6.10	Angkak.....	207
Gambar 7.1	Terasi	230
Gambar 7.2	Proses pembuatan terasi	232
Gambar 7.3	Ikan peda	240

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Produk pangan fermentasi berbasis biji-bijian, kacang-kacangan (Sanlier <i>et al.</i> 2017).....	11
Tabel 1.2	Produk pangan fermentasi berbasis buah dan sayuran	12
Tabel 1.3	Produk pangan fermentasi berbasis susu.....	13
Tabel 1.4	Produk fermentasi berbasis ikan dan mikroba yang terlibat.....	14
Tabel 2.1	Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai kultur <i>starter</i> untuk fermentasi susu dan daging (Bintsis 2018).....	40
Tabel 2.2	Karakteristik umum bakteri <i>S. thermophilus</i> dan <i>Lb. bulgaricus</i> (Tamime dan Robinson 1999)	42
Tabel 2.3	Peranan mikroba pada ragi tape (Saono <i>et al.</i> 1974).....	56
Tabel 4.1	Bakteri Asam Asetat yang ditemukan pada berbagai minuman fermentasi (Lynch <i>et al.</i> 2019).	99
Tabel 4.2	Mikroorganisme dalam kultur kombucha	110
Tabel 5.1	Pangan fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat (Ali <i>et al.</i> 2010)	126
Tabel 6.1	Komposisi nilai gizi tempe dihitung per 100 g, dengan Berat Dapat Dimakan (BDD) 100 %.....	187
Tabel 6.2	Komposisi nilai gizi aneka tempe nonkedelai dihitung per 100 g, dengan Berat Dapat Dimakan (BDD) 100%	189
Tabel 6.3	Komposisi gizi pangan oncom dihitung per 100 g, dengan Berat Dapat Dimakan (BDD) 100 %.....	197
Tabel 6.4	Komposisi gizi tauco dihitung per 100 g, dengan Berat Dapat Dimakan (BDD) 100 %	205
Tabel 7.1	<i>Archaea</i> halofilik pada berbagai pangan fermentasi (Lee 2013) ..	228
Tabel 7.2	Mikroorganisme yang ditemukan pada berbagai produk fermentasi perikanan di Asia Tenggara (Narzary <i>et al.</i> 2021)	228

2. KULTUR *STARTER*

2.1 Perkembangan Kultur *Starter*

Kultur *starter* adalah sediaan mikroorganisme hidup yang digunakan untuk memulai proses fermentasi, mengubah komposisi kimia, menghasilkan senyawa spesifik, dan mengubah karakteristik sensori substrat. Kultur *starter* dapat terdiri dari bakteri, khamir, atau kapang, atau campuran lebih dari dua jenis mikroorganisme, tergantung dari produk fermentasi yang akan dibuat. Kultur *starter* digunakan untuk memulai proses fermentasi berbagai produk pangan seperti yoghurt, kefir, keju, *nata de coco*, keju, tempe, dan tape. Perubahan yang terjadi sebagai hasil dari proses fermentasi mencakup perbaikan nilai gizi, kualitas sensori, dan keawetan produk. Dengan penambahan kultur *starter*, proses fermentasi dapat menghasilkan produk dengan kualitas yang konsisten.

Proses fermentasi secara tradisional dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme yang berada pada bahan baku. Fermentasi tradisional juga dapat dilakukan dengan menginokulasikan produk fermentasi yang sudah jadi (*backslopping*) atau dengan menggunakan wadah yang digunakan berulang kali tanpa dilakukan pembersihan, sehingga mikroorganisme yang menempel atau berada pada pori-pori wadah akan memulai proses fermentasi. Metode tradisional ini masih dilakukan untuk produk-produk fermentasi tertentu, misalnya



fermentasi *sauerkraut*, kimchi, dan pangan-pangan tradisional lainnya, meski seringkali terjadi kegagalan dan kualitas produk yang dihasilkan tidak konsisten. Untuk industri fermentasi besar dan modern, perlu dilakukan penjaminan kualitas sehingga kegagalan produk dapat dicegah. Oleh karena itu, perlu dilakukan penambahan kultur *starter* untuk memulai proses fermentasi.

Pada pertengahan abad ke-19, industrialisasi pangan fermentasi dan penemuan mikroorganisme memiliki dampak yang nyata terhadap pengembangan produk fermentasi. Proses fermentasi juga dilakukan dengan menggunakan kultur yang tetap atau telah ditentukan (Kandasamy *et al.* 2018). Beberapa kelompok mikroorganisme seperti kapang dan bakteri asam laktat (BAL) berperan penting pada berbagai pangan fermentasi, termasuk fermentasi susu, daging, roti, buah-buahan, dan sayuran. Meskipun terdapat peningkatan penggunaan teknologi yang canggih pada proses produksi skala besar, fermentasi tradisional masih diterapkan karena keunggulan aroma dan *flavor* yang dihasilkan pada fermentasi tradisional. Namun demikian, upaya-upaya untuk menggunakan kultur *starter* yang telah diketahui spesiesnya dan telah terbukti keunggulannya terus-menerus dilakukan untuk menjawab tantangan kebutuhan akan produk fermentasi yang semakin meningkat.

Kultur *starter* pada umumnya terdiri atas bakteri, khamir, dan kapang. Karakteristik kultur *starter* yang diinginkan di antaranya yaitu mampu mengasamkan dalam waktu singkat, memiliki aktivitas fermentasi sesuai dengan yang diharapkan, menghasilkan karakteristik sensori (aroma, konsistensi, rasa, dan tekstur), serta aman (Kandasamy *et al.* 2018). Produksi kultur *starter* dimulai pada awal tahun 1800-an oleh Emil Christian Hansen dan Christian D. E. Hansen, yang sampai saat ini terus berlanjut dan berkembang. Isolasi dan produksi kultur *starter* diinisiasi pada tahun 1890 dari keju dan susu asam di Denmark dan Jerman. Pada awalnya, kultur *starter* dibuat dalam proses fermentasi susu dengan menumbuhkan kultur murni pada susu steril. Kalsium karbonat seringkali ditambahkan untuk memelihara pH pada kondisi netral. Dikarenakan kultur cair memiliki umur simpan yang lebih pendek, untuk menjaga aktivitas dan viabilitas kultur *starter*, dikembangkan teknik pembekuan dan pengeringan kultur *starter*. Teknik pembuatan kultur *starter* kering yang paling banyak digunakan adalah teknik pengeringan beku.

Saat ini kultur *starter* dijual secara komersial dalam bentuk cair, beku, dan liofilisasi (dikeringkan dengan teknik pengeringan beku). Kultur *starter* juga telah diformulasikan sehingga memenuhi persyaratan fungsi kultur *starter*, meningkatkan nilai gizi, kualitas, dan keamanan produk fermentasi (Kandasamy *et al.* 2018). Proses produksi kultur *starter* mencakup pengembangan dan produksi kultur stok, penyiapan media, kultivasi kultur stok sampai mencapai densitas tertentu, pemanenan, peningkatan konsentrasi sel, serta pengawetan kultur untuk mempertahankan viabilitasnya yang dapat dilakukan dengan pembekuan atau pengeringan.

2.2 Teknik Isolasi Mikroba untuk Pengembangan Kultur *Starter*

Produksi kultur *starter* menargetkan terjadinya perbanyakkan galur spesifik atau mempertahankan populasi mikroorganisme yang penting untuk fermentasi. Untuk memperoleh kultur *starter* yang sesuai, diperlukan seleksi untuk memperoleh galur yang sesuai dengan substrat dan produk atau metabolit yang diinginkan. Mikroba hidup bebas di lingkungan, menyebar di udara, tanah, air, makanan, bahkan terdapat mikroba yang hidup dalam tubuh manusia. Mikroorganisme di alam ada yang bermanfaat seperti mikroba yang digunakan sebagai kultur *starter* dan ada yang bersifat merugikan seperti mikroba patogen dan pembusuk. Untuk membedakan mikroba yang bermanfaat dan mikroba yang merugikan, diperlukan teknik khusus untuk mengisolasi dan mengidentifikasi sebab mikroba tersebut berada dalam bentuk populasi campuran. Hal ini dapat diatasi dengan proses identifikasi melalui pemisahan populasi campuran dari lingkungannya. Pemisahan ini lebih dikenal dengan nama isolasi mikroba. Pengamatan terhadap mikroba tertentu hanya dapat dilakukan jika mikroba dipisahkan dari lingkungan dan mikroba lainnya yang dilakukan dengan teknik isolasi.

Teknik isolasi mikroba adalah upaya menumbuhkan mikroba di luar lingkungan alaminya dengan cara memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungannya sehingga diperoleh kultur murni (Nurtjahyani dan Shyntya 2014). Beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan dalam melakukan isolasi mikroba antara lain sifat jenis mikroba yang akan diisolasi, tempat hidup atau asal mikroba, media pertumbuhan yang tepat, cara menginokulasi mikroba, cara

menginkubasi mikroba, cara menguji bahwa mikroba yang terisolasi telah dalam bentuk kultur murni dan sesuai dengan apa yang dimaksudkan, serta bagaimana mempertahankan bahwa mikroba yang telah diisolasi tetap dalam bentuk kultur murni (Jufri 2020).

Kultur murni adalah suatu koloni yang berasal dari satu sel mikroorganisme atau bakteri. Pentingnya kultur murni dalam identifikasi mikroorganisme (bakteri) mengakibatkan cara-cara untuk memperoleh kultur menjadi sangat penting dalam bidang mikrobiologi. Metode isolasi yang digunakan disesuaikan dengan karakteristik hasil yang diinginkan, dan biasanya dilakukan pengayaan (Aqil *et al.* 2015). Pengayaan kultur dilakukan dengan tujuan menyeleksi mikroba, yaitu menumbuhkan bakteri yang menjadi target dan mengeliminasi bakteri yang tidak diinginkan (Bonnet *et al.* 2020). Proses isolasi melibatkan pengambilan sumber isolat yang mengandung populasi campuran dan memberikan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan jenis yang diinginkan, atau tidak cocok untuk pertumbuhan organisme lain, misalnya dengan penyediaan substrat tertentu atau dimasukkannya senyawa penghambat/inhibitor tertentu. Isolasi mikroorganisme dengan pengayaan pada kultur cair merupakan teknik yang berhasil meningkatkan jumlah mikroorganisme yang diinginkan atau mengoptimalkan pertumbuhan mikroorganisme yang lambat sehingga menjadi lebih mudah diisolasi.

Pengembangan kultur merupakan proses yang selalu dilakukan oleh industri fermentasi untuk meningkatkan produktivitas dan menghasilkan produk yang lebih konsisten. Teknik isolasi dapat diterapkan untuk memperoleh mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi alami. Banyak galur yang digunakan sebagai kultur *starter* dalam industri fermentasi berasal dari alam dan dipilih sebagai kultur *starter* setelah melalui tahapan seleksi. Mikroorganisme tersebut dapat dipilih untuk digunakan sebagai kultur *starter* pada proses fermentasi terkontrol sehingga dapat diperoleh kualitas produk yang lebih konsisten. Sebagai contoh, bakteri asam laktat (BAL) banyak ditemukan pada produk fermentasi susu, daging, ikan, sayuran, dan buah-buahan. Pada mulanya produk fermentasi ini dibuat dengan fermentasi alami atau *backslopping*. Keberhasilan fermentasi alami sangat tergantung dari keberadaan mikroorganisme yang diinginkan pada bahan baku, sedangkan fermentasi dengan *backslopping* tergantung dari dominasi

mikroorganisme pada produk terdahulu. Saat ini banyak produk fermentasi yang diproduksi dengan melibatkan BAL sebagai kultur *starter* yang telah diketahui spesiesnya dan karakteristiknya (Bintsis 2018).

2.3 Pengawetan Kultur *Starter*

Pada mulanya kultur *starter* dipersiapkan sebelum digunakan dalam bentuk cair dengan menumbuhkan bakteri pada susu steril (Kandasamy *et al.* 2018). Kultur ini lebih cepat rusak dan inaktif karena tingginya kadar asam yang terbentuk, sehingga kultur kehilangan viabilitasnya selama penyimpanan. Viabilitas diartikan sebagai kemampuan suatu isolat untuk tumbuh kembali. Dengan kata lain, penyimpanan mikroba dimaksudkan untuk memperpanjang umur mikroba dengan viabilitas yang tetap terpelihara. Kelemahan kultur *starter* segar adalah tidak bisa disimpan dalam jangka waktu lama, sehingga diperlukan metode pengawetan untuk mempertahankan viabilitas kultur yang hendak disimpan dalam jangka waktu yang lama. Penambahan kalsium karbonat untuk menetralkan asam tidak mengatasi permasalahan viabilitas selama penyimpanan. Chotiah (2006) menyatakan perlunya penyimpanan mikroba secara tepat agar mikroba tetap hidup dan stabil secara genetik, namun juga ekonomis. Permasalahan ini diatasi dengan pengeringan kultur *starter*. Saat ini kultur *starter* dipersiapkan dalam skala komersial sebagai sediaan dalam bentuk kering dengan proses pengeringan beku.

Secara umum, pengawetan kultur bertujuan mereduksi laju metabolisme mikroorganisme sedemikian sehingga viabilitasnya tetap terjaga, serta dapat ditumbuhkan kembali (*recovery*) dan bertahan (*survive*) dengan perubahan minimal (Wang *et al.* 2014). Pengawetan kultur memungkinkan tersedianya kultur stok dengan kualitas terbaik yang akan digunakan untuk menghasilkan kultur komersial.

Jenis-jenis metode pengawetan kultur memiliki kelebihan dan kelemahan masing-masing. Secara tradisional pengawetan kultur dilakukan dengan mentransfer kultur ke dalam medium segar secara periodik. Periode pemindahan kultur bervariasi antar mikroorganisme. Metode ini berisiko terjadinya kontaminasi, mutasi, dan hilangnya viabilitas. Pengawetan dengan cara subkultur harus mempertimbangkan medium yang sesuai, suhu penyimpanan, dan frekuensi

pembaruan kultur ke dalam medium segar. Metode pengawetan menggunakan teknik pendinginan, pembekuan, pengeringan, pengering beku, dan pengeringan dengan pengering semprot adalah teknik yang paling kerap digunakan untuk pengawetan kultur. Aplikasi pengawetan dengan pembekuan atau pengeringan mengurangi proses subkultur yang dapat mengurangi biaya penyiapan dan infeksi oleh bakteriofag (Peighambardousta *et al.* 2011). Teknologi pengawetan kultur yang dipilih harus mempertimbangkan hal berikut (Foerst dan Santivarngkna 2015): i) Viabilitas harus maksimal setelah proses pengawetan; ii) Aktivitas metabolisme harus tinggi, misalnya kemampuan memproduksi asam, kecepatan melakukan fermentasi, dan fase lag harus pendek; iii) Stabilitas selama penyimpanan; dan iv) Penanganan harus mudah.

2.3.1 Pengawetan Kultur dengan Pendinginan.

Penyimpanan kultur pada suhu dingin merupakan metode penyimpanan kultur jangka pendek karena memerlukan pemindahan kultur ke dalam medium baru. Untuk mengurangi laju metabolisme, kultur disimpan pada suhu 4—8 °C. Kondisi ideal untuk penyimpanan jangka pendek ini adalah penggunaan medium yang sesuai, suhu penyimpanan yang ideal, dan frekuensi antar transfer. Jangka waktu pemindahan kultur yang disimpan dingin tergantung dari jenis kulturnya, yang bervariasi antara 1 sampai 5 bulan. Kekurangan utama dari pemindahan kultur yang berulang adalah risiko kontaminasi, kesalahan pelabelan, mutasi, kehilangan viabilitas dan memerlukan ruangan untuk penyimpanan (Gherna dan Reddy 2007)

2.3.2 Pengawetan Kultur dengan Pembekuan

Secara umum, mikroba mempunyai kemampuan mempertahankan viabilitas sel lebih tinggi pada suhu penyimpanan yang lebih rendah. Pengawetan bakteri dapat dilakukan dengan pembekuan pada suhu -20 °C menggunakan *freezer* biasa. Pada suhu tersebut, beberapa bakteri dapat mempertahankan viabilitasnya selama 6 bulan sampai 2 tahun (Gherna dan Reddy 2007). Akan tetapi, proses pendinginan dengan suhu di bawah titik beku air (0 °C) mengakibatkan terbentuknya kristal es ekstraseluler (di dalam medium suspensi) dan intraseluler (di dalam sel). Oleh karena itu, dinding sel mikroba dan membran sel menjadi

rusak dan cairan intra sel keluar akibat peningkatan konsentrasi solut dalam larutan. Salah satu upaya pencegahan terbentuknya kristal es adalah dengan pemberian senyawa yang bersifat anti beku (*cryoprotectant*). Krioprotektan dapat diklasifikasikan menjadi krioprotektan yang tidak berpenetrasi dan krioprotektan yang berpenetrasi ke dalam sel. Krioprotektan yang berpenetrasi merupakan krioprotektan yang ideal. Senyawa krioprotektan melindungi sel dengan menurunkan titik beku, mendukung pembentukan ikatan hidrogen, dan menghambat pembentukan kristal es (Prakash *et al.* 2013). Gliserol (10–15%) dan dimetil sulfoksida (DMSO) (5%) sering digunakan sebagai krioprotektan dan memiliki sifat berpenetrasi ke dalam sel (Prakash *et al.* 2013).

Pengawetan pada suhu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ dapat mengawetkan mikroorganisme lebih lama dibandingkan dengan pembekuan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suhu rendah melindungi denaturasi dan kerusakan protein dan DNA serta memperlambat keluarnya air dari dalam sel sehingga dengan suhu yang lebih rendah dapat melindungi sel lebih lama (Prakash *et al.* 2013). Pembekuan pada suhu ini juga memerlukan senyawa krioprotektif, seperti gliserol dengan konsentrasi 15% atau DMSO (dimetil sulfoksida) 10%. Dengan penyimpanan pada suhu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, kultur bakteri dapat disimpan bertahun-tahun (Gherna dan Reddy 2007). Pengawetan kultur pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tidak direkomendasikan untuk jangka panjang. Penyimpanan pada suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ cukup melindungi mikroorganisme yang disimpan lama. Kondisi ideal adalah penyimpanan pada suhu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ karena peluang untuk terjadi mutasi pada suhu tersebut hampir nol (Prakash *et al.* 2013). Pengawetan kultur dengan pembekuan memiliki kelemahan pada saat transportasi sehingga membatasi distribusi pada area yang jauh, dan terdapat risiko saat *thawing* (Peighambardousta *et al.* 2011).

2.3.3 Pengawetan Kultur dengan Pengeringan

Beberapa kultur terutama spora bakteri dapat disimpan dalam kondisi kering pada medium yang sesuai. Berbagai media telah digunakan untuk pengeringan dan penyimpanan kultur kering, antara lain tanah, kertas saring, gelatin, dan gel silika (Gherna dan Reddy 2007). Metode pengeringan yang dilakukan antara lain dengan pengeringan di udara atau dengan menggunakan desikator. Pengeringan dengan sinar matahari adalah cara yang banyak dilakukan untuk pengeringan kultur *starter* tradisional, seperti pada pembuatan laru tempe atau ragi tape.

Metode pengeringan yang banyak digunakan untuk pengawetan kultur adalah pengeringan beku. Metode pengeringan lainnya adalah pengering semprot dan pengeringan dengan oven vakum. Pengeringan dengan oven vakum merupakan metode pengeringan dengan suhu sedang karena terjadi penurunan tekanan dan penurunan titik didih air (Foerst dan Santivarangkna 2015). Pengeringan vakum dilakukan dengan proses pengeringan konduktif di mana panas ditransfer via konduksi. Titik didih air diturunkan dengan mengurangi tekanan sehingga memungkinkan pengeringan dilakukan pada suhu rendah. Kerusakan sel selama pengeringan vakum terjadi karena proses dehidrasi sehingga pengeringan dengan vakum dapat menghasilkan kultur kering dengan viabilitas tinggi (Foerst dan Santivarangkna 2015).

2.3.4 Pengawetan Kultur dengan Pengering Semprot

Pengering semprot merupakan salah satu metode untuk pengawetan kultur *starter* bakteri asam laktat dan probiotik yang akan disimpan untuk jangka waktu lama (Peighambardousta *et al.* 2011). Keuntungan penggunaan pengering semprot adalah produk akan menjadi kering tanpa menyentuh permukaan logam yang panas, temperatur produk akhir rendah walaupun temperatur pengering relatif tinggi, waktu pengeringan singkat, dan produk akhir berupa bubuk bersifat stabil sehingga mudah untuk ditangani dan ditransportasikan. Namun dibandingkan dengan kultur kering beku, pengeringan semprot tidak digunakan secara luas pada produk kultur *starter* komersial karena ketahanan kultur *starter* dan stabilitas selama penyimpanan yang rendah (Peighambardousta *et al.* 2011).

Terdapat dua mekanisme yang menginaktivkan kultur *starter* dengan pengeringan semprot, yaitu inaktivasi karena dehidrasi dan inaktivasi karena paparan terhadap suhu tinggi selama pengeringan (Peighambardousta *et al.* 2011). Pada proses pengeringan beku, kultur *starter* biasanya dicampur dengan bahan pengisi atau pembawa, atau dikombinasikan dengan teknik enkapsulasi, yaitu teknik penyalutan suatu bahan sehingga bahan yang disalut dapat dilindungi dari pengaruh lingkungan. Enkapsulasi bakteri dapat memberikan kondisi yang mampu melindungi dari pengaruh lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti panas pada pengeringan semprot. Susu skim adalah salah satu bahan penyalut yang umum digunakan, terutama sebagai penyalut matriks untuk

kultur *starter* produk pangan (Victor dan Heldman 2001). Jenis dan konsentrasi pembawa memengaruhi ketahanan kultur *starter* yang dikeringkan dengan pengering semprot. Meski demikian, semakin tinggi konsentrasi bahan pembawa, proses pengeringan yang diperlukan akan semakin lama. Kultur *starter* akan terpapar pada panas yang cukup lama sehingga berakibat pada turunnya viabilitas (Peighambardousta *et al.* 2011). Selain itu, respons setiap mikroorganisme juga berbeda sehingga diperlukan pemilihan enkapsulat atau bahan pembawa yang sesuai untuk masing-masing mikroorganisme. Susu skim rekonstitusi pada konsentrasi 20% merupakan media pembawa yang sesuai untuk proses pengeringan semprot kultur bakteri asam laktat (Peighambardousta *et al.* 2011).

2.3.5 Pengawetan Kultur dengan Pengeringan Beku

Pengeringan beku merupakan cara yang banyak digunakan saat ini. Pengeringan beku merupakan teknik yang umum digunakan untuk mengawetkan kultur dan untuk produksi konsentrat kultur *starter*. Pengawetan kultur dengan pengeringan beku tidak memerlukan suhu dingin untuk distribusi kultur *starter*. Berbagai mikroba seperti khamir, serta probiotik seperti *Lactobacillus* dan spesies *Bifidobacterium* telah berhasil diawetkan dengan pengeringan beku (Biavati *et al.* 2000). Selama proses pengeringan beku, air akan diuapkan tanpa melalui fase cair atau dengan mengeringkan kultur *starter* pada kondisi beku (sublimasi) (Ghera dan Reddy 2007). Dengan cara ini, sel-sel kering dapat disimpan untuk waktu yang lama jika dijauhkan dari oksigen, kelembapan, dan cahaya. Mikroba dapat dengan mudah direhidrasi serta ditumbuhkan kembali seperti keadaan sebelumnya.

Kerusakan atau penurunan ketahanan sel dapat terjadi selama proses pengawetan kultur menggunakan metode pengeringan beku. Proses pembekuan pada pengeringan beku menyebabkan terpaparnya sel pada suhu kriogenik yang menyebabkan pembentukan kristal es dalam medium dan di dalam sel. Hal ini menyebabkan ketidakseimbangan osmosis yang menginduksi perubahan biofisik dan biokimia seperti kerusakan organel dan membran kehilangan integritasnya (Prakash *et al.* 2013). Inaktivasi kultur kering beku terjadi terutama selama proses pembekuan. Pembekuan dan pengeringan merupakan proses yang sama dalam hal menyebabkan stres karena A_w rendah. Pada suhu -10°C sampai -15°C ,

sitoplasma umumnya belum membeku, kristal es ekstraseluler terbentuk dulu dan menyebabkan solut terkonsentrasi. Hal ini menyebabkan peningkatan tekanan osmosis yang menyebabkan migrasi air dari sitoplasma keluar sel (Santivarangkna *et al.* 2008). Stabilitas kultur *starter* selama pengeringan beku dan penyimpanan dapat diperbaiki dengan penambahan senyawa krioprotektan (*cryoprotectant*). Pada umumnya senyawa krioprotektan adalah disakarida non-pereduksi, gula alkohol, polisakarida, asam amino, protein, adonitol, betain, gliserol, laktosa, susu skim, dan dimetil sulfoksida. Bagad *et al.* (2017) menyatakan bahwa susu skim, gliserol, dan berbagai gula memiliki efek perlindungan yang lebih baik. Sukrosa, laktosa dan susu skim meningkatkan viabilitas *Lactobacillus rhamnosus* setelah pengeringan beku dan susu skim memberi perlindungan terbaik ketika BAL tersebut dipaparkan pada pH rendah dan garam empedu (Puspawati *et al.* 2010).

2.4 Jenis Kultur *Starter*

Kandasamy *et al.* (2018) mengelompokkan kultur *starter* ke dalam tiga kelompok, yaitu: 1) kultur *starter* tradisional/alami; 2) kultur *starter* dengan galur campuran (*Mixed Strain Starter*/MSS); dan 3) kultur *starter* dengan galur terdefinisi (*Defined Strain Starter*/DSS).

2.4.1 Kultur *Starter* Tradisional/Alami

Produksi kultur *starter* alami dimulai pada zaman prasejarah dengan menggunakan teknik *backslopping* (menginokulasi bahan baku/substrat segar dengan hasil fermentasi sebelumnya), atau dengan cara mengatur kondisi inkubasi seperti pH dan suhu. Selama proses pertumbuhan kultur *starter*, tidak ada pengendalian untuk mencegah terjadinya kontaminasi dari bahan baku dan lingkungan yang diperlukan untuk menjamin keamanan dan kualitas kultur *starter*. Kondisi ini menyebabkan kultur *starter* alami mengandung berbagai jenis mikroorganisme.

Kultur *starter* alami yang mengandung berbagai galur mikroorganisme memiliki keunggulan dalam aroma dan senyawa antimikroba yang dihasilkan, serta lebih tahan terhadap bakteriofag. Di antara strain yang tumbuh pada kultur *starter* alami juga dapat terjadi interaksi yang menguntungkan, misalnya produksi asam

menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan produksi galur individu. Contoh dari kultur *starter* alami adalah ragi tape atau laru tempe yang diperbanyak oleh industri rumah tangga.

2.4.2 Kultur *Starter* dengan Galur Campuran (*Mixed Strain Starter/MSS*)

Kultur *starter* dengan galur campuran (*mixed-strain starter/MSS*) diperoleh dari kultur *starter* alami dengan kualitas sangat baik yang dikultivasi, kemudian diawetkan pada kondisi terkontrol. Kultur *starter* jenis MSS biasanya diproduksi oleh suatu perusahaan untuk digunakan oleh industri produk fermentasi. Seperti halnya kultur *starter* alami, MSS mengandung mikroorganisme yang memiliki karakteristik fisiologi dan teknologi yang beragam.

2.4.3 Kultur *Starter* dengan Galur Terdefinisi (*Defined Strain Starter/DSS*)

DSS terdiri atas satu atau lebih kultur yang diinginkan, diawetkan, dan ditumbuhkan. DSS umumnya diproduksi oleh perusahaan dengan spesialisasi memproduksi kultur *starter*. Jenis dan jumlah galur serta jumlah sel pada kultur *starter* DSS teridentifikasi dengan jelas. Karena yang digunakan pada kultur *starter* ini hanya beberapa galur, DSS memiliki kelemahan dapat terserang bakteriofag yang menyebabkan kultur *starter* menjadi inaktif, misalnya produksi asam oleh BAL menjadi terganggu. Dalam mengembangkan kultur *starter* jenis DSS, dilakukan karakterisasi masing-masing individu spesies atau galur sehingga dapat diperoleh campuran strain yang paling sesuai dengan tujuan produk yang akan dihasilkan. Kelemahan lain dari penggunaan kultur *starter* dengan galur yang terdefinisi adalah kurang kayanya *flavor* dan aroma yang dihasilkan pada produk fermentasi. Untuk mengatasi hal ini, seringkali kultur *starter* DSS digunakan bersamaan dengan kultur *starter* tradisional/alami, sehingga diperoleh *flavor* dan aroma seperti halnya dari fermentasi alami.

2.5 Kultur *Starter* Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang heterogen dan berperan penting dalam fermentasi pangan. Karakteristik umum BAL yaitu merupakan bakteri Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang atau koki, serta memproduksi asam laktat sebagai komponen metabolit utama dari karbohidrat. Pada mulanya BAL terdiri atas 4 genera, yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Streptococcus*. Pada sistem taksonomi yang baru, keempat genera ini membentuk genera-genera baru, antara lain *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella* (Bintsis 2018).

BAL memfermentasi karbohidrat menjadi asam laktat, dan memiliki aktivitas proteolitik dan lipolitik. Selain menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utama, BAL juga menghasilkan alkohol, asam asetat, aldehid, ester, serta senyawa-senyawa aromatik yang berperan dalam membentuk tekstur, aroma, dan *flavor*, memperpanjang umur simpan, serta memberi manfaat kesehatan (Bintsis 2018, Hatti-Kaul *et al.* 2018). Produksi bakteriosin oleh BAL menyebabkan kultur *starter* BAL digunakan sebagai pengawet alami (*bio-preservative*). Sebagai kultur *starter*, BAL memproduksi eksopolisakarida (EPS) yang dapat berperan terhadap tekstur susu fermentasi (Hatti-Kaul *et al.* 2018).

BAL diaplikasikan sebagai kultur *starter* pada berbagai produk fermentasi susu misalnya keju, yoghurt dan produk sejenisnya, kefir dan lain sebagainya, fermentasi daging, ikan, buah-buahan, sayuran, sereal, dan umbi-umbian. Dibandingkan kelompok mikroorganisme yang lain, BAL merupakan kelompok yang paling banyak ditemukan pada pangan fermentasi. Wu *et al.* (2017) menyatakan bahwa pertumbuhan BAL, kebutuhan nutrisi, dan produksi senyawa antimikroba sangat penting dalam menghambat mikroorganisme patogen dan pembusuk dalam proses fermentasi. Beberapa galur BAL terutama dari genus *Lactobacillus* diketahui memiliki manfaat kesehatan yang dikenal dengan probiotik sehingga BAL yang juga berfungsi sebagai probiotik saat ini sering digunakan sebagai kultur *starter*.

Kultur *starter* BAL dapat dikelompokkan menjadi kultur *starter* mesofilik dan termofilik. Kultur *starter* mesofilik tumbuh dan menghasilkan asam pada suhu sedang (30 °C), sedangkan kultur *starter* termofilik tumbuh pada suhu lebih tinggi (42 °C) (Kandasamy *et al.* 2018). Contoh kultur *starter* mesofilik yaitu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lb. lactis* subsp. *cremoris* dan *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, sedangkan kultur *starter* termofilik mencakup *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, dan *Streptococcus thermophilus*.

Bakteri asam laktat digunakan sebagai kultur *starter* dalam bentuk tunggal atau kombinasi. Suleiman (2017) menyatakan bahwa kultur *starter* bakteri asam laktat yang baik harus memiliki karakteristik antara lain: 1) dapat memproduksi asam laktat yang cukup dengan kecepatan yang sesuai dengan kecepatan produksi, dan dapat memproduksi produk fermentasi dengan kualitas yang baik; 2) memproduksi asam pada kisaran suhu yang lebar; 3) resisten terhadap antibiotik dan bakteriofag (virus yang menyerang bakteri); 4) aktif pada keberadaan senyawa penghambat, misalnya residu bahan kimia, sanitaiser, dan detergen pada susu; 5) diharapkan dapat memproduksi bakteriosin atau senyawa serupa dengan bakteriosin, yaitu peptida yang memiliki aktivitas antimikroba; 6) memproduksi *flavor*, aroma, dan konsistensi yang diinginkan; 7) tidak menghasilkan senyawa yang dapat merusak produk, misalnya lendir, atau senyawa lainnya yang merusak *flavor*, aroma, dan tekstur; 8) jika menggunakan kultur campuran, masing-masing kultur individu harus saling bersinergi untuk menghasilkan aroma dan *flavor*; serta 9) kultur campuran harus stabil dan dapat disubkulturkan dalam persiapan kultur *starter* berikutnya. Pada Tabel 2.1 berikut disajikan kultur *starter* BAL yang digunakan pada berbagai produk fermentasi pangan (Bintsis 2018).

Tabel 2.1 Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai kultur *starter* untuk fermentasi susu dan daging (Bintsis 2018)

Produk	BAL
Keju (<i>starter</i> mesofilik)	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Keju (<i>starter</i> termofilik)	<i>S. thermophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>
Keju (<i>mixed starter</i>)	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>S. thermophilus</i>
Yoghurt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>
Acidophilus milk	<i>Lb. acidophilus</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i>
<i>Butter</i> dan <i>buttermilk</i>	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Salami Milano	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Sosis	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i>

2.5.1 Kultur *Starter* Yoghurt

Yoghurt merupakan salah satu hasil olahan susu yang diperoleh dari proses fermentasi menggunakan bakteri asam laktat (BAL). Salah satu faktor penting yang akan menentukan mutu yoghurt adalah komposisi dan persiapan kultur *starter*. Komposisi dan persiapan kultur *starter* mempunyai peranan penting dalam proses asidifikasi dan fermentasi susu yang akan berpengaruh terhadap kualitas hasil akhir yoghurt. Umumnya, produsen yoghurt menggunakan *starter* cair dalam proses fermentasinya.

Yoghurt dapat diartikan sebagai produk koagulasi susu yang dihasilkan melalui proses fermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL), *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, dengan penambahan bahan lain yang diizinkan. Dengan kata lain, yoghurt adalah produk susu yang diasamkan. Kedua jenis bakteri tersebut mampu mengubah sebagian laktosa menjadi asam laktat dan

memecah senyawa-senyawa protein menjadi asam-asam amino. Pengawetan kultur *starter* sangat penting dilakukan oleh industri yoghurt untuk menjaga ketersediaan stok kultur *starter* yoghurt pada proses produksi yang berkelanjutan.

2.5.2 Mikrobiologi *Starter* Yoghurt

Kultur *starter* yoghurt merupakan kombinasi *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*). Kombinasi bakteri ini akan bersimbiosis mutualisme saat proses fermentasi yoghurt berlangsung. *Lb. bulgaricus* akan menghasilkan asam amino dan peptida pendek yang dapat memicu pertumbuhan *S. thermophilus*, dan *S. thermophilus* sendiri memproduksi asam format yang dapat membantu pertumbuhan *Lb. bulgaricus* (Abbassy dan Sitohy 1993).

Perubahan susu menjadi asam disebabkan oleh proses fermentasi oleh bakteri asam laktat yaitu *Lb. bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Bakteri *Lb. bulgaricus* dan *S. thermophilus* mengurai laktosa menjadi asam laktat serta berbagai komponen aroma dan citarasa. *Lb. bulgaricus* lebih berperan pada pembentukan aroma, sedangkan *S. thermophilus* lebih berperan pada pembentukan citarasa (Hadi dan Fardiaz 1990). Sarkar (2008) menjelaskan bahwa kriteria yang digunakan dalam pemilihan kultur *starter* yoghurt yang digunakan pada proses produksi yoghurt adalah sebagai berikut:

- Mempunyai kemampuan menghasilkan konsistensi tekstur optimal, memperbaiki viskositas dan *flavor*
- Mudah dipelihara dan dapat dipertahankan stabilitasnya
- Tidak mempunyai kecenderungan menginduksi terjadinya sineresis
- Toleransi yang sesuai terhadap gula
- Tetap beraktivitas dan tahan terhadap adanya bakteriofag
- Mampu memproduksi asam secara cepat dan mempunyai toleransi terhadap asam
- Masih tetap aktif dengan viabilitas tinggi selama penyimpanan suhu rendah sampai akhir masa simpan yoghurt
- Mempunyai kemampuan mempertahankan *flavor* setelah proses produksi.

Nuraida *et al.* (1995) menyatakan bahwa kultur *starter* yoghurt yang aktif harus memenuhi karakteristik sebagai berikut: (a) mengandung jumlah sel yang maksimum, (b) bebas dari cemaran mikrobia lain, dan (c) aktif pada kondisi fermentasi. Suhu pertumbuhan optimum *Lb. bulgaricus* berkisar pada 42–45 °C dan *S. thermophilus* pada 37–42 °C. Karakteristik umum *S. thermophilus* dan *Lb. bulgaricus* yang digunakan sebagai kultur dalam fermentasi susu menjadi yoghurt dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Karakteristik umum bakteri *S. thermophilus* dan *Lb. bulgaricus* (Tamime dan Robinson 1999)

Nama Bakteri	Karakteristik Umum
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Gram positif, berbentuk bulat atau oval dengan ukuran diameter <1 µm dan membentuk rantai atau berpasangan Tidak tumbuh pada suhu 15 °C, tumbuh dengan baik pada suhu 45 °C, sebagian besar strain dapat tumbuh pada suhu 50 °C atau bertahan dengan pemanasan pada suhu 60 °C selama 30 menit Homofermentatif anaerob, dan memproduksi l (+) asam laktat, asetaldehida, dan diasetil dari laktosa susu Beberapa strain memproduksi eksopolisakarida (EPS) serta membutuhkan vitamin B dan asam-asam amino untuk mendukung pertumbuhannya.
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Gram positif, berbentuk batang (ujung membulat) dengan ukuran 0,5–0,8 × 2–9 µm dan tunggal atau rantai pendek Homofermentatif obligat, memproduksi D (+) asam laktat dan asetaldehida dari laktosa susu, dan beberapa strain menghasilkan EPS Sedikit tumbuh pada suhu <10 °C dan sebagian galur dapat tumbuh pada suhu 50–55 °C.

Bakteri *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang medium atau panjang, tidak dapat tumbuh pada suhu 10 °C, dapat tumbuh pada suhu 45 °C, pereduksi litmus yang kuat, tidak tahan garam (6,5%), dan dapat bersifat termodurik (Rahman *et al.* 1992). Bakteri *S. salivarius* subsp. *thermophilus* adalah bakteri berbentuk bulat yang membentuk rantai panjang atau pendek, Gram positif, dapat mereduksi litmus milk, dan

katalase negatif. Bakteri ini tidak toleran terhadap konsentrasi garam lebih dari 6,5% dengan pH optimal untuk pertumbuhan adalah 6,5. *S. salivarius* subsp. *thermophilus* dibedakan dari genus *Streptococcus* lainnya berdasarkan pertumbuhan pada suhu 45°C, dan tidak dapat tumbuh pada suhu 10°C (Robinson dan Tamime 1989).

2.6 Kultur Starter Khamir

Khamir telah dimanfaatkan oleh manusia sejak berabad-abad yang lalu (2000–6000 SM) untuk membuat minuman dan makanan fermentasi seperti *wine* (di Kaukasia), bir (di Sumeria, Babilonia) dan roti (di Mesir) sehingga khamir merupakan mikroorganisme tertua yang digunakan di industri pangan. Kemampuan khamir untuk menghasilkan etanol dan karbondioksida diperlihatkan pada tahun 1860an oleh Louis Pasteur (Kandasamy *et al.* 2018). Khamir berperan penting dalam pembentukan *flavor*, alkohol, dan aroma pangan fermentasi, baik berbasis nabati maupun hewani.

Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler (satu sel) yang termasuk ke dalam fungi divisi *Ascomycota* dan fungi *Imperfecti*. Khamir terdiri atas berbagai spesies, namun *Saccharomyces cerevisiae* merupakan spesies khamir yang paling tua didomestikasi, dimanfaatkan, dan diindustrialisasi untuk pembuatan minuman beralkohol dan roti (Bekatorou *et al.* 2006). Produksi khamir secara komersial dimulai pada akhir abad ke-19. Saat ini telah dilakukan isolasi dan konstruksi khamir sehingga memenuhi kebutuhan karakteristik khusus khamir untuk industri seperti bir, *wine*, dan roti. Ragi roti atau *baker's yeast* yang berisi *Saccharomyces cerevisiae* telah diproduksi secara komersial dan digunakan oleh industri roti. Jenis ragi lainnya yang juga dikomersialisasi adalah *brewer's yeast* yang digunakan oleh industri *wine*.

Khamir memegang peranan penting dalam berbagai jenis pangan fermentasi, antara lain minuman dan makanan beralkohol seperti *wine*, tuak, dan tape, produk sereal seperti roti, produk susu seperti kefir dan kumis, serta kondimen seperti kecap dan tauco. Pada fermentasi produk-produk tersebut, khamir dapat berada secara tunggal maupun dalam campuran dengan bakteri atau kapang atau keduanya. Khamir telah banyak diseleksi dari alam dan diaplikasikan di industri untuk memproduksi pangan atau minuman fermentasi.

2.6.1 Ragi Roti (*Baker Yeast*)

Ragi roti atau *baker's yeast* adalah konsentrat yang berisi khamir hidup yang digunakan sebagai *starter* pada fermentasi adonan roti. Ragi roti pada awalnya merupakan produk sampingan dari industri *wine* dan bir. Pada akhir abad ke-19 atau awal abad ke-20, teknologi produksi ragi roti berkembang dan bukan lagi berasal dari produk samping industri *wine* dan bir, melainkan menjadi industri tersendiri (Gelinas 2016). Aerasi merupakan faktor yang penting dalam memproduksi ragi roti, sementara aerasi tidak diterapkan pada fermentasi *wine* dan bir.

Proses produksi ragi roti dapat dibagi ke dalam beberapa tahapan proses, yaitu penyiapan bahan baku, penyiapan inokulum, proses fermentasi, pemanenan, filtrasi, dan pengemasan. Sumber karbon dan energi untuk produksi ragi roti adalah gula yang berasal dari molases bit atau gula tebu. Gula yang berada pada molases, yaitu sukrosa, fruktosa, dan glukosa, merupakan gula yang siap digunakan untuk pertumbuhan khamir roti. Pati tidak dapat digunakan karena *Saccharomyces cerevisiae* tidak memiliki enzim untuk menghidrolisis pati. Sumber karbon dan energi yang dapat digunakan untuk produksi ragi roti selain molases adalah *whhey* susu. Media juga perlu disuplementasi dengan penambahan sumber nitrogen, fosfat, vitamin, dan mineral (Lallemand 2018).

Karakteristik khamir yang diinginkan untuk produksi ragi roti adalah mampu menggunakan melibiosa (disakarida yang tersusun atas glukosa dan galaktosa) jika menggunakan substrat molases bit, dan mampu menggunakan laktosa jika menggunakan substrat *whhey* untuk memproduksi ragi roti. Selama proses fermentasi, udara steril dihembuskan karena fermentasi harus dilakukan pada kondisi aerobik. Penambahan nutrisi, pengaturan pH, dan kecepatan hembusan udara dikontrol secara cermat selama fermentasi. Suhu dikontrol pada kisaran 30°C dengan pH 4,5–5,5. Pada akhir fermentasi, massa sel dipisahkan dari media dengan cara sentrifugasi dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan air. Massa sel yang disebut sebagai *yeast cream* mengandung total padatan 18–20%. *Yeast cream* kemudian disimpan pada suhu 4 °C yang merupakan suhu ideal untuk menghambat pertumbuhan kontaminan mesofilik (Lallemand 2018).

Yeast cream dapat digunakan langsung atau diproses menjadi *compressed yeast* dengan total padatan lebih tinggi (sekitar 30%), atau dikeringkan menjadi *active dry yeast* atau *instant dry yeast* dengan kadar air sekitar 8%.

Untuk membuat *compressed yeast* (granula atau *cake*), *yeast cream* disaring menggunakan filter untuk menghilangkan air dan meningkatkan konsentrasi solid sampai 30% dan dilakukan penambahan pengemulsi. Selanjutnya padatan diekstrusi dan dipotong untuk membuat *yeast cream* dalam bentuk *cake*, atau digranulasi untuk membuat granula yeast (*crumbled yeast*), dan dikemas. *Compressed yeast* atau *crumbled yeast* harus disimpan pada suhu 0–10 °C. Masa simpan *cream yeast*, *compressed yeast*, atau *crumbled yeast* sekitar 2–3 minggu pada suhu 0–10 °C. Masing-masing jenis ragi roti memiliki keunggulan dan kekurangan, dan penggunaannya tergantung dari proses pembuatan roti yang akan dilakukan.

Untuk mengawetkan ragi roti, dilakukan pengeringan sehingga menghasilkan produk yang dikenal dengan *active dry yeast* dan *instant dry yeast*. *Active dry yeast* merupakan ragi roti kering berbentuk granula atau utas. Aktivitas *active dry yeast* lebih lambat dari *instant dry yeast*. Sebelum digunakan, dilakukan rehidrasi pada suhu 35–38 °C untuk mengaktifkan ragi. *Active dry yeast* cocok untuk negara dengan iklim panas dan lembap. Sementara itu, *instant dry yeast* merupakan ragi roti yang berbentuk bubuk, mudah digunakan, tidak perlu direhidrasi, dan dapat mengandung asam askorbat sebagai pengawet. Dosis penggunaan *instant dry yeast* lebih rendah daripada *compressed yeast*. Ragi roti kering dalam bentuk kering dapat disimpan pada suhu kamar selama 1 tahun jika dikemas dalam kondisi vakum.

2.7 Kultur Starter Kapang

Uraz dan Özer (2014) menyatakan bahwa kapang dapat dibagi ke dalam 2 kelompok: berseptat dengan sekat pembagi hifa, misalnya *Penicillium glaucoma*, dan tidak berseptat (*coenocytic*) dengan hifa silinder tanpa adanya sekat, misalnya *Mucor mucedo*. Cabang-cabang dan kumpulan hifa ini membentuk miselium. Hifa dapat tumbuh di dalam pangan atau pada permukaan pangan. Kapang dapat tumbuh dengan memindahkan sepotong miselium. Kapang bereproduksi dengan spora aseksual, namun beberapa kapang membentuk spora seksual.

Seperti halnya mikroorganismenya lainnya, kapang memerlukan air, mineral, sumber karbon, dan nitrogen untuk pertumbuhannya. Kapang resisten terhadap kondisi lingkungan di mana bakteri tidak dapat tumbuh, misalnya pada kadar garam dan gula tinggi. Kapang dapat tumbuh pada larutan gula 50%, sementara bakteri akan mengalami lisis. Dibandingkan dengan bakteri, kapang dapat tumbuh pada berbagai jenis pangan dari yang sederhana sampai pangan yang kompleks. Sebagai contoh, *Penicillium* dapat memecah molekul yang kompleks menjadi molekul yang sederhana untuk digunakan dalam pertumbuhannya. Suhu optimum pertumbuhan kapang adalah 25 °C. Kapang memerlukan oksigen (aerob) untuk pertumbuhannya. Kapang dapat tumbuh pada kisaran pH lebar (3–9), tetapi umumnya menyukai pH 5–6. Beberapa spesies termasuk *Aspergillus* sp dan *Penicillium* sp. dapat terstimulasi untuk tumbuh dengan adanya CO₂ di udara sampai dengan 15%, bahkan *Penicillium roqueforti* tetap aktif pada konsentrasi CO₂ 80%, dan O₂ hanya 4,2% (Uraz dan Özer 2014). Berbagai spesies kapang digunakan untuk pemeraman berbagai jenis keju, seperti blue-veined, Roquefort, Camembert, Brie, dan Gammelost, serta fermentasi legum seperti tempe, kecap, dan tauco.

Penggunaan kapang sebagai kultur *starter* harus mempertimbangkan keamanan pangan karena beberapa kapang dapat menghasilkan mikotoksin. Beberapa mikotoksin seperti aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, dan citrinin telah ditemukan pada berbagai produk fermentasi (Sivamaruthi *et al.* 2019). Pembentukan toksin selama fermentasi dapat dicegah dengan penggunaan kultur *starter* spesifik, mengoptimalkan proses fermentasi, serta pengendalian sebelum dan setelah proses fermentasi. Uraz dan Özer (2014) menyatakan bahwa kultur kapang dapat disiapkan dalam beberapa cara, yaitu:

- a. Penumbuhan pada permukaan media cair atau permukaan agar
- b. Penumbuhan pada media tipis pada suatu tatakan/alas
- c. Penumbuhan pada bekatul gandum yang dibasahkan dan diasamkan atau dicampur dengan nutrisi seperti air rendaman jagung
- d. Penumbuhan pada roti dan kraker steril yang dibasahkan
- e. Penumbuhan pada kultur terendam dan diaerasi. Metode ini biasanya menghasilkan pellet miselium dengan atau tanpa spora kapang.

Penumbuhan spora *P. roqueforti* pada roti steril yang dibasahkan dan diasamkan atau penumbuhan pada gandum steril umumnya dilakukan untuk memperoleh kultur *starter P. roqueforti*. Setelah terbentuk spora, dilakukan pengeringan dan penggilingan sehingga diperoleh kultur *starter* berbentuk tepung. Spora *P. camemberti* ditumbuhkan pada kraker yang dibasahkan dan digunakan untuk menginokulasi keju Camembert, Brie, atau jenis keju yang sama. Koji atau kultur *starter* untuk fermentasi kecap dan tauco merupakan kultur campuran yang berasal dari koji sebelumnya, walaupun telah dikembangkan koji yang mengandung *Aspergillus oryzae*, khamir, dan *Lb. delbrueckii* (Uraz dan Özer 2014). Pembuatan koji dapat dilakukan menggunakan beras atau dengan campuran gandum yang sudah disterilisasi.

2.7.1 Kultur *Starter* Tempe

Tempe merupakan salah satu produk pangan hasil fermentasi kapang yang umumnya berbahan baku kacang kedelai. Proses fermentasi tempe melibatkan beberapa spesies kapang, antara lain *R. oligosporus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, dan *R. stolonifer*, namun *R. oligosporus* diketahui sebagai kapang yang paling sesuai untuk pembuatan tempe (Winarno *et al.* 2017). Kultur *starter* untuk fermentasi tempe juga dikenal sebagai ragi tempe. Inokulum tempe yang telah dikenal masyarakat saat ini adalah laru dan usar (biasanya menempel di daun waru). Kultur *starter* tempe merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan produksi tempe yang bermutu baik.

Pada industri tempe dikenal dua jenis kultur *starter*, yaitu laru dan usar. Kandungan mikroorganisme di dalam kultur *starter* tempe jenis usar dan laru didominasi oleh kapang *R. oryzae* dan *R. oligosporus* (Nuraida dan Krusong 2015; Astawan *et al.* 2017). Laru dibuat dari nasi atau tepung beras atau dari ongkok yang ditumbuhi kapang tempe atau *Rhizopus* sp., lalu dikeringkan dan digiling. Sementara usar merupakan daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) yang permukaan belakangnya telah ditumbuhi oleh kapang. Laru (Gambar 2.1) merupakan kultur *starter* yang paling umum digunakan, sementara usar hanya digunakan di daerah tertentu saja seperti daerah Yogyakarta dan sekitarnya (Rahayu *et al.* 2015).

Nout dan Rombouts (1990) mengklasifikasikan *starter* tempe menjadi empat kategori, yaitu *starter* alami, *starter* murni, *starter* semi murni, dan *starter* campuran. Tempe yang dikeringkan dan ditumbuk, laru, serta usar termasuk ke dalam *starter* alami. *Starter* murni merupakan kultur *Rhizopus* sp. yang ditumbuhkan pada media steril, sedangkan *starter* semi murni dibuat dengan cara menumbuhkan kapang *Rhizopus* sp. pada nasi atau kedelai yang sudah dimasak namun tidak disterilisasi. Steinkraus *et al.* (1983) menyarankan strain *Rhizopus* yang digunakan untuk pengolahan tempe harus memiliki karakteristik sebagai berikut:

- a. Tumbuh cepat pada suhu 37°C
- b. Memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi
- c. Memiliki aktivitas lipolitik
- d. Dapat menghasilkan antioksidan yang tinggi
- e. Berkemampuan untuk menghasilkan tempe dengan *flavor*, aroma, dan tekstur yang khas.

2.7.1.1 Laru Tempe

Laru yang berasal dari tempe umumnya dibuat secara tradisional oleh para pengrajin dengan menggunakan tempe yang sudah jadi. Tempe diiris tipis kemudian dibiarkan selama sekitar 30–33 jam agar miselium kapang tumbuh dan menghasilkan spora. Tempe yang berspora tersebut kemudian dikeringkan, digiling menjadi bubuk halus, dan hasilnya digunakan sebagai laru dalam proses produksi tempe selanjutnya (Suliantari 1996). Laru juga dapat dibuat dengan menggunakan onggok sebagai substrat. Onggok dibasahi lalu dikukus, dan setelah dingin diinokulasi dengan laru yang berasal dari produksi sebelumnya atau laru komersial. Campuran dengan ketebalan 2–3 cm dan panjang 15–20 cm tersebut diletakkan pada rak bambu, lalu ditutup dengan daun pisang. Campuran diinkubasikan pada suhu kamar (25–30 °C) selama 3 hari sampai miselium dan spora menutup permukaan. Onggok yang telah ditumbuhi kapang lalu diiris dengan ketebalan 5–10 cm dan dikeringkan dengan cara dijemur (Nuraida dan Krusong 2014).

Pada metode pembuatan laru yang lebih modern, nasi atau tepung beras digunakan sebagai substrat dengan penambahan kultur murni *Rhizopus oligosporus*. Campuran diinkubasi selama 3–4 hari pada suhu kamar (25–30 °C). Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven sehingga suhu lebih terkontrol (Nuraida dan Krusong 2014). Laru yang telah kering dapat digiling untuk memperoleh tepung laru. Variasi lain dalam pembuatan laru adalah dengan menggunakan tepung beras yang telah disangrai, kemudian dibasahi, diinokulasi dengan kultur murni, diinkubasi, dikeringkan, dan digiling. Metode pembuatan laru yang lebih modern ini tidak diadopsi secara luas oleh pengrajin tempe. Pada umumnya pengrajin tempe memperbanyak laru semi murni dengan menggunakan ongkok sebagai substrat sebagaimana dijelaskan sebelumnya. Laru tempe dengan substrat ongkok dan beras disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Laru tempe dengan substrat ongkok dan nasi

Singkong dan beras merupakan substrat yang paling baik untuk mendukung pertumbuhan dan sporulasi kapang tempe. Azizah (2007) menggunakan campuran substrat beras dan ongkok dengan perbandingan yang sama untuk pembuatan laru tempe dan diperoleh total kapang pada laru sebesar $4,9 \times 10^6$ cfu/g. Penggunaan nasi sebagai substrat menghasilkan volume produk akhir yang lebih tinggi dengan waktu fermentasi yang lebih singkat hingga sekitar 24 jam.

Metode atau kondisi penyimpanan laru juga merupakan faktor yang perlu diperhatikan karena kaitannya dengan viabilitas mikroorganisme yang terdapat pada laru. Wang *et al.* (1975) menyatakan bahwa spora kapang dapat disimpan dalam rentang suhu 4–22 °C. Selain suhu, kemasan juga dapat memengaruhi viabilitas spora kapang laru tempe. Umumnya pengemas polietilen (LDPE) digunakan untuk mengemas laru tempe bubuk selama penyimpanan. LDPE bersifat kuat dan memiliki ketahanan yang baik terhadap air dan uap air, juga ekonomis.

Kultur *starter* tempe laru kering yang disimpan pada suhu kamar (25–30 °C) memiliki umur simpan selama 4–6 minggu. Kondisi penyimpanan berpendingin (4–5 °C) mampu memperpanjang umur simpan laru hingga 6 bulan atau lebih (Jutono 1985). Shambuyi *et al.* (1992) menyatakan bahwa kultur *starter* kering dengan A_w 0,48 dapat disimpan hingga 30 minggu pada suhu 25 dan 37°C.

Terkait dengan penyimpanan laru, Shurtleff dan Aoyagi (1979) menyatakan bahwa kondisi suhu dan kelembapan yang rendah akan menurunkan kecepatan spora untuk bergerminasi sekitar 35% setelah disimpan selama 6 minggu, dan akan stabil hingga satu tahun. Laru tersebut akan menghasilkan tempe dengan kualitas yang sama dengan tempe yang dibuat dengan laru segar. Sementara itu, penyimpanan laru pada suhu ruang dengan kelembapan rendah hanya sedikit menurunkan kecepatan germinasi spora.

2.7.1.2 Usar

Jenis inokulum kapang lainnya yang sering dipakai di daerah Jawa Tengah adalah usar. Usar (Gambar 2.2) merupakan daun waru (*Hibiscus tiliaceus*) yang permukaan belakang daun telah ditumbuhi oleh kapang. Usar dibuat dengan meletakkan kedelai yang sudah direbus dan diinokulasi dengan kapang tempe di bagian bawah daun waru, lalu ditutup dengan bagian bawah daun laru, sehingga membentuk lapisan-lapisan daun waru yang berisi kedelai yang sudah diinokulasi. Bagian bawah daun waru memiliki rambut atau bulu tempat spora atau miselium dapat menempel (Purwadaria *et al.* 2016). Untuk membuat usar, daun harus dapat memberikan aerasi yang cukup untuk mendukung sporulasi kapang dan tidak menjadi rapuh setelah kering (Nuraida dan Krusong 2014). Daun

diinkubasi selama 3–4 hari, lalu dikeringkan dengan cara dijemur. Umumnya, satu lembar usar dapat dipergunakan untuk membuat tempe dari bahan baku 1–5 kg kedelai (Sarwono 2006).



Gambar 2.2 Usar dengan substrat kacang kedelai

Selain kapang tempe, usar mengandung mikroorganisme lain seperti bakteri aerob, spora, *Lactobacilli*, *Enterobacteriaceae*, dan khamir (Nout dan Rombouts 1990). Usar memiliki keragaman jenis kapang yang terdapat pada permukaannya. Nuraida dan Krusong (2014) menyatakan bahwa beberapa jenis kapang yang umum terdapat pada permukaan usar adalah *Rhizopus* sp., terutama *R. oryzae* dan *R. oligosporus*. Kapang tersebut banyak ditemukan di semua sampel usar yang berasal dari Indonesia. Sementara kapang yang ditemukan pada usar dari Nigeria, Ghana, dan Belanda didominasi oleh *Cladosporium* sp.

2.8 Kultur *Starter* Bakteri Asam Asetat

Bakteri Asam Asetat (BAA) adalah kelompok bakteri Gram negatif yang mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. Kelompok bakteri ini juga digunakan untuk memproduksi metabolit lainnya misalnya asam glukonat, L-sorbosa, dan selulosa. Oksidasi etanol menjadi asam asetat tidak diinginkan terjadi pada *wine*, bir, dan minuman beralkohol lainnya karena menyebabkan rasa asam. Salah satu produk fermentasi yang berupa selulosa adalah *nata de coco*.

Saat ini BAA diklasifikasikan menjadi 19 genera, mencakup *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neosaia*, *Neokomagataea*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Swingsia* dan *Tanticharoenia* (Gomes *et al.* 2018). Kelompok bakteri ini berperan penting pada fermentasi pangan, misalnya dalam proses fermentasi vinegar dan kombucha. Spesies utama untuk fermentasi vinegar adalah genus *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, dan *Komagataeibacter*. Genus tersebut memiliki kapasitas oksidasi etanol menjadi asam asetat yang tinggi dan resistensi yang tinggi terhadap asam asetat yang dilepaskan ke dalam medium. Spesies yang paling banyak digunakan dalam fermentasi vinegar adalah *Acetobacter aceti*, *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter malorum*, *Acetobacter oeni*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconacetobacter entanii*, *Gluconacetobacter liquefaciens*, *Gluconobacter oxydans*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter hanseni*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter medellinensis*, *Komagataeibacter oboediens*, dan *Komagataeibacter xylinus* (Gomes *et al.* 2018).

2.8.1 Kultur Starter *Nata de coco*

Nata de coco merupakan lapisan selulosa yang terbentuk pada permukaan air kelapa yang dihasilkan melalui proses fermentasi oleh bakteri *Acetobacter xylinum* (Andriani 2009). Media starter yang digunakan dalam pembuatan nata biasanya identik dengan media dalam fermentasi nata (Hamad *et al.* 2014). *Acetobacter xylinum* (kini dikenal sebagai *Gluconobacter xylinus*) adalah bakteri pembentuk selulosa yang efektif dan banyak dimanfaatkan dalam proses produksi bahan pangan, salah satunya dalam pembuatan *nata de coco* (Hungund *et al.* 2013). Karakteristik khas dari bakteri *Acetobacter xylinum* adalah kemampuannya membentuk massa selulosa dari glukosa secara ekstraseluler. Komponen selulosa ini kemudian membentuk jaringan mikrofibril yang panjang dalam medium cair fermentasi. Gelembung gas CO₂ yang dihasilkan selama fermentasi memiliki kecenderungan menempel pada jaringan selulosa sehingga lapisan selulosa yang terbentuk terangkat ke permukaan cairan (Kusnandar *et al.* 2020).

Palungkun (1992) menyatakan bahwa starter siap pakai dapat diturunkan dari biakan murni *A. xylinum* yang telah dikulturkan dalam bentuk cair, atau dapat dibuat melalui pembuatan kultur murni dengan media campuran ampas nanas, air, dan gula dengan perbandingan 6:3:1. Setelah inkubasi selama 2–3 minggu, pelikel yang terdapat di permukaan media selanjutnya dapat dipakai sebagai inokulum pada pembuatan nata. Pertumbuhan bakteri *A. xylinum* dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain pH, suhu, sumber nitrogen, dan sumber karbon (Pambayun 2006). Bakteri *Acetobacter xylinum* dapat tumbuh pada rentang suhu 20–30°C, tepatnya mencapai pertumbuhan optimal pada suhu 30°C. Selain suhu, pertumbuhan bakteri tersebut juga dipengaruhi oleh kondisi pH. Bakteri *A. xylinum* dapat tumbuh pada rentang pH 3,5–7,5 dan optimal pada pH 4,3–5,5 (Malvianie *et al.* 2014). *A. xylinum* memiliki kemampuan mencerna berbagai jenis gula dan mengubahnya menjadi nata (Adejoye *et al.* 2006). *A. xylinum* bertumbuh secara cepat hingga jumlah maksimum. Fase logaritmik dari *Acetobacter xylinum* terjadi pada waktu penyimpanan 84 jam (3–4 hari). Saxena *et al.* (2001) menyatakan bahwa waktu generasi *Acetobacter xylinum* berkisar kurang lebih 2 jam. Pertumbuhan sel *Acetobacter xylinum* mencapai maksimum dengan jumlah sel pada kisaran 10^7 cfu/ml.

2.9 Kultur Starter Campuran

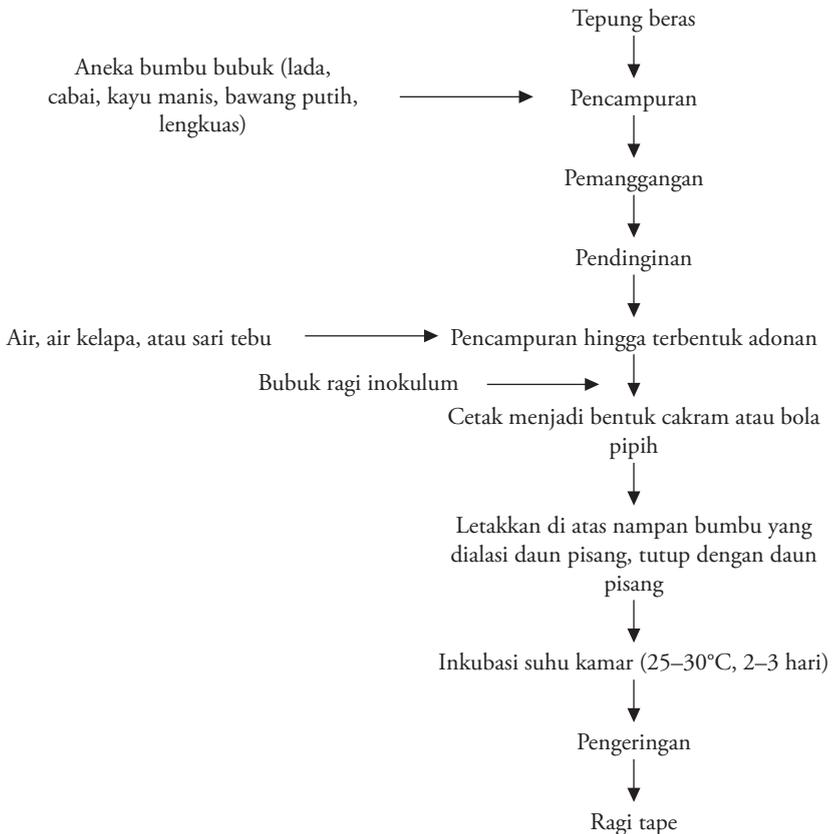
2.9.1 Ragi Tape

Tape merupakan produk pangan hasil fermentasi oleh ragi yang menggunakan bahan berpati seperti ketan atau singkong sebagai substrat. Prinsip dasar fermentasi pangan berpati adalah degradasi komponen pati menjadi dekstrin dan gula. Selanjutnya gula diubah menjadi alkohol atau asam, sehingga makanan hasil fermentasinya memiliki rasa manis, alkoholik, dan sedikit asam (Nurhartadi dan Rahayu 2011). Ragi tape termasuk ke dalam jenis kultur kering yang berwarna putih, dibentuk menjadi bulatan kecil atau bola pipih berdiameter 2–3 cm (Nuraida dan Krusong 2014). Sebagian besar produksi ragi masih dilakukan pada industri kecil. Ragi dibuat dari campuran tepung beras dengan beberapa bumbu antara lain bawang putih, merica, laos, cabai, kayu manis, cabai rawit, sedikit air jeruk nipis, dan sepotong kecil tebu (Nurhartadi dan Rahayu 2011).

Di Indonesia, Malaysia, Filipina, dan Vietnam ragi tape sering digunakan dalam fermentasi pembuatan tape ubi, beras, atau ketan secara tradisional (Kofli dan Dayaon 2010).

Ragi tape yang digunakan di Indonesia umumnya mengandung lebih dari satu jenis mikroorganisme. Khamir, kapang, maupun bakteri dalam ragi berfungsi sebagai *starter* fermentasi dan dapat meningkatkan kandungan nutrisi produk fermentasi (Beuchat 1987). Mikroba yang digunakan untuk proses sakarifikasi adalah mikroba yang bersifat amilolitik (mampu menghasilkan enzim amilase, terutama α -amilase dan glukamilase). Enzim α -amilase (α -1,4 glukon 4-glukanohidrolase) adalah endoenzim yang memutus ikatan α -1,4 secara acak di bagian dalam molekul, baik pada amilosa maupun amilopektin (Whitaker 1994). Sementara Glukamilase (1,4- α -D-glukan glukohidrolase) adalah enzim yang membebaskan glukosa dari pati melalui sisi gugus non-reduksi. Enzim ini dapat memutus rantai pati pada ikatan α -1,4 dan α -1,6 menjadi molekul-molekul glukosa pada bagian non-reduksi dari molekul amilosa maupun amilopektin (Tani *et al.* 1986). Tahapan pembuatan ragi secara tradisional dapat dilihat pada Gambar 2.3.

Mikroorganisme amilolitik dan fermentatif yang telah berhasil diisolasi oleh para peneliti dari berbagai merk ragi tape dari berbagai tempat dan pasar di Indonesia, sebagaimana dirangkum oleh Nuraida dan Krusong (2014), antara lain *Amylomyces rouxii*, *Pichia burtonii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp., serta kapang *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., dan *Fusarium* sp. Berbagai bakteri juga terdapat pada ragi, antara lain *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*), *Acetobacter*, *Pediococcus* sp., *Lactobacillus*, dan *Enterococcus* sp..



Gambar 2.3 Proses pembuatan ragi tape secara tradisional (Nuraida dan Krusong 2014)

Kapang yang terdapat pada ragi tape merupakan jenis kapang yang diketahui mempunyai kemampuan untuk menghasilkan enzim-enzim amilolitik. Kapang yang tergolong amilolitik berfungsi dalam proses sakarifikasi dan produksi alkohol, sedangkan khamir amilolitik berfungsi untuk sakarifikasi dan produksi aroma. *Mucor* dan *Rhizopus* memiliki aktivitas amilolitik, lipolitik, dan proteolitik (Saono *et al.* 1977). *Amylomyces rouxii* memiliki sifat amilolitik dan memiliki afinitas tinggi terhadap sukrosa, maltosa, dan gliserin serta memetabolisme glukosa menjadi laktosa (Hesseltine 1983). Berbagai mikroorganisme di dalam ragi tape bekerja secara sinergistik. *Aspergillus* mengubah pati menjadi senyawa yang lebih sederhana, sedangkan *Saccharomyces* sp. dan *Candida* sp. mengubah

gula yang dihasilkan dari penguraian pati oleh *Aspergillus* menjadi alkohol dan zat organik lainnya. Alkohol kemudian diubah menjadi asam cuka oleh *Acetobacter*. Peran dan karakteristik berbagai macam mikroba yang terdapat pada ragi dan tape Indonesia dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Peranan mikroba pada ragi tape (Saono *et al.* 1974)

Grup mikroba	Genus	Peranan
Kapang amilolitik	<i>Amylomyces</i> <i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>	Pembentukan sakarida dan air Pembentukan sakarida dan air Pembentukan air dan alkohol
Khamir amilolitik	<i>Endomycopsis</i>	Pembentukan sakarida dan aroma
Khamir non amilolitik	<i>Saccharomyces</i> <i>Hansenula</i> <i>Endomycopsis</i> <i>Candida</i>	Pembentukan alkohol Pembentukan aroma spesifik Pembentukan aroma spesifik Pembentukan aroma spesifik
Bakteri asam laktat	<i>Pediococcus</i>	Pembentukan asam laktat
Bakteri amilolitik	<i>Bacillus</i>	Pembentukan sakarida

2.9.2 Kultur *Starter* Kefir

Kefir adalah minuman susu fermentasi yang menggunakan granula kefir sebagai *starter* (Schwan *et al.* 2015). Kefir umumnya dibuat dari susu seperti susu sapi, domba maupun kambing, tetapi susu nabati seperti susu kedelai juga dapat dibuat menjadi kefir karena kandungan gizi, sifat fisik dan kimiawi pada susu kedelai hampir mirip dengan susu hewani (Rossi *et al.* 2016). Komposisi kimia kefir bervariasi dan dapat dipengaruhi oleh jenis mikroba *starter*, suhu dan lama fermentasi, serta bahan baku yang digunakan. Rahman *et al.* (1992) menyatakan bahwa komposisi nutrisi kefir yaitu air 89,5%, lemak 1,5%, protein 3,5%, abu 0,6%, laktosa 4,5%, dengan pH 4,6. Kefir memiliki rasa asam beralkohol, konsistensi seperti krim dan sedikit berbuih (Bottazzi 1983). Kefir memiliki aroma *yeasty* dan *flavor* yang menyegarkan karena adanya senyawa hasil akhir dari fermentasi khamir, yaitu komponen volatil kelompok alkohol dan ester (Rohmah dan Estiasih 2018).

Kultur *starter* dalam pembuatan kefir disebut *kefir grains* atau *kefir granules* (granula kefir). Bayu *et al.* (2017) menyatakan bahwa kefir grain merupakan suatu massa yang terdiri dari berbagai jenis bakteri dan khamir yang tersusun pada suatu matriks protein serta karbohidrat kompleks. Di dalam media susu, granula kefir akan mengembang dan melakukan fermentasi terhadap susu. Setelah fermentasi selesai, granula kefir dapat didapatkan kembali melalui penyaringan. Granula tersebut kemudian dapat digunakan kembali sebagai inokulum (Webb *et al.* 1983). Kualitas dan suhu penyimpanan bibit kefir (granula kefir) yang digunakan harus diperhatikan.

Garrote *et al.* (2010) dan Haliem *et al.* (2017) menyatakan bahwa granula kefir memiliki komposisi bakteri kompleks yang didominasi oleh bakteri asam laktat, bakteri asam asetat, dan khamir. Granula kefir tersusun dari campuran bakteri asam laktat (10^8 cfu/g), khamir (10^6 – 10^7 cfu/g), dan bakteri asam asetat (10^5 cfu/g), dengan karakteristik memiliki ukuran yang kecil, keras, bentuk yang tidak beraturan, warna putih kekuningan dengan ukuran diameter granula 0,3–3,5 cm (Garrote *et al.* 2010; Arslan 2014). Granula kefir mengandung sekitar 83% air, 45% protein, dan 10% polisakarida yang disebut kefiran (Bengoia *et al.* 2018). Kefiran merupakan polisakarida yang terdiri atas glukosa dan galaktosa dengan proporsi yang sama dan diproduksi oleh *Lb. kefiranofaciens* (Zajšek *et al.* 2011). Kefiran mampu memperbaiki viskositas dan viskoelastisitas gel susu (Rimada dan Abraham 2006).

Berdasarkan penelitian Yusuf *et al.* (2020), bakteri asam laktat yang ditemukan dari granula kefir asal Indonesia didominasi oleh spesies *Lb. fermentum*, *Lb. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, dan *Lb. delbreuckii* ssp. *delbreuckii*. Bakteri asam asetat yang terdapat pada granula kefir adalah *Acetobacter aceti* dan *Acetobacter rasens* (Prado *et al.* 2015). Khamir juga memiliki peran penting dalam pembentukan rasa dan aroma pada kefir. Diosma *et al.* (2014) mengidentifikasi khamir yang terdapat pada granula kefir, yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (15 strain), *Saccharomyces unisporus* (6 strain), *Issatchenkia occidentalis* (4 strain), dan *Kluyveromyces marxianus* (9 strain). Mikroorganisme yang terdapat pada granula kefir diketahui memiliki sifat aktivitas yang stabil apabila diawetkan dan disimpan pada kondisi fisiologis yang sesuai (Simova *et al.* 2002).

2.9.3 Kultur *Starter* Kombucha

Kombucha merupakan minuman hasil fermentasi air teh dan gula. Fermentasi kombucha berlangsung dengan bantuan aktivitas mikroorganisme yang terdapat pada *starter* kultur kombucha yang disebut SCOBY (*Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeast*). Setelah 10 sampai 14 hari dari inokulasi, jamur teh baru akan berkembang di permukaan teh. SCOBY merupakan hasil dari proses pembuatan teh kombucha yang berupa lapisan bersifat gelatinoid dan bertekstur liat, lapisan ini tersusun dari selulosa hasil metabolisme bakteri asam asetat. SCOBY merupakan kultur campuran yang berisi bakteri dan khamir (Wistiana dan Zubaidah 2015). Kultur campuran tersebut terbagi menjadi dua bagian atau bentuk, yaitu bentuk cairan dan biofilm yang melayang di dalamnya (pelikel) (Chakravorty *et al.* 2016). Cairan yang terbentuk setelah fermentasi dapat dikonsumsi dan dapat pula dijadikan sebagai *starter* untuk fermentasi selanjutnya.

SCOBY juga disebut jamur teh karena bentuk dan penampilannya yang mirip dengan tutup buah jamur makroskopik. Lapisan tersebut merupakan biofilm selulosa yang dibentuk oleh polimerisasi monosakarida. Substrat media kombucha yang biasa digunakan adalah teh dari daun *Camellia sinensis*, tetapi sekarang ini berkembang pembuatan kombucha menggunakan substrat lain, misalnya teh bunga telang. Teh yang akan difermentasi diberi tambahan pemanis (gula, biasanya dalam bentuk sukrosa) sebagai sumber energi bagi konsorsium mikrobial tersebut. Secara bersamaan, bakteri dan khamir bersimbiosis memanfaatkan nutrisi yang terkandung dalam teh manis menghasilkan miofibril berlapis. Lapisan terbaru berada di lapisan paling atas dan mengambang di permukaan teh (Miranda *et al.* 2016). Kombucha mempunyai bentuk massa gelatinosa atau menyerupai agar-agar biofilm putih yang mirip *nata de coco*, namun medianya berbeda (Khamidah dan Antarlina 2020).

Fermentasi yang terjadi pada pembuatan teh kombucha merupakan aktivitas dari mikroorganisme yang terdapat dalam *starter* kultur kombucha. Bahan awal yang berbeda (gula dan teh) dan kultur *starter* yang berbeda akan menyebabkan variasi komposisi mikroba pada kombucha. Mikroorganisme yang berperan dalam proses pembuatan teh kombucha yaitu *Acetobacter xylinum* dari golongan bakteri dan beberapa khamir anggota genus *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, dan *Saccharomyces* (Suhardini *et al.* 2016). Berbagai penelitian menunjukkan

komposisi mikroba pada kombucha merupakan asosiasi simbiosis bakteri seperti *Acetobacter xylinoides*, *A. pasteurianus*, *A. xylinum*, *A. aceti*, dan *Bacterium gluconicum*, serta khamir seperti *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, dan spesies *Pichia* (Chen dan Liu 2000; Fu *et al.* 2014). Harrison dan Curtin (2021) melaporkan bahwa SCOBY didominasi oleh khamir dari genus *Brettanomyces* dan bakteri dari genus *Komagataeibacter* (sebelumnya dikenal sebagai *Gluconacetobacter*) yang merupakan bakteri asam asetat. *Komagataeibacter* berada pada fase cair dan fase solid (pelikel). Spesies *Komagataeibacter* yang terdapat pada SCOBY antara lain *K. xylinus*, *K. rhaeticus*, *K. saccharivorans*, *K. intermedius*, dan *K. kombuchae* (*K. hansenii*) (Harrison dan Curtin 2021). *Komagataeibacter* berperan membentuk fase pelikel dan menghasilkan asam organik yang berkontribusi terhadap karakteristik sensori kombucha. Khamir yang dominan dan penting untuk produksi kombucha adalah dari genera *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Torulasporea*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora* dan *Saccharomyces* (Harrison dan Curtin 2021).

Peran khamir dalam pembuatan kombucha adalah mengonversi gula menjadi alkohol yang selanjutnya dioksidasi oleh bakteri asam asetat. Sukrosa yang terdapat di dalam sistem fermentasi dihidrolisis oleh enzim invertase yang dimiliki oleh khamir dalam SCOBY menjadi glukosa dan fruktosa, kemudian dimetabolisme lebih lanjut menjadi alkohol. *Acetobacter* sp. dan bakteri asam asetat lainnya dalam kultur kombucha mengoksidasi etanol menjadi asetaldehid, selanjutnya menjadi asam asetat. Komponen mayor yang dihasilkan saat fermentasi adalah asam asetat, etanol, dan asam glukuronat, sedangkan komponen minor yang dihasilkan adalah asam laktat, asam fenolat, vitamin B, dan enzim.

Daftar Pustaka

- Abbassy EMZ, Sitohy M. 1993. Metabolic interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lb. bulgaricus* in single and mixed starter yoghurt. *J Food / Nahrung*. 37(1):53-58.
- Adejoye OD, Adebayo TBC, Ogunjobi AA, Olaoye OA, Fadahunsi FI. 2006. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom. *Afr J Biotechnol*. 5:1355–1359.
- Andriani AF. 2009. Viabilitas dan produktivitas selulosa dari inokulum kering *Acetobacter xylinum* dengan substrat pembawa berupa serbuk kelapa parut dan serbuk ampas kelapa parut. *El-Hayah*. 1(1):1-6.
- Aqil H, Risdianto D, Hartati I. 2015. Isolasi dan pengayaan bakteri *Lactobacillus* dari rumen sapi. *Momentum*. 2(11):93-98.
- Arslan S. 2014. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *J Food*. 1-6.
- Astawan M, Mardhiyyah YS, Wijaya CH. 2017. Potential of bioactive components in tempe for the treatment of obesity. *J. Gizi Pangan* 13(2):79-86.
- Azizah AB. 2007. Formulasi Laru Tempe Terstandar dari Isolat Usar Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Bagad M, Pande R, Dubey V, Ghosh AR. 2017. Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lb. gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. *Asian Pac J Trop Biomed*. 7(10):921–929.
- Bayu KMH, Rizqiati, Nurwantoro. 2017. Analisis total padatan terlarut, keasaman, kadar lemak, dan tingkat viskositas pada kefir optima dengan lama fermentasi yang berbeda. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 1(2):33–38.
- Bekatorou A, Psarianos C, Athanasios AK. 2006. Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol*. 44(3):407–415.
- Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG. 2018. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J Appl Microbiol*. 126:686–700.

- Beuchat LR. 1987. *Food and Beverage Mycology*. 2nd Ed. New York (US): Van Nostrand Reinhold.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann Microbiol*. 50:117–132.
- Bintsis T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. 2018. *J Bacteriol Mycol* 6(2):89–94.
- Bonnet M, Lagier JC, Roult D, Khelaifa S. 2020. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*. 5(24):1-10.
- Bottazzi. 1983. Other Fermented Dairy Products. Di dalam: *Biotechnology 5th volume*. H. J. Rehm dan G. Reed (ed.). G. Reed (vol. ed.). Verlag Chemie. Florida, Basel.
- Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J Food Microbiol*. 220:63-72.
- Chen C, Liu B. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol*. 89(5):834-839.
- Chotiah S. 2006. Pengaruh proses freeze-drying dan penyimpanan pada suhu kamar terhadap viabilitas dan patogenisitas plasma nutfah mikroba *Pasteurella multocida*. *Buletin Plasma Nutfa*. 12(1):40-44.
- Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL. 2014. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World J Microbiol Biotechnol*. 30(1):43-53.
- Foerst P, Santivarangkna C. 2015. Advances in starter culture technology: focus on drying process. Di dalam: Holzapfel W (Ed). *Advances in Fermented Foods and Beverages, Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 265, hlm. 249–270.
- Fu C, Yan F, Cao Z, Xie F, Lin J. 2014. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sci Technol*. (Campinas). 34(1):123-126.

- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G. 2010. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. Di dalam: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, editors. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria – Novel Applications*. Iowa: Blackwell Publishing, hlm. 327–340.
- Gelinas P. 2016. Aeration and foam control in baker's yeast production: Mapping patents. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 15:371-391.
- Gherna RL, Reddy CA. 2007. Culture Preservation. Di dalam: Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak JA, Marzluf GA, Schmidt TM, Snyder LR (eds). *Methods for General and Molecular Microbiology, 3rd Edition*. John Wiley and Sons, hlm. 1020-1033.
- Gomes RJ, Borges MF, Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez, Spinosa WA. 2018. Acetic acid bacteria in the food industry: Systematics, characteristics and applications. *Food Technol Biotechnol*. 56 (2):139-151.
- Hadi, Fardiaz S. 1990. Bakteri asam laktat dan peranan dalam pengawetan makanan. *Media Teknologi Pangan*. 4(4):73-74.
- Haliem IAP, Nugerahani I, Rahayu ES. 2017. Kajian proporsi sari nanas dan konsentrasi *starter* terhadap sifat kimia dan organoleptik kefir nanas. *Jurnal Teknologi Pangan dan Gizi*. 16(1):29-35.
- Hamad A, Handayani NA, Puspawiningtyas E. 2014. Pengaruh umur *starter Acetobacter xylinum* terhadap produksi *nata de coco*. *Techno*. 15(1):37-49.
- Harrison K, Curtin C. Microbial composition of SCOBY *starter* cultures used by commercial kombucha brewers in North America. *Microorganisms*. 9:1060.
- Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, Hesham EEH. 2018. Lactic acid bacteria: from *starter* cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiol Lett*. 365(20):213.
- Hesseltine CW. 1983. Microbiology of oriental fermented foods. *Ann Rev Microbiol*. 37:575–601.
- Hungund, Prabhu S, Shetty C, Acharya S, Prabhu V, Gupta S. 2013. Production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using dual and cheaper carbon sources. *J Micr Biochem Technol*. 5:031–033.
- Jufri FR. 2020. Microbial isolation. *Journal La Lifesci*. 1:18-23.

- Jutono. 1985. The microbiology of war, a traditional tempe inoculum. Proceedings, Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation, pp. 50–59. Tsukuba, Japan, July 1985, Tsukuba Science City: National Food Research Institute.
- Kandasamy S, Kavitate D, Shetty PH. 2018. Lactic Acid Bacteria and Yeasts as *Starter Cultures for Fermented Foods and Their Role in Commercialization of Fermented Foods*. Di dalam: Panda S, Shetty P. (eds). *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries: Food Microbiology and Food Safety*. Springer, Cham.
- Karinawatie S, Kusnadi J, Martati E. 2008. Efektifitas konsentrat protein whey dan dekstrin untuk mempertahankan viabilitas bakteri asam laktat dalam *starter* kering beku yoghurt. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 2(9):121-130.
- Khamidah A, Antarlina SS. 2020. Peluang minuman kombucha sebagai pangan fungsional. *Agrika: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*. 14(2):184-200.
- Kofli NT, Dayaon SHM. 2010. Identification of microorganism from ragi for bioethanol production by API kit. *J Appl Sci*. 10(21):2751-2753.
- Kusnandar F, Rahayu WP, Marpaung AM, Santoso U. 2020. *Perspektif Global Ilmu dan Teknologi Pangan*. Bogor (ID): IPB Press.
- Lallemand Inc. 2018. Bakers Yeast Production and Characteristics. *Baking Update* 3(4).
- Malvianie E, Pratama Y, Salafudin. 2014. Fermentasi sampah buah nanas menggunakan sistem kontinu dengan bantuan bakteri *Acetobacter xylinum*. *Jurnal Institut Teknologi Nasional*. 2(1):1–11.
- Miranda B, Lawton NM, Tachibana SR, Swartz NA, Hall WP. 2016. Titration and HPLC Characterization of Kombucha Fermentation: A Laboratory Experiment in Food Analysis. *J Chem Educ*. 93(10):1770-5.
- Nout MJR, Rombouts FM. 1990. A review: Recent developments in tempe research. *J Appl Bacteriol*. 69:609-633.
- Nuraida L, Wachter MC, Owens JD. 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World J Microbiol Biotechnol*. 11: 567–571.

- Nuraida L, Krusong W. 2014. *Starter cultures*. Di dalam: Owens JD. (ed). *Indigenous Fermented Foods of Southeast Asia*. Boca Raton (US): CRC Press, hlm. 109-136.
- Nurhartadi E, Rahayu ES. 2011. Isolasi dan karakterisasi yeast amilolitik dari ragi tape. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 1(4): 66-73.
- Nurtjahyani SD, Shyntya D. 2014. Efektivitas pengenceran terhadap pertumbuhan koloni mikroba pada saus tomat. *Jurnal Saintek*. 11(2):65–68.
- Pambayun R. 2006. *Teknologi Pengolahan Nata de Coco*. Yogyakarta (ID): Kanisius
- Palungkun R. 1992. *Aneka Produk Olahan Kelapa*. Jakarta (ID): Penerbit UI-Press.
- Peighambardousta SH, Taftia AG, Hesaria J. 2011. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends Food Sci Technol*. 22:215-224.
- Prado MR, Blandon LM, Vandenberghe Luciana PS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. 2015. Milk kefir: composition, microbial, cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol*. 6:1-10.
- Prakash O, Nimonkar Y, Shouche, S. 2013. Minireview: Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol Lett*. 339:1–9.
- Purwadaria HK, Fardiaz D, Kardono LBS, Mc Elhatton A. 2016. Tempe from Traditional to Modern Practices. Di dalam: *Modernization of Traditional Food Processes and Products*, hlm. 145–160.
- Puspawati NN, Nuraida L, Adawiyah DR. 2010. Penggunaan berbagai jenis bahan pelindung untuk mempertahankan viabilitas bakteri asam laktat yang diisolasi dari air susu ibu pada proses pengeringan beku. *J. Teknologi dan Industri Pangan*. 1(21):59-65.
- Rahayu WP, Pambayun R, Santoso U, Nuraida L, Ardiansyah. 2015. *Tinjauan Ilmiah Proses Pengolahan Tempe Kedelai* Ed 1. Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia.
- Rahman A, Fardiaz S, Rahayu WP, Suliantari, Nurwitri CC. 1992. *Teknologi Fermentasi Susu*. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi IPB.

- Rimada PS, Abraham AG. 2006. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Int Dairy J.* 16:33–39.
- Robinson RK, Tamime AY. 1989. *Yoghurt: Science and Technology*. London (UK): Pergamon Press.
- Rohmah F, Estiasih T. 2018. Perubahan karakteristik kefir selama penyimpanan: Kajian pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 6(3):30-36.
- Rossi E, Hamzah F, Febriyani. 2016. Perbandingan susu kambing dan susu kedelai dalam pembuatan kefir. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 18(1):13-20.
- Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2008. Inactivation mechanisms of lactic acid *starter* cultures preserved by drying processes. *J Appl Microbiol.* 105:1–131.
- Saono S, Basuki T, Sastraamadra DD. 1977. Indonesian Ragi. Symposium on Indigenous Fermented Foods, Bangkok, Thailand.
- Saono S, Gandjar I, Basuki T, Karsono H. 1974. Microflora of ragi and some other traditional fermented foods from Indonesia. *Annales Bogoriensis* V:187-204.
- Sarkar S. 2008. Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt. *British Food J.* 110(7):717–740.
- Sarwono, B. 2006. *Membuat Tempe dan Oncom*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya.
- Saxena IM, Brown RM, Dandekar T. 2001. Structure–function characterization of cellulose synthase: relationship to other glycosyltransferases. *Phytochemistry*. 57(7):1135–1148.
- Schwan RF, Magalhaes-Guedes KT, Dias DR. 2015. Kefir - Grains and Beverages: A Review. *Scientia Agraria Paranaensis*. 14(1):1-9.
- Shambuyi, M., L.R. Beuchat, Y-C. Hung, T. Nakayama. 1992. Evaluation of substrates and storage conditions for preparing and maintaining *starter* cultures for tempeh fermentation. *Int J Food Microbiol.* 15:77–85.
- Shurtleff W, Aoyagi A. 1979. *The Book of Tempeh*. New York (US): Harper and Row Publ.

- Simova ED, Beskova DM, Angelov A, Hristozova TS, Frengova GI, Sposov Z. 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 28:1-6.
- Sivamaruthi BS, Kesika P, Chaiyasut C. 2019. Toxins in fermented foods: Prevalence and preventions—A Mini Review. *Toxins* 11(1): 4.
- Steinkraus KH, Cullen RE, Pederson CS, Nellis LF, Gavitt BK. 1983. *Handbook of Indigenous Fermented Foods.* New York (US): Marcel Dekker Inc.
- Suhardini, Prasis N, Zubaidah E. 2016. Studi aktivitas antioksidan kombucha dari berbagai jenis daun selama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri.* 4(1):221-229.
- Suleiman AM. 2017. *Microbial Starter Cultures.* Mauritius: LAP Lambert Academic Publishing.
- Suliantari. 1996. Pembuatan dan penanganan laru (inokulum) tempe. Di dalam: Syarief R. (ed). *Pengembangan Industri Kecil Tempe.* Jakarta (ID): Kantor Meneg Urusan Pangan.
- Tamime AY, Robinson RK. 1999. *Yoghurt Science and Technology* (2nd Ed.). Cambridge (UK): Woodhead Publishing Ltd.
- Tani Y, Vongsuvanlert V, Kumnuanta J. 1986. Raw cassava starch-digestive glucoamylase of *Aspergillus* sp. N-2 isolated from cassava chips. *J Ferm Technol.* 64:57-65.
- Uraz T, Özer BH. 2014. *Starter cultures: Molds employed in food processing.* Di dalam: Batt CA, Tortorello ML (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology.* Academic Press, hlm. 522-528.
- Victor RP, Heldman DR. 2001. *Introduction to Food Engineering.* 3rd ed. London (UK): Academic Press.
- Wang HL, Swain EW, Hesseltine CW. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *J Food Sci.* 40:168-170.
- Wang D, Zhang J, Yang Q, Li N, Sumathy K. 2014. Study of adsorption characteristic in silica gel-water adsorption refrigeration. *Appl Energ.* 113:734-741.

- Webb BHAH, Johnson, Alford JA. 1983. *Fundamental of Dairy Chemistry*. 2nd Ed. Westport, Connecticut (US): The Avi Publishing Co. Inc.
- Whitaker JR. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Science*. New York (US): Marcell Dekker, Inc.
- Winarno FG, Winarno W, Winarno ADA. 2017. *Tempe: Kumpulan Fakta Menarik Berdasarkan Penelitian*. Jakarta (ID): PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wistiana D, Zubaidah E. 2015. Karakteristik kimiawi dan mikrobiologis kombucha dari berbagai daun tinggi fenol selama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(4):1446-1457.
- Wu C, Huang J, Zhou R. 2017. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. *Crit Rev Microbiol*. 43:393–404.
- Yusuf D, Nuraida L, Hariyadi RD, Hunaefi D. 2020. Lactic acid bacteria and yeast from Indonesia kefir grains and their growth interaction. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*. 20(1):44-49.
- Zajšek K, Kolar M, Goršek A. 2011. Characterisation of the exopolysaccharide kefiran produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *Int. J. Dairy Technol*. 64:544–548.

3. FERMENTASI ALKOHOL

3.1 Khamir dalam Fermentasi Pangan

Khamir merupakan mikroorganisme eukariotik uniseluler yang diketahui berperan pada berbagai pangan fermentasi. Khamir berperan penting pada pangan fermentasi dengan melakukan perubahan kimia dan biokimia seperti pembentukan *flavor*, aroma, dan rasa. Keragaman pangan yang difermentasi oleh khamir meliputi minuman beralkohol seperti tuak, brem, anggur (*wine*); sereal dan ubi, misalnya roti, tape ketan, dan tape singkong; susu misalnya kefir; kacang-kacangan misalnya kecap. Pada fermentasi alami, khamir mendominasi baik sebagai mikroorganisme tunggal atau bersama dengan mikroorganisme lainnya seperti bakteri asam laktat dan kapang. Biomassa khamir juga dapat digunakan sebagai bahan baku untuk pembentukan senyawa *flavor*, seperti ekstrak khamir yang memberikan *flavor* gurih atau umami.

Khamir merupakan fungi uniseluler yang membelah diri dengan pertunasan (*budding*) atau fisi (Knop 2011). Sel vegetatif khamir dari famili *Saccharomycetaceae* memiliki bentuk elipsoid atau sferikal. Tunas tumbuh sampai diameter tertentu, namun secara umum lebih kecil dari induknya. Sebagai contoh, tunas *Saccharomyces cerevisiae* berukuran sekitar 2/3 dari sel induknya sebelum secara fisik dilepaskan dengan proses yang disebut sitokinesis.



Saat ini, telah banyak galur khamir yang telah diisolasi dari fermentasi alami dan digunakan sebagai kultur *starter*. Fermentasi khamir dapat digunakan untuk memperbaiki rasa, *flavor*, dan tekstur, serta meningkatkan nilai gizi dan sifat fungsional pangan. Salah satu jenis khamir yang sering terlibat dalam fermentasi alkohol adalah *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir ini merupakan mikroorganisme yang penting dalam aplikasi bioteknologi. *S. cerevisiae* memiliki karakteristik yang unik dalam produksi alkohol dan CO₂, serta memiliki ketahanan terhadap tekanan osmotik dan pH rendah (Parapouli 2020). Kemampuan *S. cerevisiae* dalam menghidrolisis glukosa menjadi etanol banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang, seperti pengolahan produk pangan, industri bioetanol, dan lain-lain.

Secara umum, sel khamir hidup dengan baik pada suhu optimum 20–30 °C, pH 4,5–6,5, dan A_w minimum 0,65 (Walker dan Stewart 2016). *S. cerevisiae* dapat tumbuh pada kadar etanol 10–15% (Alba-Lois dan Segal-Kischinevsky 2010) dan kadar gula 15–25% (Laluce *et al.* 2009). Konsentrasi gula, etanol, dan suhu yang lebih tinggi dari kondisi optimumnya akan menjadi cekaman yang dapat menurunkan daya hidup sel khamir sehingga membuat proses fermentasi terhenti. *S. cerevisiae* merupakan fermentor gula yang kuat, mempunyai toleransi yang tinggi terhadap alkohol, dan mampu menghasilkan konsentrasi etanol yang tinggi (Ardhana dan Fleet 1989). Saat ini *S. cerevisiae* sering digunakan untuk memproduksi etanol secara fermentasi karena dapat menghasilkan etanol dalam jumlah besar dan mempunyai nilai toleransi terhadap alkohol yang tinggi.

Peran utama khamir pada fermentasi pangan mencakup produksi alkohol, modifikasi tekstur atau pengembangan volume karena produksi karbondioksida, asidifikasi dan produksi senyawa antimikroba yang berperan terhadap pengawetan, peningkatan nilai gizi, penghilangan komponen antinutrisi, serta produksi peptida bioaktif dan vitamin (Kandasamy *et al.* 2018). Khamir digunakan pada industri roti untuk mengembangkan adonan, dan jenis yang paling banyak digunakan sebagai ragi roti adalah *S. cerevisiae*. Pada proses fermentasi roti, khamir mengonversi gula menjadi alkohol dan karbondioksida yang berperan terhadap pengembangan dan pembentukan tekstur roti. Selain memproduksi gas, khamir juga memproduksi asam suksinat yang berperan terhadap reologi adonan roti dan pembentukan *flavor* roti (Kandasamy *et al.* 2018). Selain pada

roti, khamir juga digunakan dalam fermentasi susu. Khamir memproduksi asam-asam organik yang mencakup asam asetat, butirrat, propionat, dan piruvat selama fermentasi susu (Alvarez-Martin *et al.* 2008). Maturano *et al.* (2012) dalam studinya mengenai khamir dalam kultur campuran sampel vinifikasi (fermentasi anggur atau buah lainnya menjadi *wine*) menjelaskan bahwa selama fermentasi, beberapa khamir memproduksi enzim yang dapat memperbaiki daya cerna dan meningkatkan kandungan vitamin. Enzim-enzim hidrolisis seperti amilase, selulase, β -glukosidase, invertase, lipase, pektinase, protease, fitase, dan silanase juga diproduksi oleh khamir.

Selain *S. cerevisiae*, khamir lain juga berperan pada proses fermentasi. Pada fermentasi kefir, khamir yang berperan antara lain genera *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, dan *Zygosaccharomyces* (Kandasamy *et al.* 2018). *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, dan *Yarrowia lipolytica* umumnya ditemukan pada fermentasi keju. Khamir membantu pematangan keju dan pembentukan komponen *flavor* keju dengan adanya aktivitas lipolitik (Alvarez-Martin *et al.* 2008). Khamir juga berperan pada pembentukan *flavor* sosis fermentasi (Tamang dan Fleet 2009). Khamir dilaporkan berperan dalam meningkatkan nilai gizi roti dengan meningkatkan kandungan dan bioavailabilitas sterol, fenol, vitamin, dan mineral, serta meningkatkan kelarutan serat (Poutanen *et al.* 2009). Aktivitas khamir pada fermentasi juga membantu menurunkan asam fitat yang merupakan senyawa antinutrisi (Greppi *et al.* 2015). Degradasi fitat meningkatkan penyerapan mineral divalen seperti kalsium, besi, magnesium, dan zinc pada saluran pencernaan. Khamir yang memproduksi fitase antara lain *S. cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Candida krusei*, *Arxula adeninivorans*, *Debaryomyces castellii*, *K. lactis*, *Pichia anomala*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia spartinae*, *Rhodotorula gracilis*, *Schwanniomyces castellii*, dan *Torulaspora delbrueckii* (Moslehi *et al.* 2010).

Dalam fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat, khamir meningkatkan populasi bakteri asam laktat dengan memproduksi vitamin, asam amino, purin, dan gula sederhana dari karbohidrat kompleks. Sebaliknya, bakteri asam laktat memproduksi asam organik dan menurunkan pH medium yang mendukung pertumbuhan khamir (Kandasamy *et al.* 2018). Pada fermentasi sosis dan *olive*, khamir berkontribusi terhadap pembentukan *flavor*. Demikian juga pada

fermentasi kakao, khamir memproduksi pektinase yang mendegradasi *pulp*, mengkonversi gula pada *pulp* menjadi etanol yang penting untuk pembentukan *flavor* cokelat (Ho *et al.* 2014).

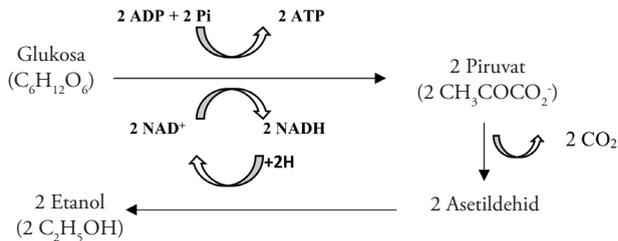
3.1.1 Metabolisme Khamir

Khamir merupakan mikroorganisme eukariotik yang paling sering digunakan dalam proses fermentasi untuk mengubah gula dari berbagai sumber yang berbeda-beda menjadi produk akhir fermentasi yaitu CO₂ dan alkohol. Khamir yang terlibat dalam proses fermentasi alkohol pada prinsipnya memiliki kemampuan menghasilkan etanol yang tinggi, toleran terhadap kadar etanol tinggi, mampu hidup pada suhu tinggi, tetap stabil selama proses fermentasi, dan stabil pada pH rendah (Rehm dan Reed 1981). Namun khamir bukan termasuk mikroorganisme amilolitik (tidak memiliki kemampuan menghidrolisis pati atau amilum menjadi lebih sederhana seperti glukosa, maltosa, dan dekstrin), sehingga pertumbuhannya dalam bahan bergantung pada jumlah gula sederhana yang terdapat pada bahan serta bergantung pada mikroorganisme lain yang dapat menghasilkan gula atau nutrisi lainnya.

Khamir menggunakan dua jalur metabolisme, yaitu melalui respirasi dan fermentasi, untuk menghasilkan ATP (*Adenosine triphosphate*) yang merupakan senyawa kunci dalam metabolisme energi. Jalur respirasi menghasilkan lebih banyak ATP (misalnya pada *S. cerevisiae* sekitar 18 ATP per molekul glukosa), sedangkan jalur fermentasi menghasilkan ATP yang jauh lebih rendah (2 ATP per molekul glukosa). Proses fermentasi tidak memerlukan oksigen (anaerob). Kedua jalur metabolisme dimulai dari glikolisis yang menghasilkan 2 ATP per mol glukosa. Pada glikolisis ini 1 molekul gula diubah menjadi 2 molekul piruvat. Pada jalur fermentasi, piruvat dikonversi menjadi etanol dan karbondioksida. Proses ini tidak menghasilkan tambahan ATP namun meregenerasi NAD⁺ yang dikonsumsi selama glikolisis sehingga tidak memerlukan oksigen. Pada proses respirasi, piruvat dioksidasi dengan sempurna melalui siklus TCA (*Tricarboxylic acid*) menuju fosforilasi oksidatif yang menghasilkan ATP lebih banyak namun memerlukan oksigen sebagai elektron akseptor (Pfeiffer dan Morley 2014). Pada konsentrasi gula dan oksigen yang tinggi, khamir dapat memperoleh energi dengan respirasi, fermentasi, atau menggunakan kedua jalur metabolisme

tersebut. Kemampuan khamir untuk memproduksi etanol pada konsentrasi gula yang tinggi menggunakan dua jalur metabolisme tersebut (respirasi aerob dan fermentasi anaerob) dikenal dengan efek *Crabtree* (Pfeiffer dan Morley 2014).

Mehta *et al.* (2012) menjelaskan bahwa proses fermentasi alkohol diawali dengan degradasi heksosa (glukosa, fruktosa) menjadi asam piruvat melalui proses glikolisis oleh khamir. Selanjutnya, asam piruvat tersebut diubah menjadi asetaldehid melalui proses dekarboksilasi oleh enzim dekarboksilase piruvat. Asetaldehid kemudian diubah menjadi etanol dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase. Reaksi pemecahan gula menjadi alkohol bersifat eksotermis dan reaksinya adalah sebagai berikut (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Proses fermentasi alkohol

3.2 Tape

3.2.1 Deskripsi Tape

Tape adalah makanan fermentasi tradisional Indonesia yang dibuat dari nasi ketan atau singkong yang telah dikukus, kemudian difermentasi menggunakan ragi tape. Tape memiliki tekstur lembut, rasa manis, sedikit asam, dan cita rasa yang khas karena mengandung sedikit alkohol. Tape yang dibuat dari beras ketan disebut tape ketan, sedangkan tape yang dibuat dari singkong disebut tape singkong. Di Jawa Barat tape diberi nama lokal peuyeum sehingga ada dua jenis peuyeum yaitu peuyeum ketan dan peuyeum sampeu (singkong). Produk yang sama juga dikenal di Malaysia dan Brunei dengan nama tapai pulut untuk tape ketan dan tapai ubi untuk tape singkong. Tape ketan dijual dalam

berbagai kemasan seperti dalam wadah kaca, wadah plastik, dengan dibungkus daun pisang atau daun jambu, sedangkan tape singkong biasanya digantung atau dikemas dalam besek (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Tape ketan (kiri) dan tape singkong (kanan)

Proses pembuatan tape cukup mudah sehingga tape banyak diproduksi oleh pengrajin tape skala rumah tangga dengan teknik pembuatan secara tradisional. Tape ketan biasa dikonsumsi sebagai hidangan pembuka atau bisa juga sebagai hidangan penutup. Namun pada umumnya tape merupakan makanan selingan, bukan makanan yang normal dikonsumsi setiap hari. Untuk membuat tape ketan, terdapat dua jenis ketan yang dapat digunakan yaitu beras ketan hitam dan beras ketan putih. Tape yang dibuat dari beras ketan putih dijumpai dengan warna putih atau hijau. Warna hijau diperoleh dari perasan daun katuk atau daun suji yang dicampurkan ke dalam beras sebelum beras ditanak. Adanya senyawa tanin, flavonoid, dan saponin dalam daun katuk yang bersifat antimikroba dapat menghambat pembusukan dan menghasilkan tape ketan dengan kualitas yang baik.

3.2.2 Fermentasi Tape

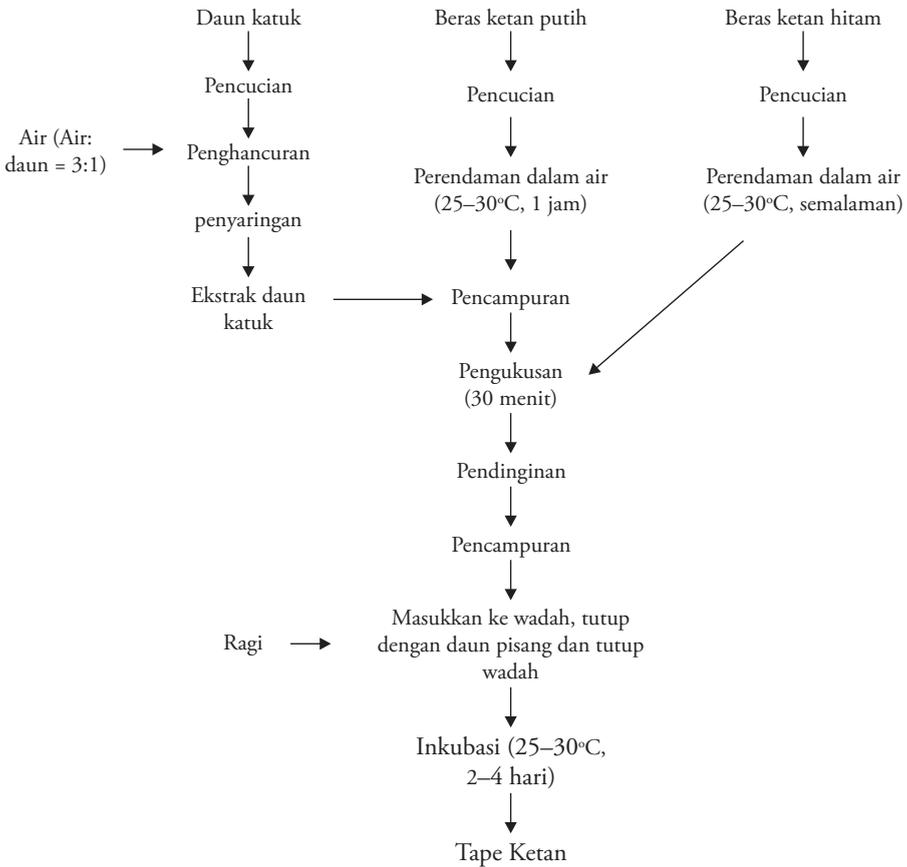
Pembuatan tape harus dilakukan dengan baik untuk menghasilkan kualitas warna, rasa, tekstur, serta aroma khas tape yang baik. Proses pembuatan tape ketan dilakukan dengan beberapa tahap yaitu beras ketan dicuci, lalu direndam, kemudian beras ketan dikukus sampai masak, beras ketan yang sudah masak kemudian didinginkan. Pemasakan diperlukan untuk melunakkan beras (Nuraida dan Owens 2014). Setelah mendekati suhu ruang, ketan ditaburi

ragi secara merata dan ditempatkan dalam wadah tertutup untuk menciptakan kondisi anaerob kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2–4 hari. Durasi fermentasi tergantung pada seberapa banyak rasa manis dan alkohol yang diinginkan. Setelah 1 hari inkubasi, rasa yang dihasilkan biasanya hanya sedikit manis dan rasa alkohol yang timbul masih lemah. Dengan waktu fermentasi yang lebih lama, tekstur tape menjadi lebih lembut dan lebih berair, serta rasa alkohol semakin kuat. Pada pembuatan tape ketan hitam, terdapat sedikit perbedaan dalam waktu perendaman. Beras ketan hitam lebih keras sehingga perendaman dilakukan semalam untuk melunakkan beras.

Proses fermentasi merupakan tahap terpenting dalam proses pembuatan tape ketan. Proses fermentasi pada tape ketan tergolong ke dalam fermentasi anaerob fakultatif. Proses fermentasi tersebut tidak memerlukan O_2 dari luar namun lebih menggunakan O_2 yang terdapat pada lingkungan sekitarnya. Selama proses fermentasi tape, mikroorganisme yang hadir akan memetabolisme senyawa nutrisi yang terdapat pada beras ketan. Proses fermentasi tape diawali dengan hidrolisis pati oleh enzim amilase yang dihasilkan oleh kapang, khamir, atau bakteri yang bersifat amilolitik menjadi glukosa yang selanjutnya akan difermentasi menjadi alkohol dan komponen *flavor* lainnya oleh khamir (Finalika dan Widjanarko 2015).

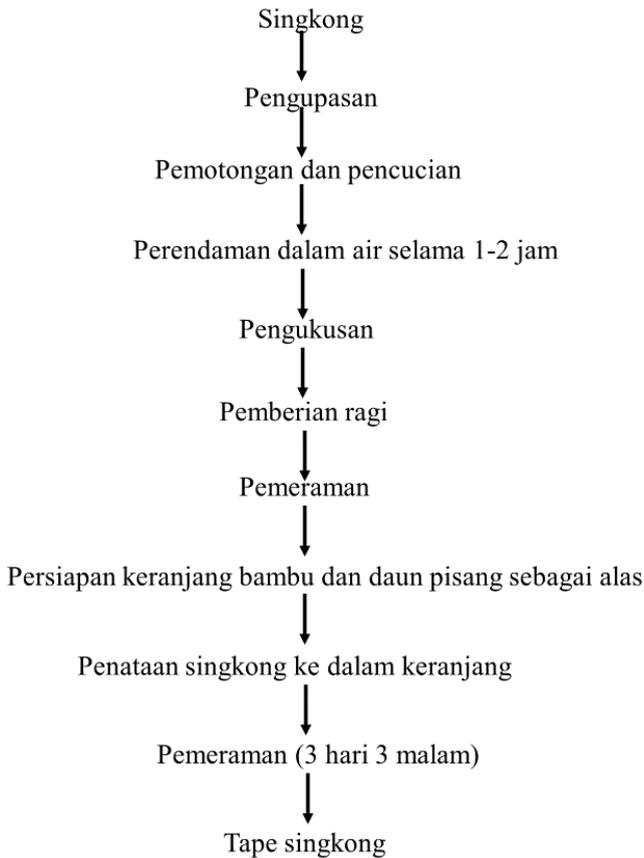
Terdapat beberapa faktor yang dapat memengaruhi proses fermentasi tape ketan, di antaranya ragi, lama fermentasi, suhu, pH, dan oksigen. Semakin besar konsentrasi ragi, maka akan berpengaruh terhadap organoleptik tape yang dihasilkan dari segi aroma, rasa, warna, dan tekstur, serta kadar alkohol yang dihasilkan akan semakin meningkat (Ninsix 2013). Semakin banyak ragi yang ditambahkan, jumlah pati yang dirombak menjadi glukosa akan semakin banyak sehingga jumlah glukosa yang tersedia untuk diubah menjadi alkohol juga semakin banyak. Semakin lama waktu fermentasi, maka semakin banyak gula yang diubah menjadi alkohol (etanol) oleh khamir *S. cerevisiae*. Suhu inkubasi (fermentasi) akan memengaruhi pertumbuhan mikroba, dengan suhu optimal untuk fermentasi tape pada kisaran 35–40°C. Kadar keasaman yang baik untuk pertumbuhan mikroba dalam fermentasi tape adalah pada pH 3,5–5,5. Oksigen dalam kemasan tape dibatasi agar tercipta suasana fermentasi anaerob. Proses pembuatan tape ketan secara tradisional dapat dilihat pada Gambar 3.3.

TEKNOLOGI FERMENTASI PANGAN



Gambar 3.3 Proses pembuatan tape ketan

Pada pembuatan tape singkong (Gambar 3.4), singkong terlebih dahulu dikupas dan dibersihkan. Pengrajin membuat tape singkong dari singkong yang dipotong-potong atau singkong utuh. Singkong yang telah dikupas lalu dikukus, didinginkan, dan ditempatkan pada keranjang bambu yang telah dialasi daun pisang. Ragi yang sudah ditumbuk ditaburkan pada setiap lapisan singkong. Keranjang lalu ditutup dengan daun pisang dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 2–3 hari. Tape singkong yang dibuat dari singkong yang telah dipotong-potong umumnya difermentasi pada besek bambu atau dibungkus dengan daun pisang.



Gambar 3.4 Proses pembuatan tape singkong

3.2.3 Mikrobiologi Tape

Proses fermentasi tape melibatkan beberapa mikroorganisme yang ditambahkan dalam bentuk ragi untuk membuat bahan baku (beras ketan atau singkong) menjadi produk yang diinginkan. Ragi tape mengandung konsorsium mikroba seperti kapang, khamir, dan bakteri yang berfungsi untuk mengubah karbohidrat (pati) menjadi gula dan alkohol (Barus *et al.* 2013). Perubahan tersebut juga menyebabkan tekstur tape menjadi lunak dan empuk. Kapang *Amylomyces rouxii* merupakan kapang yang penting pada fermentasi tape (Nuraida dan Owens 2014). Khamir yang umum ditemukan pada tape adalah *Hyphopichia burtonii* (*Endomycopsis burtonii*), *Saccharomycopsis fibuligera* (*Endomycopsis fibuligera*),

Saccharomyces cerevisiae, *Hansenula anomala*, dan *Candida beerwijckiae* (*Candida pelliculosa*) (Nuraida dan Owens 2014). Law *et al.* (2011) menyatakan bahwa *Amylomyces rouxii* dan *Candida pelliculosa* merupakan mikroorganisme dominan di tape, diikuti *Saccharomyces cerevisiae* dan *Hansenula anomala*.

Penelitian Ardhana dan Fleet (1989) menunjukkan bahwa fermentasi tape didominasi oleh pertumbuhan *A. rouxii*, *C. pelliculosa*, dan *S. cerevisiae*, namun *S. cerevisiae* jumlahnya lebih sedikit. Dengan menggunakan *A. rouxii* yang diisolasi dari ragi tape dan dikombinasikan dengan *Pichia burtonii* (*Endomycopsis burtonii*) dan khamir lainnya termasuk *Candida* spp. dan *Hansenula* spp., Cronk *et al.* (1977) menyimpulkan bahwa untuk pembuatan tape diperlukan campuran kapang dengan setidaknya satu spesies khamir. Nuraida dan Owens (2014) menyatakan bahwa kapang menginisiasi fermentasi dengan mengonversi pati menjadi gula lalu diikuti dengan fermentasi alkohol oleh khamir. *A. rouxii* dan *C. beerwijckiae* merupakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan amilolitik yang kuat sehingga akan menghidrolisis pati dari bahan baku menjadi gula. Sifat amilolitik ini penting agar gula sederhana yang dihasilkan dapat digunakan untuk memfasilitasi pertumbuhan mikroorganisme lainnya. *Hyphopichia burtonii*, *Saccharomycopsis fibuligera*, dan *S. cerevisiae* tidak bersifat amilolitik sehingga pertumbuhannya dalam beras ketan bergantung pada mikroba lain yang menghasilkan gula sederhana dan nutrisi lainnya (Cronk *et al.* 1979; Ardhana dan Fleet 1989). Dalam pembentukan rasa, aroma, dan *flavor* pada tape, *Wickerhamomyces anomalus* dan *C. beerwijckiae* berkontribusi dalam pembentukan aroma ester pada tape, sedangkan *S. cerevisiae* diketahui memiliki kemampuan untuk memfermentasi gula (Nuraida dan Owens 2014). *S. cerevisiae* merupakan fermentor gula yang kuat dan toleran terhadap etanol sehingga mampu menghasilkan konsentrasi etanol yang tinggi (Ardhana dan Fleet 1989).

Selain kapang dan khamir, bakteri asam laktat juga terdapat pada fermentasi tape (Nuraida dan Owens 2014). Selama fermentasi tape, Sujaya *et al.* (2002) mengamati adanya pertumbuhan yang berturut-turut dari berbagai jenis bakteri asam laktat. *Weissella* spp. merupakan bakteri yang pertama tumbuh, diikuti *Pediococcus pentosaceus*. Selain kedua bakteri tersebut, terdapat juga *Enterococcus* spp. yang tumbuh di awal. *Lactobacillus* spp. terdeteksi setelah 24 jam dan

selanjutnya jumlahnya menurun selama fermentasi. Ardhana dan Fleet (1989) juga mendeteksi adanya bakteri asam asetat seperti *Bacillus coagulans*, *B. brevis* dan *B. stearothermophilus* dari tape yang dijual di pasar. Pada tape singkong, Barus *et al.* (2013) melaporkan adanya *Bacillus* yang bersifat amilolitik yaitu *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, dan *B. thuringiensis*. Keberadaan *Bacillus* pada fermentasi tape singkong dapat berkontribusi terhadap modifikasi jaringan singkong (Amoa-Awua dan Jakobsen 1995). Hasanah *et al.* (2018) melaporkan bahwa jumlah bakteri asam laktat pada tape yang diproduksi industri rumah tangga berada pada kisaran 7,9–8,5 log cfu/g, sedangkan pada tape singkong pada kisaran 6,5–8,1 log cfu/g. Namun demikian, tidak ada korelasi antara kandungan bakteri asam laktat dengan skor deskriptif untuk keasaman, rasa alkohol, dan rasa manis.

3.2.4 Perubahan Kimia

Nilai gizi dari beberapa bahan pangan fermentasi dapat meningkat dibandingkan bahan mentah yang belum mengalami proses fermentasi. Selama fermentasi, tape mengalami perubahan-perubahan biokimiawi karena adanya aktivitas mikroba. Perubahan kimia yang terjadi selama fermentasi tape yaitu degradasi pati menjadi maltosa dan glukosa. Glukosa hasil degradasi pati kemudian akan diubah menjadi alkohol dan asam-asam organik. Perubahan kimia yang terjadi selama proses fermentasi dikatalis oleh enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroba.

Saccharomyces cerevisiae memproduksi enzim zimase dan invertase yang berperan dalam konversi glukosa menjadi alkohol. Khamir memiliki peranan yang penting dalam proses pembuatan tape, yaitu mengubah pati pada singkong atau beras ketan menjadi gula, serta mengubah sebagian gula menjadi alkohol dan komponen *flavor*. Perubahan kimiawi utama yang terdapat dalam proses fermentasi adalah hidrolisis pati yang terkandung pada beras ketan menjadi maltosa dan glukosa, karena adanya aktivitas kapang amilolitik *Amylomyces rouxii* dan khamir *Endomycopsis burtonii*. Selanjutnya, glukosa akan difermentasi menjadi etanol dan asam-asam organik yang menimbulkan rasa dan aroma yang khas. Khamir *Hansenula* akan mengesterifikasi alkohol dan asam-asam organik sehingga menghasilkan tape yang beraroma kuat (Steinkraus *et al.* 2008).

Tape ketan hitam yang merupakan hasil fermentasi beras ketan hitam mengandung antosianin, fenol, dan aktivitas antioksidan. Beras ketan hitam (*Oryza sativa glutinosa*) sebagai bahan baku tape ketan hitam merupakan komoditas yang sangat potensial sebagai sumber karbohidrat, antioksidan, senyawa bioaktif, dan serat yang penting bagi kesehatan (Rooney dan Serna 2000). Selain memiliki komponen fenolik, flavonoid dan antosianin, tape ketan hitam juga mengandung serat. Berbeda dengan nasi putih pada umumnya, ketan hitam sebagai bahan dasar tape ketan hitam memiliki kandungan serat yang lebih tinggi. Penelitian Bazzano *et al.* (2002) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian serat larut terhadap penurunan LDL dan berperan mengurangi risiko penyakit jantung koroner. Studi terbaru menunjukkan bahwa asupan serat yang tinggi khususnya serat larut air dapat mengurangi risiko penyakit kardiovaskuler.

3.3 Brem dan Sake

3.3.1 Deskripsi Brem Bali dan Sake

Brem Bali adalah minuman fermentasi beralkohol yang dibuat dari beras ketan putih atau hitam atau campuran keduanya. Brem sebagai minuman beralkohol dikenal terutama di Bali (Gambar 3.5). Di pulau Jawa, brem dipadatkan menjadi brem padat yang memiliki rasa manis-asam dengan sensasi *effervescent* dan lumer di dalam mulut. Oleh karena itu, nama brem merujuk pada brem padat, sedangkan minuman beralkohol seringkali disebut brem cair. Minuman brem serupa dengan sake di Jepang. Kedua jenis minuman ini diproduksi tanpa melalui proses destilasi. Selain di Jepang, minuman beralkohol sejenis brem Bali juga terdapat di negara lain, seperti Mie chiu (China), Sato (Thailand), Sonti (India), dan Yakyu (Korea).



Gambar 3.5 Brem cair khas Bali

(Sumber: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Balinese_brem_Eagle_brand.jpg)

3.3.2 Fermentasi Brem Bali dan Sake

Proses fermentasi brem bali pada dasarnya sama dengan proses fermentasi tape ketan, namun setelah proses fermentasi selama 3–5 hari, cairan yang diperoleh diperas dan disaring. Cairan yang diperoleh atau brem muda selanjutnya diperam. Secara tradisional pemeraman dilakukan dalam gentong atau periuk tanah liat. Selama proses pemeraman terjadi fermentasi gula menjadi alkohol sehingga terjadi peningkatan kadar alkohol. Pemeraman dilakukan dalam wadah tertutup selama 6 bulan untuk menghasilkan cairan jernih berwarna kecokelatan dengan kadar alkohol sekitar 11–15% (Sujaya *et al.* 2004). Brem cair memiliki rasa manis, asam, dan *flavor* alkohol. Pada fermentasi brem tradisional, cairan jernih yang terbentuk secara berkala dipindahkan ke dalam wadah lain yang bersih untuk memperoleh brem yang jernih. Setelah fermentasi dianggap selesai, brem dikemas dalam botol.

Fermentasi brem yang dilakukan secara tradisional seringkali menghasilkan brem dengan rasa yang tidak konsisten. Sujaya *et al.* (2004) menyatakan bahwa brem yang terlalu manis disebabkan karena kadar glukosa yang masih tinggi (5–10%). Dari brem yang difermentasi dengan 5 ragi yang berbeda, Sujaya *et al.* (2004)

menemukan *Saccharomyces cerevisiae* (35 strain), *Candida glabrata* (6 strain), *Pichia anomala* (3 strain) dan *Issatchenkia orientalis* (7 strain). Khamir-khamir tersebut tumbuh secara bertahap, namun *S. cerevisiae* menjadi khamir utama yang ada sampai dengan akhir fermentasi.

Nishida (2021) melaporkan bahwa sake diproses melalui proses fermentasi menggunakan beras khusus yang disebut beras sake. Konsentrasi alkohol pada produk akhir sake sekitar 20%. Hal yang penting pada pembuatan sake adalah beras, koji, dan khamir. Berbeda dengan fermentasi brem Bali, fermentasi sake menggunakan kapang koji yang akan mengonversi pati pada beras menjadi gula sederhana, untuk selanjutnya dikonversi menjadi etanol oleh khamir sake. Kedua mikroorganisme yang terlibat yaitu *Aspergillus oryzae* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Tahap pertama dalam membuat sake adalah membuat koji dengan menumbuhkan *A. oryzae* pada nasi bahan baku sake (Zhang *et al.* 2020). Koji memiliki 3 fungsi, yaitu menghasilkan enzim untuk mendekomposisi pati, protein, dan lemak pada nasi; memproduksi vitamin dan asam amino yang diperlukan oleh khamir sake; serta berkontribusi terhadap *flavor* sake. Tahap berikutnya adalah mencampur koji dengan nasi sake dan khamir sake. Kultur starter khamir sake disebut juga *subo* atau *moto*. Khamir sake yang terlibat adalah *S. cerevisiae* dengan karakteristik khusus yaitu dapat memproduksi etanol lebih tinggi (Zhang *et al.* 2020). Selama proses fermentasi, dilakukan penambahan air, koji, dan nasi sake secara berkala. Fermentasi sake dilakukan selama 18–35 hari. Tahap selanjutnya yaitu pengepresan, sedimentasi, dan penjernihan. Setelah filtrasi, sake dengan konsentrasi alkohol sekitar 20% dipasteurisasi dan selanjutnya diperam (Nishida 2021).

3.3.3 Brem Padat

Brem padat merupakan makanan fermentasi khas Indonesia yang umumnya berbentuk lempengan berwarna putih kekuningan dengan cita rasa manis-asam, mudah hancur dan larut dengan adanya air, serta memberikan sensasi dingin di lidah saat dikonsumsi. Karakteristik brem yang unik ini dihasilkan dari fermentasi alkoholik beras ketan, diikuti dengan filtrasi, pemekatan, pengadukan, dan pengeringan. Brem banyak diproduksi di wilayah Jawa Timur (Brem Madiun) dan Jawa Tengah (Brem Wonogiri).

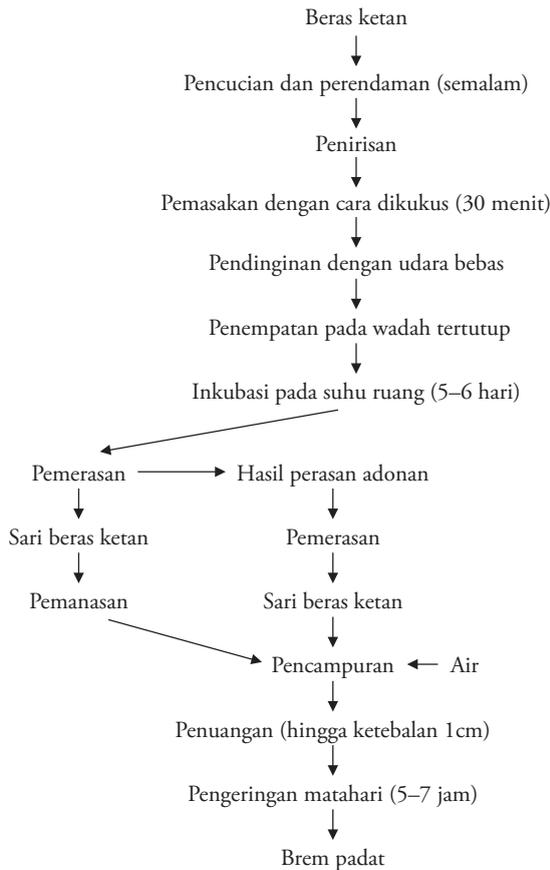
Brem padat yang sering dijumpai di pasaran pada umumnya berwarna putih hingga kecoklatan (Gambar 3.6), mempunyai rasa manis keasaman, serta hancur bila dimakan di mulut (Astawan dan Mita 1991). Brem padat merupakan makanan tradisional yang terbuat dari hasil fermentasi tape beras ketan putih atau beras ketan hitam. Brem padat dapat diperoleh dengan cara mengolah air tape ketan yang terbentuk selama fermentasi dan dilanjutkan dengan proses pemanasan, pengadukan, dan pencetakan.



Gambar 3.6 Brem padat

Proses fermentasi merupakan tahapan terpenting dalam proses pembuatan brem (Gambar 3.7). Proses fermentasi pembuatan brem diuraikan menjadi 4 tahap. Tahap pertama yaitu pemecahan molekul-molekul pati menjadi dekstrin dan gula-gula sederhana. Proses ini merupakan hidrolisis enzimatis menggunakan enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, sebagaimana dijelaskan pada fermentasi tape. Tahap kedua, gula yang terbentuk akan dikonversi menjadi alkohol. Gula juga akan dipecah menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat. Tahap ketiga, alkohol kemudian diubah menjadi asam organik oleh bakteri asam asetat seperti *Acetobacter* melalui proses oksidasi alkohol. Tahap keempat, sebagian asam organik akan bereaksi dengan alkohol membentuk cita rasa yang khas, yaitu ester. Enzim yang digunakan untuk mengubah glukosa menjadi alkohol dan karbondioksida dalam proses fermentasi adalah enzim zimase yang dihasilkan oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Proses fermentasi pembuatan brem juga dapat menghasilkan asam piruvat, yang merupakan zat antara produk yang terbentuk dalam hidrolisis gula menjadi etanol dan dapat diubah menjadi

etanol atau asam laktat. Perubahan asam piruvat menjadi asam laktat dikatalisis oleh bakteri *Pediococcus pentasaeus* (Sujaya *et al.* 2004) dan bakteri asam laktat lainnya yang terdapat pada fermentasi.



Gambar 3.7 Proses pembuatan brem padat (Steinkraus 1983)

3.4 Tuak

3.4.1 Deskripsi Tuak

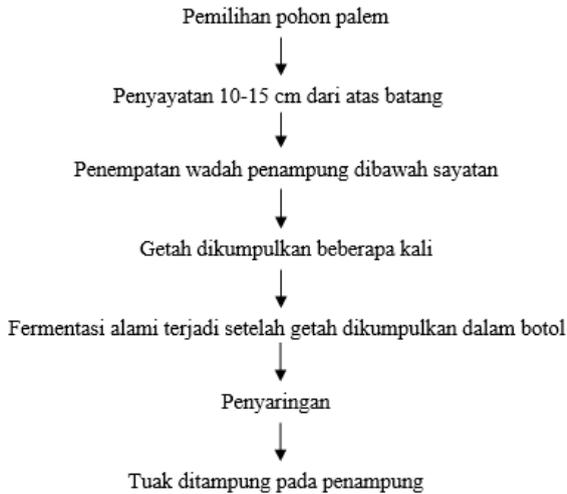
Tuak merupakan minuman beralkohol yang terbuat dari nira kelapa atau nira aren. Minuman sejenis juga dikenal di negara Asia Tenggara, misalnya di Filipina disebut tuba, dan di Vietnam disebut nuoudua. Secara internasional, produk

sejenis tuak disebut *palm wine* atau *toddy*. Produk ini juga terdapat di negara-negara Afrika. Nira merupakan cairan manis yang mengucur dari tandan kelapa atau pun aren. Nira didapat melalui proses penyadapan tandan bunga kelapa/aren/siwalan yang bunganya belum mekar, dikenal dengan mayang kelapa. Cairan yang keluar ditampung dalam wadah plastik atau batang bambu. Kondisi penyadapan terbaik adalah saat pohon aren berumur 8–9 tahun saat mayang bunga sudah keluar. Penyadapan dapat dilakukan pagi dan sore. Biasanya dalam setahun dapat disadap 3–12 tangkai bunga (Dedi 2010). Dalam keadaan segar, nira mempunyai rasa manis, aroma yang khas, berbau harum, dan relatif tidak berwarna. Biasanya nira digunakan sebagai bahan dasar pembuatan gula merah, cuka, serta penghasil alkohol (Leasa dan Matdoan 2015).

Proses penyadapan nira memerlukan penanganan khusus, baik sebelum maupun sesudah penyadapan. Nira merupakan cairan yang mengandung kadar gula tinggi, yaitu sukrosa, glukosa, dan fruktosa, serta memiliki derajat keasaman (nilai pH) rata-rata 6–7. Proses fermentasi oleh mikroorganisme yang berasal dari mayang kelapa dan terdapat dalam wadah dimulai ketika nira mengalir ke dalam wadah penampung. Setelah 24 jam kadar alkohol dapat mencapai 9%. Proses fermentasi yang terlalu lama akan menyebabkan terbentuknya asam asetat yang mengganggu aroma tuak (Endo *et al.* 2014).

3.4.2 Fermentasi dan Mikrobiologi Tuak

Nira secara alami mengandung gula sebanyak 10–12% sehingga sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme saat proses fermentasi (Law *et al.* 2011). Mussa (2014) menjelaskan bahwa air nira yang baru diambil dari pohonnya memiliki rasa manis dengan pH netral sekitar 7, akan tetapi pengaruh lingkungan dan proses fermentasi menyebabkan air nira tersebut mengalami perubahan sehingga pH menurun menjadi 5,34 dan rasa manis pada nira berubah menjadi asam. Diagram alir proses fermentasi alami pembuatan tuak disajikan pada Gambar 3.8.



Gambar 3.8 Fermentasi alami pada proses pembuatan tuak

Untuk membuat tuak secara tradisional, nira sawit yang disadap dibiarkan secara spontan mengalami fermentasi alami. Fermentasi tuak terdiri atas fermentasi asam laktat oleh bakteri asam laktat, fermentasi alkohol oleh khamir, diikuti oleh fermentasi asetat oleh bakteri asam asetat. Pada awalnya, fermentasi terjadi karena adanya khamir *Saccharomyces* sp. secara alami. Fermentasi umumnya dilakukan selama sehari. Selain khamir, mikroorganisme yang berperan adalah bakteri seperti *Lactobacillus*. Selama fermentasi berlangsung, gula diubah oleh *Saccharomyces* menghasilkan etanol dan oleh *Lactobacillus* menghasilkan asam. Jumlah khamir pada tuak adalah 10^7 – 10^8 sel/mL sampel, sedangkan bakteri akan mengalami suksesi pertumbuhan karena konsentrasi etanol yang meningkat (Mussa 2014).

Mikroorganisme yang terlibat dalam proses fermentasi minuman tuak dapat terus berubah pada tiap tahapan proses fermentasi. Hal ini merupakan akibat fermentasi oleh ragi serta akumulasi asam organik, terutama asam asetat hasil fermentasi bakteri asam asetat yang berkembang setiap hari. Khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat adalah mikroba yang paling banyak dilaporkan dalam berbagai penelitian. Namun *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme utama karena bertanggung jawab untuk mengubah gula dalam nira menjadi alkohol.

Berbagai macam mikroorganisme yang terlibat dalam proses pembuatan tuak telah berhasil diisolasi. Spesies *Acetobacter* berhasil diisolasi dari tuak dan dari batang pohon palem yang belum matang. Khamir yang termasuk dalam genera *Saccharomyces*, *Pichia*, dan *Candida* merupakan isolat dominan dalam fermentasi nira kelapa. Khamir *Saccharomyces chevalieri* merupakan spesies yang paling dominan, yaitu mencapai 35% dari total isolat (Atputharajah *et al.* 1986), sedangkan khamir yang bertanggung jawab untuk fermentasi alami nira yang menjadi tuak antara lain *Saccharomyces cerevisiae* dan *Schizosaccharomyces pombe*. Bakteri asam asetat dominan yang telah diisolasi dari tuak yaitu *A. aceti*, *A. rancens*, dan *A. suboxydans*. Bakteri lain seperti *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Leuconostoc dextranicum*, dan *Leuconostoc* sp. juga ditemukan dalam tuak (Atputharajah *et al.* 1986). Bakteri asam asetat menghasilkan asam asetat dalam jumlah tinggi dari alkohol, sedangkan bakteri asam laktat memfermentasi gula menjadi asam laktat.

Selama penyadapan, terjadi perubahan konsistensi dan warna pada nira aren, dari transparan menjadi putih karena bakteri asam laktat menghasilkan polisakarida seperti dekstran (Naknean *et al.* 2010). Suspensi khamir dan bakteri juga memberikan penampilan putih susu (Lasekan *et al.* 2007). Pada pembuatan tuak, biasanya ditambahkan kulit batang *Sonneratia* sp. (kayu raru) untuk menghambat fermentasi lanjutan pada nira, khususnya oksidasi alkohol menjadi asam cuka (Zenta dan Sinda 2003). Fermentasi alami akan mengubah nira menjadi tuak dengan rasa sedikit alkohol, dengan rasa lebih manis, buih kuat, dan warna putih susu karena banyak mengandung suspensi bakteri dan khamir (Law *et al.* 2011).

Fermentasi yang terjadi mengakibatkan adanya perombakan terhadap senyawa-senyawa yang terdapat pada nira. Proses fermentasi menyebabkan sukrosa yang terdapat di dalam nira akan berubah menjadi alkohol dan berlanjut menjadi asam asetat sehingga terjadi perubahan cita rasa. Perubahan ini juga diikuti dengan jumlah kelimpahan khamir pada nira yang digunakan, karena khamir akan mengalami sukseksi jika substratnya mengandung asam. Sukseksi adalah pergantian jenis mikroba sejalan dengan bertambahnya waktu fermentasi. Proses fermentasi pada nira dapat berlangsung dalam hitungan jam. Mikroba yang berkembang selanjutnya adalah mikroba yang membentuk asam asetat. Setelah melalui proses fermentasi, tuak yang dihasilkan mengandung air 88,4%, protein 0,38%, lemak 0,2%, mineral 0,02%, karbohidrat 7%, dan alkohol 4%.

Santiago-Urbina *et al.* (2013) melaporkan bahwa karakteristik fermentasi tergantung pada komposisi nira, jenis pohon palem, dan lokasi pohon. Konsentrasi etanol yang terbentuk dari hasil perombakan glukosa pada nira dalam tuak dipengaruhi berbagai faktor seperti adanya mikroorganisme yang bertanggung jawab untuk fermentasi alkohol, komposisi nira, jenis pohon palem, kondisi lingkungan seperti suhu dan kecepatan angin, jenis penyadapan, laju aliran nira, waktu saat tuak sampel diambil, dan waktu antara pengumpulan dan analisis sampel.

3.5 Roti yang Dikembangkan dengan Khamir

3.5.1 Deskripsi

Seni pembuatan roti berasal dari jaman prasejarah. Roti yang dikembangkan dengan khamir tercatat berasal dari Mesir kuno pada 1300–1500 SM dan di China pada 500–300 SM (Lahue *et al.* 2020). Saat ini roti tidak hanya berperan pada diet, namun juga sebagai hasil karya seni kreatif. Pembuatan roti terdiri dari dua tahap yang tergantung pada suhu (Ali *et al.* 2012). Tahap pertama adalah fermentasi, dengan produk karbondioksida yang tergantung pada aktivitas khamir untuk membentuk struktur adonan berpori dan meningkatnya volume roti. Tahap kedua adalah pemanggangan untuk menguatkan struktur roti. Struktur roti yang terbentuk tergantung dari ingredien adonan, aktivitas ragi, jenis ragi, suhu fermentasi dan pembentukan gelembung karbondioksida, serta perlakuan pendahuluan terhadap ragi roti (Ali *et al.* 2012; Struyf *et al.* 2017). Secara singkat, pembuatan roti terdiri atas pencampuran tepung gandum dengan ragi roti dan ingredien lainnya, pembuatan adonan, fermentasi tahap pertama, pembentukan roti, fermentasi tahap kedua, pemanggangan, pendinginan, dan pengemasan.

3.5.2 Fermentasi, Perubahan Kimia, dan Mikroorganisme yang Terlibat

Khamir telah diketahui berperan pada berbagai fermentasi pangan terutama minuman atau makanan beralkohol. Pada tahap fermentasi roti, terjadi pengembangan adonan yang berfungsi untuk menciptakan tekstur yang empuk.

Khamir melakukan pengembangan roti dengan memfermentasi gula menjadi alkohol dan karbondioksida. Volume roti ditentukan oleh kemampuan adonan mempertahankan karbondioksida dan produksi gas oleh ragi roti (Gelinas dan McKinnon 2018). Produksi gas merupakan keseimbangan antara jumlah khamir, *gassing power* (kemampuan menghasilkan karbondioksida), dan ketersediaan gula yang dapat difermentasi. Produksi karbondioksida dipengaruhi juga oleh jenis ragi roti dan strain khamir yang digunakan. Substrat yang paling disukai oleh khamir adalah glukosa dan fruktosa (Struyf *et al.* 2017). Sukrosa harus dikonversi terlebih dahulu menjadi glukosa dan fruktosa. Begitu pula dengan pati, harus dikonversi menjadi gula-gula sederhana. Karbondioksida yang diproduksi akan berperan dalam pembentukan struktur roti. Selain berperan pada pembentukan gas, khamir atau ragi roti berperan pada pembentukan *flavor* dan reologi adonan.

Aktivitas ragi roti pada fermentasi roti dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya jumlah ragi yang ditambahkan, penambahan enzim, komposisi adonan, ketersediaan air pada adonan, suhu dan RH lingkungan fermentasi, serta ketersediaan oksigen. Untuk fermentasi yang optimal pada adonan yang berbeda, harus dipilih strain khamir yang sesuai. Jumlah khamir yang ditambahkan biasanya sekitar 2,5%, jika kurang dari itu, *flavor* tidak terbentuk dengan baik. Penambahan enzim-enzim pemecah pati seperti α -amilase, β -amilase, α -glukosidase, dan amiloglukosidase juga dapat membantu dengan menyediakan glukosa yang difermentasi oleh khamir (Struyf *et al.* 2017).

Adonan roti merupakan matriks kompleks yang berisi berbagai ingredien yang dapat memengaruhi aktivitas ragi roti. Komposisi adonan akan menyediakan nutrisi utama yang dibutuhkan oleh ragi roti, termasuk ketersediaan gula sederhana. Gula sederhana diperoleh dari adonan dan tepung, aktivitas α -amilase, dan dapat ditambahkan sebagai bagian dari formulasi, misalnya dalam bentuk sukrosa (gula pasir). Meski demikian, adonan roti manis yang mengandung gula sampai 30% per berat tepung dapat menyebabkan cekaman/stres osmosis terhadap khamir dan merusak sel khamir sehingga mengurangi kinerja ragi roti (Ali *et al.* 2012; Struyf *et al.* 2017). Adanya garam dalam adonan dapat menginduksi stres osmotik dan ionik sehingga menyebabkan cekaman pada khamir. Faktor lain yang juga memengaruhi aktivitas ragi roti adalah ketersediaan air pada adonan.

Lingkungan adonan roti sangat memengaruhi aktivitas ragi roti sehingga aktivitas ragi roti akan berbeda untuk setiap jenis adonan. Paparan yang berlebihan terhadap oksigen akan menyebabkan glukosa dimetabolisme secara aerob dan kurang menghasilkan gas. Fermentasi adonan roti sebaiknya dilakukan pada suhu 23–30°C (Struyf *et al.* 2017). Pada suhu yang lebih tinggi dari 30°C pengembangan adonan akan terlalu cepat, sementara pada suhu 60°C khamir akan terinaktivasi. Durasi fermentasi dan RH lingkungan fermentasi juga memengaruhi pembentukan gas. Fermentasi biasanya dilakukan pada RH 70–80%.

Dari sisi penggunaan ragi roti, terdapat dua metode fermentasi roti (Lahue *et al.* 2020). Yang pertama adalah dengan penambahan ragi roti komersial berisi *Saccharomyces cerevisiae* kultur murni. Kultur murni *S. cerevisiae* dipelihara dan digunakan untuk membuat ragi roti oleh perusahaan ragi roti. Ragi roti dijual secara komersial dalam bentuk *compressed yeast* (berbentuk *cake* atau granula), *active dry yeast*, dan *instant yeast*. Yang kedua adalah dengan menggunakan kultur *starter* alami yang berisi khamir dan bakteri. Kultur *starter* tersebut dipelihara secara turun-temurun, dan diperbanyak secara tradisional di produsen roti. Pada cara yang kedua, kultur *starter* lebih kompleks dan kaya akan berbagai mikroorganisme yang bervariasi antar produsen roti, dipengaruhi jenis gandum yang digunakan, sejarah kultur *starter*, dan faktor-faktor lainnya. Namun demikian, *S. cerevisiae* selalu hadir pada *starter* kedua ini.

Lahue *et al.* (2020) menyatakan bahwa adonan roti memerlukan *Saccharomyces cerevisiae* yang secara efisien menggunakan gula kompleks berisi maltosa, toleran terhadap tekanan osmotik, garam, dan kandungan gula tinggi, dapat bertahan pada berbagai kondisi proses seperti pembekuan dan pengeringan, serta memproduksi aroma dan *flavor* yang diinginkan. Selama produksi ragi roti, khamir terpapar pada berbagai cekaman/stres seperti pengeringan dan siklus *freeze-thaw*, dan selama fermentasi roti terpapar pada konsentrasi gula tinggi. Khamir yang digunakan untuk fermentasi roti harus mengalami penyesuaian terhadap berbagai konsentrasi sukrosa selama proses fermentasi (Ali *et al.* 2012).

Terkait dengan ragi, Struyf *et al.* (2017) menyatakan bahwa beberapa faktor pada ragi roti seperti medium pertumbuhan, perlakuan pasca panen sel, dan pelarutan ragi roti dapat memengaruhi laju fermentasi. Perlakuan terhadap ragi

roti sebelum pencampuran juga memengaruhi aktivitas khamir. Jika adonan yang telah dicampur dengan ragi roti dibekukan, kemampuan pengembangan ragi roti dapat menurun secara bertahap. Selama penyimpanan dingin, khamir pada adonan dapat kehilangan viabilitasnya, yang selanjutnya memengaruhi kemampuannya menghasilkan gas karbondioksida.

Selain roti yang difermentasi oleh khamir, jenis roti lainnya adalah *sourdough* yang difermentasi oleh khamir dan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat menyebabkan asidifikasi adonan yang dapat meningkatkan umur simpan roti dengan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Pembuatan *sourdough* pada industri roti umumnya dikombinasikan dengan ragi roti yang berisi *S. cerevisiae*, yang berperan mengembangkan roti (Xu *et al.* 2019). Penggunaan ragi roti pada pembuatan *sourdough* memperbaiki flavor, tekstur, dan meningkatkan umur simpan dengan memperlambat *staling* (roti menjadi keras) dan pertumbuhan kapang. Berbeda dengan fermentasi roti dengan ragi roti, pembuatan *sourdough* masih sering menggunakan fermentasi *backslopping* dengan memelihara adonan dari adonan sebelumnya. *Sourdough* tradisional (Tipe I) mengandung *Lb. sanfranciscensis* yang berasosiasi dengan spesies *Kazachstania*, terutama *Kazachstania humilis*, sementara *sourdough* industri (Tipe II) didominasi oleh *Lactobacillus* sp. terutama *Lb. reuteri* dan *Lb. delbrueckii* dengan atau tanpa keberadaan khamir (Xu *et al.* 2019). Komposisi tepung dan interaksi metabolisme antara BAL dan khamir memengaruhi pengembangan adonan karena khamir dapat menghasilkan volume karbondioksida yang berbeda. Pada *sourdough*, *Lactobacillus* memengaruhi *flavor* adonan terutama karena konversi karbohidrat dan asam amino menjadi komponen *flavor* (Gänzle 2019). Polimerisasi gluten dan aktivitas proteolitik selama fermentasi *sourdough* merupakan faktor penentu kualitas roti.

Daftar Pustaka

- Alba-Lois L, Segal-Kischinevzky C. 2010. Yeast fermentation and the making of beer and wine. *Nat Educ.* 3(9):17.
- Ali A, Shehzad A, Khan MR, Shabbir MA, Amjid MR. 2012. Yeast, its types and role in fermentation during bread making process—A Review. *Pak J Food Sci.* 22(3):171-179.

- Alvarez-Martin P, Florez AB, Hernández-Barranco A, Mayo B. 2008. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*. 19(1):62–70.
- Amoa-Awua WKA, Jakobsen M. 1995. The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava. *J Appl Bacteriol*. 79:250-256.
- Ardhana MM, Fleet GH. 1989. The microbial ecology of tape ketan fermentation. *Int J Food Microbiol*. 9:157–165.
- Astawan M, Mita W. 1991 *Teknologi Pengadukan Pangan Nabati Tepat Guna*. Jakarta (ID): Akademika Pressindo.
- Atputharajah JD, Widanapathirana S, Samarajeewa U. 1986. Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiol*. 3:273–280.
- Barus T, Kristani A, Yulandi A. 2013. Diversity of amylase-producing *Bacillus* spp. from ‘tape’ (fermented cassava). *HAYATI J Biosci*. 20:94–98.
- Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. 2002. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. *Am J Clin Nutr*. 76:93-99.
- Cronk TC, Steinkraus KH, Hackler LR, Mattick LR. 1977. Indonesian Tape Ketan Fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 33(5):1067-1073.
- Cronk TC, Mattick LR, Steinkraus KH, Hackler LR. 1979. Production of higher alcohols during Indonesian tape ketan fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 37:892–896.
- Dedi SE. 2010. *Prospek Pengembangan Tanaman Aren (Arenga pinnata Merr.) Mendukung Kebutuhan Bioetanol di Indonesia*. Bogor (ID): Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Endo A, Irisawa T, Dicks L, Tanasupawat S. 2014. Fermentations of East and Southeast Asia. Di dalam: *Encyclopedia of Food Microbiology: FERMENTED FOODS*, hlm. 846–851.
- Finalika E, Widjanarko SB. 2015. Penentuan nilai maksimum respon rendemen dan gula reduksi brem padat tape ubi kayu (*Manihot esculenta*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2):670–680.

- Gänzle MG. 2019. Fermented foods. Di dalam: Doyle MP, Diez-Gonzalez F, Hill C. (Eds). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 5th Ed. Washington DC (US): ASM Press.
- Gelinas P, McKinnon C. 2018. Baking tests: Effect of sucrose and water on yeast gassing power. *Cereal Chem.* 95:822–828.
- Greppi A, Krych Ł, Costantini A, Rantsiou K, Hounhouigan DJ, Arneborg N *et al.* 2015. Phytase-producing capacity of yeasts isolated from traditional African fermented food products and PHYPk gene expression of *Pichia kudriavzevii* strains. *Int J Food Microbiol.* 205:81–89.
- Hasanah U, Ratihwulan H, Nuraida L. 2018. Sensory profiles and lactic acid bacteria density of tape ketan and tape singkong in Bogor. *Agritech.* 38(3): 265-272.
- Ho VTT, Zhao J, Fleet GH. 2014. Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol.* 174:72–87.
- Kandasamy S, Kavitate D, Shetty PH. 2018. Lactic Acid Bacteria and Yeasts as *Starter Cultures for Fermented Foods and Their Role in Commercialization of Fermented Foods*. Di dalam: Panda S, Shetty P. (eds). *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries: Food Microbiology and Food Safety*. Springer, Cham, hlm. 25-50.
- Knop M. 2011. Yeast cell morphology and sexual reproduction—A short overview and some considerations. *Comptes Rendus Biologies* 334:599-606.
- Lahue C, Madden AA, Dunn RR, Smukowski Heil C. 2020. History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. *Front. Genet.* 11:584718.
- Laluce C, Tognolli JO, de Oliveire KF. 2009. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83:627–637.
- Lasekan O, Buettner A, Christlbauer M. 2007. Investigation of important odorants of palm wine (*Elaeis guineensis*). *Food Chem.* 105:15-23.
- Law SV, Abu Bakar F, Mat Hashim D, Abdul Hamid A. 2011. Mini Review: Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *Int Food Res J.* 18:475–484.

- Leasa H, Matdoan MN. 2015. Pengaruh lama fermentasi terhadap total asam cuka aren (*Arenga pinnata* Merr.). *Biopendix*. 1(2):140-145.
- Maturano YP, Nally MC, Toro ME, De Figueroa LIC, Combina M, Vazquez F. 2012. Monitoring of killer yeast populations in mixed cultures: influence of incubation temperature of microvinifications samples. *World J Microbiol Biotechnol*. 28(11):3135–3142.
- Mehta BM, Eldin AK, Iwanski RZ. 2012. Fermentation Effects on Food Properties. Boca Raton (US): CRC Press Taylor & Francis Group.
- Moslehi S, Lindegaard L, Jespersen L. 2010. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Forum Nutr*. 2(4):449–473.
- Mussa R. 2014. Kajian tentang lama fermentasi nira aren (*Arenga pinnata*) terhadap kelimpahan mikrobadan kualitas organoleptik tuak. *Biopendix*. 1(1):56-60.
- Naknean P, Meenune M, Roudaut G. 2010. Characterization of palm sap harvested in Songkhla province, Southern Thailand. *Int Food Res J*. 17:977-986.
- Ninsix R. 2013. Pengaruh konsentrasi ragi merk NKL terhadap mutu tape yang dihasilkan. *Jurnal Teknologi Pertanian UNISI* 2(2):1-11.
- Nishida H. 2021. Sake brewing and bacteria inhabiting sake breweries. *Front. Microbiol*. 12:602380.
- Nuraida L, Owens JD. 2014. Sweet, sour, alcoholic solid substrate fungal fermentations. Di dalam: Owens JD (Ed). *Indigenous Fermented Foods of Southeast Asia*. Boca Raton (US): CRC Press.137(2):56-66.
- Parapouli M, Vasileiadis M, Afendra AS, Hatziloukas E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*. 6 (1):1–31.
- Pfeiffer T, Morley A. 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci*. 1:17.
- Poutanen K, Flander L, Katina K. 2009. *Sourdough* and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol*. 26(7):693–699.
- Rehm HJ, Reed G. 1981. *Biotechnology: A Comprehensive Treatise* Vol. III. Weinheim (DE): Verlag Chemie.

- Rooney LW, S Serna. 2000. *Handbook of Cereal Science and Technology*. New York (US): Marcel Dekker. hal. 149–175.
- Santiago-Urbina JA, Ruíz-Terán F. 2014. Microbiology and biochemistry of traditional palm wine produced around the world. *Int Food Res J*. 21:1261–1269.
- Steinkraus KA, Kaerberlein M, Kennedy B. 2008. Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 24:29–54.
- Steinkraus KH. 1983. *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. New York (US): Marcel Dekker.
- Struyf N, Maelen EV, Hemdane S, Verspreet J, Verstrepen KJ, Courtin CM. 2017. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 16:850-867.
- Sujaya IN, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Tomita F. 2004. Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. *World J Microbiol Biotechnol*. 20(2):143–150.
- Tamang JP, Fleet GH. 2009. Yeasts diversity in fermented foods and beverages. In: *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Netherlands: Springer, hal. 169–198.
- Walker GM, Stewart GG. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*. 2(4):30.
- Xu D, Zhang Y, Tang K, Hu Y, Xu X, Gänzle MG. 2019. Effect of mixed cultures of yeast and *Lactobacilli* on the quality of wheat sourdough bread. *Front Microbiol*. 10:2113.
- Zenta F, Sinda L. 2003. Peranan kulit kayu buli *Sonneratia* sp. dalam fermentasi nira aren menjadi minuman beralkohol. *Marina Chimica Acta* 1(1):12-16.
- Zhang K, Wu W, Yan Q. 2020. Research advances on sake rice, koji, and sake yeast: A review. *Food Sci Nutr*. 8(7):2995-3003.

5. FERMENTASI ASAM LAKTAT

5.1 Bakteri Asam Laktat dalam Fermentasi Pangan

Bakteri asam laktat (BAL) adalah suatu kelompok bakteri yang dapat memproduksi asam laktat dari fermentasi karbohidrat. BAL memiliki karakteristik Gram-positif, aerotoleran, tidak membentuk spora, berbentuk bulat dan batang, tahan terhadap asam, bersifat katalase negatif, dan memiliki kandungan basa DNA Guanin+Sitosin (G+C) yang rendah. BAL termasuk dalam filum *Firmicutes*. Awalnya, BAL diklasifikasikan oleh Orla-Jensen pada tahun 1919 ke dalam empat genera: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Klasifikasi awal ini didasarkan pada karakteristik fenotip, termasuk suhu optimal untuk pertumbuhan, penggunaan gula, dan metabolit yang dihasilkan. Pada abad ke-20, klasifikasi dilakukan dengan kriteria hibridisasi DNA-DNA, persentase mol G+C, dan struktur kimia peptidoglikan, sehingga klasifikasi BAL mengalami perubahan (Zheng *et al.* 2020). Berdasarkan hal tersebut, saat ini jenis BAL lebih beragam dengan ditambahkannya genus baru seperti *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weissella*. Sebagian besar BAL merupakan bakteri nonpatogenik dan



berstatus aman untuk dikonsumsi (*Generally Recognized as Safe/GRAS*) (Mozzi 2016; Bintsis 2018). Dari genera tersebut, *Lactobacillus* dan *Carnobacterium* berbentuk batang, dan lainnya berbentuk bulat/koki, kecuali species *Weisella* yang dapat berbentuk batang atau koki (Mozzi 2016). Genus *Lactobacillus* terdiri dari 261 species yang sangat berbeda-beda dari sisi fenotip, ekologi dan genotip, sehingga saat ini *Lactobacillus* diklasifikasikan kembali menjadi 25 genera, yang terdiri dari *Lactobacillus* (grup *Lactobacillus delbrueckii*), *Paralactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, dan *Secundilactobacillus* (Zheng *et al.* 2020). Namun dalam buku ini masih digunakan klasifikasi genus *Lactobacillus* yang lama.

BAL umumnya ditemukan pada lingkungan yang mengandung komponen kompleks seperti karbohidrat, asam amino, vitamin, mineral, dan asam lemak untuk sumber nutrisinya. Keberadaan BAL pada jenis pangan meliputi sayuran, produk susu, daging, dan sereal. Di luar bahan pangan, bakteri ini berhabitat sebagai flora pada manusia dan hewan seperti mulut dan saluran pencernaan (Mozzi 2016).

Bakteri asam laktat berperan pada berbagai pangan fermentasi. Peranan bakteri asam laktat diasosiasikan dengan aktivitas metabolisme dengan memanfaatkan gula yang difermentasi menjadi asam organik dan metabolit lainnya. Metabolit yang dihasilkan bakteri asam laktat berperan terhadap pembentukan tekstur, *flavor*, dan keamanan produk fermentasi asam laktat. Bakteri asam laktat berperan pada fermentasi susu seperti keju dan yoghurt, fermentasi daging, ikan, sayuran, buah-buahan, dan sereal serta kacang-kacangan. Produk-produk ini pada awalnya difermentasi dengan fermentasi alami atau *backslopping*. Karakteristik produk tergantung pada dominasi galur yang telah teradaptasi dengan baik. Pada fermentasi alami, keberadaan BAL yang diinginkan tergantung pada kandungan BAL pada bahan baku dan lingkungan (Bintsis 2018). Saat ini sebagian besar produk fermentasi asam laktat menggunakan kultur *starter* yang telah diseleksi

dan dikarakterisasi sesuai dengan produk yang akan dibuat. Namun demikian, masih banyak produk fermentasi asam laktat yang difermentasi secara alami, terutama produk-produk fermentasi tradisional.

Dalam pembentukan *flavor* pangan fermentasi, bakteri asam laktat berkontribusi melalui 3 jalur, antara lain fermentasi gula atau glikolisis, degradasi lemak atau lipolisis, dan pemecahan protein atau proteolisis (Bintsis 2018). Komponen *flavor* yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat antara lain alkohol aldehida, asam, ester, dan senyawa sulfur pada produk pangan fermentasi tertentu. Asam laktat dihasilkan dari metabolisme karbohidrat, dan konversi piruvat dapat membentuk komponen esensial untuk *flavor* yoghurt seperti diasetil, asetoin, asetaldehida, atau asam asetat. Kontribusi BAL terhadap pemecahan lemak relatif tidak banyak. Akan tetapi, BAL memiliki sifat proteolitik yang berperan penting pada pembentukan *flavor* pangan fermentasi, misalnya hidrolisis kasein dalam susu fermentasi yang berkontribusi terhadap pembentukan karakter sensori produk. Sistem proteolitik BAL sangat penting untuk mendukung pertumbuhan BAL (Rakhmanova *et al.* 2018).

BAL diaplikasikan sebagai pengawet pangan nabati maupun hewani sejak zaman kuno. Sejak abad ke-20, BAL telah digunakan sebagai kultur *starter* untuk produksi pangan fermentasi komersial. Seiring berkembangnya pengetahuan di bidang manfaat kesehatan BAL, sejumlah BAL sudah banyak diteliti potensinya sebagai probiotik yang memberikan nilai tambah fungsional untuk produk pangan yang ditambahkan mikroorganisme tersebut (Mozzi 2016). Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya (FAO/WHO 2001). Fermentasi BAL menghasilkan beragam produk makanan dan minuman baik dengan menggunakan kultur *starter* seperti sebagian besar produk susu (yoghurt, *buttermilk*, kefir, keju) maupun dengan fermentasi spontan seperti dadih; produk fermentasi daging (sosis fermentasi); ikan (kecap ikan, terasi, peda); dan sayuran (*sauerkraut*, kimci, sawi asin). Contoh pangan fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat disajikan pada Tabel 5.1.

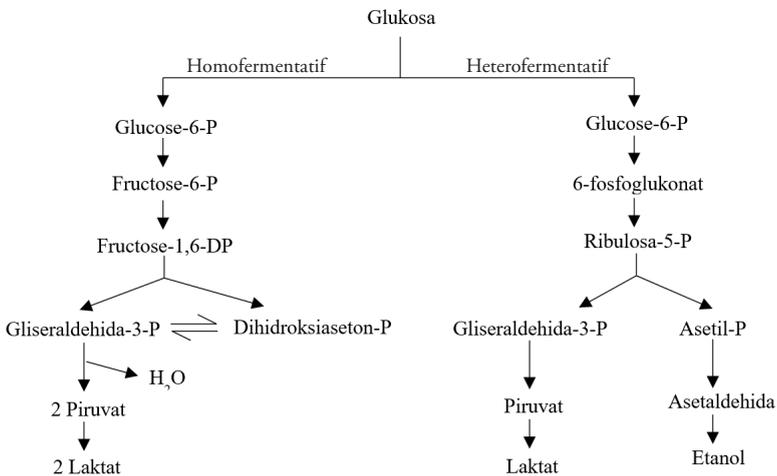
Tabel 5.1 Pangan fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat (Ali *et al.* 2010)

Produk fermentasi	Bakteri asam laktat
Susu fermentasi	
Keju keras tanpa mata	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Keju dengan mata kecil	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Jenis keju Itali dan Swiss	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yoghurt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. brevis</i>
Daging fermentasi	
Sosis (Eropa)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>
Sosis (Amerika)	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Sayuran fermentasi	
<i>Sauerkraut</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
<i>Pickel</i> (acar)	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>Lb. brevis</i>
Acar Zaitun	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Kedelai dan serealia fermentasi	
Kecap	<i>Tetragenococcus halophilus</i>
<i>Sourdough</i>	<i>Lb. sanfransicensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Weissella cibaria</i>

Bakteri asam laktat mendominasi produk fermentasi susu. Bintsis (2018) menjelaskan bahwa dalam fermentasi susu BAL dibagi ke dalam dua grup berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, yaitu BAL mesofilik yang memiliki suhu pertumbuhan optimum 20–30°C dan BAL termofilik yang memiliki suhu pertumbuhan optimum 30–45°C. Berdasarkan fermentasinya terhadap glukosa, BAL dibagi menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. BAL homofermentatif seperti *Pediococcus*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus* memproduksi asam laktat dari glukosa, sementara BAL heterofermentatif seperti *Leuconostoc* dan *Weissella* memproduksi CO₂, laktat, dan etanol dari glukosa.

5.1.1 Metabolisme Asam Laktat

BAL menggunakan gula sebagai sumber karbon dan sumber energi utama. Untuk memperoleh energi, BAL memfermentasi gula menjadi asam organik dan menyebabkan penurunan pH, baik pada media laboratorium maupun pada pangan. Dalam memetabolisme glukosa, BAL diklasifikasikan berdasarkan jalur fermentasinya yaitu homofermentatif atau heterofermentatif (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Jalur fermentasi glukosa pada bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif (Caplice dan Fitzgerald 1999).

BAL homofermentatif memfermentasi gula melalui jalur Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) menjadi piruvat yang selanjutnya dikonversi oleh enzim laktat dehidrogenase (LDH) menjadi asam laktat. Dua jenis isomer laktat, yaitu L dan D, dapat diproduksi oleh enzim stereospesifik yang bergantung pada *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD), yaitu L-LDH dan D-LDH (Mozzi 2016). Sesuai dengan penamaannya, BAL homofermentatif hanya menghasilkan satu produk utama yakni asam laktat. BAL yang tergolong homofermentatif berasal dari genus *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, dan sejumlah spesies dari *Lactobacillus*. Pada kondisi jumlah sumber karbon yang terbatas, metabolisme homolaktik dapat bergeser menjadi metabolisme dengan campuran asam yang selain asam laktat juga menghasilkan asam format, asam asetat, etanol, dan atau CO₂. Berbeda dengan BAL homofermentatif, BAL heterofermentatif tidak

hanya menghasilkan produk akhir asam laktat, melainkan etanol atau asetat dan CO₂. Fermentasi ini berlangsung melalui jalur pentosa fosfat. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, dan beberapa spesies *Lactobacillus* menggunakan jalur metabolisme ini (Mozzi 2016). Perbedaan kedua jenis BAL ini secara nyata dibuktikan dengan uji produksi gas dari glukosa. Media yang mengandung BAL heterofermentatif akan menampakkan gelembung, sedangkan media yang mengandung BAL homofermentatif tidak menampakkan gelembung (Halász 2009).

Fermentasi oleh BAL memengaruhi perubahan fisik, nilai gizi, dan sensori bahan pangan. Lebih dari itu, BAL juga dapat menghasilkan efek antimikroba yang berasal dari asam organik, bakteriosin, hidrogen peroksida, dan etanol. Asam organik dihasilkan oleh semua BAL, tetapi bakteriosin hanya dihasilkan oleh BAL tertentu. Keberadaan komponen antimikroba berperan dalam meningkatkan keamanan pangan seperti menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk maupun patogen yang dapat memperpanjang umur simpan produk serta menekan risiko penyakit yang disebabkan kontaminasi bahan pangan. Asam organik yang umumnya dihasilkan BAL adalah asam laktat dan asam asetat. Bakteriosin adalah peptida atau protein yang diproduksi suatu bakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain dalam strain yang sama atau berdekatan. Contoh dari bakteriosin yang saat ini diaplikasikan secara komersial sebagai bahan pengawet pangan adalah nisin (Saranraj *et al.* 2013).

5.2 Susu Fermentasi Asam Laktat

Di antara pangan fermentasi, susu fermentasi merupakan produk yang paling banyak dikonsumsi secara global, terutama di Eropa dan Amerika Utara. Fermentasi susu diperkirakan sudah dilakukan sejak peradaban Mesopotamia pada 3000 SM. Pada umumnya, BAL yang dimanfaatkan untuk fermentasi susu adalah dari kelompok *Lactobacillus*, *Lactococcus*, dan *Leuconostoc* (Ray dan Joshi 2014). Beragam jenis produk susu fermentasi tersebar di berbagai negara sebagai produk tradisional negara tersebut, dengan spesies dan strain BAL serta asal susu yang berbeda-beda. Susu sapi, kambing, dan kuda telah digunakan sebagai bahan baku fermentasi. BAL yang secara alami berada pada susu, udara, dan wadah berperan dalam proses fermentasi. Sejalan dengan perkembangan ilmu pengetahuan, saat ini fermentasi susu tidak hanya dilakukan secara alami/

spontan, tetapi juga dengan penambahan kultur *starter* khusus, misalnya pada fermentasi yoghurt. Panesar (2010) mengelompokkan susu fermentasi menjadi 3 kelompok yaitu: i) asam sedang dengan aroma menyenangkan, misalnya susu berkultur (*cultured milk*); ii) asam dan sangat asam berbentuk *curd*, misalnya yoghurt; serta iii) asam dan alkohol, misalnya kumiss dan kefir.

Yoghurt merupakan produk fermentasi susu yang paling populer di dunia, dengan menggunakan susu sapi sebagai bahan baku dan dua spesies BAL: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* dan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Produk sejenis yoghurt yang dikenal sebagai produk fermentasi tradisional berbagai negara antara lain *laban* (Timur Tengah), *dahi* (India), *juju dhau* (Nepal), susu *acidophilus* (Amerika Utara), dan *dadih* (Sumatera Barat). Produk fermentasi susu lainnya di antaranya *buttermilk*, krim asam (*sour cream*), keju, dan kefir. *Buttermilk* diproduksi dengan menggunakan kultur *starter* dari *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sedangkan krim asam diproduksi dengan menggunakan *L. lactis* subsp. *cremoris* untuk memfermentasikan susu skim, khususnya untuk menghasilkan *flavor*. Jenis *buttermilk* dari berbagai negara antara lain *ymer* (Denmark), *langfil* (Swedia), *villi* (Finlandia) yang juga melibatkan *Geotrichum candidum* selain BAL, dan *lassi* (India) (Ray dan Joshi 2014). Keju merupakan produk susu fermentasi yang juga populer. Secara tradisional keju dibuat dari susu non-pasteurisasi dan tergantung pada keberadaan BAL pada susu (Ray dan Jishi 2014). Namun saat ini keju diproduksi dengan bantuan kultur *starter* *Lactobacillus*, *Lactococcus*, dan *Streptococcus* untuk mengasamkan susu yang diperlukan saat penggumpalan protein susu oleh enzim renin, serta *starter* sekunder seperti *Propionibacterium* yang membentuk lubang pada keju Swiss dan kapang pada produksi keju biru (*blue cheese*), keju camembert, atau keju brie. Produk fermentasi susu tidak hanya melibatkan BAL saja, tetapi dapat juga melibatkan khamir sebagai ko-kultur yang memberikan citarasa alkoholik seperti pada kefir (Eropa Timur) dan kumiss (Asia Tengah) (Panesar 2011).

5.2.1 Yoghurt

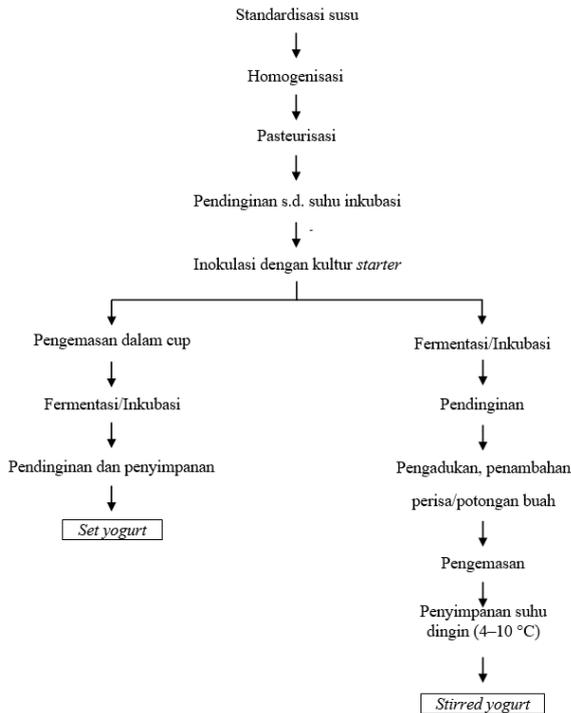
5.2.1.1 Deskripsi Produk

Secara definisi, yoghurt merupakan produk susu fermentasi yang memanfaatkan simbiosis dua spesies BAL yaitu *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*Streptococcus thermophilus*) dan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*) sebagai kultur *starter* (FAO/WHO 2011). Meskipun tradisi fermentasi susu sudah dilakukan sejak zaman kuno, yoghurt mulai diproduksi secara massal pada awal abad ke-20, tepatnya di Barcelona, Spanyol oleh perusahaan Danone. Sejak diperkenalkan di Amerika pada 1940-an, variasi yoghurt semakin berkembang dengan munculnya varian yoghurt rasa buah (Weerathilake *et al.* 2014). Yoghurt disajikan sebagai bagian dari tradisi di sejumlah negara. Di Turki misalnya, yoghurt menjadi komponen terpenting pada setiap hidangan khas Turki, baik itu sup, makanan manis, maupun minuman lokal seperti *ayran* (Gezginc dan Akbay 2015). Yoghurt memiliki tekstur yang kental dan cita rasa yang masam.

5.2.1.2 Proses Fermentasi

Pembuatan yoghurt dapat menggunakan susu sapi, kambing, kerbau, kuda, atau domba. Dalam produksi skala industri, susu perlu distandardisasi berdasarkan kadar lemak dan protein. Standar kadar lemak berkisar dari 0,01% untuk bebas lemak, 1–2% untuk rendah lemak, dan >3,2% untuk susu segar. Standardisasi kadar protein (5–15%) diperlukan untuk mendapatkan tekstur yoghurt yang baik serta mencegah sineresis. Sebelum diinokulasi dengan *starter*, susu harus dihomogenisasi kemudian dipanaskan (pasteurisasi) pada suhu 80–85°C selama 30 menit untuk mematikan mikroorganisme pembusuk dan patogen, serta mendenaturasi protein agar gel lebih stabil. Setelah dipanaskan, susu didinginkan sampai suhu 37–43°C, kemudian diinokulasi dengan *starter* yoghurt *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* sebanyak 10^6 – 10^7 cfu/ml. Fermentasi berlangsung pada suhu 43 °C selama kurang lebih 6–8 jam untuk memperoleh pH akhir 4,5–4,8. Cara inkubasi dan wadah untuk fermentasi disesuaikan dengan produk akhir yang diinginkan. Pada produksi yoghurt tipe *stirred* (diaduk) dan minuman, inkubasi berlangsung pada tangki berpengaduk; sementara *set* yoghurt langsung dalam

kemasan cup. Setelah pH akhir diperoleh, yoghurt perlu didinginkan untuk menghentikan proses fermentasi. Pada tipe *stirred* dan minuman, yoghurt yang sudah mencapai suhu 18–25 °C dapat ditambahkan bahan tambahan seperti sari buah, pemanis, dan senyawa cita rasa (*flavor*), kemudian diisikan ke dalam kemasan individual dalam kondisi aseptik. Yoghurt yang sudah dikemas dapat disimpan pada suhu < 4°C (Corrieu dan Beal 2016). Alur proses pembuatan yoghurt disajikan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Alur proses fermentasi *set yogurt* dan *stirred yogurt*

5.2.1.3 Mikrobiologi Yoghurt

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* adalah kultur *starter* kunci dalam pembuatan yoghurt. Umumnya kedua spesies ini diberikan dalam rasio komposisi 1:1 dan tidak melebihi 2:3. Pertumbuhan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* bergantung pada pH dan komponen kimia pada susu. Awalnya, *S. thermophilus* tumbuh lebih cepat karena

pH susu yang masih netral. Seiring keasaman meningkat dan pH menurun, pertumbuhan *Streptococcus* mulai melambat sementara jumlah *Lactobacillus* meningkat karena toleran terhadap asam. Kandungan *solid non fat* (SNF) yang tinggi berdampak pada viabilitas sel bakteri yang lebih baik karena tingginya kapasitas penyangga yang dimiliki SNF (Hill *et al.* 2017).

Pertumbuhan kombinasi kedua strain berlangsung secara simbiotik. *Streptococcus* memproduksi enzim urease yang melepaskan asam format dan CO₂. Komponen ini secara berurutan mampu merangsang pertumbuhan *Lactobacillus* sekaligus menciptakan kondisi anaerob yang dapat memudahkan proses fermentasi. Di sisi lain, *Streptococcus* kurang mampu memecah protein sendiri sehingga harus memperoleh asam amino dari sumber lain untuk mendukung pertumbuhannya. Oleh karena itu, *Lactobacillus* berperan dalam menghasilkan asam amino yang akan digunakan oleh *Streptococcus*. Sinergisitas *starter* ini ditunjukkan dengan proliferasi masing-masing strain yang lebih cepat ketika dibiakkan bersama daripada jika ditumbuhkan terpisah (Hill *et al.* 2017).

Starter yoghurt juga berkontribusi terhadap atribut fisik dan sensori yoghurt. Umumnya, *S. thermophilus* berperan dalam menghasilkan *flavor* dan tekstur, sementara *L. bulgaricus* bertanggung jawab terhadap rasa asam yoghurt. Asetaldehida adalah komponen *flavor* utama pada yoghurt yang dihasilkan dari metabolisme laktosa oleh BAL heterofermentatif seperti *starter* yoghurt (Chaves *et al.* 2002). Tekstur kental yoghurt diperoleh dari asidifikasi susu oleh *L. bulgaricus* yang memicu penggumpalan protein susu, serta polisakarida ekstraseluler yang diproduksi *S. thermophilus* yang berkontribusi meningkatkan viskositas yoghurt (Hill *et al.* 2017).

5.2.1.4 Perubahan Kimia

Komponen utama pada susu yang digunakan BAL dalam fermentasi yaitu laktosa dan protein. Laktosa akan dipecah menjadi glukosa dan galaktosa dengan bantuan enzim β -galaktosidase yang dilepaskan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*. Kedua bakteri ini hanya bisa memetabolisme glukosa, sehingga galaktosa akan dikeluarkan dari sel ke medium. Galaktosa hanya dapat dimetabolisme oleh *Lb. helveticus* dan beberapa galur *Lb. delbruecki* subsp. *lactis* (Gal+) dan mungkin *Leuconostoc* melalui jalur Leloir (Bintsis 2018). Produk akhir metabolisme

laktosa yaitu asam laktat yang dihasilkan oleh masing-masing spesies berbeda. *L. bulgaricus* menghasilkan D (-) laktat sementara *S. thermophilus* menghasilkan L (+) laktat (Settachaimongkon 2014). Pada beberapa kasus, *S. thermophilus* mampu mempolimerisasi glukosa untuk memproduksi polisakarida yang berkontribusi terhadap tekstur yoghurt.

Metabolisme protein dimulai dari hidrolisis protein susu (kasein) menjadi fragmen peptida oleh enzim proteinase yang terdapat pada dinding sel BAL. Akumulasi peptida yang terlalu banyak akan memicu rasa pahit. Selanjutnya, peptida didegradasi menjadi asam amino oleh peptidase. Sejumlah asam amino akan digunakan oleh *S. thermophilus* yang tidak mampu memproduksi asam amino sebanyak *L. bulgaricus*. Proteolisis ini menyebabkan yoghurt memiliki kandungan peptida dan asam amino bebas yang tinggi, terutama valin, prolin, serin, dan histidin (Hou *et al.* 2015).

5.2.1.5 Manfaat Kesehatan

Yoghurt kaya akan kandungan nutrisi seperti protein, vitamin, dan mineral. Sebagai produk susu, yoghurt diakui sebagai sumber kalsium yang tinggi. Manfaat susu fermentasi terhadap kesehatan berawal dari pengamatan seorang ilmuwan Rusia Ellie Metchnikoff pada awal abad 20. Ia menemukan bahwa konsumsi susu fermentasi secara rutin diasosiasikan dengan usia hidup orang Bulgaria yang lebih panjang (Weerathilake *et al.* 2014). Pada bukunya “*The Prolongation of Life*” yang dipublikasikan pada tahun 1907, Metchnikoff menyatakan bahwa beberapa bakteri dalam saluran pencernaan dapat menghasilkan senyawa toksin yang dapat berkontribusi terhadap penyakit dan penuaan. Metchnikoff menyarankan menggunakan bakteri yang menguntungkan, yaitu bakteri asam laktat, untuk melawan dominasi bakteri patogen dalam saluran pencernaan (Nuraida 2016).

Yoghurt merupakan alternatif produk susu yang bisa dikonsumsi penderita intoleransi laktosa. Individu tersebut tidak bisa mencerna laktosa dengan baik dalam sistem pencernaannya karena kekurangan enzim laktase sehingga laktosa akan langsung difermentasi mikroflora usus yang menyebabkan munculnya gejala flatulensi dan diare setelah mengonsumsi produk susu. Fermentasi oleh BAL pada yoghurt membantu degradasi laktosa sehingga yoghurt aman dikonsumsi untuk individu yang intoleran terhadap laktosa (Weerathilake *et al.* 2014).

Protein susu yang terkandung dalam yoghurt merupakan sumber utama terbentuknya peptida bioaktif. Peptida bioaktif adalah fragmen protein spesifik yang dapat memberikan dampak positif bagi kesehatan tubuh. Kemampuan proteolitik BAL untuk melepaskan peptida bioaktif memberikan nilai tambah untuk susu fermentasi, termasuk yoghurt. Efek kesehatan dari bioaktif peptida di antaranya meningkatkan kesehatan jantung, pencernaan, dan imunitas tubuh sehingga berdampak pada penurunan risiko penyakit kronis (Mann *et al.* 2017).

Nilai fungsional yoghurt juga dapat diperoleh jika ditambahkan probiotik, yaitu bakteri hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan efek kesehatan bagi yang mengonsumsinya. Yoghurt jenis ini seringkali disebut bio-yoghurt dengan kandungan probiotik lebih dari 10^6 cfu/mL. Probiotik dilaporkan memiliki sejumlah efek kesehatan seperti menekan konstipasi, mencegah diare, mencegah alergi, hiperkolesteromia, meningkatkan respons imun, menurunkan kolesterol, dan mencegah osteoporosis (Weerathilake *et al.* 2014; Nuraida 2016).

5.2.2 Kefir

5.2.2.1 Deskripsi Produk

Kefir adalah produk minuman susu fermentasi yang dicirikan dengan konsistensi yang kental serta citarasa alkoholik dan lebih asam. Karakteristik unik kefir ini diperoleh dari fermentasi oleh granula kefir, yaitu kultur *starter* yang terdiri dari beragam jenis dan spesies mikroorganisme berupa BAL, bakteri asam asetat, dan khamir yang hidup secara simbiotik (Rosa *et al.* 2017). Fermentasi yang melibatkan khamir menyebabkan kefir mengandung kadar alkohol sebesar 0,5–1,5%. Kefir berasal dari pegunungan Tibet hingga daratan Kaukasus di Eropa Timur, kemudian berkembang menjadi tradisi suku Kaukasus yang diturunkan antar generasi sebagai sumber kemakmuran keluarga. Pada zaman dahulu, kefir dibuat secara spontan dengan menyimpan susu dalam kantung kulit kambing yang digantungkan di dekat pintu rumah, kemudian siapapun yang melewatinya harus meremas kantung tersebut untuk memicu fermentasi (Willey *et al.* 2008).

5.2.2.2 Proses Fermentasi

Kefir dapat diproduksi dengan dua metode: metode pertama secara tradisional dengan metode Rusia, dan metode kedua dengan penambahan kultur *starter* yang diisolasi dari kefir atau yang tersedia secara komersial. Pada metode Rusia, granula kefir ditambahkan ke dalam susu pasteurisasi dengan rasio komposisi granula dan substrat 1:30 b/v, kemudian diinkubasikan pada suhu ruang (27–37 °C) selama kurang lebih 24 jam. Setelah fermentasi, granula dipisahkan dari susu yang sudah terfermentasi dengan penyaringan dan dapat digunakan kembali untuk pembuatan *batch* kefir berikutnya (Rosa *et al.* 2017). Metode lainnya yang umumnya diaplikasikan untuk produksi kefir secara massal untuk komersial, yaitu dengan menggunakan kultur murni yang diisolasi dari granula kefir yang secara langsung ditambahkan ke dalam susu (Prado *et al.* 2015). Keberadaan oksigen berpengaruh besar terhadap hasil akhir kefir. Apabila diinkubasi pada wadah tertutup rapat, kefir yang diperoleh memiliki kadar CO₂ dan alkohol yang lebih tinggi, sedangkan pada wadah setengah terbuka, kefir akan terbentuk seperti yoghurt. Kefir yang difermentasikan pada suhu rendah menunjukkan aktivitas khamir lebih tinggi dalam produksi alkohol dan gas (Yusuf 2020).

Komponen utama untuk membuat kefir yaitu granula kefir (Gambar 5.3). Granula kefir tersusun atas polisakarida larut air yang disebut kefiran yang teragregasi. Karakteristik granula kefir yaitu bentuk menyerupai kembang kol, diameter 0,3–3,0 cm, berwarna putih kekuningan, serta bertekstur semi padat dan elastis (Leite *et al.* 2013). Polisakarida kefiran merupakan polimer glukogalaktan yang dihasilkan oleh mikrobiota kefir terutama *Lactobacillus kefiranofaciens* dan dibantu oleh khamir *Saccharomyces* (Moradi dan Kalanpour 2019).



Gambar 5.3 Kefir dan granula kefir

5.2.2.3 Mikrobiologi Kefir

Starter utama kefir merupakan kombinasi simbiotik antara bakteri dan khamir yang diimobilisasi dalam granula kefir. Mikroorganisme dalam granula kefir umumnya terkomposisi atas 60–80% BAL (10^8 cfu/g), 10^6 – 10^7 cfu/g khamir, dan 10^5 cfu/g bakteri asam asetat (Prado *et al.* 2015). Meski demikian, komposisi dan jumlah masing-masing mikroorganisme setiap granula atau kefir berbeda satu sama lain, dipengaruhi oleh negara atau daerah produksi, substrat yang digunakan, dan pemeliharaan kulturnya. Keragaman mikroorganisme pada kefir memengaruhi sifat fisik dan aktivitas biologis kefir. Proses fermentasi kefir mampu meningkatkan biomassa mikroorganisme sebesar 5–7%. Perubahan komposisi mikrobiota pada kefir dipengaruhi faktor proses fermentasi seperti waktu dan suhu fermentasi, jenis susu, serta rasio dan sebaran mikroorganisme dalam granula kefir (Leite *et al.* 2013).

Keberadaan BAL pada granula atau kefir sangat mendominasi. *Lactobacillus* paling sering ditemukan pada granula kefir dari berbagai negara di dunia dibandingkan dengan genus lainnya. Jenis BAL yang terdapat pada granula kefir meliputi BAL homofermentatif dan heterofermentatif dengan rasio komposisi yang beragam pada setiap granula (Vardjan *et al.* 2013). *Lb. delburueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb. acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp.

cremoris, dan *Streptococcus thermophilus* merupakan spesies BAL homofermentatif yang telah teridentifikasi dalam granula maupun produk kefir, sementara *Lb. kefiri*, *Lb. parakefiri*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, dan *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* termasuk BAL heterofermentatif (Leite *et al.* 2013).

Selain BAL, granula kefir mengandung khamir dan bakteri asam asetat (BAA). Beberapa khamir dalam kefir mampu mengasimilasi laktosa. *Saccharomyces*, *Candida*, dan *Kluyveromyces* merupakan genus khamir yang umumnya ditemukan pada granula kefir. Dibandingkan jenis khamir lainnya, *Saccharomyces* unggul dalam memproduksi alkohol, cepat beradaptasi, dan tahan terhadap kadar alkohol dan suhu tinggi. Spesies *Saccharomyces* yang sering teridentifikasi pada granula kefir yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *S. boulardii*, dan *S. uvarum*. Khamir *Candida*, misalnya *Candida inoconspicua* dan *Candida krusei*, dan *Kluyveromyces*, seperti *Kluyveromyces lactis* dan *Kluyveromyces marxianus* berkontribusi dalam fermentasi kefir dengan menghasilkan enzim β -galaktosidase untuk memecah laktosa, serta enzim *chymosin* untuk mengkoagulasi susu (Yusuf 2020). Populasi BAA tidak sebanyak BAL dan khamir, akan tetapi BAA berkontribusi terhadap karakter sensori produk akhir kefir (Leite *et al.* 2013). BAA yang telah diisolasi dari kefir yaitu *Acetobacter aceti* dan *A. rasens* (Prado *et al.* 2015).

5.2.2.4 Perubahan Kimia

Komposisi minuman kefir tersusun atas 90% air, 6% gula, 3,5% lemak, 3% protein, dan 0,7% abu. Kefir juga kaya akan vitamin dan mineral seperti vitamin B₁, B₂, B₅, C, A, K, dan karoten, sedangkan mineral meliputi Mg, Ca, P yang dominan dibandingkan mineral lain seperti Zn, Cu, Mn, dan Fe. Sementara pada granula kefir, komposisinya meliputi 45,7% polisakarida, 34,3% protein total (27% tidak larut air, 1,6% larut air), 12,1% abu, 5,6% asam lemak bebas, 4,4% lemak, vitamin B dan K, triptofan, serta mineral Ca, P, dan Mg. Ketika fermentasi berlangsung, konsentrasi vitamin seperti piridoksin, B₁₂, asam folat, biotin, thiamin, dan riboflavin pada susu akan meningkat (Liutkevičius dan Šarkinas 2004).

Seperti yoghurt, metabolisme kimia pada kefir melibatkan fermentasi laktat dan degradasi protein. Fermentasi oleh BAL yang turut dibantu dengan sejumlah khamir penghasil enzim β -galaktosidase mendegradasi 30% laktosa susu menjadi glukosa dan galaktosa. Produk akhir utama yaitu asam laktat memicu turunnya pH dan meningkatnya konsistensi susu. Produk utama lain seperti CO_2 dan etanol dihasilkan oleh BAL heterofermentatif dan khamir yang memberikan sensasi alkoholik pada kefir. Protein susu turut dihidrolisis pada proses fermentasi serta mengalami koagulasi asam yang menghasilkan protein yang mudah dicerna. Kandungan asam amino esensial pada kefir lebih tinggi dibandingkan susu yang tidak difermentasikan, dan kandungan lisin, isoleusin, serta fenilalanin lebih tinggi dibandingkan asam amino lainnya. Beberapa kefir ditemukan mengandung komponen amina biogenik, produk hasil dekarboksilasi asam amino oleh BAL yang jika terkandung dalam jumlah yang tinggi akan menimbulkan rasa pahit (Altay *et al.* 2013). Komponen minor hasil dari fermentasi yaitu asam asetat, asam propionat, diasetil, dan asetaldehida yang berkontribusi terhadap *flavor* khas kefir (Leite *et al.* 2013; Rosa *et al.* 2017).

5.2.2.5 Manfaat Kesehatan

Hingga saat ini, kefir dikenal dengan khasiatnya terhadap kesehatan. Efek kesehatan berasal dari mikroorganisme pada fermentasi kefir yang melakukan berbagai aktivitas baik secara independen maupun ko-kultur yang sinergis untuk memproduksi komponen fungsional. Beberapa bakteri asam laktat galur spesifik pada kefir bersifat sebagai probiotik. Selain itu, mikrobiota kefir terutama BAL juga melepaskan komponen bioaktif terutama peptida yang berfungsi sebagai pencegahan sejumlah penyakit, misalnya sebagai antioksidan dan antihipertensi (Yusuf 2020).

Aktivitas BAL selama fermentasi menjadikan kefir aman dikonsumsi untuk penderita intoleransi laktosa karena komponen laktosa yang terdapat pada susu sudah didegradasi oleh BAL. Komponen organik yang dilepaskan BAL seperti asam organik, CO_2 , H_2O_2 , selama fermentasi berperan sebagai antimikroba terhadap patogen seperti *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Heliobacter pylori*, *Listeria monocytogens*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, dan lain-lain (Rosa *et al.* 2017). Selain itu, kefir dilaporkan memiliki manfaat fungsional

seperti mengurangi risiko hiperkolesteromia atau peningkatan kadar kolesterol. Efek tersebut diduga dihasilkan dengan sejumlah mekanisme antara lain: (1) sel BAL akan mengikat kolesterol sehingga absorpsi kolesterol ke dinding usus akan terhambat; (2) BAL meningkatkan produksi asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid*/SCFA) seperti propionat. SCFA mampu menstimulasi enzim yang berperan dalam biosintesis kolesterol; (3) BAL melakukan dekonjugasi garam empedu dengan melepaskan enzim *bile salt hydrolase* (BSH) (Yusuf *et al.* 2020).

Manfaat kesehatan kefir juga diperoleh dari beragam peptida bioaktif yang dihasilkan dari proteolisis kasein oleh BAL selama fermentasi. Peptida-peptida ini mengeluarkan efek fungsional seperti antidiabetik, antihipertensi, antiinflamasi, dan antioksidan (Vieira *et al.* 2021). Aktivitas antidiabetik oleh BAL berupa produksi senyawa penghambat α -glukosidase berupa peptida bioaktif atau polisakarida ekstraseluler. Peptida bioaktif juga mampu menghambat aktivitas enzim pengubah angiotensin (ACE) yang bersifat menstimulasi penyempitan pembuluh darah dan meningkatkan kerja jantung, sehingga dapat menekan resiko hipertensi. Sifat anti-inflamasi ditunjukkan dengan pelepasan peptida bioaktif oleh BAL yang dapat merangsang sel-sel imun terhadap infeksi (Vieira *et al.* 2021). Selain peptida bioaktif, komponen antioksidan yang dihasilkan BAL meliputi asam laktat, polisakarida ekstraseluler, glutathion, butirir, dan folat (Yusuf 2020). Senyawa-senyawa tersebut mampu merangsang aktivitas enzim yang berperan pada penangkapan radikal bebas.

5.2.3 Keju

5.2.3.1 Deskripsi

Keju adalah produk susu terkoagulasi sebagai hasil fermentasi dan koagulasi oleh enzim renin, dengan atau tanpa proses pemeraman. Pembuatan keju didasarkan pada pemanfaatan BAL baik sebagai *starter* yang terdefinisi maupun yang tidak. BAL akan mengasamkan susu melalui produksi asam laktat, sehingga memicu penurunan pH yang memengaruhi sejumlah aspek dalam proses pembuatan, komposisi, serta kualitas keju (Briggiler-Marco *et al.* 2007). Produksi keju pada mulanya mengandalkan fermentasi secara spontan oleh mikroflora endogenus

asal susu segar serta lingkungan sekitarnya (Kongo 2013). Kualitas produk akhir merupakan hasil dari aktivitas beragam jenis mikroorganisme pada bahan baku. Fermentasi alami kemudian dioptimalkan dengan metode *backslopping*, yaitu menginokulasikan bahan baku dengan sejumlah kecil *whey* yang sudah terfermentasikan sebelumnya. Dengan demikian, karakter produk yang dihasilkan bergantung pada dominasi strain mikroorganisme yang paling adaptif.

5.2.3.2 Proses Fermentasi

Hampir setiap negara di dunia memproduksi keju dengan variasi diperkirakan lebih dari 2000 jenis, baik yang dibuat dari susu berbagai jenis mamalia maupun diproses secara tradisional atau dalam skala industri (Kongo 2013). Meskipun variasi keju sangat beragam, tahap dasar yang dibutuhkan dalam pembuatan keju pada esensinya sama. Sedikit perbedaan pada langkah-langkah ini dimungkinkan dapat mengubah kualitas produk secara umum. Kongo (2013) menjelaskan tahapan pembuatan keju sebagai berikut:

Tahap pertama dalam produksi keju adalah persiapan susu yang sudah bebas dari kontaminasi mikroorganisme patogen dan pembusuk. Susu dipasteurisasi pada suhu 73 °C selama 15 detik untuk menghentikan pertumbuhan kontaminan tersebut. Akan tetapi pada produksi keju secara tradisional, pasteurisasi susu biasanya tidak dilakukan. Setelah melalui pasteurisasi, kultur *starter* ditambahkan ke dalam susu. Metode penambahan *starter* keju bergantung pada proses produksi yang dilakukan. Pembuatan keju skala industri umumnya menggunakan kultur *starter* komersial, sementara pembuatan keju dengan proses tradisional lebih lazim memanfaatkan *backslopping* dari fermentasi alami *batch* sebelumnya.

Tahap selanjutnya adalah koagulasi susu, yaitu pemadatan susu menjadi bentuk gel yang dipicu oleh koagulan yang memodifikasi struktur fisik protein susu. Berbagai koagulan dapat digunakan pada pembuatan keju, seperti jus lemon, rennet, atau enzim proteolitik yang aktif secara optimum dalam kondisi asam seperti *chymosin* (rennin) atau yang dihasilkan kapang *Rhizomucor miehei* melalui proses bioteknologi. Enzim ini memiliki karakteristik asam sehingga optimum pada lingkungan yang sedikit asam. Oleh karena itu, BAL pada *starter* keju yang ditambahkan memegang peranan penting dalam mengasamkan susu dan menurunkan pH dari 6.7 menjadi 6.2 sehingga dapat menciptakan

kondisi yang optimum untuk aktivitas renin, serta mendukung berlangsungnya koagulasi susu. Selain memadatkan susu, pH yang telah mencapai 4.5 dapat menghentikan aktivitas bakteri yang tidak diinginkan dalam produksi keju sehingga meningkatkan keamanan produk akhir. Selama koagulasi berlangsung, kasein terhidrolisis oleh renin dan enzim pemecah protein dari BAL. Degradasi peptida lebih lanjut dikatalisasi oleh endopeptidase yang dilepaskan BAL selama tahap pematangan.

Setelah susu memadat, koagulum kemudian diiris dengan alat pemotong seperti pisau untuk memperoleh potongan kecil sebesar diameter 1–2 cm. Pengirisan ini bertujuan untuk mengeluarkan air berlebih dan *whey* dari padatan protein. Tahapan ini adalah salah satu yang terpenting karena akan menentukan kepadatan tekstur dan pembentukan asam pada keju. Selanjutnya, potongan susu padat tersebut dipanaskan pada suhu 37–45 °C, tergantung jenis keju yang akan diproduksi. Pemanasan membantu pematangan susu dan pengeluaran *whey* dari padatan. Selain itu, suhu yang diberikan mendukung pertumbuhan mikroorganisme *starter* keju. Selama pemanasan, padatan susu juga diaduk untuk mencegah terjadinya pemisahan partikel. Setelah pengadukan, *curd* makin memadat dan membentuk bongkahan massa, sementara *whey* semakin surut.

Pada pembuatan keju cheddar, padatan susu yang sudah mencapai tekstur yang diinginkan kemudian digiling agar semua partikel tergaransi merata. Penggilingan *curd* dapat dilakukan baik dengan tangan maupun mesin atau alat. Penggaransi bertujuan meningkatkan cita rasa *curd* serta memperpanjang umur simpan. Terakhir, massa *curd* dicetak sebelum disimpan dalam ruang pematangan. Pematangan (*aging*) dapat berlangsung selama 15 hari sampai bertahun-tahun. Keju dapat disimpan pada kabinet atau di dalam ruang berbentuk seperti gua. Pada tahapan ini fermentasi berlangsung dengan suhu dan kelembapan terkendali. Seperti mikroorganisme lain, BAL turut berperan penting selama pemeraman keju. Aroma dan *flavor* khas keju terbentuk dari aktivitas enzimatik yang dilepaskan BAL. Selain itu, penguraian protein dari kasein menjadi peptida dan asam amino oleh BAL juga berlangsung. Pemeraman keju memerlukan waktu yang lama untuk menghasilkan kualitas sensori yang memuaskan, seperti aroma, cita rasa, dan tekstur (Kongo 2013).

5.2.3.3 Manfaat Kesehatan

Keju kaya akan kandungan nutrisi esensial seperti protein, lipid, mineral, dan vitamin. Fraksi protein berupa peptida bioaktif juga terkandung dalam keju. Peptida tersebut diketahui mampu memberikan manfaat kesehatan sebab memiliki kemampuan bioaktif seperti antimikroba, antikarsinogenik, dan antitrombotik. Lemak pada keju juga dapat memiliki aktivitas biologis seperti asam lemak terkonjugasi (CLA) dan membran globular lemak susu (*milk fat globule membrane*/MFGM). Meskipun memiliki manfaat kesehatan dari komponen bioaktif yang berperan penting bagi yang mengonsumsinya, keju juga mengandung asam lemak jenuh, kolesterol, dan garam tinggi yang memicu risiko penyakit jika dikonsumsi berlebihan. Namun hal ini dapat diatasi dengan membuat keju rendah lemak atau menghilangkan kolesterol dengan penambahan bakteri probiotik. Bakteri probiotik non-*starter* keju juga dapat memproduksi peptida bioaktif dan asam gamma-aminobutirat (Kwak *et al.* 2011).

5.3 Sayuran Fermentasi

Pada dasarnya sayuran merupakan bahan pangan yang mudah rusak dan layu. Oleh sebab itu, berbagai usaha dilakukan untuk mengawetkan sayuran, salah satunya dengan memanfaatkan fermentasi. Fermentasi ini berlangsung spontan, bakteri indigenus yang terseleksi dengan proses terkontrol akan tumbuh. Hingga saat ini, produk fermentasi sayuran masih menjadi bagian dari menu diet penduduk di berbagai negara terutama kawasan Asia dan sebagian Eropa. Di Asia, ditemukan banyak produk lokal seperti kimchi, tempoyak, mandai, dan sawi asin, sementara produk yang populer di Eropa dan Amerika Serikat adalah *sauerkraut*. Dibandingkan metode pengawetan lainnya seperti pengalengan dan pembekuan, fermentasi masih diyakini sebagai metode dengan energi yang efisien karena tidak membutuhkan banyak energi mekanik dalam prosesnya.

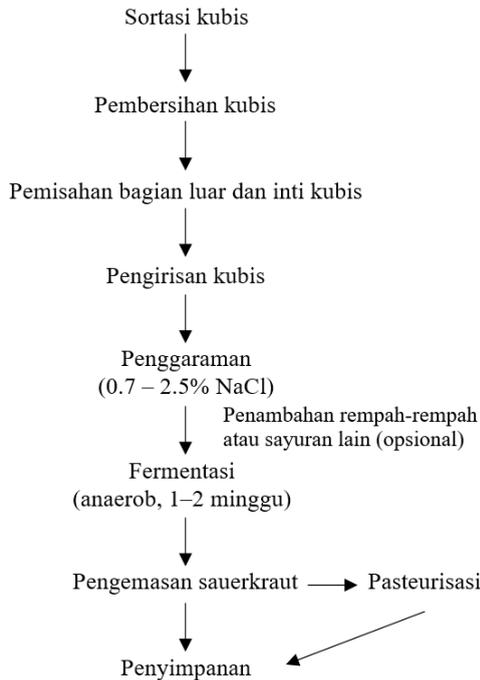
5.3.1 *Sauerkraut*

5.3.1.1 Deskripsi Produk

Sauerkraut adalah salah satu pangan fermentasi yang berasal dari Jerman dengan menggunakan kubis (*Brassica oleracea*) sebagai substratnya. Secara etimologi, *sauerkraut* dalam bahasa Jerman berarti “kubis asam”. Diperkirakan *sauerkraut* sudah disebut 2000 tahun yang lalu di Tiongkok. Pada mulanya, *sauerkraut* difermentasikan dengan media anggur beras (*rice wine*) 2000 tahun yang lalu di Tiongkok, kemudian diperkenalkan di Eropa 1000 tahun kemudian oleh Genghis Khan. Sejak saat itu, orang Eropa menerapkan fermentasi dengan garam tinggi sebagai pengganti anggur beras untuk membuat *sauerkraut* (Peñas *et al.* 2017). Larutan garam hasil samping *sauerkraut* seringkali digunakan kembali sebagai bahan baku produksi karotenoid secara mikrobial oleh *Rhodotorula rubra* atau enzim β -glukosidase oleh *Candida wickerhamii* dan dikomersialisasikan (Swain *et al.* 2014).

5.3.1.2 Proses Fermentasi

Fermentasi kubis menjadi *sauerkraut* bersifat spontan dan tidak melibatkan banyak proses (Gambar 5.4). Proses dimulai dari persiapan kubis segar dengan sortasi dan pembersihan, bagian luar dan inti tengah kubis dipisahkan. Selanjutnya, kubis diiris tipis kemudian digaramkan dengan konsentrasi 0,7–2,5% NaCl. Penambahan garam bertujuan menghambat komponen-komponen yang memicu pembusukan sayuran, antara lain bakteri pembusuk dan enzim pektinase. Selain itu, kadar garam yang ditambahkan memengaruhi keragaman populasi mikroba serta atribut organoleptik dari *sauerkraut*. Untuk meningkatkan *flavor*, irisan kubis seringkali ditambahkan rempah-rempah, wortel, atau minuman anggur sebelum proses fermentasi. Setelah penggaraman, kubis iris diinkubasi dalam wadah kedap udara karena fermentasi yang berlangsung secara anaerob, kemudian didiamkan selama beberapa minggu. Setelah fermentasi, *sauerkraut* dapat dikemas dalam toples maupun kaleng. *Sauerkraut* juga dapat dipasteurisasi terlebih dahulu untuk memperpanjang umur simpan (Peñas *et al.* 2017).



Gambar 5.4 Alur produksi *sauerkraut* (Penas *et al.* 2017)

5.3.1.3 Mikrobiologi *Sauerkraut*

Sebagai salah satu produk fermentasi spontan, mikroorganisme yang terdapat pada *sauerkraut* diperoleh secara alami atau disebut juga kultur *indigenus*. Karena fermentasi dikondisikan dalam keadaan anaerob, BAL merupakan mikroorganisme yang dominan pada *sauerkraut*. Produksi *sauerkraut* melibatkan baik BAL homofermentatif maupun heterofermentatif dengan perubahan ragam populasi yang berlangsung saat fermentasi. Suksepsi mikrobiota ini dipicu oleh perubahan kondisi lingkungan substrat selama proses fermentasi. Pada periode awal fermentasi, BAL heterofermentatif terutama spesies *Leuconostoc* mendominasi karena kondisi lingkungan yang rendah asam dan oksigen disukai oleh spesies yang toleran asam rendah dan mikroaerofilik tersebut. Hasil metabolisme BAL heterofermentatif seperti asam laktat dan karbondioksida memicu penurunan pH, peningkatan kadar asam sampai 0,7–1%, dan kondisi anaerob pada substrat, sehingga komunitas *Leuconostoc* berkurang lalu digantikan dengan

BAL homofermentatif yang lebih toleran asam yaitu *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus brevis*. Populasi spesies ini berjumlah jauh lebih banyak pada tahap akhir fermentasi ketika pH mencapai 3,7 (Peñas *et al.* 2017).

Sebelum mengalami fermentasi, kubis menyimpan berbagai jenis mikroba termasuk bakteri aerob pembusuk seperti *Pseudomonas*, *Enterobacter*, khamir, dan kapang dengan jumlah koloni 10^4 – 10^6 cfu/g, lebih banyak daripada populasi BAL sebanyak 10^2 – 10^3 cfu/g. Setelah fermentasi dimulai, keberadaan oksigen berkurang sehingga mendukung pertumbuhan BAL. Pada kondisi inilah BAL tumbuh pesat sementara jumlah populasi bakteri aerob menurun (Peñas *et al.* 2017).

5.3.1.4 Perubahan Kimia

Kubis, seperti sayuran lainnya, menyimpan zat nutrisi dan senyawa bioaktif yang tinggi. Komponen kubis tersusun atas karbohidrat (4,2–5,5%), serat pangan (2–3%), protein (1,3–1,4%), mineral (0,3–0,7%), lemak (0,1–0,2%), dan vitamin (0,03–0,04%). Komponen fitokimia pada kubis meliputi senyawa fenol dan glukosinolat (GLS). GLS adalah metabolit sekunder kubis yang tersusun atas nitrogen dan sulfur, dan berperan penting dalam menghasilkan *flavor* serta aroma khas kubis. Meskipun GLS bukan termasuk komponen bioaktif, GLS akan terhidrolisis selama kubis diproses dan menghasilkan beragam komponen bioaktif (Peñas *et al.* 2017).

Fermentasi berperan memengaruhi perubahan komposisi kimia kubis. Tidak hanya komponen makro dan mikro yang terkandung, *sauerkraut* juga mengandung asam organik (2% laktat, 1% asetat, propionat, malat, suksinat), etanol, etil asetat, asetaldehida, dan CO₂ yang dihasilkan BAL. Di samping itu, keragaman BAL yang terlibat dalam produksi *sauerkraut* menghasilkan mutu sensori yang baik. *Sauerkraut* kaya akan antioksidan seperti vitamin C dan senyawa fenolik (Peñas *et al.* 2017).

Fermentasi BAL tidak hanya mengonversi gula menjadi asam organik, tetapi juga menggunakan GLS sehingga lebih bermanfaat (Johanningsmeier *et al.* 2005). *Glucobrassicin* adalah salah satu jenis GLS yang dipecah menjadi sejumlah komponen bioaktif seperti isotiosianat (ITC) dan indol-3-karbinol (I₃C) oleh enzim mirosinase. Dalam kondisi pH rendah karena fermentasi, metabolit yang

diproduksi tersebut bereaksi secara nonenzimatis dengan asam askorbat dan menghasilkan askorbinogen (ABG), yang merupakan komponen penting pada *sauerkraut* karena sifat antikarsinogenik yang dimilikinya. Metabolit turunan GLS lainnya antara lain sulforaphane (SFN), alil isothiosianat (AITC), iberin nitril, dan alil sianida yang berpotensi mencegah risiko kanker (Peñas *et al.* 2017).

5.3.1.5 Manfaat Kesehatan

Sauerkraut diyakini menyimpan beragam manfaat kesehatan meskipun sejauh ini belum diteliti secara luas. *Sauerkraut* diketahui menunjukkan efek antioksidan, antikarsinogenik, dan anti-inflamasi yang telah dibuktikan oleh sejumlah penelitian. Kandungan fitokimia yang tinggi pada *sauerkraut* memiliki potensi fungsional yang menjanjikan. Vitamin C dan E terkandung pada *sauerkraut* dalam jumlah tinggi, begitu juga dengan senyawa fenolik. Senyawa-senyawa tersebut berperan sebagai donor elektron bagi sejumlah enzim pada manusia untuk menetralkan superoksida dan radikal bebas. Sebagai contoh, vitamin E dengan kemampuan donor H⁺ diteliti dapat menghambat oksidasi LDL yang berdampak baik sebagai agen protektif terhadap penyakit kardiovaskular (Podsędek 2007; Peñas *et al.* 2017). Selain itu, produk hidrolisis GLS dari kelompok isotiosianat menunjukkan kemampuan menangkap radikal bebas. Dibandingkan dengan kubis utuh, *sauerkraut* mempunyai aktivitas antioksidan lebih besar. Karena kemampuan antioksidatifnya yang tinggi, *sauerkraut* diketahui juga mampu mencegah kerusakan atau mutasi DNA (Peñas *et al.* 2017).

Tidak hanya sebagai agen antioksidan, komponen hasil pemecahan GLS seperti I₃C dan ABG mampu menghasilkan efek kemopreventif dan anti-inflamasi sehingga menghindarkan dari penyakit kronis (Peñas *et al.* 2017). Sejumlah penelitian mengungkapkan bahwa terdapat asosiasi positif antara konsumsi *sauerkraut* dan penurunan risiko kanker prostat (Kristal dan Lampe 2002). Selain itu, penelitian lain menemukan kemampuan ekstrak *sauerkraut* sebagai agen pencegah kanker payudara dengan menghambat aktivitas estrogen (Licznarska *et al.* 2013).

BAL alami pada *sauerkraut* dapat berpotensi sebagai probiotik jika berjumlah cukup dan mampu bertahan hidup pada saluran pencernaan untuk memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya. Meskipun tidak banyak penelitian yang mempelajari potensi ini dibandingkan produk fermentasi lain, terdapat sejumlah

studi yang melaporkan strain BAL asal *sauerkraut* dengan potensi probiotik yang menjanjikan seperti *Lactobacillus paraplantarum* SF9 dan *Lactobacillus brevis* SF15 yang berasal dari Kroasia (Beganović *et al.* 2011). Produksi *sauerkraut* juga berpotensi melibatkan suplementasi kultur probiotik, seperti yang dilakukan Beganović *et al.* (2011) dengan mengombinasikan strain probiotik *Lactobacillus plantarum* L4 dan *Leuconostoc mesenteroides* LM dalam pembuatan *sauerkraut* untuk memperoleh khasiat dari probiotik.

5.3.2 Tempoyak

5.3.2.1 Deskripsi Produk

Tempoyak adalah fermentasi buah durian yang berbentuk pasta. Rasa unik dari tempoyak diperoleh dari aroma durian yang kuat, bersama dengan rasa asam karena fermentasi. Di Indonesia, tempoyak lazim dikonsumsi di daerah selatan Sumatera. Produk ini juga sering ditambahkan untuk berbagai hidangan gurih di Malaysia. Tidak seperti durian yang dikonsumsi segar, tempoyak digunakan sebagai ingredien untuk membuat kondimen sebagai hidangan pembangkit selera seperti sambal, atau digunakan untuk berbagai masakan ikan atau sayuran. Tempoyak memiliki masa simpan yang lebih lama dari durian karena asam yang dihasilkan selama fermentasi, yaitu sekitar 2,5-2,6% (Nuraida *et al.* 2014).

5.3.2.2 Proses Fermentasi

Pembuatan tempoyak dilakukan secara tradisional dengan mengandalkan fermentasi spontan. Pertama-tama, daging buah durian dilumatkan kemudian ditambahkan garam dan dicampur merata. Inkubasi daging buah durian dilakukan dengan wadah yang harus tertutup rapat dan berlangsung pada suhu kamar selama satu minggu. Preparasi dalam wadah dapat dilakukan secara berlapis antara durian dengan garam hingga wadah terisi penuh. Wadah yang digunakan dapat terbuat dari keramik, plastik, atau toples kaca. Di daerah pelosok tepi hutan, bambu dimanfaatkan sebagai wadah fermentasi untuk menghasilkan tempoyak (Yuliana 2007).

Faktor utama untuk menghasilkan tempoyak dengan mutu baik yaitu kondisi anaerob dan penambahan garam. Sebagai produk fermentasi asam laktat, fermentasi tempoyak memerlukan keterlibatan BAL sebagai penghasil asam laktat yang cenderung menyukai kondisi anaerob dengan sedikit kadar oksigen. Jenis tempoyak dapat dibedakan berdasarkan kadar garam yang ditambahkan, yaitu tempoyak asam dan tempoyak asin. Jika garam ditambahkan kurang dari 5% maka tempoyak asam akan diperoleh, sementara pemberian garam melebihi 5% akan menghasilkan tempoyak asin. Masing-masing jenis tempoyak ini memiliki keunggulan tersendiri. Tempoyak asam mengandung lebih banyak BAL, sedangkan tempoyak asin berumur simpan lebih lama dan awet (Yuliana 2007).

Meskipun lebih lazim diproses secara spontan, tempoyak juga dapat difermentasi dengan penambahan kultur *starter*. Metode ini menciptakan fermentasi yang terkontrol untuk mencegah potensi tumbuhnya mikroba pemicu kontaminasi. Untuk mengaplikasikan *starter* pada fermentasi tempoyak, BAL merupakan kultur utama yang wajib diberikan. Salah satu BAL yang pernah diuji untuk pembuatan tempoyak dengan kultur *starter* yaitu *Pediococcus acidilactici* yang membawa dampak positif terhadap keragaman mikrobiologis, antara lain BAL berjumlah lebih banyak dan mikroba kontaminan berkurang, begitu juga dengan penerimaan konsumen yang lebih tinggi dibandingkan dengan tempoyak yang difermentasikan secara spontan (Yuliana dan Garcia 2009).

5.3.2.3 Mikrobiologi Tempoyak

Berbagai bakteri asam laktat telah diisolasi dari tempoyak, antara lain genus *Lactobacillus* dan *Leuconostoc*, dan *Lb. plantarum* merupakan spesies yang dominan (Nuraida *et al.* 2014). Dengan kandungan gula yang tinggi, pH mendekati netral, dan diproses secara anaerob, BAL merupakan mikroorganisme utama pada tempoyak yang jumlahnya dapat mencapai 10^8 cfu/g. *Lb. plantarum* mendominasi terutama pada tahap akhir fermentasi (Li 2004). *Lb. plantarum* relatif paling resisten terhadap kondisi asam dan kadar garam tinggi (Nuraida *et al.* 2014). Selain itu, terdapat dua strain *Lactobacillus* yang diketahui telah diisolasi dari tempoyak yaitu *Lactobacillus durianis* dan *Leuconostoc durionis* (Leisner *et al.* 2002 dan 2005). *Lactobacillus durianis* dan *Leuconostoc durionis*

tidak dapat memfermentasi glukosa (Leisner *et al.* 2001). Kedua spesies ini bersifat heterofermentatif obligat serta dapat menghasilkan D-laktat dan asam asetat (Leisner *et al.* 2002). Perbedaan kedua spesies tersebut yaitu *Lactobacillus durianis* juga memproduksi isomer L-asam laktat, sedangkan *Leuconostoc durionis* tidak menghasilkan produk samping berupa etanol (Leisner *et al.* 2005). *Lactobacillus durianis* menggunakan substrat dari komponen gula selain glukosa, seperti maltosa, pentosa, L-arabinosa, dan D-xilosa, sedangkan *Leuconostoc durionis* (saat ini diklasifikasikan ulang sebagai *Fructobacillus durionis*) menggunakan fruktosa yang lebih mudah difermentasi (Endo dan Okada 2008). BAL lainnya yang diasosiasikan dengan tempoyak antara lain *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella paramesenteroides*, dan *Pediococcus acidilactici* (Leisner *et al.* 2001; Yuliana dan Dizon 2011).

Jumlah bakteri asam laktat pada tempoyak dipengaruhi oleh kadar garam. Tempoyak dengan konsentrasi garam 1 atau 2 % mengandung jumlah BAL lebih tinggi dibandingkan tempoyak dengan konsentrasi garam 0 atau 3%. Jumlah maksimum tercapai setelah 4 hari fermentasi, yaitu 10^{10} cfu/g, lalu menurun secara bertahap (Amiza *et al.* 2004). Jumlah bakteri asam laktat menurun dengan bertambahnya waktu, namun kapang dan khamir mulai tumbuh. Penurunan pH membunuh bakteri asam laktat dan menstimulasi pertumbuhan kapang dan khamir (Nuraida *et al.* 2014).

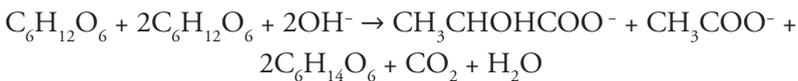
Seiring bertambahnya umur simpan produk, pH tempoyak yang semakin rendah akan memicu penurunan populasi BAL hingga tak terdeteksi pada penyimpanan lebih dari 1 bulan. Di sisi lain, pertumbuhan kapang dan khamir mulai muncul dan kemudian dapat mengasimilasi asam laktat. Proses pembuatan tempoyak yang spontan menyebabkan perlunya kewaspadaan akan potensi kontaminasi mikroba yang dapat terjadi, baik dari bakteri lain, khamir, maupun kapang. Sejumlah penelitian menemukan adanya *Bacillus megaterium* dan khamir pada tempoyak yang diproduksi di Indonesia (Yuliana 2005; Yuliana 2007).

5.3.2.4 Perubahan Kimia

Bagian yang dapat dimakan dari buah durian tersusun atas kandungan gula yang tinggi, terutama sukrosa yang menyumbang proporsi terbesar. Kandungan sukrosa pada durian adalah 15–20% (Amiza *et al.* 2004), yang merupakan gula

yang siap digunakan oleh bakteri asam laktat. Dengan pH sebesar 6,2, durian merupakan substrat yang baik untuk melangsungkan fermentasi gula oleh BAL (Nuraida *et al.* 2014). Selama fermentasi tempoyak, dihasilkan *flavor* yang kuat yang merupakan kombinasi gula dan asam organik, termasuk asam organik volatil. Total asam pada tempoyak berkisar antara 2,8–3,6% dengan pH 3,9–4,1 (Amiza *et al.* 2004). Kandungan asam laktat pada tempoyak berkorelasi dengan jumlah BAL. Tidak hanya asam laktat, asam asetat juga terdapat pada tempoyak tetapi dengan kadar yang lebih rendah dari asam laktat, yaitu 0,8% asam asetat dan 1,8% asam laktat (Leisner *et al.* 2001).

Terkait fermentasi oleh *Lactobacillus durianis* dan *Leuconostoc durionis*, agar kedua jenis BAL ini tumbuh dengan efektif, diperlukan akseptor elektron eksternal yang dapat menyempurnakan degradasi glukosa (Endo dan Okada 2008). Ketika fermentasi dibantu oleh fruktosa sebagai penerima elektron, reaksi tersebut tidak akan menghasilkan etanol. Hanya diperoleh asam organik dan gas gelembung dari H₂O dan CO₂, yang ditunjukkan oleh Nuraida *et al.* (2014) dalam persamaan reaksi berikut:



Jika *Leuconostoc durionis* ditumbuhkan pada media kombinasi glukosa dan fruktosa akan diperoleh manitol dalam jumlah besar. Selain itu, sejumlah penelitian melaporkan bahwa strain *Leuconostoc* ini mampu tumbuh lebih baik pada gula yang dicampur dengan piruvat (Endo dan Okada 2008).

5.3.2.5 Manfaat Kesehatan

Secara komposisi, tidak banyak perbedaan yang mencolok antara tempoyak dengan buah durian utuh, salah satunya adalah kandungan karbohidrat yang tinggi. Tempoyak dapat dibedakan dari durian karena tingginya kandungan asam organik pada tempoyak. Terlepas dari itu, masyarakat umumnya mengonsumsi tempoyak sebagai kondimen sehingga dampak kesehatan yang diberikan dari mengonsumsi tempoyak tidak begitu signifikan. Dengan adanya BAL yang tumbuh selama fermentasi durian, tempoyak diduga menyimpan bakteri yang

potensial sebagai probiotik, namun sejauh ini tidak banyak penelitian yang menelusuri potensi probiotik lebih lanjut pada tempoyak. Wirawati (2002) melaporkan bahwa BAL yang diisolasi dari tempoyak menunjukkan resistensi terhadap pH rendah dan garam empedu serta memiliki kemampuan antimikroba terhadap patogen.

5.3.3 Mandai

5.3.3.1 Deskripsi Produk

Salah satu produk fermentasi berbasis buah indigenus lainnya yaitu mandai yang berasal dari Banjarmasin, Kalimantan Selatan. Pembuatan mandai memanfaatkan kulit buah cempedak (*Arthocarpus integer* (Thunb.) Merr.) yang difermentasikan secara spontan. Buah cempedak serumpun dengan nangka karena berada dalam genus yang sama (*Arthocarpus*). Perbedaan cempedak dengan nangka yaitu tekstur daging yang lebih lembut dan aroma yang lebih tajam daripada nangka.

5.3.3.2 Proses Fermentasi

Produksi mandai pada prinsipnya melibatkan fermentasi natural/spontan dengan garam berkadar tinggi. Tahap pertama, kulit buah bagian dalam cempedak diambil, dicuci, kemudian direndam dalam larutan garam dengan kadar 15–25% (b/v) selama beberapa waktu (Nur 2009). Konsentrasi garam yang tinggi ini diberikan untuk mencegah kontaminasi dari bakteri yang tidak diinginkan. Di sisi lain, penambahan garam dapat mengurangi tingkat penerimaan konsumen serta menimbulkan masalah kesehatan karena tingkat konsumsi NaCl yang tinggi seperti hipertensi. Salah satu cara untuk menekan penambahan garam tinggi yaitu menerapkan praktik proses produksi yang higienis (Rahmadi *et al.* 2017). Dalam penerapan praktik higienis, kulit bagian dalam cempedak direbus terlebih dahulu selama 15 menit pada suhu 80–90 °C. (Rahmadi *et al.* 2018).

5.3.3.3 Mikrobiologi Mandai

Sejauh ini, penelitian yang mengeksplorasi keragaman mikroorganisme pada mandai masih terbatas. Namun, dengan kondisi fermentasi yang spontan, BAL dapat berhabitat dengan proporsi terbesar dibandingkan mikroorganisme lain.

Aktivitas BAL selama fermentasi ditunjukkan dengan perubahan tekstur mandai menjadi lunak, munculnya aroma asam, dan menurunnya pH produk (Nur 2009).

Sebagai produk yang berasal dari tanaman, mandai didominasi oleh *Lb. plantarum* dan *Leuconostoc* sp. (Rahmadi *et al.* 2017, Emmawati *et al.* 2015). Rahayu (2003) memperoleh sejumlah isolat BAL dari mandai asli Indonesia, dengan strain teridentifikasi sebagai *Lb. plantarum* dan *Pediococcus pentosaceus*. Sebagai salah satu BAL yang bersifat heterofermentatif fakultatif, *Lb. plantarum* dapat menghasilkan beragam jenis asam organik. Selain itu, spesies ini mampu bertahan pada kondisi pH rendah dan kadar garam tinggi. Emmawati *et al.* (2015) memperoleh isolat BAL asal mandai Kalimantan Timur yang teridentifikasi melalui API 50 CHL sebagai *Lb. plantarum* dan bersifat toleran terhadap kondisi asam. Isolat dari mandai yang diperoleh Juwana *et al.* (2020) memiliki kesamaan dengan *Lb. suebicus*, *Lb. perolens*, dan *Lb. harbinensis* berdasarkan identifikasi 16s rRNA. *Lb. suebicus* tergolong BAL heterofermentatif obligat, mampu bertahan hingga pH 2,8, serta lazim berhabitat pada minuman beralkohol yang berasal dari distilasi buah apel dan pir. Sementara *Lb. perolens* dan *Lb. harbinensis* memiliki kekerabatan yang dekat. Keduanya merupakan BAL heterofermentatif fakultatif, nonmotil, dan berbentuk batang. Akan tetapi, resistensi kedua spesies ini terhadap asam tidak sebaik *Lb. suebicus* karena selnya tidak menunjukkan pertumbuhan pada pH 3,0–3,7. *Lb. perolens* dapat ditemukan pada limbah industri bir, sementara *Lb. harbinensis* dilaporkan telah diisolasi pada produk fermentasi tradisional asal Tiongkok *suan-tsai* (Juwana *et al.* 2020). Tidak hanya BAL, mikroorganisme lain juga dapat ditemukan pada mandai dengan proporsi yang sangat kecil (Rahmadi *et al.* 2018). Nur (2009) menemukan adanya khamir selama fermentasi cempedak di mana paling banyak terdeteksi pada hari ke-5 pemeraman.

5.3.3.4 Perubahan Kimia

Buah cempedak diketahui merupakan salah satu sumber karbohidrat yang sebagian besar tersusun atas sukrosa. Selain itu, sejumlah asam organik pada buah utuh juga tersedia, antara lain asam malat, asam sitrat, dan asam suksinat. Kadar air dan protein cempedak berturut-turut sebesar 58–85% dan 3,5–7%

(b/v). Kandungan serat cempedak cukup tinggi, yaitu 5–6%, sementara tingkat ketersediaan lemak relatif rendah (0,5–2,0%) (Pui *et al.* 2018). Seperti produk fermentasi laktat lain, mandai dapat mengandung metabolit fenolik seperti asam fenilaktat yang dilepaskan selama fermentasi BAL (Rahmadi *et al.* 2019).

Kemampuan *Lb. plantarum* sebagai BAL heterofermentatif bersifat fakultatif. Hal ini berarti jika substrat berupa heksosa maka fermentasi akan berlangsung melalui glikolisis dan memproduksi produk homofermentatif yang hanya berupa asam laktat, sedangkan jika substrat berupa pentosa maka degradasi substrat berlangsung melalui jalur fosfoketolase yang akan menghasilkan metabolit heterolaktik. Karena keterbatasan referensi mengenai metabolisme karbohidrat pada mandai atau selama fermentasi cempedak, penjelasan mengacu pada penelitian yang memanfaatkan substrat jus mentimun dengan kandungan glukosa dan fruktosa yang memadai. Plumed-Ferrer *et al.* (2008) menyatakan bahwa metabolisme gula dengan media tersebut oleh *Lb. plantarum* berlangsung secara homofermentatif. Selain itu, diketahui pula bahwa fermentasi karbohidrat yang dikombinasikan dengan asam malat dapat meningkatkan biomassa asam laktat daripada tanpa adanya ko-fermentasi (Plumed-Ferrer *et al.* 2008). Sebagian besar spesies *Leuconostoc* dapat melangsungkan metabolisme glukosa dan fruktosa secara bersamaan, tetapi glukosa lebih cepat difermentasikan daripada fruktosa (Erten 2000). Meski demikian, terdapat sejumlah strain yang justru mengalami hal yang sebaliknya, seperti *Leu. mesenteroides* LC yang lebih cepat mendegradasi fruktosa dibandingkan glukosa (Chen *et al.* 1983).

5.3.3.5 Manfaat Kesehatan

Hingga kini, studi yang mengeksplorasi nilai fungsional dari mandai masih terbatas. Namun demikian, terdapat penelitian yang mengulas potensi fungsional mandai dari beragam aspek meliputi antioksidan, penurunan kadar kolesterol, dan potensi probiotik pada BAL indigenus. Kulit bagian dalam cempedak diketahui kaya akan kandungan antioksidan berupa polifenol. Dengan bantuan fermentasi oleh BAL, mandai cenderung memiliki kadar fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi daripada cempedak utuh (Rahmadi *et al.* 2019). Mariana *et al.* (2020) meneliti kemampuan dari fraksi cairan dari mandai (cuka mandai) untuk menekan kadar kolesterol pada mencit (*Mus musculus*), dan hasilnya menunjukkan penurunan yang signifikan.

Sebagai produk fermentasi laktat, mandai dapat dianggap sebagai sumber BAL yang menyimpan potensi sebagai probiotik pada sejumlah strain. Emmawati *et al.* (2015) menemukan sepuluh isolat BAL asal mandai Kalimantan Timur yang berpotensi sebagai probiotik. Isolat yang teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* ini diteliti mampu bertahan pada suasana pH rendah dan 0,5% garam empedu, serta melepaskan efek antimikroba terhadap patogen *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhimurium*. Secara *in vivo*, *Lb. plantarum* MB 427 dapat menekan tingkat keparahan penyakit diare pada tikus yang disebabkan oleh infeksi EPEC serta memicu pelepasan antibodi yang berdampak pada peningkatan imunitas tubuh (Emmawati 2014).

5.3.4 Kimci

5.3.4.1 Deskripsi Produk

Kimci merupakan salah satu produk pangan utama di Korea yang dibuat dengan melibatkan fermentasi spontan pada sayuran. Bahan baku sayuran yang lazim digunakan yaitu kubis, lobak, dan mentimun. Hal yang membedakan kimci dengan produk fermentasi sayuran lain yaitu penambahan berbagai bumbu dan rempah seperti garam, bawang putih, bubuk paprika merah, daun bawang, dan jahe. Penambahan ini memberikan kombinasi cita rasa asam dan pedas, dan gurih. Oleh sebab itu, kimci menjadi daya tarik global karena keunikan dari segi organoleptik, kandungan nutrisi, serta manfaat kesehatan, dan hingga kini masih terus diteliti (Park *et al.* 2014).

5.3.4.2 Proses Fermentasi

Terdapat ratusan jenis kimci yang diketahui saat ini, dengan keragaman yang bergantung pada bahan baku, asal, dan metode produksi (Park dan Cheigh 2004). Di antara berbagai macam kimci yang tersedia di pasaran, kimci kubis (*baechu-kimchi*) adalah yang paling banyak ditemukan dan paling lazim direpresentasikan sebagai kimci pada umumnya. Untuk memproduksi kimci kubis, langkah pertama, kubis harus dipersiapkan dengan bersih dan higienis dari potensi bakteri pembusuk atau patogen melalui sortasi, pemangkasan bagian-bagian kubis yang tidak dibutuhkan, pencucian, dan perendaman dalam larutan garam 10%.

Kemudian kubis dibilas dengan air biasa dan ditiriskan selama kurang lebih tiga jam. Pasta bumbu kimci juga dapat disiapkan dengan mencampurkan 13% (b/v) lobak iris, 3,5% bubuk paprika merah, 1,4% bawang putih, 0,6% jahe halus, 2,2% ikan teri lumat, 2% daun bawang, 1% gula, dan garam untuk memperoleh kadar 2,5%. Komposisi ini merupakan standar yang banyak diterapkan untuk memproduksi kimci. Selanjutnya, kubis yang sudah tiris dilumurkan dengan bumbu pasta di seluruh bagian. Kubis yang tercampur dengan bumbu kemudian dikemas dan disimpan dalam wadah tertutup untuk melangsungkan fermentasi. Inkubasi berlangsung selama 1–2 hari pada suhu ruang. Kimci dapat dikonsumsi segar hingga hari ke-7 fermentasi. Nilai pH akhir produk kimci umumnya mencapai antara 4,2–4,7 (Park *et al.* 2017).

5.3.4.3 Mikrobiologi Kimci

Fermentasi spontan pada kimci memicu pertumbuhan BAL lebih signifikan dibandingkan mikroorganisme lain. Selain *Lactobacillus*, BAL yang sering dijumpai pada kimci adalah *Weissella* dan *Leuconostoc*. Sebagian besar penelitian menyebutkan bahwa spesies yang menempati proporsi terbanyak yaitu *Leu. mesenteroides* dan *Lb. plantarum*. Park *et al.* (2014) menyatakan bahwa dari beragam jenis BAL yang diisolasi dari berbagai kimci komersial asal Korea, spesies yang mendominasi yaitu *Weissella koreensis* diikuti dengan *Lb. sakei* dan *Lb. graminis*. Jenis BAL lain yang lazim teridentifikasi antara lain *Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*, *Leu. gasicomitatum*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lactococcus lactis*, *W. confusa*, *W. Koreensis*, dan *Pediococcus pentosaceus*.

Sukses mikroorganisme sepanjang fermentasi kimci sangat ditentukan oleh pH dan tingkat keasaman. Pada tahap awal, *Leuconostoc mesenteroides* paling banyak terdeteksi hingga pH mencapai 4,3, kemudian dominansi BAL digantikan oleh *Lb. sakei* ketika tingkat keasaman semakin tinggi (Park *et al.* 2017). Selain itu, keberadaan BAL juga dipengaruhi oleh suhu fermentasi. Sebagai contoh, *Lb. sakei* banyak berkembang ketika diperam pada suhu rendah yaitu antara 9 °C hingga -2 °C (Park *et al.* 2017). Akhir-akhir ini muncul pengembangan produk kimci dengan mensuplementasikan *starter* BAL probiotik untuk fermentasi. Strain dari *Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides*, serta kombinasi *Leu. mesenteroides* dan *Lb. plantarum* yang memiliki sifat probiotik pernah diuji kemampuannya sebagai *starter* kimci (Park *et al.* 2017).

5.3.4.4 Perubahan Kimia

Selama fermentasi kimci, BAL melakukan metabolisme secara heterofermentatif, baik obligat maupun fakultatif. Spesies dari *Leuconostoc* dan *Weissella*, juga *Lb. brevis*, termasuk BAL heterofermentatif obligat, sementara *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, dan *Lb. curvatus* tergolong BAL yang bersifat heterofermentatif fakultatif. BAL asal kimci dapat melakukan metabolisme karbohidrat baik pada substrat glukosa maupun fruktosa. Pada metabolisme glukosa, BAL heterofermentatif kimci umumnya akan melepaskan asam laktat, etanol, dan gas CO₂. Sementara itu, metabolisme fruktosa dapat terjadi melalui dua proses: konversi menjadi glukosa-6-P dengan bantuan enzim glukosa fosfat isomerase untuk selanjutnya bisa memasuki proses metabolisme gula; dan/atau sintesis manitol dan asetat dengan mereduksi fruktosa yang dikatalisis oleh manitol dehidrogenase. Manitol adalah salah satu gula alkohol yang berkalori rendah karena sulit diabsorpsi dalam usus. Di antara BAL lainnya, *Leuconostoc* merupakan BAL penghasil manitol utama yang memberikan sensasi menyegarkan dari kimci selain karbondioksida (Jung *et al.* 2014).

Tidak hanya metabolisme karbohidrat, fermentasi kimci juga melibatkan aktivitas proteolitik yang menghasilkan sejumlah asam amino. Metabolisme ini dipicu oleh protease asal sayuran utuh maupun mikroorganisme yang terlibat secara spontan dalam fermentasi (Jung *et al.* 2014). Komponen lain yang dihasilkan BAL kimci yaitu asam gamma-aminobutirat (GABA). GABA merupakan asam amino nonprotein yang dapat ditemukan pada otak mamalia dan berfungsi sebagai neurotransmitter dalam sistem saraf. Sejumlah penelitian mengungkap bahwa GABA juga dapat dihasilkan spesies *Lactobacillus*, terutama *Lb. sakei* dan *Lb. buchneri* asal kimci selama fermentasi. Komponen minor pada kimci meliputi senyawa *flavor* volatil berupa diasetil, asetoin, asetaldehida, serta alkohol sekunder yang dikonversi dari karbohidrat atau asam lemak oleh mikroflora kimci (Jung *et al.* 2014).

5.3.4.5 Manfaat Kesehatan

Sifat fungsional kimci dapat diperoleh dari BAL yang bersifat probiotik maupun dari senyawa kimia yang dihasilkan selama fermentasi atau dari sayuran utuh itu sendiri. Kimci mengandung vitamin (vitamin C, betakaroten, vitamin B

kompleks), mineral (Na, Ca, K, Fe, P), serat pangan, antioksidan, dan senyawa bioaktif seperti isotiosianat dan beta-sitosterol. Namun demikian, belum tentu semua kimci mengandung BAL probiotik, karena sifat probiotik tergantung pada galur BAL. Sejumlah penelitian mengungkapkan bahwa BAL asal kimci diduga menunjukkan aktivitas antimutagenik, antioksidan, berpotensi mencegah alergi, menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori*, serta menurunkan risiko kanker, obesitas, diabetes, dan kolesterol (Park *et al.* 2014). Penelitian-penelitian tersebut masih terus dilakukan secara *in vitro* dan pada tikus percobaan. Di sisi lain, penelitian efek BAL kimci terhadap kesehatan manusia masih terbatas (Jung *et al.* 2014).

Komponen antioksidan yang tersimpan pada kimci meliputi klorofil, senyawa fenolik, vitamin C, karotenoid, serat pangan, dan senyawa fitokimia lainnya (Park *et al.* 2017). Efek antioksidan ini juga diperkaya oleh BAL yang tumbuh selama fermentasi kimci. Salah satu strain BAL indigenus kimci *Lb. plantarum* dilaporkan mampu melepaskan efek antioksidan terhadap reaksi oksidatif lipid yang merupakan pemicu penyakit gagal jantung, arthritis, dan gangguan imun (Lee *et al.* 2005). Aktivitas antioksidan yang diperoleh dari mengonsumsi kimci ini juga berkaitan dengan dampaknya sebagai agen pencegah penuaan terhadap kulit manusia (Park *et al.* 2017).

Tekanan oksidatif pada manusia juga dapat menginisiasikan kanker. Efek antikanker yang diperoleh dari kimci dihasilkan dari komponen bioaktif beta-sitosterol dan asam linoleat. Akan tetapi, kadar garam perlu diperhatikan karena dapat berkontribusi terhadap efek antimutagenik. Park *et al.* (2014) menyatakan bahwa kandungan garam yang terlalu tinggi (8,5–9,5%) justru dapat mendorong aktivitas mutagenik. Aktivitas pencegah kanker juga dihasilkan oleh BAL indigenus kimci. Chang *et al.* (2010) melaporkan bahwa strain *Lb. acidophilus* yang diisolasi dari kimci menunjukkan kemampuan menekan proliferasi sel kanker kolon.

Pengaruh kimci terhadap penekanan obesitas telah dibuktikan dengan pengujian isolat kimci *Weissella koreensis* pada sel adiposa mencit (Moon *et al.* 2012). Selain itu, efek antiobesitas juga teramati pada penelitian dengan penambahan *starter*

Leu. mesenteroides pada kimci yang diberikan pada mencit (Cui *et al.* 2015). Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan massa tubuh dan jaringan adiposa mencit yang diberikan kimci dengan pengayaan BAL.

BAL kimci dilaporkan dapat menurunkan kolesterol berlebih, seperti yang telah ditunjukkan oleh galur tertentu dari *Lb. plantarum* yang mampu menekan kadar kolesterol hingga sebesar 42% dan tingkat LDL sebesar 32%. BAL dapat menghasilkan efek hipokolesteromik dengan dugaan mekanisme berupa peningkatan sintesis asam empedu dari kolesterol dan/atau pelepasan asam empedu (Jeun *et al.* 2010).

5.3.5 Sawi Asin

5.3.5.1 Deskripsi Produk

Sawi asin merupakan produk olahan sawi yang diproduksi melalui pemeraman spontan. Sawi asin berasal dari Tiongkok, yang dikenal dengan istilah *meigan cai* atau *suan-tsai*. Di Indonesia, sawi fermentasi ini banyak dijumpai di kawasan Pecinan kota-kota besar seperti Bogor, Batam, Jakarta, Sukabumi, Semarang, dan Surabaya. Jenis sawi asin juga beragam di berbagai negara seperti *fu-tsai* atau *suan-tsai* asal Taiwan, *kiam chai* dan *pak gard dong* dari Thailand, *kiam chaye* dari Malaysia, serta *dua cai be* asal Vietnam. Keberagaman dari setiap negara ini meliputi cara pembuatan dan waktu fermentasi yang berbeda satu sama lain. Sawi asin dicirikan dengan penampilan berwarna hijau kecokelatan, rasa dominan asin, dan bertekstur renyah. Umumnya sawi asin disajikan dalam asinan, nasi tim, atau dimasak tumis.

5.3.5.2 Proses Fermentasi

Tahapan awal dalam pembuatan sawi asin meliputi sortasi dan pembersihan bahan baku sawi, dilanjutkan dengan penjemuran di bawah sinar matahari untuk membuat sawi layu. Setelah dilayukan, sawi diberi taburan garam merata pada seluruh permukaannya lalu diremas agar air dari sawi dapat keluar. Sawi yang sudah tergarami dидiamkan selama satu jam. Sementara itu, air rendaman yang meliputi 500 mL air, 1 sendok tepung beras, 2 sendok makan garam, dan 1 sendok makan gula pasir disiapkan, lalu dididihkan dan didinginkan. Setelah satu

jam, sawi dibilas bersih dengan air kemudian ditiriskan. Persiapan pemeraman sawi dimulai dengan mengikat 3–4 lembar daun sawi menjadi satu, ditaruh pada wadah kaca, lalu diberi air rendaman pada setiap wadah. Wadah sawi yang direndam kemudian didiamkan untuk melangsungkan fermentasi alami selama 3–4 hari (Kurnia 2018).

5.3.5.3 Mikrobiologi Sawi Asin

Sawi asin difermentasi secara alami/spontan dengan mengandalkan mikroorganisme yang berasal dari sayuran itu sendiri, udara, bahan perendam, peralatan, maupun bahan-bahan lain yang ditambahkan selama pembuatan. Metode fermentasi spontan menyebabkan keragaman mikroorganisme yang berhabitat pada sawi asin. BAL menduduki populasi terbesar di antara mikroorganisme lain dengan genus yang lazim dijumpai antara lain *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus*, dan *Enterococcus* (Chao *et al.* 2009). Di Indonesia, Arihantana dan Partiw (2015) memperoleh isolat sawi asin yang teridentifikasi sebagai *Lb. fermentum*. Pada produk sayur asin asal Vietnam yang mengombinasikan sawi dengan buah bit, BAL yang mendominasi teridentifikasi sebagai *Lb. fermentum*, *Lb. pentosus*, dan *Lb. plantarum* (Nguyen *et al.* 2013). BAL pada umumnya tergolong bakteri halotoleran yang mampu bertahan pada kondisi lingkungan dengan kadar garam tinggi, yaitu 2,5–10%. Dengan konsentrasi garam yang tinggi tersebut, air yang terkandung dalam sawi akan dilepaskan sehingga menurunkan aktivitas air (A_w) sawi yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba pembusuk (Kurnia 2018).

Pertumbuhan BAL selama fermentasi sawi berlangsung secara suksesif. Chen *et al.* (2006) mengungkapkan bahwa BAL homofermentatif seperti *P. pentosaceus* dan *Tetragenococcus halophilus* berkontribusi besar terhadap fermentasi *suan-tsai*, sawi asin asal Tiongkok. Pada tahap awal, *Pediococcus pentosaceus* mendominasi dibandingkan BAL lain. Setelah kurang lebih 40 hari pemeraman, konsentrasi NaCl meningkat sehingga BAL yang bersifat halofilik dapat meningkatkan aktivitas fermentasi dengan pesat, seperti *T. halophilus*.

Sukses BAL juga terjadi pada fermentasi sawi asin asal Thailand dengan spesies yang berbeda yaitu *Weissella* spp. dan *Lb. plantarum* (Kamdee *et al.* 2014). Ketika fermentasi dimulai, proporsi terbesar populasi BAL adalah genus *Weissella*.

Dominasi tersebut bertahan selama 3 hari hingga *Lb. plantarum* menggantikan posisi *Weissella* sampai periode akhir fermentasi. Baik *Weissella* spp. dan *L. plantarum* juga teridentifikasi pada produk fermentasi spontan sayuran seperti kimci. Kedua spesies ini merupakan BAL heterofermentatif, tetapi *Weissella* bersifat heterofermentatif obligat sementara *Lb. plantarum* tergolong heterofermentatif fakultatif.

Selain BAL, terdapat bakteri lain yang terdeteksi pada *su-an-tsai* seperti *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Bacillus*, dan *Betaproteobacteria* (Wu *et al.* 2015; Yang *et al.* 2014). Kapang juga dapat dijumpai selama fermentasi seperti *Debaryomyces hansenii*, *Candida tropicalis*, *Penicillium expansum* (Wu *et al.* 2015), *Candida sake*, *Cystofilobasidium infirmominium*, *Cladosporium* sp., dan *Tilletiopsis washingtonensis* (Yang *et al.* 2014).

5.3.5.4 Perubahan Kimia

Sawi asin diketahui memiliki kandungan nitrat yang relatif tinggi (Hord *et al.* 2009). Ketika sawi asin melalui tahap awal fermentasi, nitrat akan direduksi menjadi nitrit oleh bakteri yang tidak memproduksi asam yang berhabitat pada daun sawi. Nitrit yang tersimpan dalam kadar tinggi akan menjadi perhatian utama keamanan pangan karena merupakan salah satu bahaya kimia yang berpotensi memicu kanker (Wu *et al.* 2015). Akan tetapi, BAL mulai aktif melakukan metabolisme pada tahap pertengahan fermentasi. Kadar asam yang meningkat dan pH yang menurun seiring waktu fermentasi akan menekan pertumbuhan bakteri pereduksi nitrat tersebut. BAL seperti *Lb. plantarum* yang aktif pada tahap pertengahan dan akhir fermentasi diketahui mampu melepaskan enzim nitrit reduktase untuk mendegradasi nitrit (Gøtterup *et al.* 2007) sehingga produk sawi asin aman dikonsumsi.

BAL dapat memproduksi enzim pendegradasi protein dalam fermentasi sawi asin sehingga menghasilkan asam amino bebas. Asam amino tersebut berkontribusi terhadap produk akhir sawi asin dalam peningkatan mutu dan nilai nutrisi. Asam amino seperti asam glutamat dan asam aspartat yang terikat dengan Na^+ dapat menciptakan *flavor* segar khas pada sawi asin. *Flavor* tersebut diperoleh secara optimal ketika sawi asin sudah matang, yaitu dalam tahap akhir fermentasi (Wu *et al.* 2015). Aroma khas sawi asin juga dihasilkan berkat kombinasi fermentasi

homolaktik dan heterolaktik oleh beragam jenis BAL. Komponen *flavor* berupa ester, alkohol, aldehid, isotiosianat nitril, dan sulfida terdeteksi pada setengah tahap akhir fermentasi sawi asin (Wu *et al.* 2015).

5.3.5.5 Manfaat Kesehatan

Sawi kaya akan antioksidan alami seperti betakaroten, klorofil, asam askorbat, dan mineral seperti zat besi, kalsium, dan kalium (Fang *et al.* 2008; Oh *et al.* 2016). Sawi asin dari Korea mengandung metabolit seperti glukosinolat yang dapat memicu aktivitas antioksidan dari produk tersebut (Oh *et al.* 2016). Sebagai salah satu produk fermentasi spontan, sawi asin menyimpan sejumlah mikroorganisme terutama BAL yang berpotensi sebagai probiotik, walau belum tentu semua sawi asin mengandung galur BAL probiotik. Di samping itu, BAL asal sawi asin sudah dikaji potensinya dalam menghasilkan berbagai efek kesehatan seperti aktivitas penurunan kolesterol dan peningkatan respons imun, meskipun penelitiannya masih terbatas. Isolat BAL asal sawi asin Indonesia *Lb. plantarum* dan *Lb. fermentum* diketahui berpotensi sebagai penurun kadar kolesterol (Kurnia 2018). Strain *Lb. plantarum* yang diisolasi dari *suan-tsai* memiliki potensi hipokolesterolemia yang dibuktikan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* (Yu *et al.* 2013). Chang *et al.* (2015) menemukan strain *Lb. plantarum* dan *Weissella cibaria* mampu memodulasi sistem imun, terutama mendorong produksi nitrit oksida (NO) dan sitokin.

5.4 Daging Fermentasi

5.4.1 Deskripsi Produk

Produk fermentasi daging merupakan produk daging yang memiliki *flavor*, warna, difermentasi secara alami atau dengan penambahan kultur *starter* (Cui dan Fan 2019). Produk yang dikenal di dunia terutama adalah sosis fermentasi seperti salami, Cervelat, dan ham fermentasi dengan karakteristik dan metode fermentasi yang bervariasi yang mencakup *curing*, fermentasi, pengeringan atau pengasapan. Indonesia memiliki sosis fermentasi tradisional yang berasal dari Bali, yaitu urutan. Stabilitas produk fermentasi daging terutama ditentukan oleh kombinasi asam yang dihasilkan oleh BAL, dan penurunan A_w akibat *curing* dan

pengeringan (Fontana *et al.* 2012). Cui dan Fan (2019) mengklasifikasikan daging fermentasi berdasarkan keasamanannya yaitu asam rendah dan asam tinggi. Produk fermentasi asam rendah memiliki pH di atas 5,5, misalnya Spanish ham, salami, sosis Perancis, Itali, Hungaria dan sosis fermentasi kering lainnya, yang dibuat dengan tahapan *curing*, fermentasi dan pengeringan pada suhu rendah (0–25°C). Produk fermentasi daging asam tinggi memiliki pH <5,5, yang diproduksi dengan penambahan kultur *starter* dan difermentasi pada suhu >25°C. Sosis juga diklasifikasikan berdasarkan kehalusan daging, yaitu sosis kasar dan halus, serta berdasarkan kadar airnya yaitu sosis semi kering dengan kadar air 40–45% dan sosis kering dengan kadar air 25–40% (Cui dan Fan 2019).

5.4.2 Proses Fermentasi

Sosis fermentasi semi kering dan kering merupakan produk daging fermentasi yang dibuat dari campuran daging babi/daging sapi dengan lemak babi, garam, senyawa *curing*, gula, rempah-rempah dan kultur *starter*. Rasio daging dan lemak umumnya 2:1. Kriteria pemilihan daging berdasarkan komposisi, pH dan karakteristik daya ikat. Campuran lalu dimasukkan ke dalam selongsong dan difermentasi lalu dikeringkan dan/atau diasap (Fontana *et al.* 2012). Pada fermentasi sosis secara alami/spontan, daging dicincang lalu ditambah bumbu dan dicampur merata, selanjutnya dimasukkan ke dalam selongsong. Sosis difermentasi sambil diangin-anginkan pada suhu rendah untuk jangka waktu lama (Cui dan Fan 2019). Pada fermentasi urutan, sosis tradisional Bali, campuran daging babi, lemak babi, gula, garam dan rempah-rempah, campuran dimasukkan ke dalam usus sapi dan difermentasi pada kondisi yang tidak terkontrol di bawah sinar matahari selama 5 hari (Antara *et al.* 2002).

Suhu dan waktu fermentasi tergantung pada jenis sosis. Pada umumnya semakin tinggi suhu semakin cepat produksi asam oleh BAL dan pembentukan warnanya. Untuk sosis kering fermentasi dilakukan pada suhu 12–24°C selama 1–7 hari, sedangkan untuk sosis semi kering dilakukan pada suhu yang lebih tinggi (25–35°C) dan RH antara 70% dan 95% (Fontana *et al.* 2012). Pengeringan sosis fermentasi merupakan tahapan penting yang waktunya bervariasi tergantung

jenis sosisnya. Untuk sosis semi kering dilakukan pengeringan dengan laju rendah (10–15°C selama 4–12 minggu), sedangkan untuk sosis kering dilakukan pengeringan cepat (Fontana *et al.* 2012).

5.4.3 Mikrobiologi Fermentasi Sosis

Mikroorganisme yang berperan pada fermentasi daging mencakup bakteri, kapang, dan khamir. Secara umum BAL adalah yang paling penting di antara mikroorganisme lainnya. Bakteri lainnya yang berperan adalah bakteri koki koagulase negatif, *Micrococcus* dan *Staphylococcus* (Cui dan Fan 2019, Krockel 2013). Kelompok bakteri ini memiliki kemampuan untuk mendekomposisi senyawa nitrogen dan memiliki peran pada pembentukan warna daging fermentasi. Khamir umumnya resisten terhadap garam tinggi dan memiliki kapasitas fermentasi yang kuat serta tumbuh pada permukaan daging. Umumnya khamir digunakan bersama-sama dengan BAL. BAL yang digunakan pada fermentasi daging termasuk fermentasi sosis antara lain *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Pediococcus lactis*, *P. pentosaceus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, dan *Lactococcus diacetylactis*. *Lb. sakei* merupakan BAL yang dominan pada sosis fermentasi. Pada fermentasi sosis, BAL berperan pada pembentukan senyawa *flavor* dan menurunkan pH sehingga meningkatkan umur simpan. Bakteri lainnya yang sering digunakan atau ditemukan pada fermentasi daging termasuk fermentasi sosis antara lain *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *S. carinii*, *S. xylose*, *S. amber* dan *S. equi*. *S. carnosus* merupakan bakteri kunci untuk pembentukan *flavor* sosis fermentasi. *S. succinus* dan *S. equorum* berperan pada pematangan sosis (Cui dan Fan 2019). Mikroorganisme yang berperan pada pematangan sosis sangat tergantung pada teknologi yang diterapkan. NaCl, nitrat/nitrit, gula dan kondisi lingkungan seperti A_w (0,85–0,92), suhu (12–18°C sampai 24–30°C), dan gradien oksigen selama pematangan akan menyeleksi mikroorganisme yang dapat tumbuh (Fontana *et al.* 2012). Pada fermentasi sosis tradisional, *Lb. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* dan *Pediococcus* spp. yang paling sering ditemukan (Fontana *et al.* 2012). Pada fermentasi urutan yang dilakukan secara spontan, ditemukan *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis*, *Lb. fermentum*, *Pediococcus acidilactici* dan *P. pentosaceus* (Antara *et al.* 2002). *Lb. plantarum* mengawali pertumbuhan diikuti oleh *P. acidilactici*, dan terakhir *Lb. farciminis* mendominasi fermentasi tahap akhir.

Flavor sosis fermentasi di Eropa Selatan dipengaruhi oleh khamir dan kapang. Khamir menghambat ketengikan dengan menggunakan residu oksigen pada daging cincang, mendekomposisi lemak dan protein serta memproduksi *flavor*. Hidrogen peroksida yang diproduksi khamir dapat mencegah diskolorasi daging (Cui dan Fan 2019). Khamir yang paling umum ditemukan pada fermentasi sosis adalah *Debaryomyces hansenii* yang toleran terhadap garam dan gas serta dapat tumbuh pada permukaan sosis. Khamir lainnya yang ditemukan pada daging fermentasi adalah *Candida famata*. Kapang *Penicillium* umumnya ditemukan pada sosis kering yang dapat tumbuh pada permukaan sosis dan membentuk film sehingga menghambat difusi oksigen dan mencegah ketengikan. Kapang juga berkontribusi terhadap aroma sosis dengan aktivitas lipase dan protease yang mendegradasi lemak dan protein. Penggunaan kapang pada fermentasi harus mempertimbangkan keamanan, yaitu tidak mempergunakan kapang penghasil mikotoksin. Kapang yang digunakan pada fermentasi daging adalah *Penicillium chrysogenum* dan *Penicillium nalgiovense* (Cui dan Fan 2019).

Penggunaan kultur *starter* BAL pada fermentasi daging dapat mempercepat produksi asam dari gula, sehingga dapat segera menghambat bakteri patogen dan pembusuk. BAL menghambat bakteri patogen dan pembusuk dengan menciptakan kondisi yang tidak mendukung pertumbuhan bakteri tersebut (Laranzo *et al.* 2019). Selain menghasilkan asam laktat, BAL juga dapat menghasilkan senyawa antimikroba lainnya seperti asam asetat, propionat, etanol, hidrogen peroksida dan bakteriosin, walaupun tidak semua BAL dapat menghasilkan bakteriosin.

5.4.4 Perubahan Kimia

Selama proses fermentasi terjadi dua reaksi secara simultan yang disebabkan oleh pertumbuhan mikroorganisme, yaitu penurunan pH melalui glikolisis oleh bakteri asam laktat dan produksi nitrit oksida oleh bakteri pereduksi nitrat dan nitrit seperti bakteri koki koagulasi negatif antara lain *Staphylococcus* dan/atau *Micrococcus* (Fontana *et al.* 2012). Pada hari pertama fermentasi terjadi pemecahan protein sarkoplasma dan miofibril oleh proteinase jaringan otot daging. Enzim intraseluler *Lactobacillus* berperan dalam menghasilkan peptida kecil dan asam amino yang berkontribusi terhadap pembentukan *flavor* selama

proses pematangan/pemeraman sosis kering fermentasi (Fadda *et al.* 2010). Aktivitas proteolitik selama fermentasi sosis berasal dari enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme dan protease endogenus yang diaktivasi oleh pH rendah akibat produksi asam oleh BAL. Dengan demikian terjadi aksi sinergis antara BAL dan enzim protease endogenus (Fadda *et al.* 2020) .

5.4.5 Manfaat Kesehatan

Pada kondisi asam dan pH rendah akibat produksi asam organik oleh BAL, protein dan lemak pada daging mengalami perubahan sifat fisik, kimia dan biologis sehingga meningkatkan asam amino bebas dan asam lemak serta memperbaiki daya cerna protein (Cui dan Fan 2019). Penggunaan kultur *starter* tertentu pada fermentasi sosis dapat diarahkan untuk berkontribusi terhadap pembentukan senyawa aroma, molekul-molekul yang bermanfaat bagi kesehatan, produksi bakteriosin dan senyawa antimikroba lainnya, pembentukan warna, bersifat probiotik dan tidak memiliki efek negatif seperti pembentukan amin biogenik dan senyawa toksin (Leroy *et al.* 2006).

Daftar Pustaka

- Ali AA. 2010. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: a review. *Res J Microbiol.* 5:1213-1221.
- Altay F, Karbancioglu-Guler F, Daskaya-Dikmen C, Heperkan D. 2013. A review on traditional Turkish fermented nonalcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Int J Food Microbiol.* 167:44–56.
- Amiza MA, Zakiah J, Ng LK. 2004. Effect of salt on tempoyak fermentation and sensory evaluation. *J Biol Sci.* 4:650–653.
- Antara NS, Sujaya IN, Yokota A, Asano K, Aryanta WR, Tomita F. 2002. Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of ‘urutan’, a Balinese indigenous fermented sausage. *World J Microbiol Biotech.* 18: 255–262.
- Arihantana NMIH, Partiw DPK. 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat indigenous dari sawi asin. *Media Ilmiah Teknologi Pangan.* 2(1):41-50.

- Beganović J, Pavunc AL, Gjuračić K, Špoljarec M, Šušković J, and Kos B. 2011. Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *J Food Sci.* 76(2): M124–M129.
- Bintsis T. 2018. Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J Bacteriol Mycol.* 6(2):89–94.
- Briggiler-Marco M, Capra ML, Quiberoni A, Vinderola G, Reinheimer JA, Hynes E. 2007. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: *in vitro* characterization and performance in two model cheeses. *J Dairy Sci.* 90(10):4532–4542.
- Caplice E, Fitzgerald GF. 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 50(1-2):131–149.
- Chang JH, Shim YY, Cha SK, Chee KM. 2010. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J Appl Microbiol.* 109:220–230.
- Chang CK, Wang SC, Chiu CK, Chen SY, Chen ZT, Duh PD. 2015. Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5(4):281–286.
- Chao S, Wu R, Watanabe K, Tsai Y. 2009. Diversity of lactic acid bacteria in *suan-tsai* and *fu-tsai*, traditional fermented mustard products of Taiwan. *Int J Food Microbiol.* 135:203–210.
- Chaves ACS, Fernandez M, Lerayer ALS, Mierau I, Kleerebezem M, Hugenholtz J. 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 68(11):5656–5662.
- Chen KH, McFeeters RF, Fleming HP. 1983. Fermentation characteristics of heterolactic acid bacteria in green bean juice. *J Food Sci.* 48:962-966.
- Chen YS, Yanagida F, Hsu JS. 2006. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *suan-tsai* (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan. *J Appl Microbiol.* 101:125–130.
- Corrieu G, Beal C. 2016. Yogurt: The Product and its Manufacture. Di dalam: Caballero B, Finglas P, Toldrá F (Ed.). *Encyclopedia of Food and Health.* Oxford (UK): Academic Press. hlm 501–508.

- Cui M, Kim HY, Lee KH, Jeong JK, Hwang JH, Yeo KY, Ryu BH, Choi JH, Park KY. 2015. Antiobesity effects of kimchi in diet-induced obese mice. *J Ethn Foods*. 2:137–144.
- Cui S, Fan Z. 2019. Lactic acid bacteria and fermented meat products. Di dalam: Chen W. Editor. *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Singapore.
- Emmawati A. 2014. Study of antiinfection properties of lactic acid bacteria isolated from mandai [disertasi]. Bogor (ID): Bogor Agricultural University.
- Emmawati A, Jenie BSL, Nuraida L, Syah D. 2015. Karakterisasi isolat bakteri asam laktat dari mandai yang berpotensi sebagai probiotik. *Agritech*. 35(2):146–155.
- Endo A, Okada S. 2008. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:2195–2205.
- Erten H. 2000. Fermentation of glucose and fructose by *Leuconostoc mesenteroides*. *Turk J Agric For*. 24(2000):527–532.
- Fadda S, López C, Vignolo G. 2010. Review: Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Sci*. 86:66–79.
- Fang Z, Hu Y, Li D, Chen J, Ye X. 2008. Changes of phenolic acids and antioxidant activities during potherb mustard (*Brassica juncea* Coss.) pickling. *Food Chem*. 108:811–817.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization [online]. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2011. Codex Alimentarius: Milk and Milk Products, Second Edition. Rome (IT): Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.

- Fontana CA, Fadda S, Cocconcelli PS, Vignolo G. 2012. Lactic acid bacteria in meat fermentations. Di dalam Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A. Editors. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. Fourth Edition. CRC Press, Boca Raton. hal. 247-263.
- Gezginc Y, Akbay C. 2015. An analysis of household's yogurt consumption in Turkey. *J Food Nutr Res*. 3(4):285-289.
- Gøtterup J, Olsen K, Knöchel S, Tjener K, Stahnke LH, Møller JKS. 2007. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated *Staphylococci* and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *Int J Food Microbiol*. 120:303–310.
- Halász A. 2009. Lactic acid bacteria. Di dalam: Lasztity R (ed.). *Food Quality and Standards - Volume III*. Oxford (UK): Eolss Publishers/UNESCO. hlm 70–82.
- Hill D, Ross RP, Arendt E, Stanto C. 2017. Microbiology of yogurt and bio-yogurts containing probiotics and prebiotics. Di dalam: Shah NP (ed.). *Yogurt in Health and Disease Prevention*. Oxford (UK): Academic Press. hlm 69-85.
- Hord NG, Tang Y, Bryan NS. 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*. 90(1):1–10.
- Hou J, Liu F, Ren D, Han W, Du Y. 2015. Effect of culturing conditions on the expression of key enzymes in the proteolytic system of *Lactobacillus bulgaricus*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 16(4):317-326.
- Jeun J, Kim S, Cho SY, Jun HJ, Park HJ, Seo JG, Chung MJ, Lee SJ. 2010. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition*. 26:321–330.
- Johanningsmeier SD, Fleming HP, Thompson RL, Mcfeeters RF. 2005. Chemical and sensory properties of sauerkraut produced with *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures of differing malolactic phenotypes. *J Food Sci*. 70(5): S343-S349.
- Jung JY, Lee SH, Jeon CO. 2014. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98:2385–2393.

- Juwana A, Seno BA, Lindayani, Hartayanie L. 2020. Identification of probiotic potential *Lactobacillus* from mandai using molecular technique. Di dalam: Sujaya IN, Rahayu ES, Utami T (ed.). *10th Asian Conference of Lactic Acid Bacteria*. hlm 1–12.
- Kamdee S, Plengvidhya V, Chokesajjawatee N. 2014. Changes in lactic acid bacteria diversity during fermentation of sour pickled mustard green. *KKU Res J*. 19(Supplement Issue):26-33.
- Kongo, JM. 2013. Lactic acid bacteria as *starter*-cultures for cheese processing: past, present and future developments. Di dalam: Kongo JM (ed.). *Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. London (UK): Intertechopen.
- Kristal AR, Lampe JW. 2002. *Brassica* vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*. 42:1–9.
- Krockel L. 2013. The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products. Di dalam Kongo M. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. London: IntechOpen; hal 129-152.
- Kurnia H. 2018. Manfaat bakteri asam laktat asal sawi (*Brassica juncea* L.) asin dalam menurunkan kolesterol secara *in vitro* [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Kwak H, Ganesan P, Hong Y. 2011. Nutritional benefit in cheese. Di dalam: Foster RD (ed.). *Cheese: Types, Nutrition and Consumption*. Hauppauge, New York (US): Nova Science Publishers, Inc. hlm. 269-289.
- Laranjo M, Potes ME, Elias M. 2019. Role of *starter* cultures on the safety of fermented meat products. *Front Microbiol*. 10:853.
- Lee J, Hwang KT, Heo MS, Lee JH, Park KY. 2005. Resistance of *Lactobacillus plantarum* KCTC 3099 from kimchi to oxidative stress. *J Med Food*. 8:299–304.
- Leisner JJ, Vancanneyt M, Lefebvre K, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Vilalta NE, Rusul G, Swings J. 2002. *Lactobacillus durianis* sp. nov., isolated from an acid-fermented condiment (tempoyak) in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52:927–931.

- Leisner JJ, Vancanneyt M, Rusul, Pot GB, Lefebvre K, Fresi A, Tee LK. 2001. Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63: 149–157.
- Leisner JJ, Vancanneyt M, Van der Meulen R, Lefebvre K, Engelbeen K, Hoste B, Laursen BG, Bay L, Rusul G, De Vuyst L, Swings J. 2005. *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:1267–1270.
- Leite AMO, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VMS. 2013. Microbiological, technological, and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol.* 44(2):341-349.
- Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. 2016. Functional meat *starter* cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol.* 106:270 – 285.
- Li KY. 2004. Fermentation: Principles and microorganisms. Di dalam: *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. New York (US): Marcel Dekker. hlm 595–609.
- Licznarska BE, Szafer H, Murias M, Bartoszek A, Baer-Dubowska W. 2013. Modulation of CYP19 expression by cabbage juices and their active components: indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethene in human breast epithelial cell lines. *Eur J Nutr.* 52:1483–1492.
- Liutkevičius A, Šarkinas A. 2004. Studies on the growth conditions and composition of kefir grain – as a food and forage biomass. *Vet Ir Zootech.* 25(47).
- Mann B, Athira S, Sharma R, Bajaj R. 2017. Bioactive peptides in yogurt. Di dalam: Shah NP (ed.). *Yogurt in Health and Disease Prevention*. Oxford (UK): Academic Press. hlm 69-85.
- Mariana, Rahmadi A, Syahrumsyah H. 2020. Pengaruh pemberian cuka mandai terhadap kadar kolesterol total, lipoprotein dan trigliserida pada mencit (*Mus musculus*) dengan induksi kuning telur. *Journal of Tropical AgriFood.* 2(1):45–52.
- Moon YJ, Soh JR, Yu JJ, Sohn HS, Cha YS, Oh SH. 2012. Intracellular lipid accumulation inhibitory effect of *Weissella korensis* OK1-6 isolated from kimchi on differentiating adipocyte. *J Appl Microbiol.* 113:652–658.

- Moradi Z, Kalanpour N. 2019. Kefiran, a branched polysaccharide: preparation, properties and applications: a review. *Carbohydr Polym.* 223:115100.
- Mozzi F. 2016. Lactic acid bacteria. Di dalam: Caballero B, Finglas P, Toldrá F (ed.). *Encyclopedia of Food and Health*. Oxford (UK): Academic Press. hlm 501–508.
- Nguyen DTL, Van HK, Cnockaert M, Brandt ED, Aerts M, Vandamme P. 2013. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *Int J Food Microbiol.* 163(1):19–27.
- Nur HS. 2009. Suksesi mikroba dan aspek biokimiawi fermentasi mandai dengan kadar garam rendah. *Makara Sains.* 13(1):13-16.
- Nuraida L. 2016. Probiotik lokal dan pangan fermentasi tradisional untuk meningkatkan kesehatan masyarakat di Indonesia: Peluang dan tantangan pengembangannya. Di dalam: Wijaya CH, Khomsan A (ed.). *Pangan Bermartabat bagi Kedaulatan Bangsa*. Bogor (ID): IPB Press. hlm 87-130.
- Nuraida L, Owens JD, Bakar JA, Kuswanto KR. 2014. Lactic vegetable and fruit fermentations. Di dalam: Owens JD (ed.). *Indigenous Fermented Foods of Southeast Asia*. Boca Raton (US): CRC Press. hlm 188–211.
- Oh SK, Tsukamoto C, Kim KW, Choi MR. 2016. Investigation of glucosinolates, and the antioxidant activity of Dolsan leaf mustard kimchi extract using HPLC and LC-PDA-MS/MS. *J Food Biochem.* e12366:1–10.
- Panesar PS. 2011. Fermented dairy products: *starter* cultures and potential nutritional benefits. *Food Nutr Sci.* 2:47–51.
- Park KY, Cheigh HS. 2004. Kimchi. Di dalam: Hui YH, Meunier- Goddik L, Hansen AS, Josephsen J, Nip WK, Stanfield PS, Toldra F (ed.). *Handbook of Food Science and Beverage Fermentation Technology*. New York (US): Marcel Dekker. hlm 621–655.
- Park KY, Jeong J, Lee Y, Daily JW. 2014. Health benefits of kimchi (korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food.* 17(1):6–20.
- Park KY, Kim HY, Jeong JK. 2017. Kimchi and its health benefits. Di dalam: Frias J, Martinez-Villaluenga C, Peñas E (ed.). *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Cambridge (US): Academic Press, hlm 477–502.

- Peñas E, Martínez-Villaluenga C, Frias CJ. 2017. Sauerkraut: Production, composition, and health benefits fermented foods in health and disease prevention. Di dalam: Frias J, Martínez-Villaluenga C, Peñas E (Eds). *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Cambridge (US): Academic Press. hlm 557–576.
- Plumed-Ferrer C, Koistinen KM, Tolonen TL, Lehesranta SJ, Kaˆrenlampi SO, Maˆkimattila E, Joutsjoki V, Virtanen V, Wright A. 2008. Comparative study of sugar fermentation and protein expression patterns of two *Lactobacillus plantarum* strains grown in three different media. *Appl Environ Microbiol*. 74(17):5349–5358.
- Podsedek A, 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: a review. *LWT - Food Sci Technol*. 40:1–11.
- Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. 2015. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol*. 6:1177.
- Pui LP, Karim R, Yusof YA, Wong CW, Ghazali HM. 2018. Physicochemical and sensory properties of selected ‘cempedak’ (*Artocarpus integer* L.) fruit varieties. *Int Food Res J*. 25(2):861–869.
- Rakhmanova A, Khan ZA, Shah K. 2018. A mini review fermentation and preservation: role of lactic acid bacteria. *MOJ Food Process Technol*. 6(5):414–416.
- Rahayu ES. 2003. Lactic acid bacteria in fermented foods of Indonesian origins. *Agritech*. 23:75-84.
- Rahmadi A, Sabarina Y, Agustin S. 2018. Different drying temperatures modulate chemical and antioxidant properties of mandai cempedak (*Artocarpus integer*). *F1000Res*. 7:1706.
- Rahmadi A, Sari K, Handayani F, Yuliani, Prabowo S. 2019. Modulation of phenolics substances and antioxiidaant activity in *mandai cempedak* by unsalted spontaneous and *Lactobacillus casei* induced fermentation. *J Teknol dan Industri Pangan*. 30(1):75–82.

- Rahmadi A, Sari K, Sitohang S, Khoiriyah N, Handayani F, Emmawati A, Yuliani. 2017. Profil perubahan populasi BAL, pH, kadar flavonoid, dan potensi aktivitas antioksidan dari fermentasi mandai cempedak higienis tanpa garam. Prosiding Seminar Nasional PATPI 10–12 Oktober 2017, Bandar Lampung, Lampung.
- Ray RC, Joshi VK. 2014. Fermented foods: past, present, and future. Di dalam: Ray RC, Didier M (ed.). *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. Boca Raton (US): CRC Press. hlm 1–36.
- Rosa DD, Dias MMS, Grzes'kowiak LM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MCG. 2017. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev*. 30: 82–96.
- Saranraj P, Naidu, MA, Sivasakthivela P. 2013. Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: a review. *Int J Pharm Biol Arch*. 4(6):1124–1133.
- Settachaimongkon S. 2014. Simultaneous growth and metabolite production by yoghurt *starters* and probiotics: a metabolomics approach [tesis]. Wageningen (NL): Wageningen University.
- Swain MR, Anandharaj M, Ray RC, Rani RP. 2014. Fermented fruits and vegetables of asia: a potential source of probiotics. *Biotechnol Res Int*. 1–19.
- Vardjan T, Lorbeg PM, Rogelj I, Majhenič AČ. 2013. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *J Dairy Sci*. 96:2729–2736.
- Vieira CP, Rosario AILS, Lelis CA, Rekowsky BSS, Carvalho APA, Rosário DKA, Elias TA, Costa MP, Foguel D, Conte-Junior CA. 2021. Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: A systematic review and meta-analysis. *Oxid Med Cell Longev*. 9081738.
- Weerathilake WADV, Rasika DMD, Ruwanmali JKU, Munasinghe MADD. 2014. The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *Int J Sci Res Publ*. 4(4):1–10.
- Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology 7th ed*. New York (US): McGraw-Hill.
- Wirawati CU. 2002. Potency of lactic acid bacteria isolated from tempoyak as probiotic [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

- Wu R, Yu M, Liu X, Meng L, Wang Q, Xue Y, Wu J, Yue X. 2015. Changes in flavour and microbial diversity during natural fermentation of *suan-cai*, a traditional food made in Northeast China. *Int J Food Microbiol.* 211:23–31.
- Yang H, Zou H, Qu C, Zhang L, Liu T, Wu H, Li Y. 2014. Dominant microorganisms during the spontaneous fermentation of *suan cai*, a chinese fermented vegetable. *Food Sci Technol Res.* 20(5):915–926.
- Yu Z, Zhang X, Li S, Li C, Li D, Yang Z. 2013. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World J Microbiol Biotechnol.* 29:489–498.
- Yuliana N. 2007. Pengolahan durian (*Durio zibethinus*) fermentasi (tempoyak). *Jurnal Teknologi dan Industri Hasil Pertanian.* 12(2):74–80.
- Yuliana N. 2005. Identification of non-lactic acid bacteria associated with *tempoyak* (fermented Durian). *Microbiol Indones.* 10:25–28.
- Yuliana N, Dizon EI. 2011. Phenotypic identification of lactic acid bacteria isolated from tempoyak (fermented durian) made in the Philippines. *Int J Biol.* 3:145–152.
- Yuliana N, Garcia VV. 2009. Influence of *Pediococcus acidilactici* as a starter on the flavour of *tempoyak* (fermented durian). *Indian J Biotechnol.* 8:304–310.
- Yusuf D. 2020. Kajian in vitro bakteri asam laktat asal granula kefir Indonesia sebagai probiotik penurun kolesterol, penghasil inhibitor α -glukosidase dan antioksidan [disertasi]. Bogor (ID): IPB University.
- Yusuf D, Nuraida L, Dewanti-Hariyadi R, Hunaefi D. 2020. *In vitro* characterization of lactic acid bacteria from Indonesian kefir grains as probiotics with cholesterol-lowering effect. *J Microbiol Biotechnol.* 30(5):726-732.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Haris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Wakter J, Watanabe K, Wuys S, Felis GE, Ganzle MG, Lebeer S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70:2782–285

6. FERMENTASI KAPANG

6.1 Kapang pada Fermentasi Pangan

Fermentasi merupakan salah satu cara untuk memproduksi berbagai produk yang melibatkan biakan mikroba melalui aktivitas metabolisme baik secara aerob maupun anaerob. Salah satu mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi pangan adalah kapang yang merupakan mikroorganisme aerobik. Berbagai jenis pangan fermentasi diproduksi dengan melibatkan berbagai jenis kapang, baik pangan asal hewani maupun pangan asal nabati. Produk fermentasi susu seperti keju melibatkan kapang dalam proses fermentasinya, terutama saat pemeraman keju peram, misalnya keju biru, keju brie, dan camembert. Kapang mendominasi sebagai kultur *starter* pada produk sereal, seperti pada fermentasi tempe, oncom, tauco, dan produk serupa serta kecap.

Selama proses fermentasi kapang berlangsung, akan terjadi perubahan-perubahan kimia, mikrobiologi, dan enzimatis pada komponen bahan baku yang digunakan. Perubahan ini disebabkan oleh adanya aktivitas berbagai enzim yang dihasilkan oleh mikroba yang berperan aktif selama proses fermentasi tersebut. Perubahan yang terjadi antara lain berupa pemecahan komponen-komponen kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana, pembentukan komponen baru, serta perubahan sifat fisik dan sifat kimia substrat. Proses fermentasi dapat



menyebabkan perubahan sifat bahan pangan akibat pemecahan kandungan bahan pangan tersebut sehingga memungkinkan makanan lebih bergizi, lebih mudah dicerna, lebih aman, dapat memberikan rasa yang lebih baik, dan memberikan tekstur tertentu pada produk pangan (Djayasupena *et al.* 2014).

Kapang dapat menghasilkan enzim yang memiliki banyak fungsi dan keuntungan dalam pembuatan produk pangan. Enzim ekstraseluler diekskresikan oleh kapang ke lingkungan sehingga senyawa pada substrat (bahan baku produk pangan) dapat terurai menjadi senyawa sederhana. Enzim-enzim seperti protease, amilase, dan lipase akan memecah senyawa kompleks protein, pati, dan lemak, sehingga kapang mampu tumbuh pada bahan-bahan dengan kandungan senyawa kompleks tersebut. Contoh produk pangan yang dihasilkan dengan melibatkan aktivitas kapang melalui proses fermentasi diantaranya tempe, oncom, tauco, dan kecap. Selain untuk produksi pangan fermentasi, kapang juga digunakan untuk memproduksi ingredien pangan seperti asam sitrat, pigmen atau pewarna makanan, serta berbagai enzim dan biomassa kapang seperti *Fusarium venenatum* yang dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan daging sintesis.

6.1.1 Karakteristik Kapang

Kapang adalah fungi multiseluler yang membentuk filamen dan pertumbuhannya pada makanan tampak seperti kapas. Kapang merupakan anggota dari kingdom fungi yang memiliki ciri-ciri berukuran mikroskopik, multiseluler, membentuk filamen, dinding selnya tersusun dari kitin, menghasilkan enzim ekstraseluler, menghasilkan spora atau konidia, serta bereproduksi secara seksual atau aseksual. Berbeda dengan khamir dan bakteri, kapang adalah organisme multiseluler, oleh karena itu bentuk makroskopisnya dapat dilihat dengan mata telanjang tanpa bantuan alat seperti mikroskop.

Kapang dibedakan dari khamir karena kapang membentuk jalinan filamen yang disebut hifa. Hifa kemudian berkembang membentuk filamen, kemudian filamen-filamen tersebut membentuk satu kesatuan yang disebut miselium. Kapang tumbuh dengan cara memperpanjang hifa dan menembus substrat. Selain miselium, tubuh/badan vegetatif kapang atau disebut dengan *thallus* juga terdiri dari bagian yang disebut spora. Pembentukan spora, baik secara seksual

ataupun aseksual, dapat diamati pada beberapa bagian hifa. Ribuan spora aseksual dapat dihasilkan dari satu hifa. Spora kapang memiliki sifat yang tahan terhadap perubahan lingkungan.

Berdasarkan struktur hifa, kapang dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu hifa bersekat (septat) dengan dinding silang yang membagi hifa menjadi sel (misalnya *Penicillium glaukoma*), dan hifa aseptat (senositik) dengan hifa tampak seperti silinder tanpa sekat (misalnya *Mucor muceda*). Kapang tidak mengandung klorofil seperti pada tumbuhan tingkat tinggi, sehingga kapang tidak dapat mensintesis senyawa organik esensial untuk pertumbuhannya. Sebaliknya, mereka menggunakan senyawa organik yang ada di alam. Oleh karena itu, mereka menunjukkan karakter saprofit dan parasit. Kapang memiliki dinding sel yang tipis, fleksibel, dan tidak berwarna. Berbagai komponen yang termasuk ke dalam sitoplasma di antaranya yaitu vakuola, inti sel, dan beberapa nutrisi, termasuk glikogen dan lemak. Pada umumnya kapang bereproduksi secara aseksual. Namun, beberapa kapang juga dapat membentuk spora seksual. Kapang diklasifikasikan sebagai *Oomycetes* atau *Zygomycetes* jika tidak bersepta, dan *Ascomycetes* atau *Basidiomycetes* jika bersepta (Uraz dan Özer 2014).

Seperti halnya mikroorganisme lainnya, kapang memerlukan air, mineral, sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhannya. Dibandingkan dengan bakteri, kapang lebih tahan terhadap garam dan gula. Secara umum kapang membutuhkan lebih sedikit air bebas (A_w lebih rendah) untuk pertumbuhannya dibandingkan dengan khamir atau bakteri. Kebanyakan khamir dan bakteri tidak dapat tumbuh pada A_w di bawah 0,95 (Uraz dan Özer 2014). Masing-masing kapang memiliki kebutuhan terhadap air yang berbeda, misalnya kapang serofilik sedang tumbuh memiliki kebutuhan minimum A_w 0,75–0,79 sedangkan kapang hidrofilik membutuhkan A_w minimum 0,9 (Kuka *et al.* 2022). *Ascomycetes* dan *Deuteromycetes* dapat tetap aktif ketika A_w serendah 0,65 (Uraz dan Özer 2014). Beberapa jenis kapang dapat memproduksi senyawa penghambat organisme lain, seperti penisilin dari *P. chrysogenum* dan clavacin dari *Aspergillus clavatus*. Senyawa kimia tertentu yang dihasilkan oleh kapang juga diketahui bersifat mikostatik (menghambat pertumbuhan jamur) seperti asam sorbat, propionat, dan asetat (Uraz dan Özer 2014).

Suhu pertumbuhan kapang sekitar 25°C dengan kisaran 20–30°C (Uraz dan Özer 2014, Kuka *et al.* 2022). Kapang merupakan mikroorganisme aerobik dan dapat tumbuh pada kisaran pH yang lebar (pH 3-9) walaupun kebanyakan menyukai pH asam yaitu pH 5-6 (Uraz dan Özer 2014). Babu *et al.* (2009) menyatakan kecepatan pertumbuhan kapang cenderung stabil selama pH lingkungan ada di nilai 3,5 atau di atas 3,5. Namun, pengaturan pH perlu disesuaikan sesuai dengan pH optimum pertumbuhan kapang yang digunakan serta disesuaikan dengan kondisi pertumbuhan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan kapang (Nout dan Kiers 2005). Kapang tahan terhadap berbagai variasi kondisi lingkungan, seperti kandungan garam dan gula yang tinggi, karena dinding selnya tersusun atas kitin dan selulosa. Sebagai contoh, kapang dapat tumbuh dalam larutan gula 50%, sedangkan bakteri akan mengalami lisis karena tekanan osmotik yang tinggi. Kapang dapat memanfaatkan berbagai jenis substrat, mulai dari yang sederhana hingga kompleks. Pertumbuhan kapang tergantung pada konsentrasi dan jenis garam nitrogen, unsur hara makro, dan unsur hara mikro seperti P, K, Mg, Fe, Cu, dan Mn. Berbeda dengan mikroorganisme lain, pertumbuhan kapang dirangsang oleh natrium klorida pada konsentrasi sedang (Uraz dan Özer 2014).

Kapang telah dikenal sebagai mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi pembuatan berbagai produk pangan, diantaranya adalah tempe, angkak (pewarna makanan), tauco, oncom, serta kecap. Kapang yang digunakan dalam proses pembuatan angkak yaitu kapang *Monascus purpureus* yang terdapat pada beras angkak (Rismayanti *et al.* 2017). Kapang yang berperan dalam pembuatan produk kecap adalah *Aspergillus sojae* (Meutia 2015), sedangkan kapang yang berperan aktif selama proses fermentasi tauco yaitu *Rhizopus oligosporus*, *R. oryzae*, dan *Aspergillus oryzae* (Nuraida 2019). Kapang *Rhizopus* juga berperan dalam pembuatan produk oncom dan tempe. Kapang tempe yang utama adalah *Rhizopus oligosporus*. Perbedaan antara oncom merah dan hitam terletak pada jenis kapang yang digunakan untuk fermentasi. Oncom hitam dibuat dengan menggunakan laru tempe yang berisi kapang *Rhizopus oligosporus*, dengan bahan baku bungkil kacang tanah, sedangkan oncom merah menggunakan kapang *Neurospora*, terutama *N. crasa*, *N. intermedia*, dan *N. sitophila*, dengan menggunakan bahan baku ampas tahu atau bungkil kacang tanah. Warna hitam pada oncom berasal dari warna bungkil dan warna spora *Rhizopus*, sedangkan warna merah/oranye berasal dari warna pigmen yang dihasilkan *Neurospora*.

Kapang dapat dimanfaatkan untuk memproduksi berbagai jenis senyawa seperti asam laktat, sitrat, asetat, glukonat, malat, fumarat, dan asam tartarat. Kapang juga digunakan dalam produksi antibiotik, vitamin, etil alkohol, asam amino, dan hormon, serta untuk persiapan protein sel tunggal dan untuk sintesis lemak. Selain digunakan dalam produksi bahan tambahan makanan tertentu, kapang mensintesis beberapa enzim yang banyak digunakan dalam pembuatan makanan dan diaplikasikan di industri pangan. Sebagai contoh, lipase dan protease yang disintesis oleh *A. niger* dan *A. oryzae* sering digunakan untuk mempersingkat masa pematangan keju dan untuk mengontrol perkembangan aroma/rasa. Protease yang diproduksi oleh *A. niger* telah digunakan dalam pembuatan keju sebagai alternatif dari enzim rennin dalam membantu pembekuan susu tradisional. Enzim yang dihasilkan oleh *A. niger* dan *A. flavus* seperti α -amilase, β -galaktosidase, β -glukonase, glukoamilase, glukosidase, katalase, pektinase, dan selulase digunakan dalam pembuatan berbagai jenis makanan. Sebagai contoh, amilase banyak digunakan dalam pembuatan roti dan pembuatan bir, sedangkan pektinase dan selulase digunakan dalam persiapan makanan yang mudah dicerna (Uraz dan Özer 2014).

6.2 Tempe

6.2.1 Deskripsi

Tempe kedelai merupakan salah satu komoditas pangan terfermentasi sumber protein nabati dan umum dikonsumsi masyarakat di Indonesia, Jepang, dan Eropa. Indonesia merupakan negara produsen tempe terbesar di dunia dan menjadi pasar kedelai terbesar di Asia. Gibbs *et al.* (2004) menyatakan bahwa tempe dikenal sebagai salah satu pangan fungsional karena sifat-sifat yang dimilikinya, yaitu sebagai antioksidan, antimikroba, antikanker, antihipertensi, antitrombotik, dan hipokolesterolemik. Tempe (Gambar 6.1) banyak diminati oleh masyarakat Indonesia karena rasa yang nikmat dan harga yang terjangkau. Selain itu, kandungan gizi pada tempe juga sangat beragam dan daya cerna tempe cukup tinggi dikarenakan pada proses fermentasi tempe terjadi pemecahan ikatan-ikatan protein pada kedelai oleh kapang atau laru tempe. Menurut data BSN

tahun 2012, terdapat 81 ribu unit usaha pembuatan tempe yang memproduksi 2,4 juta ton tempe per tahun di Indonesia. Rata-rata orang Indonesia mengonsumsi sebanyak 0,146 kg tempe setiap minggunya (BPS 2018).



Gambar 6.1 Tempe kedelai

Definisi tempe berdasarkan SNI (BSN 2009) yaitu produk fermentasi yang terbuat dari kedelai dengan melibatkan kapang *Rhizopus oligosporus*, memiliki bentuk kompak, berwarna putih keabu-abuan, dan memiliki aroma seperti tempe. Secara tradisional, tempe kebanyakan diolah sebagai masakan yang digoreng, ditumis, ataupun dimasak dengan santan dan disajikan bersama nasi. Namun saat ini produk olahan tempe semakin beragam, seperti keripik tempe, burger tempe, nugget tempe, dan kue tempe. Codex Alimentarius Commission (CAC 2013) telah menetapkan standar tempe yaitu tempe merupakan produk berbentuk kompak, berwarna putih, membentuk cake, dan diproduksi dengan memfermentasikan kedelai yang telah dikupas kulit arinya dengan *Rhizopus* spp. melalui fermentasi substrat padat (SSF). Standar mutu organoleptik tempe yang telah ditetapkan oleh Codex Alimentarius antara lain: 1) memiliki tekstur yang kompak dan tidak mudah hancur ketika dipotong dengan pisau, 2) memiliki warna putih dari pertumbuhan *Rhizopus* spp., 3) memiliki *flavor* tempe yaitu *nutty* (kacang), *meaty* (menyerupai daging), dan seperti jamur, serta 4) memiliki aroma dari tempe segar tanpa bau amonia. Karakteristik tempe yang baik juga disampaikan oleh Barus *et al.* (2019), yaitu warna tempe yang paling baik adalah tempe yang berwarna putih bersih dan merata pada seluruh permukaan. Karakter tempe yang unggul ini juga menjadikan tempe sebagai pangan fermentasi yang disukai oleh banyak kalangan, terutama oleh *vegetarian*.

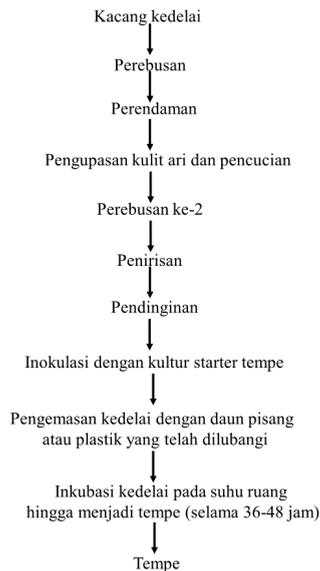
6.2.2 Fermentasi

Fermentasi merupakan tahap terpenting dalam proses pembuatan tempe. Tahapan fermentasi pada tempe berfungsi untuk memecah ikatan-ikatan yang ada pada kedelai oleh kapang dengan cara menghidrolisis senyawa-senyawa kompleks pada kedelai menjadi senyawa yang lebih sederhana. Selain itu, mudah dicerna oleh tubuh manusia sehingga nilai gizi dan daya cerna meningkat (Nout dan Kiers 2015). Proses fermentasi juga menurunkan beberapa senyawa antinutrisi yang terdapat pada kedelai (Nuraida 2019). Kapang yang tumbuh akan membentuk hifa, yaitu benang putih yang menyelimuti permukaan biji kedelai dan membentuk jalinan miselium yang mengikat biji kedelai satu sama lain, membentuk struktur yang kompak dan tekstur yang padat.

Metode fermentasi berbeda antara pengrajin tempe yang satu dengan yang lainnya. Nuraida (2019) menyatakan bahwa perbedaan kebanyakan terjadi pada proses persiapan. Pada dasarnya proses pembuatan tempe dimulai dengan perendaman, perebusan, dan inokulasi kedelai rebus dengan laru tempe. Pada beberapa pengrajin, kacang kedelai direbus sebelum direndam lalu diikuti dengan perebusan kedua, tetapi beberapa pengrajin melakukan perendaman tanpa perebusan terlebih dahulu. Pada beberapa pengrajin lainnya tidak dilakukan perebusan kedua. Pengrajin juga ada yang mengganti perebusan kedua dengan penyiraman dengan air panas. Perbedaan proses persiapan akan memengaruhi populasi mikroba selama fermentasi dan memengaruhi kualitas tempe seperti tekstur, rasa, dan aroma serta kandungan vitamin B12. Tempe juga dapat dibuat dari kedelai kupas kulit sehingga dapat mengurangi tahapan pengupasan setelah perendaman. Contoh proses pembuatan tempe dengan dua kali perebusan disajikan pada Gambar 6.2.

Setiap tahapan pada proses pembuatan tempe berkontribusi terhadap keberhasilan proses fermentasi (Nuraida 2019). Perebusan pertama akan mengurangi jumlah kontaminan dan melunakkan kedelai sebelum perendaman. Proses perendaman penting untuk menurunkan pH sampai di bawah 5. Terdapat dua kali fermentasi pada pembuatan tempe, yaitu fermentasi laktat pada tahap perendaman dan fermentasi kapang yang menjalin biji-biji kedelai menjadi tempe. Pada saat proses perendaman, mikroorganisme dari lingkungan akan tumbuh dan mengasamkan kedelai. Selain bakteri asam laktat, bakteri lain seperti *Bacillus* dan *Acetobacter* juga

ditemukan dalam proses pengasaman selama perendaman (Barus *et al.* 2008). Perebusan dan perendaman menghidrasi biji kedelai sehingga dapat mendukung pertumbuhan kapang tempe. Pengupasan kulit ari akan melepaskan kulit ari kedelai yang keras sehingga keping kedelai lebih mudah ditembus miselium kapang. Proses pencucian dapat membuang kulit ari yang tertinggal dan mengurangi kelebihan asam dan lendir yang terbentuk selama proses perendaman (Nuraida 2019). Proses penirisan penting untuk mengurangi air yang tidak terserap biji kedelai. Air yang berlebihan akan mendukung pertumbuhan bakteri seperti *Bacillus* yang tidak mati pada saat perendaman, dan pertumbuhannya akan membusukkan kedelai. Penirisan diikuti dengan tahap inokulasi. Inokulasi harus memberikan jumlah spora yang cukup untuk memulai proses fermentasi. Jumlah spora kapang pada awal fermentasi di pengrajin tempe sekitar 10^4 cfu/g kedelai rebus (Nurdini *et al.* 2015). Setelah inokulasi dengan laru tempe, *Rhizopus* sp. akan berperan sebagai mikroorganisme utama yang memfermentasi tempe. Selama fermentasi, miselium akan tumbuh dan menjalin ikatan pada keping-keping kedelai (Nout dan Kiers 2005). Fermentasi pada suhu 25–37°C dapat berlangsung 36 hingga 48 jam. Pada suhu 35–58°C dengan RH 75–78% fermentasi dapat berlangsung selama 18 jam (Nout dan Rombout 1990).



Gambar 6.2 Proses pembuatan tempe dengan dua kali perebusan

Kondisi optimum untuk germinasi spora *R. oligosporus* adalah 42°C dan pH 4,0 (Nout dan Rombout 1990). *R. oligosporus* dapat tumbuh dengan baik pada kisaran pH 4,3–4,5. Nilai pH yang lebih rendah atau lebih tinggi dari kisaran tersebut akan menghambat pertumbuhan *Rhizopus* sp. sehingga tidak akan tumbuh baik (Kusharyanto dan Agus 1995). Keberadaan sumber karbon dan nitrogen terutama asam amino diperlukan untuk pertumbuhan hifa. *Rhizopus* dengan cepat tumbuh dan menghabiskan sumber karbon yang dapat difermentasi sehingga dapat menghambat pertumbuhan kapang kompetitor jika ada. Kapang tempe bersifat aerobik, apabila proses fermentasi kekurangan oksigen maka pertumbuhan *Rhizopus* sp. akan terhambat dan menstimulasi pertumbuhan bakteri pembusuk (Nout dan Rombout 1990). Oksigen yang terlalu banyak juga tidak diharapkan karena menyebabkan metabolisme terlalu cepat sehingga suhu naik dan pertumbuhan *Rhizopus* sp. terhambat (Kusharyanto dan Agus 1995). Oksigen yang terlalu banyak juga menyebabkan sporulasi (Nout dan Rombout 1990). Pengaturan oksigen dilakukan dengan menggunakan plastik berlubang kecil.

Pengemas yang digunakan untuk fermentasi tempe harus dapat menahan keluarnya uap air, tetapi memberikan akses terhadap udara karena kapang memerlukan oksigen untuk pertumbuhannya. Secara tradisional daun pisang digunakan sebagai pembungkus kedelai untuk tempe, tetapi saat ini banyak pengrajin yang menggunakan kantong plastik sebagai pengemas kedelai pada fermentasi tempe. Kantong plastik harus dilubangi sebesar jarum dengan jarak sekitar 2 cm untuk memberikan oksigen yang diperlukan untuk pertumbuhan kapang tempe, tetapi tidak berlebihan. Suhu inkubasi juga penting dalam pemeraman kedelai menjadi tempe. Panas yang berlebihan akan menyebabkan pertumbuhan kapang tidak merata dan menyebabkan kondensasi berlebihan, sedangkan suhu yang terlalu dingin akan menyebabkan pertumbuhan kapang terhambat. Proses fermentasi tempe dilakukan pada suhu ruang pada ruangan dengan ventilasi yang baik.

6.2.3 Mikrobiologi

Terdapat setidaknya empat spesies *Rhizopus* yang sering ditemukan pada proses pembuatan tempe, yaitu *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, dan *Rhizopus stolonifer* (Nuraida 2019). Pada pembuatan tempe Indonesia, *Rhizopus oligosporus* merupakan spesies utama yang digunakan, diikuti oleh *Rhizopus oryzae*. *Rhizopus oligosporus* memiliki aktivitas proteolitik dan lipolitik tertinggi di antara kapang yang berada pada tempe. Selain keempat spesies tersebut, *Rhizopus* lainnya yang sering ditemukan pada tempe adalah *Rhizopus microspores* dan *Rhizopus formosaensis* (Babu *et al.* 2009). Kapang lain yang juga telah diisolasi dari tempe adalah *Mucor indicus*, *Mucor circinelloides*, *Geotrichum candidum*, *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria alternata*, dan *Cladosporium oxysporum* (Samson *et al.* 1987).

Komposisi mikroba pada tempe dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti proses pengasaman selama perendaman, proses perebusan, kontaminasi silang selama proses pendinginan, komposisi kultur starter, dan lingkungan ketika tempe difermentasikan (Nout dan Kiers 2005). Penelitian Efriwati *et al.* (2013) dan Nurdini *et al.* (2015) menunjukkan bahwa mikroorganisme lain seperti BAL dan khamir juga hadir dalam jumlah lebih dari satu juta per gram selama fermentasi tempe dan dapat berkontribusi dalam meningkatkan kualitas serta keamanan dari tempe. Pada proses fermentasi tempe terdapat bakteri asam laktat (BAL) yang dapat mencapai 10^7 cfu/g (Nurdini *et al.* 2015).

Berbagai jenis BAL telah diisolasi dan diidentifikasi pada tempe, di antaranya *Lb. plantarum-pentosus*, *Pediococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, dan *Leu. paramesenteroides* (Rahayu 1993). *L. fermentum* dan *P. pentosaceus* juga ditemukan pada tempe (Nuraida 2019). Seumahu (2012) juga melaporkan keberadaan *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, dan *Lactobacillus mucosae* pada tempe. Pisol *et al.* (2015) mengisolasi BAL dari tempe Malaysia yang diidentifikasi sebagai *Leu. lactis* dan *Leuconostoc* sp. Pisol *et al.* (2013) juga menunjukkan terdapat 13 jenis bakteri asam laktat yang tergolong *Lactobacillus* heterofermentatif dan mendominasi hampir di setiap tahap proses produksi tempe kedelai. Jenis BAL ini paling banyak ditemukan pada tahap perendaman biji kedelai, sedangkan pada produk akhir tempe, selain *Lactobacillus* heterofermentatif juga terdapat satu

isolat *Streptococcus non enterococci*. Kehadiran bakteri asam laktat selama proses produksi berdampak pada penurunan pH selama proses perendaman sehingga lebih menstabilkan produk tempe. Selain itu bakteri asam laktat menghasilkan metabolit yang dapat meningkatkan aroma, *flavor*, dan tekstur tempe, serta dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang tidak diinginkan sehingga dapat memperpanjang umur simpan tempe (Nout dan Kiers 2005; Efriwati *et al.* 2013).

Selain bakteri asam laktat, pada proses fermentasi tempe juga ditemukan bakteri lainnya dari famili *Enterobacteriaceae* yaitu *Citobacter freundii* dan *Klebsiella pneumoniae* (Nuraida 2019). Kedua bakteri ini merupakan kontaminan dari lingkungan, tetapi berkontribusi terhadap pembentukan vitamin B12 dan thiamin pada tempe. Kedua bakteri ini tidak ada pada tempe yang diinokulasi dengan kultur murni *Rhizopus* dan difermentasi dalam kondisi steril. Ayu *et al.* (2014) melaporkan bahwa *K. pneumoniae* dari tempe Indonesia berbeda secara genetik dengan *K. pneumoniae* yang merupakan bakteri patogen penyebab penyakit. Selama proses fermentasi tempe, bakteri yang merugikan juga dapat mengkontaminasi. *Bacillus* dapat tumbuh selama fermentasi tempe dan menyebabkan rasa pahit (Barus *et al.* 2008). *Bacillus* sp. memiliki aktivitas proteolitik yang tinggi dan menghasilkan asam amino dan peptida yang diantaranya berkontribusi terhadap rasa pahit. Bakteri lainnya yang telah ditemukan pada tempe adalah *Acinetobacter baumannii*, *Acetobacter cibinongensis*, *Acetobacter pasterianus*, *Acetobacter indonesiensis*, *Sphingomonas*, *Acetobacter* sp., *Azospirillum amazonense*, *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. dan *Serratia* sp.. (Seumahu 2012).

Khamir dapat tumbuh pada fermentasi tempe hingga mencapai jumlah 10^8 cfu/g (Nurdini *et al.* 2015). Nisa (2016) mengisolasi *Candida famata*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida krusei/inconspicua*, *Geotrichum klebahnii*, *Candida pelliculosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida guilliermondii*, dan *Candida utilis* dari tempe. *Candida krusei/inconspicua* memiliki aktivitas β -glucosidase yang tinggi, yaitu enzim yang membantu pelepasan isoflavon aglikon. *Trichosporon beigelii*, *Clavispora (Candida) lusitaniae*, *C. maltosa*, *C. intermedia*, *Yarrowia lipolytica*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *C. sake*, *Hansenula fabiani*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula rubra*, *C. rugosa*, *C. curvata*, dan *Hansenula anomola* telah diidentifikasi berada pada tempe di Belanda (Samson *et al.* 2007).

6.2.4 Perubahan Kimia

Pada proses fermentasi kedelai menjadi tempe terjadi aktivitas enzim proteolitik, amilolitik, dan lipolitik oleh enzim protease, amilase, dan lipase yang diproduksi oleh kapang *Rhizopus* sp. (Ghosh dan Ray 2011). Protease berperan dalam mendegradasi polipeptida, sehingga membentuk asam amino bebas (Hernandez *et al.* 2017). Degradasi protein oleh protease memproduksi senyawa volatil dan asam amino yang berpengaruh terhadap rasa dan aroma tempe yang dihasilkan (Puteri *et al.* 2015). Amilase berperan dalam mendegradasi pati menjadi gula pereduksi, seperti glukosa. Hasil degradasi komponen pati yang terkandung pada bahan baku kemudian akan digunakan oleh kapang sebagai sumber karbon untuk memproduksi lipase. Lipase berperan mendegradasi lipid, seperti lemak dan minyak, menjadi asam lemak. Produksi asam lemak akan memengaruhi warna dan tekstur tempe. Asam lemak merupakan sumber karbon bagi kapang yang tumbuh pada tempe (Utari 2010). Degradasi protein, lemak, dan karbohidrat kedelai menjadi komponen yang lebih sederhana selama fermentasi menjadi tempe menyebabkan peningkatan daya cerna nutrisi tersebut. Fermentasi juga meningkatkan kandungan isoflavon aglikon pada tempe serta menurunkan aktivitas inhibitor tripsin dan kandungan asam fitatnya (Bavia *et al.* 2012).

6.2.5 Manfaat Kesehatan

Saat ini tempe menjadi makanan sehat yang populer di dunia dikarenakan kandungan komponen bioaktif dan manfaat kesehatannya. Tempe merupakan makanan kaya protein dan mengandung berbagai komponen gizi lainnya seperti serat, lemak, vitamin B12 dan mineral (Tabel 6.1). Keuntungan utama dari fermentasi kedelai menjadi tempe adalah perubahan kualitas sensori kedelai dan peningkatan nilai gizinya (Nuraida 2016). Proses perendaman kedelai dan proses fermentasi dapat menghilangkan bau langu kedelai. Selama proses fermentasi kedelai terjadi perubahan aroma dan tekstur khas tempe. Enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang berada pada tempe di antaranya protease, lipase, enzim-enzim pemecah karbohidrat, dan fitase mendegradasi makromolekul menjadi senyawa-senyawa dengan berat molekul rendah. Sebagai contoh, hidrolisis oligosakarida pada saat fermentasi tempe dapat meningkatkan penyerapan gula oleh saluran pencernaan dan tidak menyebabkan flatulensi.

Dalam kedelai terdapat asam fitat yang menghambat absorpsi mineral seperti zinc, besi dan kalsium. Selama fermentasi tempe, kapang *Rhizopus* memproduksi enzim fitase yang mendegradasi fitat.

Tabel 6.1 Komposisi nilai gizi tempe dihitung per 100 g, dengan Berat Dapat Dimakan (BDD) 100 %

Zat Gizi	Kandungan
Air	68,30 g
Energi	150 Kal
Protein	14,00 g
Lemak	7,70 g
Karbohidrat	9,10 g
Serat	1,40 g
Abu	0,90 g
Kalsium (Ca)	517 mg
Fosfor (P)	202 mg
Besi (Fe)	1,5 mg
Natrium (Na)	7 mg
Kalium (K)	165,9 mg
Tembaga (Cu)	0,40 mg
Seng (Zn)	1,2 mg
Beta-Karoten	0 mcg
Thiamin (Vit. B1)	0,17 mg
Riboflavin (Vit. B2)	0,44 mg
Niasin	3,6 mg

Sumber: Data Komposisi Pangan Indonesia (<https://www.panganku.org/id-ID/view>)

Peningkatan daya cerna tempe memiliki manfaat fisiologis untuk mengatasi malfungsi sistem pencernaan. Pemberian tempe akan membantu merehabilitasi status gizi pada anak-anak yang mengalami malnutrisi dan diare akut (Nout dan Kiers 2005). Penelitian menunjukkan bahwa pemberian formula berbasis tempe dapat memperpendek durasi diare akut pada bayi dan anak-anak. Manfaat kesehatan lainnya dari tempe antara lain menghambat biosintesis kolesterol dalam hati, mencegah oksidasi LDL, menurunkan total kolesterol dan triasilgliserol, meningkatkan enzim antioksidan SOD, serta menurunkan risiko kanker rektal, prostat, payudara, dan kolon (Astuti *et al.* 2000). Selain meningkatkan nilai

gizi, proses fermentasi juga menghasilkan senyawa-senyawa fungsional atau bioaktif seperti isoflavon aglikon, GABA (*Gamma Amino Butyric Acid*), SOD (Superoksida Dismutase), peptida, dan senyawa antimikroba. Selama proses fermentasi, kapang akan menghidrolisis isoflavon glukosida menjadi aglikon (daidzein, genistein, dan glisitein), sehingga kapasitas antioksidatif pada tempe meningkat. Isoflavon aglikon juga lebih mudah diserap tubuh (Nuraida 2016).

6.3 Tempe Non-Kedelai

Kedelai merupakan bahan baku yang paling banyak digunakan untuk membuat tempe. Namun di beberapa daerah di Jawa Tengah, tempe juga dibuat dari kacang-kacangan lain seperti kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus*), koro benguk (kacang beludru, *Mucuna pruriens*), koro pedang (kacang pedang merah, *Canavalia ensiformis*; kacang pedang putih, *Canavalia gladiata*), beludru buncis (*Phaseolus vulgaris*), kacang polong merpati atau kacang gude (pigeon pea, *Cajanus cajan*), dan lamtoro (pisang perdu Selong, *Leucaena leucocephala*). Ketika kacang lain selain kedelai digunakan sebagai bahan baku pembuatan tempe, nama tempe akan diikuti dengan nama bahan bakunya, misalnya tempe koro benguk, tempe kecipir, dan sebagainya.

Tempe juga dibuat dari bahan lain yang merupakan limbah dari pengolahan pangan, misalnya tempe gembus yang dibuat dari ampas tahu, atau tempe bongkrek dari ampas kelapa. Tempe bongkrek saat ini tidak diperkenankan diperjualbelikan karena potensi bahaya keamanan pangan yang tinggi. Proses fermentasi tempe bongkrek seringkali terkontaminasi oleh bakteri *Burkholderia cocovenenans* (saat ini diklasifikasikan sebagai *Bulkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans*) yang memproduksi dua jenis toksin yaitu toksoflavin dan asam bongkrek (Nuraida 2019). Bakteri ini tumbuh bersama-sama dengan kapang tempe, terutama ketika kapang tempe tidak tumbuh sempurna. Asam bongkrek tidak berasa dan tidak berbau sehingga tempe yang dihasilkan akan memiliki kenampakan yang normal.

Pada dasarnya proses pembuatan tempe kacang nonkedelai dikembangkan berdasarkan proses pembuatan tempe kacang kedelai, namun memerlukan penyesuaian proses. Tempe yang dibuat dari kacang-kacangan nonkedelai atau

dari limbah industri pangan berbasis bahan baku hasil pertanian seperti ampas tahu merupakan sumber protein yang murah. Nilai gizi berbagai tempe non-kedelai disajikan pada Tabel 6.2.

Tabel 6.2 Komposisi nilai gizi aneka tempe nonkedelai dihitung per 100 g, dengan Berat Dapat Dimakan (BDD) 100%

Zat Gizi	Kandungan					
	Tempe bongkretek	Tempe gembus P3G	Tempe kacang babi	Tempe koro benguk	Tempe lamtoro	Tempe kacang belimbing
Air	72,5 g	81,9 g	64,0 g	64,0 g	66,8 g	58,2 g
Energi	119 Kal	73 Kal	139 Kal	141 Kal	128 Kal	212 Kal
Protein	4,4 g	5,7 g	12,5 g	10,2 g	10,7 g	17,5 g
Lemak	3,5 g	1,3 g	0,8 g	1,3 g	0,5 g	10,0 g
Karbohidrat	18,3 g	10,3 g	21,9 g	23,2 g	21,3 g	12,9 g
Serat	-	4,2 g	1,8 g		7,1 g	2,9 g
Abu	146,3 g	0,8 g	1,2 g	1,3 g	0,7 g	1,4 g
Kalsium	27 mg	204 mg	68 mg	42 mg	203 mg	186 mg
Fosfor	100 mg	80 mg	182 mg	15 mg	108 mg	180 mg
Besi	2,6 mg	1,5 mg	2,6 mg	2,6 mg	0,6 mg	2,2 mg
Retinol (Vit A)	0 mcg	-		0 mcg		
Thiamin	0,08 mg	0,09 mg	0,10 mg	0,09 mg	0,17 mg	0,20 mg
Vitamin C	0 mg			0 mg	2 mg	
Karoten Total	-	22 mcg	20 mcg		121 mcg	
Riboflavin		0,10 mg				
Niasin	-	0,9 mg				

Sumber: Data Komposisi Pangan Indonesia (<https://www.panganku.org/id-ID/view>)

6.3.1 Tempe Koro Benguk

Tempe koro merupakan tempe berbahan baku kacang koro seperti koro pedang putih (*Canavalia ensiformis*), koro kratok (*Phaseolus lunatus* L.), kacang gude (*Cajanus cajan*) dan koro benguk (*Mucuna pruriens*). Kandungan protein yang cukup tinggi menjadikan tempe koro-koroan berpotensi sebagai bahan pengganti tempe kedelai di Indonesia (Rahayu *et al.* 2019). Proses fermentasi tempe koro benguk (Gambar 6.3) pada dasarnya hampir sama dengan pembuatan tempe kacang kedelai. Selama proses fermentasi, komponen-komponen yang kompleks akan dihidrolisis oleh kapang menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana.



Gambar 6.3 Tempe koro benguk

Kacang-kacangan dari negara tropis umumnya mengandung inhibitor tripsin dan kimotripsin, asam fitat, tanin, lektin, dan glikosida sianogenik. Betancur-Ancona *et al.* (2012) menyatakan bahwa koro benguk (*M. pruriens*) mengandung nikotin, fisostigmin, serotonin, L-DOPA, serta glikosida sianogenik. Kandungan glikosida sianogenik pada koro benguk berkisar antara 5,1–10,8 mg/kg (Hamzah dan Hamzah 2011). Sianogen adalah glikosida dari gula dan mengandung aglikon sianida, keberadaannya bervariasi antara spesies koro-koroan. Pengolahan koro-koroan memerlukan teknik untuk menginaktivasi faktor antinutrisi. Proses non-termal seperti imbibisi, germinasi, pengupasan, dan fermentasi, serta proses termal seperti pemasakan dapat menurunkan faktor antinutrisi pada kacang-kacangan dan meningkatkan daya cerna. Perendaman selama 24–48 jam yang dilakukan dengan cara mengganti air rendaman setiap 6–8 jam dapat mengurangi glukosianida secara signifikan (Kasmidjo 1990). Proses perebusan juga dapat menghilangkan senyawa toksin yang secara alami berada pada kacang-kacangan (Nuraida 2019).

Kandungan protein kacang koro benguk yaitu sebesar 28,82% (Kalidas dan Mahapatra 2014). Protein menjadi komponen penting dalam fermentasi tempe karena protein inilah yang akan dihidrolisis oleh jamur tempe menjadi peptida-peptida yang berpotensi memiliki sifat bioaktif (Rahayu *et al.* 2019). Kapang yang berperan juga tidak jauh berbeda dari fermentasi tempe berbahan kacang kedelai. Kapang yang dominan selama proses fermentasi yaitu *Rhizopus oligosporus*. Pada fermentasi 48 jam akan tercium aroma khas tempe dengan

miselia jamur yang tumbuh menutupi seluruh permukaan biji koro benguk, sehingga tempe berwarna putih dengan tekstur yang kompak. Miselia-miselia putih yang menyelubungi biji koro benguk ini yang membuat tekstur tempe menjadi kompak (Sparringa *et al.* 2002).

6.3.2 Tempe Koro Pedang

Kacang Koro Pedang (*Canavalia ensiformis L.*) merupakan jenis kacang-kacangan yang dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan tempe (Gambar 6.4). Koro pedang merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang memiliki kandungan protein yang relatif besar dibandingkan dengan kacang lainnya seperti kacang hijau, kacang tanah, kacang tolo, dan kacang gude, yaitu sebesar 27,4% (Ekanayake 2006). Kendala dalam pemanfaatan kacang koro pedang sebagai bahan baku pembuatan tempe adalah adanya kandungan senyawa toksik yang terdapat secara alami, yaitu asam sianida (HCN). Kandungan HCN pada kacang koro pedang cukup tinggi dan sangat berbahaya. Oleh karena itu, dilakukan perlakuan fermentasi untuk mengurangi jumlah HCN pada koro pedang (Wahono *et al.* 2016).



Gambar 6.4 Tempe Canavalia

Kacang koro pedang mengandung inhibitor tripsin, kimotripsin, serta asam fitat, juga mengandung asam amino yang bersifat toksik yaitu canavanine dan canaline, yang berefek negatif terhadap pencernaan (Betancur-Ancona *et al.* 2012).

Penurunan asam sianida pada proses fermentasi dipengaruhi oleh inokulum ragi tempe yang ditambahkan yaitu *Rhizopus oligosporus*. Menurut Tope (2014), kapang *Rhizopus oligosporus* sebagai agen fermentasi mampu mendegradasi zat anti nutrisi pada kedelai. Fermentasi dalam hal ini mampu mengurangi senyawa pengganggu dalam suatu bahan pangan untuk memperbaiki produk akhir. Berdasarkan hasil penelitian Wahono *et al.* (2016), penurunan asam sianida pada proses fermentasi dipengaruhi oleh inokulum ragi tempe yang ditambahkan yaitu *Rhizopus oligosporus*. Kapang ini mampu memanfaatkan unsur N bukan protein dari HCN sendiri sehingga mampu menurunkan kadar HCN pada koro pedang yang difermentasi.

6.3.3 Tempe Gembus

Tempe gembus merupakan salah satu pangan fermentasi khas Indonesia yang banyak ditemukan di daerah Jawa Tengah. Tempe gembus dibuat dari fermentasi ampas tahu. Untuk membuat tempe gembus, ampas tahu segar dicuci untuk menghilangkan keasaman, kemudian diperas dalam keadaan terbungkus kain mori (Nuraida 2019). Tahap ini dilakukan dua kali. Ampas tahu yang sudah diperas lalu dikukus selama 30 menit, kemudian didinginkan. Setelah dingin, ampas tahu diinokulasi dengan laru tempe, kemudian dihomogenkan (dicampur) dan dibungkus dengan kantong plastik atau daun pisang. Fermentasi dilakukan selama 36–48 jam pada suhu ruang. Hasil fermentasi berupa padatan kompak berwarna putih keabu-abuan yang merupakan miselium jamur yang tumbuh saat proses fermentasi tempe gembus (Gambar 6.5).

Meskipun tempe gembus terbuat dari ampas tahu, tempe gembus mengandung beberapa kandungan gizi, seperti asam lemak esensial yaitu asam linoleat (21,51%) dan asam linolenat (1,81%), asam lemak tak jenuh oleat (16,72%), protein, karbohidrat, serat, kalsium, dan zat besi (Kurniasari *et al.* 2017). Tempe gembus merupakan sumber protein walaupun kadar proteinnya lebih rendah dari tempe (Nuraida 2019).



Gambar 6.5 Tempe gembus

6.4 Oncom

6.4.1 Deskripsi

Oncom merupakan salah satu produk olahan fermentasi yang berasal dari daerah Jawa Barat. Oncom terbuat dari limbah padat industri pangan berbahan baku hasil pertanian seperti ampas tahu, bungkil kacang tanah, dan onggok. Seperti halnya tempe, oncom merupakan sumber gizi yang potensial untuk masyarakat. Proses fermentasi menghasilkan oncom dengan aroma dan cita rasa yang khas karena terjadi penguraian struktur kimia bahan-bahan bersifat kompleks menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dan mudah dicerna untuk dimanfaatkan oleh tubuh (Zamakhsyari *et al.* 2018). Oncom banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bahan makanan pendamping nasi atau sebagai makanan camilan. Beberapa contoh olahan oncom yang banyak dijumpai di masyarakat adalah tumis oncom, pepes oncom, oncom goreng, dan comro.

Terdapat dua jenis oncom yang dikenal masyarakat, yaitu oncom hitam dan oncom merah. Oncom merah terdiri atas dua tipe, yaitu oncom merah yang dibuat dari ampas tahu yang dikenal di Bogor dan oncom merah yang dibuat dari bungkil kacang tanah atau dikenal sebagai oncom Bandung. Oncom hitam hanya

dibuat dari bungkil kacang tanah. Perbedaan kedua jenis oncom tersebut terletak pada jenis mikroba yang memfermentasinya. Oncom hitam menggunakan laru tempe yang berisi kapang *Rhizopus* terutama *Rhizopus oligosporus*, sedangkan oncom merah menggunakan *Neurospora* terutama *N. crasa*, *N. intermedia*, dan *N. sitophila* yang menghasilkan pigmen merah/oranye (Nuraida 2019).

6.4.2 Fermentasi Oncom dan Mikroorganisme yang Berperan

Oncom merah merupakan makanan tradisional Indonesia yang memanfaatkan produk samping dari produksi tahu, yaitu ampas tahu, namun sebelum pengukusan, ampas tahu dicampur dengan onggok. Pembuatan oncom merah (Gambar 6.6) sama seperti pembuatan tempe gembus yang sudah dijelaskan di atas. Untuk membuat oncom merah, pengrajin biasanya menggunakan oncom merah yang sudah dibuat sebelumnya sebagai laru atau kultur *starter* (Nuraida 2019). Setelah diinokulasi, campuran ampas tahu dan onggok tersebut diletakkan pada rak bambu yang sudah diberi alas daun pisang atau kertas, lalu ditutup dengan daun pisang atau kertas. Pemeraman dilakukan pada suhu kamar selama 36–48 jam (Nuraida 2019). Jika menggunakan bungkil kacang tanah sebagai bahan baku, bungkil kacang direndam terlebih dahulu selama semalam (24 jam) untuk memisahkan residu minyak kacang tanah yang masih tersisa dan mengasamkan bahan baku (Nuraida 2019). Pengaturan pH juga perlu diperhatikan untuk menunjang pertumbuhan kapang. Pengaturan dilakukan sehingga pH di bawah 6 dan biasanya sampai 4. Untuk mempercepat pengasaman, beberapa pengrajin menambahkan asam asetat ke dalam air perendam. Setelah perendaman, bungkil kacang tanah lalu diperas untuk menghilangkan kelebihan air dan dicampur dengan onggok, lalu dikukus selama 30 menit. Waktu pengukusan tergantung dari jumlah bahan baku yang dikukus. Pengukusan bertujuan untuk memperlunak bahan sehingga memudahkan penetrasi mikroba sekaligus mematikan mikroba yang tidak dikehendaki. Campuran kemudian didinginkan dan diinokulasi dengan laru oncom merah atau oncom merah yang sudah jadi.



Gambar 6.6 Oncom merah

Pada pembuatan oncom hitam (Gambar 6.7), campuran diinokulasi dengan laru tempe. Campuran bungkil kacang tanah dan onggok yang sudah diinokulasi lalu ditempatkan pada rak bambu yang telah diberi alas daun pisang, lalu ditutup dengan daun pisang. Penambahan tapioka juga dilakukan untuk menambah sumber karbohidrat sehingga dapat mempercepat pertumbuhan kapang sekaligus memperbaiki cita rasa. *Flavor* oncom bungkil kacang tanah lebih kuat karena berasal dari *flavor* kacang tanah, *fruity*, seperti almond, dan agak beralkohol. Rasa yang diinginkan tersebut terbentuk selama proses fermentasi (Beuchat 1976).



Gambar 6.7 Oncom Hitam

6.4.3 Perubahan Kimia

Oncom memiliki sumber energi dalam bentuk sederhana dibandingkan dengan ampas tahu akibat adanya aktivitas enzimatik pada proses fermentasi sehingga oncom lebih mudah dicerna (Mahfudz *et al.* 2004). Penelitian Matsuo (2006) menunjukkan bahwa terdapat aktivitas protease, leusin aminopeptidase, lipase, β -glukosidase, xilanase, dan selulase selama fermentasi oncom berlangsung. Selain itu, oncom menunjukkan aktivitas fitase dan amilase (Kanti dan Sudiana 2016; Indrastuti 2016). Enzim lipase dan protease yang aktif selama proses fermentasi memegang peranan penting dalam penguraian pati menjadi gula, penguraian bahan-bahan dinding sel kacang, dan penguraian lemak, serta pembentukan sedikit alkohol dan berbagai ester yang berbau sedap dan harum (Jay 2000).

Oncom memiliki aktivitas enzim kelompok hidrolase yang dapat menghidrolisis nutrisi kompleks pada ampas tahu menjadi bentuk yang lebih sederhana (Matsuo 2006). Fermentasi dengan *Neurospora* dapat mengurangi fitat, senyawa anti nutrisi yang memiliki afinitas ikatan yang kuat dengan mineral penting, pada ampas kedelai dan mengubahnya menjadi fosfor anorganik (Dendougui dan Schwedt 2004). Hal ini sejalan dengan penelitian Kanti dan Sudiana (2016) yang menunjukkan bahwa enzim fitase yang disekresikan oleh kapang *Neurospora* dapat mengurangi senyawa antinutrisi yaitu fitat pada ampas tahu.

6.4.4 Manfaat Kesehatan

Meskipun memiliki harga relatif murah, oncom mengandung gizi yang tinggi. Komposisi zat gizi yang terkandung pada oncom disajikan pada Tabel 6.3. Oncom juga mengandung senyawa fungsional yang bermanfaat bagi kesehatan, yaitu karotenoid yang dihasilkan oleh kapang *Neurospora* sp. (Purnamasari *et al.* 2013). Berbagai temuan menarik tersebut menyiratkan bahwa konsumsi makanan fermentasi yang mengandung protein tinggi dapat mencegah penyakit kardiovaskular. Oncom kaya akan kandungan gizi, khususnya karbohidrat dan protein. Selain itu, pemberian ekstrak oncom pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) menunjukkan peningkatan kadar estrogen yang signifikan, dan tidak terdapat perbedaan nyata antara kadar estrogen dari pemberian ekstrak oncom merah dan oncom hitam (Laksmi *et al.* 2021).

Tabel 6.3 Komposisi gizi pangan oncom dihitung per **100 g**, dengan **Berat Dapat Dimakan (BDD) 100 %**

Zat Gizi	Kandungan
Air	57,0 g
Energi	187 Kal
Protein	13,0 g
Lemak	6,0 g
Karbohidrat	22,6 g
Serat	-
Abu	1,4 g
Kalsium (Ca)	96 mg
Fosfor (P)	115 mg
Besi (Fe)	27 mg
Retinol (Vit A)	0 mcg
Thiamin (Vit B1)	0,09 mg
Riboflavin (Vit. B2)	0,00 mg
Niasin	1,6 mg
Vitamin C	0 mg

Sumber: Data Komposisi Pangan Indonesia (<https://www.panganku.org/id-ID/view>).

6.5 Kecap

6.5.1 Deskripsi

Kecap merupakan ekstrak dari fermentasi kedelai yang dicampurkan dengan bahan-bahan lain yang digunakan untuk meningkatkan *flavor* dari makanan. Kecap kedelai merupakan salah satu produk fermentasi yang telah dikenal sejak ribuan tahun yang lalu di berbagai negara, termasuk Indonesia. Kecap banyak dikonsumsi oleh masyarakat Asia sebagai penyedap makanan, penambah cita rasa, pemberi warna makanan, dan lain sebagainya. Kecap dapat dibuat melalui 3 cara, yaitu fermentasi, hidrolisis asam, dan kombinasi keduanya. Dibandingkan dengan kecap yang dibuat secara hidrolisis, kecap yang dibuat dengan cara fermentasi biasanya mempunyai aroma yang lebih baik. Karakteristik bahan baku

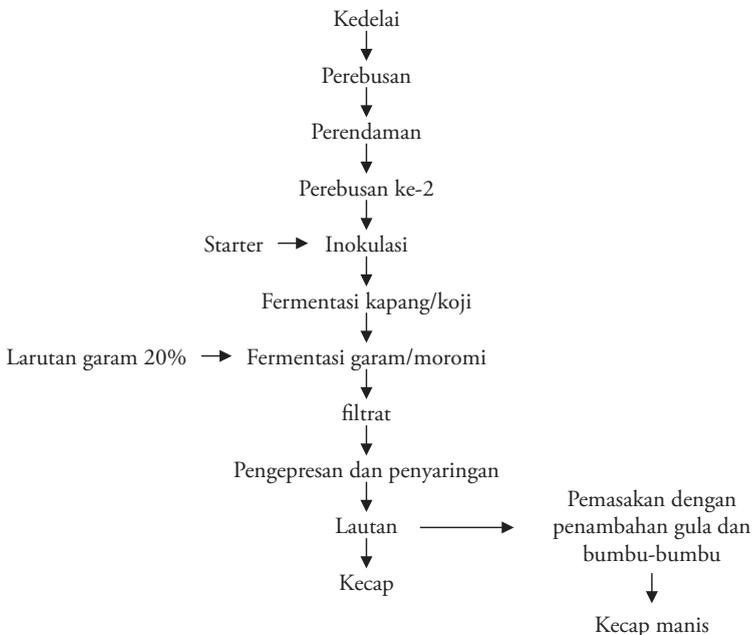
serta strain mikroorganisme yang digunakan akan memengaruhi karakteristik kecap yang dihasilkan sehingga masing-masing kecap yang dihasilkan dari berbagai produsen kecap manis di Indonesia memiliki rasa dan aroma tersendiri.

Di dunia internasional, jenis kecap yang lebih dikenal adalah kecap asin yang memiliki rasa asin dan umami dengan aroma yang merangsang nafsu makan. Jenis kecap asin ini dapat dikelompokkan menjadi tipe Jepang dan tipe Cina (Nuraida 2019). Kecap Jepang menggunakan kacang kedelai dan gandum sebagai bahan baku, sedangkan tipe Cina hanya menggunakan kacang kedelai atau sedikit gandum. Di Indonesia terdapat dua jenis kecap, yaitu kecap asin dan kecap manis. Kecap manis lebih dikenal dibandingkan kecap asin. Penambahan gula kelapa dan bahan-bahan lainnya seperti bumbu-bumbu membuat kecap memiliki rasa yang khas. Berdasarkan SNI 01-3543-2013, kecap kedelai manis adalah produk cair yang diperoleh dari hasil fermentasi kacang kedelai (*Glycine max* L.) dan gula, gula merah, dengan atau tanpa proses karamelisasi, dengan atau tanpa penambahan bahan lain, dengan karakteristik dasar total gula tidak kurang dari 40% (Meutia 2015). Aroma dan cita rasa kecap manis yang khas membuat kecap banyak disukai dan diterima luas sebagai bumbu masak. Penggunaan kecap manis dapat dijumpai di berbagai kalangan, mulai dari rumah tangga, pedagang kaki lima, pedagang menengah, hingga restoran. Perkembangan industri kecap di Indonesia terus mengalami peningkatan di setiap tahunnya. Kementerian Perindustrian RI melaporkan di dalam Direktori Industri Kecap bahwa pada tahun 2019, terdapat 100 industri kecap yang tersebar di seluruh Indonesia.

Pembuatan kecap di Indonesia pada umumnya dilakukan melalui proses fermentasi. Bahan baku utama kecap yang sering digunakan adalah kedelai hitam. Kandungan protein kedelai yang tinggi membuat kedelai sering dipilih sebagai bahan dasar pangan fermentasi, salah satunya adalah kecap. Pembuatan kecap secara fermentasi pada prinsipnya menyangkut pemecahan karbohidrat, protein, dan lemak oleh aktivitas enzim kapang, khamir dan bakteri menjadi senyawa sederhana, yang menentukan rasa, aroma, dan komposisi kecap (Koswara 1997). Meutia (2015) menyatakan kualitas kecap yang diproduksi dengan cara tradisional lebih baik daripada kecap yang diproduksi dengan hidrolisis asam, sehingga cara tradisional banyak digunakan di Indonesia. Bahan baku pembuatan kecap secara umum adalah kedelai hitam, tetapi tidak menutup kemungkinan kecap dibuat dari kedelai kuning.

6.5.2 Fermentasi

Proses pembuatan kecap dilakukan dengan 2 tahap fermentasi, yaitu fermentasi kapang (fermentasi padat) dan fermentasi dalam larutan garam (*brine fermentation*). Sebelum dilakukan fermentasi kapang, tahapan persiapan kedelai sama seperti pembuatan tempe, yaitu melalui perebusan, perendaman, pengupasan kulit, perebusan atau pengukusan, serta inokulasi dengan laru kecap yang berisi *Aspergillus sojae* atau *Aspergillus oryzae* dan inkubasi. Secara umum, tahapan proses pembuatan kecap dapat dilihat pada Gambar 6.8.



Gambar 6.8 Diagram alir pembuatan kecap manis kedelai (Meutia 2015)

Fermentasi padat atau biasa disebut dengan sebutan fermentasi koji dilakukan dengan menggunakan kapang sebagai kultur *starter*/laru. Fermentasi koji umumnya berlangsung selama 2–3 hari. Kapang yang digunakan dalam fermentasi koji adalah *Aspergillus sojae*, *A. oryzae*, dan *Rhizopus* sp. (Nuraida 2019). Kapang berwarna hijau dan abu-abu akan tumbuh menyebar pada permukaan kedelai. Koji yang berkualitas tinggi memiliki ciri-ciri berwarna hijau tua, aroma menyenangkan, aktivitas amilase dan protease tinggi, jumlah bakteri rendah,

populasi ragi yang tinggi, serta pertumbuhan kapang yang pesat (Hesseltine dan Wang 1972). Pertumbuhan koji merupakan salah satu tahap penting dalam pembentukan komponen fenolik yang berpengaruh terhadap *flavor* kecap yang dihasilkan.

Tahapan fermentasi selanjutnya yaitu proses perendaman koji/tempe dalam air garam, atau biasa disebut fermentasi moromi yang membentuk rasa yang khas, aroma, dan warna yang muncul pada kecap. Kedelai yang sudah berkapang dimasukkan ke dalam air garam dengan konsentrasi 18–20%. Pada beberapa industri kecap, kedelai yang sudah ditumbuhi kapang dijemur terlebih dahulu sebelum direndam dalam air garam dalam gentong tanah atau plastik dan dijemur selama siang hari (Nuraida 2019). Keberhasilan fermentasi moromi sangat menentukan kualitas kecap yang dihasilkan. Fermentasi moromi dilakukan selama 3–4 bulan dalam wadah tertutup yang dibiarkan di bawah sinar matahari (Wu *et al.* 2010). Suhu dan aerasi merupakan faktor penting pada fermentasi moromi. Untuk hasil yang lebih baik, pemeraman pada bulan pertama dilakukan pada suhu 15°C lalu secara bertahap dinaikkan menjadi 30°C. Pembentukan alkohol oleh *Zygosaccharomyces rouxii* tergantung pada suhu lingkungannya. Aerasi secara berselang akan mempercepat proses pemeraman moromi pada pembuatan kecap. Jika aerasi kurang akan menyebabkan kurangnya produksi *flavor* dan kecap memiliki *flavor* yang tidak matang (Wu *et al.* 2010). Pada fermentasi secara tradisional, aerasi dilakukan dengan pengadukan secara berselang ketika wadah moromi dijemur. Tahapan selanjutnya, moromi diperas dan disaring, dan ke dalam cairannya ditambahkan gula dan rempah-rempah serta dikentalkan sehingga diperoleh kecap manis dengan konsistensi kental. Penambahan gula, rempah-rempah membuat kecap manis memiliki rasa yang khas. Untuk membuat kecap asin, setelah proses penyaringan pertama tidak dilakukan penambahan gula dan rempah-rempah, namun langsung dibotolkan, sehingga kecap asin berupa larutan berwarna coklat encer dengan rasa asin.

6.5.3 Mikrobiologi

Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, proses fermentasi pembuatan kecap terdiri atas 2 tahapan yaitu fermentasi koji dan fermentasi moromi. Pada fermentasi kapang (koji), mikroba yang dominan berperan adalah *Aspergillus*

sojae (Meutia 2015). Sugiyama (1984) melaporkan bahwa mikroorganisme yang berperan dalam tahap fermentasi pertama (fermentasi kapang) produksi kecap adalah kapang *Aspergillus oryzae* atau *Aspergillus sojae*. Selama fermentasi koji, kapang menghasilkan enzim proteolitik, amilolitik, dan lipolitik. *A. sojae* dikenal sebagai kapang yang paling banyak menghasilkan enzim, yaitu α -amilase, α -galaktosidase, glutaminase, protease, dan β -glukosidase (Wedhastri 1990).

Tahapan setelah fermentasi koji yaitu fermentasi moromi. Selama fermentasi moromi, mikroorganisme yang tumbuh merupakan mikroorganisme yang dapat tumbuh pada kondisi garam tinggi selama fermentasi atau mikroorganisme halotoleran seperti *Tetragenococcus halophilus* dan *Zygosaccharomyces rouxii*. *T. halophilus* merupakan bakteri asam laktat yang dominan tumbuh pada moromi kecap Indonesia (Roling *et al.* 1994). Mikroorganisme yang berperan dalam tahap fermentasi garam diantaranya yaitu BAL (*Pediococcus (Tetragenococcus) halophilus*) dan khamir osmofilik (*Saccharomyces rouxii*), *Candida (Torulopsis) versatilis*, *Candida (Torulopsis) etchellsii*) (Sugiyama 1984). Kapang yang berperan pada fermentasi kapang dapat menjadi kontaminan pada produk akhir. Abalunan *et al.* (2013) melaporkan bahwa pada 6 sampel kecap berbeda merek di wilayah Diliman Filipina didapatkan kapang jenis *Aspergillus* sp. dan *Fusarium* sp. Keberadaan kapang pada kecap ini akan berpengaruh terhadap masa simpan kecap, sehingga peran sanitasi sangat penting pada produksi kecap.

6.5.4 Perubahan Kimia

Perubahan-perubahan biokimiawi selama proses fermentasi terjadi karena adanya aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba yang berperan selama fermentasi kapang (koji) maupun fermentasi dalam larutan garam (moromi). Selama proses fermentasi koji, protein yang terkandung dalam kedelai akan dipecah menjadi peptida dan asam amino oleh enzim proteolitik, terutama dari jenis protease netral dan basa. Kadar protein terlarut yang meningkat selama fermentasi kecap menunjukkan adanya pemecahan protein kompleks (proteolisis) oleh enzim protease menjadi peptida pendek dan asam amino (Rahayu *et al.* 2005), sehingga total nitrogen pada produk yang dihasilkan semakin meningkat.

Proses fermentasi moromi berperan dalam perubahan komponen kimia yang membentuk rasa dan aroma sebagai penentu kualitas (Gao *et al.* 2010; Gao *et al.* 2011). Perubahan yang terjadi merupakan hasil dari aktivitas mikroorganisme, seperti khamir dan bakteri asam laktat (Singracha *et al.* 2017; Song *et al.* 2015). *Aspergillus oryzae* atau *Aspergillus sojae* tidak memproduksi mikotoksin dan memiliki aktivitas yang tinggi dari enzim proteolitik dan amilolitik serta enzim-enzim pemotong lainnya. *T. halophilus* memproduksi asam laktat dan asam organik lainnya pada fermentasi garam. *T. halophilus* merupakan BAL utama pada fermentasi moromi (Wu *et al.* 2010).

Khamir yang secara alami berasal dari lingkungan yaitu *Zygosaccharomyces rouxii* dan *Candida* sp. mengkonversi gula yang tersisa menjadi alkohol dan beberapa komponen *flavor* (Sugiyama 1984, Wu *et al.* 2010) seperti 4-ethylguaiacol (Wu *et al.* 2010). Konsentrasi etanol berkorelasi dengan jumlah khamir selama fermentasi moromi (Wu *et al.* 2010). Selama fermentasi moromi, juga terjadi proses perombakan karbohidrat pada kedelai oleh enzim amilase yang dieksresikan oleh *Aspergillus sojae* (Gao *et al.* 2011). Enzim α -amilase akan menghidrolisis polisakarida menjadi oligosakarida, disakarida, dan monosakarida. Selain itu, enzim lipase akan memecah lipid ketika proses fermentasi koji berlangsung. Ketersediaan nutrisi pada moromi menentukan kualitas produk akhir yaitu kecap kedelai karena selama fermentasi garam terjadi perubahan asam amino dan glukosa menjadi berbagai senyawa pembentuk aroma (alkohol, ester, fenol, aldehida, dan keton) oleh aktivitas mikroorganisme (Zhang *et al.* 2020).

6.6 Tauco

6.6.1 Deskripsi

Taucu adalah produk fermentasi kedelai kuning berupa pasta yang digunakan sebagai bumbu masak, seperti tumis sayuran, ikan dan daging, soto daging. Bagi kalangan tertentu, taucu merupakan produk yang tidak dapat dipisahkan dari menu makanan sehari-hari. Taucu tidak sepopuler tempe atau kecap, hanya dikenal di daerah tertentu, seperti Cianjur yang merupakan produsen taucu terbesar di Indonesia. Pada skala yang lebih kecil, taucu diproduksi juga di Bangka, Medan, dan Pekalongan. Di Pekalongan taucu digunakan sebagai bumbu pada

sejenis soto daging. Produk yang serupa dengan tauco adalah miso di Jepang, chiang di Cina, jang atau doenjang di Korea, antao chieo di Thailand (Nuraida 2019). Di Indonesia terdapat 2 jenis tauco, yaitu bentuk bubur atau pasta dan bentuk kering. Tauco berbentuk pasta atau bubur banyak diproduksi terutama di Cianjur, sedangkan tauco kering banyak diproduksi di Pekalongan. Proses fermentasi tauco serupa dengan fermentasi kecap, tetapi diambil keseluruhannya, tidak melalui proses pemerasan, penyaringan, ataupun pengambilan filtrat. Fermentasi garam pada fermentasi tauco lebih pendek daripada fermentasi garam untuk pembuatan kecap.

6.6.2 Fermentasi dan Mikroorganisme

Seperti halnya pada fermentasi kecap, fermentasi tauco terdiri dari dua tahap fermentasi, yaitu fermentasi kapang dan fermentasi garam. Persiapan kedelai untuk fermentasi kapang sama dan *starter* yang digunakan sama. Selama proses fermentasi berlangsung, komponen di dalam bahan baku pembentuk tauco mengalami perombakan karena adanya aktivitas enzimatik yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Kapang yang sering digunakan dalam proses fermentasi pembuatan tauco yaitu *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, dan *Rhizopus oligosporus* (Nuraida 2019). Beberapa pengrajin menggunakan laru tempe sebagai *starter* fermentasi kapang pada pembuatan tauco. Pengrajin lainnya menggunakan kedelai yang sudah terfermentasi sebelumnya sebagai kultur *starter*. Fermentasi kapang dimulai dengan perendaman kedelai selama semalam, diikuti dengan pengupasan, perebusan, penirisan dan pendinginan pada nampan bambu. Beberapa pengrajin mencampur kedelai dengan tepung beras yang sudah disangrai, lalu diinokulasi dengan laru tempe atau kedelai yang sudah terfermentasi sebelumnya. Nampan bambu lalu ditempatkan di ruang inkubasi selama 3–5 hari. Setelah fermentasi selesai, kedelai yang sudah menyatu dilepaskan menjadi bagian-bagian kecil, lalu dijemur dan dilanjutkan dengan fermentasi garam dalam 20% larutan garam selama 20–30 hari.

Secara tradisional, fermentasi garam dilakukan dalam gentong tanah dan ditutup dengan tampah. Selama fermentasi garam dilakukan penjemuran dan pengadukan kedelai. Penambahan garam bertujuan meningkatkan daya tahan produk terhadap organisme pembusuk, sehingga hanya mikroorganisme yang

diinginkan yang tumbuh, meningkatkan cita rasa produk, menyeleksi aktivitas mikroorganisme, dan mengembangkan aroma dan rasa oleh khamir dan bakteri asam laktat (Hesseltine dan Wang 1972). Setelah fermentasi garam selesai, bubur kedelai ditambah gula merah dan dimasak sampai membentuk pasta. Selain menambahkan gula, beberapa pengrajin juga menambahkan rempah-rempah selama pemasakan. Tauco pasta dijual dalam botol atau kemasan plastik (Gambar 6.9). Untuk membuat tauco kering, tauco disebar pada tampah (nampan bambu) lalu dijemur.



Gambar 6.9 Tauco

6.6.3 Perubahan Kimia

Selama proses fermentasi, kapang akan menghasilkan enzim hidrolitik, seperti enzim amilase, lipase, dan protease yang akan memecah protein, lemak, dan pati menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Shurtleff dan Aoyagi 1976). Kapang tauco, *R. oligosporus* yang sering digunakan dalam fermentasi kapang pada pembuatan tauco, memproduksi enzim lipase sebagai pemecah karbohidrat (Djayasupena *et al.* 2014). Selama fermentasi garam dan pemeraman, protein kedelai lebih lanjut dihidrolisis oleh enzim protease yang diproduksi oleh kapang. Bersamaan dengan itu, terjadi fermentasi asam laktat oleh bakteri asam laktat dan fermentasi alkohol oleh khamir. Asam amino dan garamnya, terutama sodium glutamat berkontribusi terhadap *flavor* tauco (Nout *et al.* 2007). Proses yang terjadi selama fermentasi menyerupai proses yang terjadi pada fermentasi moromi pada pembuatan kecap.

6.6.4 Manfaat Kesehatan

Komposisi kimia tauco dapat dilihat pada Tabel 6.4. Tauco mengandung isoflavon dalam bentuk isoflavon aglikon (bebas) yang aktif dalam jumlah melimpah (Chen dan Wei 2008). Dalam kedelai terdapat glukosida daidzin dan genistin, sehingga tauco berpotensi mengandung senyawa aglikon yaitu daidzein dan genistein. Kedua isoflavon aglikon ini mampu membantu menurunkan osteoporosis (Angulo *et al.* 2008), menurunkan kadar kolesterol darah (Achi 2005), menghambat perkembangan sel kanker dan angiogenesis (Amirthaveni dan Vijayalakshmi 2000), serta berbagai manfaat lainnya.

Tabel 6.4 Komposisi gizi tauco dihitung per **100 g**, dengan **Berat Dapat Dimakan (BDD) 100 %**

Zat Gizi	Kandungan
Air	11,4 g
Energi	347 Kal
Protein	7,4 g
Lemak	5,2 g
Karbohidrat	67,6 g
Serat	3,2 g
Abu	8,4 g
Kalsium (Ca)	63 mg
Fosfor (P)	106 mg
Besi (Fe)	6,2 mg
Karoten total	936 mcg
Thiamin (Vit. B1)	0,35 mg
Vitamin C	0 mg

Sumber: Data Komposisi Pangan Indonesia (<https://www.panganku.org/id-ID/view>).

6.7 Angkak

6.7.1 Deskripsi

Angkak atau dikenal dengan nama lain *Red Mold Rice (RMR)*, *red yeast rice (RYR)*, *red fermented rice*, *red koji*, *red koji rice*, *beni-koji* (Jepang), *hung-chu*, *hong qu*, *zhitai* (Cina), *rotschimmelreis* (Eropa), *red mould* (USA) adalah produk

fermentasi dengan bahan baku beras yang difermentasi menggunakan fungi *Monascus* sp. Beras yang telah difermentasi akan menjadi angkak dengan warna merah. Pigmen yang dihasilkan pada angkak bergantung kepada galur, media, dan waktu fermentasi yang dilakukan (Danuri 2008). Zat warna pada angkak merupakan pigmen merah yang dihasilkan oleh *Monascus purpureus* sebagai metabolit sekunder. *Monascus* sp. menghasilkan 6 pigmen utama yang berasal dari poliketida (Manan *et al.* 2017) yang menghasilkan tiga warna utama, yaitu kuning, oranye, dan merah (Zubaidah dan Sari 2015).

Angkak banyak digunakan di negara-negara Asia. Produk ini pertama kali difermentasi di Cina pada masa dinasti Tang (Kawuri 2013). Pada mulanya produksi angkak dirahasiakan. Angkak digunakan sebagai pewarna keju dan minuman yang disebut anchu (Pattanagul *et al.* 2007). Di Filipina angkak juga digunakan sebagai pewarna bagoong, produk serupa terasi, dan minuman beralkohol. Saat ini pada beberapa tempat lainnya, angkak dipakai sebagai pewarna minuman alami untuk minuman beralkohol, keju, daging, dan ikan, serta untuk kepentingan medis. Angkak dapat digunakan sebagai pewarna makanan karena sifat pigmennya yang stabil, memiliki kelarutan yang tinggi, tidak mengandung racun, serta mudah dicerna di dalam tubuh. Pigmen angkak juga memiliki aktivitas sebagai antimikroba sehingga dapat memperpanjang masa simpan makanan (Susetyo *et al.* 2016).

6.7.2 Fermentasi dan Mikroorganisme yang Berperan

Pembuatan angkak (Gambar 6.10) diawali dari pencucian beras menggunakan air dan direndam selama 1 jam, kemudian dikukus dan dibiarkan dingin sampai suhu 55–58°C (Kawuri 2013). Selanjutnya dilakukan inokulasi dengan spora *Monascus purpureus* atau bubuk RMR dengan perbandingan 0,4–0,6%, dicampur hingga merata dan didiamkan selama 7 hari pada temperatur ruang. Proses fermentasi mengakibatkan temperatur naik dan selama itu beras dibolak-balik untuk menjaga temperatur antara 35–45 °C. Beras secara bertahap akan berubah warna menjadi merah dan beras telah ditumbuhi kultur dengan sempurna jika warna luar beras menjadi merah tua keunguan dan warna merah sampai ke dalam biji beras. Kelembapan yang ideal untuk produksi pigmen pada substrat padat adalah sekitar 56% dengan pH 6. Selama proses fermentasi angkak, pigmen-

pigmen warna terbentuk berturut-turut. Pada awal fermentasi, hifa *M. purpureus* berwarna kuning, kemudian bagian askomata menghasilkan warna pigmen jingga (oranye) dan bagian askomata dewasa menghasilkan warna pigmen merah (Permana *et al.* 2004).



Gambar 6.10 Angkak

Menurut Pattanagul *et al.* (2007), *Monascus* menghasilkan enam jenis pigmen yang dibagi menjadi 3 grup. Ketiga grup tersebut adalah:

1. Pigmen oranye, dinamakan monascorubrin ($C_{23}H_{30}O_5$) dan rubropunctanin ($C_{21}H_{22}O_5$)
2. Pigmen kuning, dinamakan ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$) dan monascin ($C_{21}H_{26}O_5$)
3. Pigmen merah, dinamakan monascorubramin ($C_{23}H_{27}NO$) dan rubropunctamine ($C_{21}H_{23}NO_4$).

Monascus sp. merupakan fungi dari genus *Monascus*, keluarga *Monascaceae* dan kelas *Ascomycetes* (Kuo *et al.* 2009; Liu 2006). Genus *Monascus* terdiri dari 9 spesies, yaitu *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber*, *M. floridanus*, *M. argentinensis*, *M. eremophilus*, *M. lunisporas*, *M. pallens*, dan *M. sanguineus* (Manan *et al.* 2017). Tiga spesies dari genus *Monascus*, yaitu *M. purpureus*, *M. ruber*, dan *M. pilosus* sering digunakan untuk memproduksi angkak. Pada kondisi tertentu, kapang ini akan memproduksi berbagai metabolit sekunder (pigmen, citrinin, monacolin K, dan lain-lain) yang dikarakterisasi memiliki struktur poliketida dan aktivitas

biologis (Patakova 2013). Selama proses fermentasi, *Monascus* akan mengubah substrat berpati menjadi beberapa metabolit seperti alkohol, senyawa antibiotik, senyawa antihipertensi, enzim, asam lemak, senyawa pemberi rasa, flokulan, keton, asam organik, pigmen, mevinolin, citrinin, dan vitamin (Pattanagul *et al.* 2007).

Jenis dan komposisi medium fermentasi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap produksi pigmen angkak. Medium fermentasi angkak yang baik adalah media dengan kandungan amilosa tinggi namun rendah amilopektin. Beras merupakan substrat yang sering digunakan dalam proses fermentasi oleh kapang *Monascus* untuk menghasilkan kadar pigmen merah optimum. Meski berbagai jenis beras dapat digunakan sebagai bahan baku angkak, namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa beras biasa memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan beras ketan, sebab melekatnya butiran antar beras ketan menghalangi pertumbuhan *Monascus purpureus*. Selain beras terdapat substrat lain yang digunakan sebagai medium seperti gandum dan jagung (Carvalho *et al.* 2005). Ketersediaan nitrogen juga menjadi faktor penting dalam produksi angkak. Pembuatan angkak tradisional tidak memerlukan penambahan sumber nitrogen karena selain menjadi sumber karbon, beras juga mengandung 5–8% protein (basis kering).

Pertumbuhan mikroba penghasil pigmen dipengaruhi oleh karbon, nitrogen, vitamin, mineral, dan faktor lingkungan seperti oksigen, pH, kelembapan, dan suhu (Timotius 2004). Kisaran suhu optimal yang diperlukan yaitu antara 28–32°C bergantung pada strain mikroba yang berperan dalam produksi angkak. Untuk keperluan produksi pigmen, suhu yang lebih tinggi mungkin lebih memadai (Carvalho *et al.* 2003). Strain genus *Monascus* tidak mampu tumbuh secara anaerobik, tetapi dapat tumbuh dalam kondisi oksigen yang terbatas. Kondisi tersebut menyebabkan produksi etanol dan CO₂ yang lebih tinggi namun produksi pigmen yang lebih rendah. Produksi pigmen akan meningkat pada kondisi aerasi yang lebih tinggi. Pastrana (1995) melaporkan bahwa peningkatan tekanan parsial CO₂ dapat meningkatkan produksi pigmen. Nilai pH awal fermentasi juga berpengaruh terhadap angkak yang dihasilkan. Mikroba yang berperan dalam produksi angkak tumbuh lebih baik pada pH 4,0. Meskipun pertumbuhan optimalnya pada pH 4, biomassa yang dihasilkan akan lebih tinggi pada pH 6,5.

Metode fermentasi yang digunakan juga perlu diperhatikan sebab akan memengaruhi produksi angkak. Terdapat dua metode fermentasi yang dapat digunakan dalam fermentasi angkak yaitu fermentasi substrat padat dan fermentasi cair. Menurut Lee dan Chen (1995), produksi pigmen *Monascus* secara tradisional dilakukan dengan fermentasi substrat padat, sedangkan produksi secara industri dilakukan dalam fermentasi cair. Pada fermentasi padat, pengendalian aerasi, kelembaban, suhu, dan pH lebih sulit dilakukan, sedangkan pada fermentasi cair pengendalian lebih mudah dilakukan. Selain itu, fermentasi cair dinilai fleksibel karena dapat menggunakan fermentor yang sama untuk beberapa proses, sehingga lebih efisien untuk industri. Pada proses fermentasi angkak secara tradisional, metode fermentasi padat lebih disukai. Terdapat beberapa keuntungan dalam produksi pigmen *Monascus* oleh fermentasi padat dibandingkan dengan fermentasi cair. Fermentasi substrat padat menyajikan habitat yang lebih memadai untuk kapang (Pandey *et al.* 2001; Soccol dan Vandenberghe 2003), dengan produktivitas pigmen yang tinggi dalam proses yang relatif murah, sebab fermentasi dapat dilakukan menggunakan nampian.

6.7.3 Manfaat Kesehatan

Proses fermentasi menyebabkan peningkatan kandungan senyawa fungsional pada angkak. Salah satu kandungan bioaktif dari angkak adalah pigmen hasil fermentasi. Pigmen tersebut memiliki kandungan antosianin dari golongan flavonoid. Golongan ini memiliki sifat sebagai antioksidan dan diketahui dapat berperan dalam pencegahan kanker. Senyawa lain yang juga terdapat pada angkak terdiri atas saponin, triterpenoid, terpenoid, kumarin, flobatanin, dan flavonoid. Keseluruhan senyawa ini merupakan antioksidan yang potensial (Kongbuntad dan Saenphet 2016). Lovastatin pada angkak yang merupakan hasil metabolit sekunder *Monascus purpureus* dilaporkan mampu menurunkan kolesterol. Zubaida dan Sari (2015) menyatakan bahwa lovastatin adalah senyawa statin yang merupakan senyawa inhibitor kompetitif HMG-KoA (3-hidroksi-3 metilglutaril Koenzim A) reduktase, yang dapat membantu menurunkan kadar kolesterol. Penelitian menunjukkan bahwa zat warna yang terdapat pada angkak mempunyai aktivitas antiproliferasi (Zhang *et al.* 2010), antitumor potensial (Hsu *et al.* 2011), antidiabetes, antioksidatif stres (Shi *et al.* 2012), anti-inflamasi

(Hsu *et al.* 2012; Hsu *et al.* 2013), dan antiobesitas (Lee *et al.* 2013). Angkak juga dikenal berperan dalam pengobatan dengan meningkatkan kadar trombosit darah pada penderita penyakit demam berdarah (DBD) (Kawuri 2013).

6.8 Kapang pada Fermentasi Keju

Keju merupakan salah satu produk pangan yang diperoleh dari koagulasi protein susu (Khalish *et al.* 2020). Saat ini terdapat berbagai jenis keju, dan sebagian besar varietas keju dikonsumsi setelah mengalami pemeraman. Pada proses pemeraman terjadi perubahan cita rasa dan tekstur. Perubahan tersebut disebabkan adanya pemecahan protein menjadi peptida sederhana dan asam amino, pemecahan lemak menjadi asam lemak dan asam volatil seperti asam asetat dan propionat, fermentasi laktosa, sitrat, serta bahan organik lainnya menjadi asam-asam ester, alkohol, komponen cita rasa, diasetil dan komponen lainnya. Enzim penggumpal susu (renin) dan kultur *starter* berperan penting dalam proses pematangan keju. Endo dan eksoenzim yang dihasilkan oleh bakteri *starter* (lipase dan protease) memberikan aroma dan rasa yang khas pada keju. Jenis mikroorganisme yang digunakan bervariasi tergantung pada jenis keju. Mikroorganisme ini dapat diterapkan baik tunggal atau dalam bentuk kombinasi bakteri dan khamir (Uraz dan Özer 2014). Kultur *starter* bakteri asam laktat bertanggung jawab atas pembentukan rasa keju. Peran utama kultur *starter* adalah untuk menghasilkan asam selama pembuatan dan berkontribusi juga pada proses pematangan keju (Assefa dan Hailu 2019).

Pembuatan keju dapat menggunakan dua macam enzim penggumpal susu, yaitu renin sapi dan renin *M. pusillus*. Rennet adalah ekstrak dari perut keempat (abomasum atau *rennet-bag*) hewan ruminansia, terutama anak sapi dan sapi dewasa, yang memiliki kemampuan untuk menggumpalkan susu melalui kerja enzim (Assefa dan Hailu 2019). Proses pembuatan keju dapat dilakukan sebagai berikut: susu dipasteurisasi pada suhu 72–73 °C selama 15 menit, didinginkan sampai 37°C, diinokulasi dengan starter keju, kemudian dibiarkan selama 5 jam. Kultur *starter* keju bervariasi tergantung dari jenis keju yang akan dibuat. Sebagai contoh, *starter* mesofilik yang banyak digunakan adalah *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, dan *L. lactis* subsp. *cremoris* (Kongo 2013).

Setelah inkubasi, tahapan selanjutnya adalah koagulasi. Koagulasi dilakukan dengan penambahan enzim renin sebanyak 2,5% (v/v) dengan aktivitas koagulasi 100 U/ml sambil diaduk perlahan-lahan pada pemanasan 40 °C. Pengadukan disertai pemanasan dilakukan selama beberapa menit, kemudian dibiarkan sampai susu membentuk koagulum (*curd* atau tahu susu). Koagulum yang terbentuk dipotong kecil-kecil dan ditiriskan agar *whey* terpisah dari koagulum. Selanjutnya koagulum diperas dengan tekanan yang bertahap mulai dari 2 kg/cm² sampai 8 kg/cm² selama sekitar 20 menit. Kemudian koagulum dipanaskan pada suhu 40°C selama 2 jam dan ditiriskan selama 2 jam. Keju dikemas dan disimpan dalam lemari pendingin, siap digunakan lebih lanjut (Amen *et al.* 2020).

Keju diperam dengan menggunakan bakteri atau kapang sebagai kultur *starter* sekunder. *Penicillium* sp. (misalnya *P. camemberti* dan *P. roqueforti*) juga banyak digunakan dalam pembuatan keju yang dimatangkan/diperam. *P. camemberti* digunakan sebagai *starter* sekunder untuk keju Prancis yang terbuat dari susu sapi, seperti *Camembert*, *Brie*, *Carré de l'Est*, *Neufchâtel*, dan beberapa keju lain yang dihasilkan dari susu kambing. *P. roqueforti* berperan memberikan aroma/ rasa khas pada keju yang terbuat dari susu sapi, seperti *Bleu d'Auvergne*, *Bleu de Bresse*, *Gorgonzola*, *blue Danois*, *Stilton*, *Roquefort* yang terbuat dari susu domba, dan beberapa keju yang dibuat dari susu kambing. Meskipun tidak umum, *G. candidum* juga digunakan sebagai *starter* pada beberapa keju lunak dan keju *Camembert*, *Pont l'Évêque*, dan *Saint-Nectaire*. Uraz dan Özer (2014) menjelaskan bahwa secara umum terdapat beberapa metode inokulasi kapang untuk pemeraman yang dilakukan sesuai dengan jenis keju, diantaranya:

- a. dengan menambahkan bersama dengan kultur *starter* atau bersama-sama dengan enzim untuk menggumpalkan susu
- b. dengan menambahkan pada air garam (dilakukan untuk penambahan *P. camemberti*)
- c. dengan cara dioleskan ke permukaan keju di ruangan yang dingin (dilakukan untuk penambahan *P. camemberti*, *G. candidum*)
- d. dengan menginokulasikan ke tahu susu sebelum pengepresan (*P. roqueforti*).

Dari sekitar 1000 spesies *Penicillium* yang telah diidentifikasi, hanya terdapat beberapa strain dari spesies tersebut yang memiliki peran penting dalam proses fermentasi keju. *P. camemberti* telah dikenal sejak tahun 1906 (Uraz dan Özer 2014). Laju pertumbuhan *P. camemberti* sama dengan spesies *Penicillium* lainnya, namun lebih rendah dari *P. roqueforti*. Suhu pertumbuhan optimum *P. camemberti* adalah sekitar 20–25 °C, sedangkan suhu pertumbuhan optimum *P. roqueforti* adalah sekitar 35–40 °C. *P. camemberti* dapat tumbuh pada suhu 5 °C, namun suhu tinggi seperti 37 °C menghambat pertumbuhan kapang ini. Di sisi lain, karena kemampuannya untuk tumbuh pada suhu rendah (<5 °C), *P. roqueforti* sering merusak makanan yang didinginkan. *P. camemberti* cukup toleran terhadap garam, tetapi pertumbuhan terhenti pada konsentrasi garam 20%. Pertumbuhan *P. roqueforti* dirangsang pada konsentrasi garam rendah, tetapi pada kondisi konsentrasi garam 6–8% laju pertumbuhan menurun dan pada kondisi konsentrasi garam 20% pertumbuhan akan terhenti. Spesies *Penicillium* lainnya lebih toleran terhadap asam daripada *P. camemberti*. Spesies ini tumbuh dengan baik pada pH rendah yaitu pada kisaran 3,5–6,5. Meskipun *P. roqueforti* tumbuh lebih baik pada pH asam (pH 4), kapang ini menunjukkan aktivitas dalam lingkungan dengan kisaran pH yang lebih lebar dari *P. camemberti* (pH 3,0–10,5) (Uraz dan Özer 2014). Kedua spesies *Penicillium* tersebut (*P. camemberti* dan *P. roqueforti*) mampu memetabolisme senyawa organik dan anorganik. Kemampuan untuk memetabolisme laktosa sangat penting dalam pembuatan keju (Uraz dan Özer 2014).

6.8.1 Keju Camembert

Keju Camembert secara tradisional dibuat dari susu mentah dengan tambahan *starter* mesofilik. Penambahan renin dilakukan saat pH sekitar 6,4 dengan waktu koagulasi sekitar 30–45 menit. Pemindahan koagulum ke dalam cetakan dilakukan dengan sendok (lima sendok per cetakan) baik secara manual maupun menggunakan sistem otomatis. Penirisan secara spontan terjadi melalui lubang yang terdapat pada sisi-sisi cetakan selama jam pertama pada suhu 26–28°C, lalu terjadi penghilangan air dengan cepat pada suhu sekitar 20°C. *Curd*/tahu susu dengan kandungan rendah mineral dengan pH 4,6–4,7 diperoleh setelah penirisan. Keju dicampur dengan garam kering dan diperam selama minimal 21 hari di ruang bawah tanah pada suhu 11–13°C dan kelembapan relatif 90%.

Selain dari susu mentah, keju Camembert juga dapat diproduksi dari susu pasteurisasi. Koagulasi umumnya berlangsung terus menerus dalam sistem produksi tipe Alpma. Koagulum dipotong menjadi kubus berukuran 2–2,5 cm² dan dicetak (manual atau otomatis, dalam berbagai cetakan) 30–50 menit setelah pemotongan. Kemudian potongan tersebut diasinkan dalam air garam (Spinnler 2017).

Modifikasi pembuatan keju peram dengan kapang dilakukan untuk pemenuhan kebutuhan pasar dan distribusi. Jenis keju modifikasi ini disebut keju yang distabilisasi atau keju terlarut (Spinnler 2017). Susu yang telah dipasteurisasi akan digumpalkan dengan renin dalam waktu yang sangat singkat. Koagulum dipotong menjadi kubus, berukuran 0,7–1 cm kemudian diaduk dan dicuci. Bagian dari whey dipisahkan sebelum dicetak. *Starter* yang digunakan terdiri dari *Streptococci* termofilik atau campuran *Streptococci* dan *Lactococci*. *Curd* tahu susu yang diperoleh memiliki keasaman yang lebih rendah dibandingkan dengan PDO (*Protected Designation of Origin*) Camembert de Normandie. Istilah PDO diberikan pada keju tradisional di Italia yang merujuk pada daerah dan area produksi keju khusus yang memiliki keterkaitan dengan area geografis dan hanya diproduksi di daerah tersebut. Keju PDO memiliki tekstur yang lembut dan matang (diperam) dalam waktu yang relatif singkat, dengan rasa yang lebih ringan daripada Camembert tradisional dan sifat penyimpanan yang lebih baik.

6.8.2 Mikrobiologi

Wolfe *et al.* (2014) menyatakan bahwa komposisi dan evolusi flora kapang pada permukaan keju yang matang sangat kompleks, terutama ketika menggunakan bahan baku susu mentah. Salah satu contohnya adalah keragaman mikroorganisme pada keju Camembert tradisional. Parameter garam, aktivitas air, dan pH yang berbeda pada proses teknologi pembuatan keju akan menghambat sebagian besar pertumbuhan mikroba, tetapi flora kapang dan bakteri dari keju yang dimatangkan tetap sangat beragam. Pada keju dengan bahan baku susu mentah, perlakuan fisikokimia akan menyeleksi mikroba yang berperan, sedangkan pada keju berbahan susu pasteurisasi, sebagian besar mikroorganisme ditambahkan ke susu sebagai *starter*. Beragam mikroorganisme seperti bakteri asam laktat, *P. camemberti*, khamir, *Geotrichum candidum*, dan bakteri *Coryneform*

menghasilkan senyawa berbeda. Senyawa-senyawa yang dihasilkan tersebut bertanggung jawab untuk fungsi yang berbeda seperti perubahan tekstur, rasa, warna, aktivitas antimikroba, dan kualitas sensori. Hal ini membuktikan bahwa keragaman mikroorganisme yang berperan merupakan bagian penting dalam proses fermentasi keju (Wolfe *et al.* 2014).

Suksesi mikroorganisme ditentukan oleh perubahan kimia di lingkungan. Pada awal proses, bakteri asam laktat (terutama *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* dan *L. lactis* ssp. *cremoris*) akan menurunkan pH untuk menyeleksi mikroorganisme asidofilik seperti khamir dan kapang berfilamen (Spinnler 2017). Kapang tumbuh pada permukaan dan distimulasi oleh oksigen, kemudian memetabolisme asam laktat pada tahu susu, meningkatkan pH dan menciptakan kondisi yang sesuai untuk bakteri-bakteri yang berperan pada proses pematangan keju. Nilai pH 5,8 dianggap sebagai batas, sebab di bawah pH tersebut bakteri yang berperan pada pematangan tidak dapat tumbuh (Spinnler 2017). Untuk memperbaiki kualitas keju Camembert yang dibuat dari susu pasteurisasi, strain *Geotrichum candidum* dan khamir yang terpilih ditambahkan ke dalam susu sebelum koagulasi sehingga produk mendekati keju Camembert tradisional. *Debaryomyces hansenii* dan *Kluyveromyces marxianus* biasanya ditambahkan karena memproduksi flavor dengan karakteristik yang berbeda. *Geotrichum* sangat sensitif terhadap garam sehingga proses penggaraman kering akan menghentikan pertumbuhannya. Khamir akan menghidrolisis protein dan lemak sehingga membantu pembentukan curd dan pertumbuhan *Penicillium*. Setelah 6–7 hari pemeraman, pertumbuhan *P. camemberti* terlihat dan miselium menutupi seluruh permukaan keju dengan warna putih. Pertumbuhan *P. camemberti* sangat cepat dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya yang berperan dalam pemeraman. *P. camemberti* berperan penting dalam pembentukan karakteristik keju, sedangkan mikroorganisme lainnya berperan sebagai pelengkap dalam pembentukan kualitas sensori, terutama *flavor* tradisional (Spinnler 2017).

Daftar Pustaka

- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2018. Rata-rata konsumsi per Kapita seminggu beberapa macam bahan penting, 2007-2018. [Internet] [diakses 31 Maret 2020] tersedia pada <https://www.bps.go.id/statictable/2014/09/08/950>.
- Abalunan, April JF, Teves FG, Madamba MRSB. 2013. Isolation of fungal spesies and aflatoxin detection in fermented product. *Int Res J Biol Sci.* 2(4):51-54.
- Achi OK. 2005. The potential for upgrading traditional fermented foods through biotechnology. *Afr J Biotechnol.* 4(5):375-380.
- Amen O, Jumiono A, Fulazzaky MA. 2020. Penjaminan mutu dan kehalalan produk olahan susu. *Jurnal Pangan Halal.* 2(1):42-48
- Amirthaveni S, Vijayalakshmi P. 2000. Role of soyflour supplementation on lipid profile among cardiovascular patients. Prosiding "TSPUC-III" October 15-20. *Tsukuba, Japan*, hlm 185-186.
- Angulo BPI, Vergudo MNM, Cuevas REO, Carrilo JM, Escobedo RM, Valenzuela JAL, Tiznado JAG, Moreno CR. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum l.*) nutritional and physicochemical properties. *Food Chem.* 107:106-112.
- Assefa B, Hailu R. 2019. The role of *starter* culture and enzymes/rennet for fermented dairy products manufacture-A review. *Nutr Food Sci Int J.* 9(2):555756.
- Astuti M, Andreanyta M, Dalais SF, Wahlqvist ML. 2000. Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pac J Clin Nutr.* 9:322-325.
- Ayu E, Suwanto A, Barus T. 2014. *Klebsiella pneumoniae* from Indonesian tempeh were genetically different from that of pathogenic isolates. *Microbiol Indones.* 8(1):2.
- Babu PD, Bhakayaraj R, Vidhyalakshmi R. 2009. A low cost nutritious food "tempeh"- A review. *World J Dairy Food Sci.* 4(1):22-27.
- Barus T, Suwanto A, Tri Wahyudi A, Wijaya H. 2008. Role of bacteria in tempe bitter taste formation: Microbiological and molecular biological analysis based on 16s rRNA gene. *Microbiol Indones.* 2(1):17-21.

- Barus T, Maya F, Hartanti AT. 2019. Peran beberapa galur *Rhizopus microsporus* yang berasal dari "laru tradisional" dalam menentukan kualitas tempe. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 8(1):17–22.
- Bavia ACF, DaSilva CE, Ferreira MP, Santos-Leite RS, Mandarino JMG, CarraoPanizzi MC. 2012. Chemical composition of tempeh from soybean cultivars specially developed for human consumption. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas*. 32(3):613–620.
- Betancur-Ancona D, Segura-Campos M, Rosado-Rubio G, Franco LS, Chel-Guerrero L. 2012. Chemical composition and anti-nutritional factors in five tropical legume seeds. *Beans: Nutrition, Consumption and Health*. 117-141.
- Beuchat LR. 1976. Fungal fermentation of peanut press cake. *Econ Bot*. 30:227.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 1999. SNI 01-3543-1999 Standar Nasional Indonesia Kecap kedelai. ICS 67.060. Badan Standardisasi Nasional.
- Carvalho JC, Oishi BO, Pandey A, Soccol CR. 2005. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Braz Arch Biol Technol*. 48(6):885-894.
- Carvalho JC, Pandey A, Babitha S, Soccol CR. 2003. Production of *Monascus* biopigments: An overview. *Agro Food Ind Hi Tech*. 14(6):37-42.
- Chen TR, Wei QK. 2008. Analysis of bioactive aglycone isoflavones in soybean and soybean products. *Nutr Food Sci*. 36(6):540-547.
- [CAC] Codex Alimentarius Commission. 2013. Regional Standard for Tempe CXS 313R-2013. FAO-WHO.
- Danuri H. 2008. Optimizing angkak pigments and lovastatin production by *Monascus purpureus*. *Hayati J Biosci*. 15(2):61-66.
- Dendougui F, Schwedt G. 2004. In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. *Eur Food Res Technol*. 219:409–415.
- Djayasupena S, Korinna GS, Rachman SD, Pratomo U. 2014. Potensi tauco sebagai pangan fungsional. *Chimica et Natura Acta*. 2(2):137-141.

- Efriwati, Suwanto A, Rahayu G, Nuraida L. 2013. Population dynamics of yeasts and lactic acid bacteria (LAB) during tempeh production. *Hayati J Biosci.* 20(2):57-64.
- Ekanayake S. 2006. *Canavanine Content in Swordbeans (Canavalia gladiata): Analysis and Effect of Processing*. Nugegoda (LK): University of Sri Jayewardenepura.
- Gandjar IW, Sjamsuridzal, Oetari A. 2006. *Mikologi*. Jakarta (ID): Yayasan Obor Indonesia.
- Gao X, Chui C, Zhao HF, Zhao M, Yang L, Ren JY. 2010. Changes in volatile aroma compounds of traditional Chinese-type soy sauce during moromi fermentation and heat treatment. *Food Sci Biotechnol.* 19:889–898.
- Gao X, Cui C, Ren J, Zhao H, Zhao Q, Zhao M. 2011. Changes in the chemical composition of traditional Chinese-type soy sauce at different stages of manufacture and its relation to taste. *Int J Food Sci Technol.* 46:243–249.
- Ghosh B, Ray RR. 2011. Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: A review. *J Appl Sci.* 11(14):2470–2486.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 37(2):123-131.
- Hamzah F, Hamzah FH. 2011. Kadar zat gizi dalam tempe benguk. *Agriplus.* 21(1):26-29.
- Hernandez LL, Torob CR, Ruiza HA, Valdesa JAA, Gonzalezc MAA, Herreraa RR, Aguilar CN. 2017. *Rhizopus oryzae* – ancient microbial resource with importance in modern food industry. *Int J Food Microbiol.* 257:110–127.
- Hesseltine CW, Wang HL. 1972. Fermented soybean food products. Di dalam: Smith AK, Circle SJ (Eds). *Soybean: Chemistry and Technology*. Westport, Connecticut (US): The AVI Publ. Co., Inc.
- Hsu LC, Hsu YW, Liang YH, Pan TM. 2011. Anti-tumor and antiinflammatory properties of ankaflovins and monaphilones from *Monascus purpureus* NTU 568. *J Agric Food Chem.* 59(4):1124-1130.

- Hsu WH, Lee BH, Liao TH, Hsu YW, Pan TM. 2012. Monascus fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR- γ regulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes. *Food Chem Toxicol.* 50:1178-1186.
- Hsu LC, Liang YH, Hsu YW, Kuo YH, Pan TM. 2013. Antiinflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. *J Agric Food Chem.* 61:2796-2802.
- Indrastuti RW. 2016. Cassava and tofu solid waste as substrate formulation for amylase production by *Aspergillus niger* and *Neurospora crassa*. *Int J Eng Eco Soc Pol Gov.* 1(1):17-24.
- Jay JM. 2000. *Modern Food Microbiology*. Gaithersburg, Maryland (US): Aspen Publisher, Inc.
- Kalidas C, Mahapatra MK. 2014. Evaluation of the proximate and phytochemical compositions of an underexploited legume *Mucuna pruriens* var. *utilis* (Wall ex Wight) LH Bailey. *Int Food Res J.* 21(1):303-308.
- Kanti A, Sudiana IM. 2016. Comparison of *Neurospora crassa* and *Neurospora sitophila* for phytase production at various fermentation temperatures. *Biodiversitas.* 17:769-775.
- Kasmidjo RB. 1990. *Tempe: Mikrobiologi dan Biokimia Pengolahan Serta Pemanfaatannya*. Yogyakarta (ID): PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Kawuri R. 2013. Red mold rice (angkak) sebagai makanan terfermentasi dari China: suatu kajian pustaka. *Jurnal Biologi.* 17(1):24-28.
- Khalish LH, Andarwulan N, Koswara S, Talitha ZA. 2020. Formulasi dan tingkat kesukaan terhadap es krim keju dengan menggunakan berbagai keju lunak (cream cheese, ricotta, dan camembert). *Jurnal Mutu Pangan.* 7(2):90-97.
- Kongbuntad W, Saenphet S. 2016. Effects of red mold rice produced from *Monascus purpureus* CMU002U on growth performances and antioxidant activity of Japanese quail. *Int J Poult Sci.* 15(1):8-14.
- Kongo, JM, 2013. Lactic acid bacteria as *starter*-cultures for cheese processing: past, present and future developments. Di dalam: Kongo JM (ed.). *Lactic Acid Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. London (UK): Intertechopen.

- Koswara S. 1997. Mengenal makanan tradisional. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan* 8(2):1-6.
- Kuka E, Cirule D, Andersone I, Andersons B, Fridrihsone V. 2022. Conditions influencing mould growth for effective prevention of wood deterioration indoors. *Appl Sci.* 12: 975. 13 hal.
- Kuo CF, Chyau CC, Wang TS, Li CR, Hu TJ. 2009. Enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Monascus pilosus* fermented products by addition of turmeric to the medium. *J Agric Food Chem.* 57:11397-11405.
- Kurniasari R, Sulchan M, Afifah DN, Anjani G, Rustanti N. 2017. Influence variation of tempe gembus (an Indonesian fermented food) on homocysteine and malondialdehyde of rats fed an atherogenic diet. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis.* 24(3):203-211.
- Kusharyanto, Budiyo A. 1995. Upaya Pengembangan Produk Tempe dalam Industri Pangan. Prosiding Simposium Nasional Pengembangan Tempe dalam Industri Tempe Modern. Jakarta (ID): Yayasan Tempe Indonesia.
- Laksmi DNDI, Setiasih NLE, Trilaksana IGNB. 2021. Effect of oncom extract on the level of estrogen hormone of productive white rats. *Bali Med J.* 10(2):559-561.
- Lee YK, Chen DC. 1995. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. *J Ferm Bioeng.* 79:516-518.
- Lee CL, Wen JY, Hsu YW, Pan TM. 2013. *Monascus*-fermented yellow pigments monascin and ankaflavin showed antiobesity effect via the suppression of differentiation and lipogenesis in obese rats fed a high-fat diet. *J Agric Food Chem.* 61:1493-1500.
- Liu J. 2006. Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Chin Med.* 1:1-13.
- Mahfudz LD, Sarengat W, Prayitno DN, Atmomarsono U. 2004. Ampas tahu yang difermentasi dengan laru oncom sebagai pakan ayam ras pedaging. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Semarang (ID): Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro.

- Manan MA, Mohamad R, Ariff A. 2017. *Monascus* spp.: A source of natural microbial color through fungal biofermentation. *J Microbiol Exp.* 5(3):00148
- Matsuo M. 2006. Chemical components, palatability, antioxidant activity and antimutagenicity of oncom miso using mixture of fermented soybean and okara with *Neurospora intermedia*. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52:216–222.
- Meutia YR. 2015. Standardisasi produk kecap kedelai manis sebagai produk khas Indonesia. *Jurnal Standardisasi.* 17(2):147-156.
- Nisa AK. 2016. Isolasi dan Identifikasi Khamir Asal Tempe serta Uji Aktivitas Enzim β -Glukosidasenya. [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nout, MJR, Rombouts, FM. 1990. Recent Developments in Tempe Research. *J Appl Bacteriol.* 69:609-633.
- Nout MJR, Kiers JL. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *J Appl Microbiol.* 98(4): 789-805.
- Nout MJR, Sarkar PK, Beuchat LR. 2007. Indigenous fermented food. Di dalam: Doyle MP, Beuchat LR. (Ed). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd Ed. Washington DC (US): ASM Press, hlm 817-835.
- Nuraida L. 2016. Health benefit of tempe. Di dalam: Winarno FG, Winarno W, Purnomo SH. (Ed). *Tempe Indonesian Exotic Fermented Food*. Bogor (ID): Mbrio Press, hlm 5-10.
- Nuraida L. 2019. Fermented protein-rich plant-based foods fermented food product. Di dalam: Sankanarayanan A, Amerasan N, Dhanasekaran. *Fermented Food Product*. Boca Raton (US): CRC Press, hlm. 141-166.
- Nurdini A. 2015. Bacterial growth dynamics and identification of culturable dominant lactic acid bacteria during tempe fermentation in two different home industries (in Indonesian). [Master thesis]. Bogor (ID): Bogor Agricultural University.
- Pandey A, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Nigam P. 2001. *Solid State Fermentation in Biotechnology—Fundamentals & Applications* 1st Ed. New Delhi (IN): Asiatech Publishers Inc.

- Pastrana L, Blanc PJ, Santerre AL, Loret MO, Goma G. 1995. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Proc. Biochem.* 30(4):333-341.
- Patakova P. 2013. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40(2):169-181.
- Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhon A, Leksawasdi N. 2007. Review of angkak production (*Monascus purpureus*). *Chiang Mai J Sci.* 34(3):319-328.
- Permana RD, Marzuki S, Tisnadaja D. 2004. Analisis kualitas produk fermentasi beras (Red Fermentation Rice) dengan *Monascus purpureus* 3090. *Biodiversitas* 5(1):7-12.
- Pisol B, Abdullah N, Khalil KA, Nuraida L. 2015. Isolation and identification of lactic acid bacteria from different stages of traditional Malaysian tempeh production. *Malay J Microbiol.* 11(4):358-364.
- Purnamasari N, Andriani M, Kawiji. 2013. Pengaruh jenis pelarut dan variasi suhu pengering spray dryer terhadap kadar karotenoid kapang oncom merah (*Neurospora* sp.). *Jurnal Teknosains Pangan.* 2(1):108.
- Puteri MDPTG, Hassanein TR, Prabawati EK, Wijaya CH, Mutukumira. 2015. Sensory characteristics of seasoning powders from overripe tempeh, a solid-state fermented soybean. *Procedia Chem.* 14:263-269.
- Rahayu A, Suranto P, Tjahjadi. 2005. Analisis karbohidrat, protein, dan lemak pada pembuatan kecap lamtoro gung (*Leucaena leucocephala*) terfermentasi *Aspergillus oryzae*. *Jurnal Bioteknologi.* 2:14-20.
- Rahayu ES, Indrati R, Utami T, Harmayani E, Cahyanto MN. 1993. *Bahan Pangan Hasil Fermentasi*. Yogyakarta: PAU UGM.
- Rahayu NA, Cahyanto MN, Indrati R. 2019. Pola perubahan protein koro benguk (*Mucuna pruriens*) selama fermentasi tempe menggunakan inokulum Raprima. *Agritech.* 39(2): 128-135.
- Rismayanti F, Yuliana A, Khusnul. 2017. Karakterisasi kapang *Monascus purpureus* hasil isolasi dari produk fermentasi angkak yang berada di pasaran. *Jurnal Kesehatan Tunas Bakti Husada.* 17(1): 1-7.

- Roling WFM, Timotius KH, Prasetyo AB, Stouthamer AH, Van Verseveld HW. 1994. Changes in microflora and biochemical composition during the Baceman stage of traditional Indonesian kecap (soy sauce) production. *J Ferment Bioeng.* 77:62–70.
- Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken J, Frisvad JC, Varga J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies Mycol.* 59:129–145.
- Samson RA, Van Kooij JA, De Boer E. 1987. Microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands. *J Food Protect.* 50(2):92–94.
- Seumahu C. 2012. Metagenome analysis to fingerprint bacterial and fungi communities in tempe. [disertasi]. Bogor (ID): Bogor Agricultural University.
- Shi YC, Liao VHC, Pan TM. 2012. Monascin from red mold dioscorea as a novel antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and caenorhabditis elegans. *Free Radic Biol Med.* 52:109-117.
- Singracha P, Niamsiri N, Visessanguan W, Lertsiri S, Assavanig A. 2017. Application of lactic acid bacteria and yeasts as *starter* cultures for reduced salt soy sauce (moromi) fermentation. *LWT.* 78:181–188.
- Soccol CR, Vandenberghe LPS. 2003. Overview of applied solid state fermentation in Brazil. *Biochem Eng J.* 13:205- 218.
- Song Y, Jeong D, Baik S. 2015. Effects of indigenous yeasts on physicochemical and microbial properties of Korean soy sauce prepared by low-salt fermentation. *Food Microbiol.* 51:171-178.
- Sparringa RA, Kendall M, Westby A, Owens JD. 2002. Effects of temperature, pH, water activity and CO₂ concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *J Appl Microbiol.* 92(2):329-337.
- Spinnler H. 2017. Cheese: Surface mold–ripened cheeses. Di dalam: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW (Ed.). *Cheese Chemistry, Physics & Microbiology Fourth edition Volume 1: General Aspects.* Elsevier (ND): Academic Press, hlm 911-928.
- Sugiyama SI. 1984. Selection of micro-organisms for use in the fermentation of soy sauce. *Food Microbiol.* 1(4):339–347.

- Susetyo YA, Hartini S, Cahyanti MN. 2016. Optimasi kandungan gizi tepung ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) terfermentasi ditinjau dari dosis penambahan inokulum angkak serta aplikasinya dalam pembuatan mie basah. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 5(3):56-63.
- Timotius KH. 2004. Produksi pigmen angkak oleh *Monascus*. *Jurnal Teknol. dan Industri Pangan*. 15(1):79-86.
- Tope AK. 2014. Effect of fermentation on nutrient composition and anti-nutrient contents of ground Lima bean seeds fermented with *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus stolonifer* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Adv Res*. 2(7):1208-1215.
- Uraz T, Özer BH. 2014. *Starter cultures: Molds employed in food processing*. Di dalam: Batt CA, Tortorello ML (Eds.). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press. hal. 522-528.
- Utari DM. 2010. Kandungan asam lemak, zink, dan copper pada tempe, bagaimana potensinya untuk mencegah penyakit degeneratif. *Gizi Indones*. 33(2):108–115.
- Wahono F, Abduh SBM, Nurwantoro. 2016. Perubahan konsentrasi biomassa, kadar asam sianida (HCN), pH dan tampilan sensori dari koro pedang selama proses fermentasi 4 hari. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 5(4):123-128.
- Wedhastri S. 1990. Perilaku *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae* pada Kadar Sianogen Biji Koro Benguk (*Mucuna prumens* D.C). [Tesis] Yogyakarta: Pascasarjana UGM.
- Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*. 158:422–433.
- Wu TY, Kan MS, Siow LF, Lithnes Kalaivani Palniandy LK. 2010. Effect of temperature on moromi fermentation of soy sauce with intermittent aeration. *African J Biotechnol*. 9(5):702-706.
- Zamakhsyari I, Alshuhendra, Ridawati. 2018. Pengaruh teknik pemanasan basah dalam pembuatan oncom instan terhadap kualitas tumis oncom. *Jurnal Sains Boga*. 1(1):18–22.

- Zhang L, Zhang L, Xu, Y. 2020. Effects of *Tetragenococcus halophilus* and *Candida versatilis* on the production of aroma-active and umami-taste compounds during soy sauce fermentation. *J Sci Food Agric*. 100:2782–2790.
- Zubaidah E, Sari DP. 2015. Pengaruh penambahan kacang hijau pada media beras IR36 terhadap pigmen dan lovastatin angkak. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(3):962-971.

8. FERMENTASI UNTUK MENINGKATKAN MANFAAT KESEHATAN

8.1 Manfaat Kesehatan Pangan Fermentasi

Pangan fermentasi menjadi bagian diet sehari-hari di berbagai belahan bumi sejak berabad-abad yang lalu. Pangan fermentasi adalah pangan yang diproduksi dengan melibatkan pertumbuhan mikroorganisme yang diinginkan secara terkontrol sehingga terjadi perubahan komponen-komponen pangan secara enzimatik. Proses fermentasi pangan dapat dikategorikan berdasarkan metabolit utama yang dihasilkan dan mikroorganisme yang terlibat, misalnya fermentasi alkohol dan karbondioksida oleh khamir seperti *Saccharomyces cerevisiae*, asam asetat oleh *Acetobacter*, asam laktat oleh BAL seperti *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, dan *Streptococcus*, asam propionat oleh *Propionibacterium freudenreichii*, dan proteolitik (amonia) serta asam lemak oleh *Bacillus* dan kapang seperti *Rhizopus oligosporus*. Produksi pangan seperti yoghurt, susu berkultur, sauerkraut, wine, dan sosis melalui proses fermentasi pada mulanya dilakukan sebagai cara untuk memperpanjang masa simpan bahan baku, meningkatkan keamanan, serta memperbaiki citarasanya. Sanlier *et al.* (2017)



menyatakan bahwa selain mengawetkan pangan, proses fermentasi juga dapat meningkatkan kandungan gizi dari bahan asalnya sehingga memberikan manfaat dalam meningkatkan kesehatan.

Dalam perkembangannya, selain sebagai sumber gizi, pangan fermentasi saat ini dikenal juga sebagai pangan fungsional yaitu pangan yang memberikan manfaat kesehatan konvensional. Perubahan kimia yang terjadi selama proses fermentasi tidak hanya meningkatkan nilai gizi, tetapi memberikan manfaat kesehatan di luar manfaat gizi pada umumnya. Pemecahan komponen yang kompleks menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana menyebabkan produk fermentasi lebih mudah dicerna daripada produk pangan asalnya. Pada beberapa produk fermentasi, dilaporkan pula adanya peningkatan kandungan beberapa vitamin, antioksidan, dan senyawa lain yang bermanfaat bagi kesehatan. Hwang *et al.* (2017) menyatakan proses fermentasi akan meningkatkan sifat organoleptik makanan, pencernaan protein, pencernaan karbohidrat, serta bioavailabilitas vitamin dan mineral. Pertumbuhan mikroorganisme selama fermentasi menghasilkan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas biologis seperti enzim dan peptida bioaktif yang berperan sebagai antioksidan, membantu regulasi tekanan darah, dan membantu memelihara kesehatan. Konsumsi produk susu yang difermentasi berasosiasi dengan pemeliharaan berat badan. Konsumsi yoghurt dalam jangka panjang mengurangi risiko penyakit kardiovaskular, diabetes mellitus tipe 2, memperpanjang usia, memperbaiki metabolisme glukosa dan mengurangi sakit otot setelah olahraga berat (Marco *et al.* 2017). Kimchi telah dilaporkan memiliki manfaat sebagai antidiabetik dan anti-obesitas (An *et al.* 2013).

Nuraida (2015) menyatakan bahwa banyak makanan fermentasi di Indonesia yang dapat digunakan sebagai sumber mikroba potensial, terutama bakteri asam laktat yang mempunyai manfaat kesehatan, seperti penurunan kolesterol, stimulasi sistem kekebalan, dan pencegahan diare. Proses fermentasi sering dikaitkan dengan terbentuknya peptida bioaktif yang merupakan hasil dari degradasi protein oleh mikroba yang terlibat selama proses fermentasi (Peñas *et al.* 2017). Bersama dengan enzim yang dihasilkan seperti lipase, glukoamilase, protease, dan amilase, mikroorganisme yang terlibat dalam proses fermentasi akan meningkatkan nilai gizi substrat anti-nutrisi yang tidak dapat dimakan serta mengubahnya menjadi produk yang dapat dimakan dengan banyak manfaat kesehatan bagi konsumen

(Tamang *et al.* 2016). Sebagai contoh, beberapa efek menguntungkan dari makanan fermentasi yang mengandung probiotik antara lain: (i) meningkatkan kesehatan saluran usus; (ii) meningkatkan sistem kekebalan tubuh, mensintesis dan meningkatkan ketersediaan hayati nutrisi; (iii) mengurangi gejala intoleransi laktosa, menurunkan prevalensi alergi pada individu yang rentan; dan (iv) mengurangi risiko kanker tertentu (Hasan *et al.* 2014).

8.2 Peran Mikroorganisme dalam Peningkatan Bioaktivitas Komponen Pangan

Salah satu senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada sayur dan buah adalah polifenol. Di alam, polifenol umumnya berada dalam bentuk glikosida. Glikosida tersusun dari gugus gula dan aglikon. Beberapa penelitian menunjukkan potensi bioaktivitas yang lebih besar pada aglikon (bentuk bebas) dibandingkan dengan glikosidanya (bentuk terikat dengan gula). Noratiriol (*norathyriol*), aglikon dari mangiferin (senyawa bioaktif yang terdapat pada mangga), dilaporkan memiliki potensi lebih tinggi sebagai antidiabetes (Gu *et al.* 2019) serta antikanker payudara (Wilkinson *et al.* 2015), kolon, dan paru-paru (Souza *et al.* 2020) jika dibandingkan dengan mangiferin. Daidzein, aglikon dari daidzin, dapat dipecah lebih lanjut menjadi equol yang bermanfaat mencegah osteoporosis, kanker, dan penyakit kardiovaskuler (Mayo *et al.* 2019).

Pemecahan ikatan glikosidik antara aglikon dan gugus gula dapat meningkatkan kesiapan senyawa bioaktif untuk dimanfaatkan oleh tubuh. Meski demikian, tidak semua aglikon dapat dibebaskan dengan mudah. Berdasarkan jenis ikatan glikosidiknya atau cara terikat dengan gugus gula, glukosida dapat dikelompokkan menjadi *O*-glikosida, *N*-glikosida, *S*-glikosida, dan *C*-glikosida. *O*-glikosida adalah jenis yang paling banyak diteliti dan dilaporkan, sebab pemecahan ikatan glikosidiknya (ikatan C-O) lebih mudah dilakukan melalui reaksi hidrolisis dan membebaskan air. Contoh dari *O*-glikosida adalah daidzin, genistin, dan glisitin. Dibandingkan dengan *O*-glikosida, senyawa *C*-glikosida lebih jarang diteliti sebab ikatan *C*-glikosil (C-C) lebih resisten terhadap perlakuan asam, basa, dan hidrolisis oleh enzim.

Mikroorganisme berperan dalam meningkatkan bioaktivitas komponen pangan. Peningkatan bioaktivitas komponen pangan seperti membebaskan senyawa aglikon (baik *O*-glikosida maupun *C*-glikosida), juga untuk metabolisme senyawa kompleks menjadi senyawa bioaktif lainnya, dapat dilakukan dengan:

1. Fermentasi produk pangan

Mikroba yang berperan dalam fermentasi pangan akan mendegradasi senyawa-senyawa kompleks menjadi lebih sederhana, dan dapat meningkatkan bioaktivitas senyawa tertentu. Mikroba yang terlibat dalam fermentasi pangan (baik ditambahkan sebagai kultur *starter* maupun sebagai bahan tambahan pangan) dapat pula memiliki sifat probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Konsumsi pangan fermentasi dapat memberikan manfaat kesehatan dari senyawa bioaktif dan/atau bakteri probiotik yang terkandung di dalamnya.

2. Pencernaan dalam tubuh

Selain sebagai sumber nutrisi, makanan yang telah direduksi kompleksitasnya menjadi lebih sederhana juga dapat memberikan fungsi-fungsi kesehatan yang lain. Dalam hal ini, bakteri saluran cerna yang bersifat probiotik berperan penting mengubah senyawa dalam bahan pangan yang dikonsumsi agar memberikan fungsi kesehatan.

3. Biokonversi untuk produksi senyawa dengan potensi bioaktivitas lebih tinggi. Perbedaan mikrobiota dalam saluran cerna antarindividu menyebabkan perlunya produksi senyawa yang memiliki bioaktivitas lebih tinggi. Produksi senyawa bioaktif di luar tubuh dapat dilakukan dengan biokonversi oleh mikroba dengan karakteristik yang spesifik. Senyawa bioaktif yang telah dihasilkan selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan tambahan pangan fungsional sehingga berperan meningkatkan kesehatan individu yang memerlukan.

8.3 Probiotik dalam Pangan Fermentasi

8.3.1 Probiotik dan Manfaatnya

Manfaat kesehatan mikroorganisme dalam pangan fermentasi, khususnya bakteri asam laktat pada susu fermentasi, dimulai dari teori Metchnikoff yang mengaitkan umur panjang dengan konsumsi susu fermentasi. Teori tersebut diperkenalkan pada awal abad ke-20. Dalam bukunya, “*The Prolongation of Life*” yang dipublikasi pada tahun 1907, Ellie Metchnikoff menyatakan bahwa beberapa bakteri dalam saluran pencernaan dapat menghasilkan senyawa toksin yang dapat berkontribusi terhadap penyakit dan penuaan. Metchnikoff menyarankan penggunaan bakteri yang menguntungkan, yaitu bakteri asam laktat, untuk melawan dominasi bakteri patogen dalam saluran pencernaan. Teori tersebut mendasari konsep probiotik yang dikenal pada saat ini.

Mikrobiota manusia terdiri atas bakteri, *archaea*, virus dan mikroba eukariotik yang berada pada badan manusia. Diperkirakan mikrobiota manusia terdiri dari 10^{14} sel bakteri, lebih besar 10 kali lipat daripada sel manusia (Vyas dan Ranganathan 2012). Organ yang dihuni oleh paling banyak mikrobiota adalah saluran pencernaan, yaitu sekitar 70% mikroorganisme pada manusia berada pada saluran pencernaan, dari mulai lambung sampai anus. Tiga bagian utama saluran pencernaan, yaitu lambung, usus kecil dan usus besar memiliki jumlah dan jenis mikrobiota yang berbeda. Mikrobiota lambung merupakan kelompok mikroorganisme Gram positif aerobik ($<10^3$ CFU/g). Usus kecil terutama dihuni oleh genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, dan *Streptococcus* (10^3 - 10^4 CFU/g). Mikrobiota usus besar lebih bervariasi dengan jumlah yang paling banyak, yaitu *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, dan *Eubacterium* (10^{11} - 10^{12} CFU/g) (Quinto *et al.* 2014). Orang dewasa sehat memiliki lebih dari 1000 species bakteri yang didominasi oleh filum *Firmicutes*, *Bacteroidetes* dan *Actinobacteria* (D’Argenio dan Salvatore 2015). Mikrobiota saluran pencernaan memiliki dampak penting terhadap fisiologi manusia, baik kesehatan maupun penyakit. Mikroorganisme ini berkontribusi terhadap fungsi metabolisme, proteksi terhadap infeksi patogen dan secara langsung dan tidak langsung mempengaruhi fungsi fisiologis (Shreiner *et al.* 2015).

Mikroorganisme pada saluran pencernaan manusia berasal dari saluran lahir dan lingkungan, dan akan berkembang sesuai dengan asupan makanan, umur, dan pola hidup. Berbagai faktor seperti stres atau pengobatan dengan antibiotik dapat mengganggu keseimbangan mikrobiota pada saluran pencernaan sehingga menyebabkan disbiosis dan meningkatkan risiko sakit. Upaya pengembalian keseimbangan mikrobiota saluran pencernaan dapat dilakukan dengan pemberian probiotik (Nuraida 2016). Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup dapat memberikan manfaat kesehatan bagi inangnya (FAO/WHO 2001). Probiotik harus mampu melewati saluran pencernaan bagian atas, dapat menempel, dan mampu hidup serta berkembang biak pada saluran pencernaan bagian bawah serta memiliki manfaat kesehatan. Saat ini probiotik yang paling banyak digunakan dan diteliti adalah galur tertentu dari bakteri asam laktat terutama genus *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*, misalnya galur-galur dari *Lb. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, dan *L. plantarum*, serta *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, dan *B. lactis*. Fungsi spesifik probiotik merupakan spesifik strain, tidak dapat digeneralisir untuk semua probiotik. Suatu strain mungkin memberikan manfaat yang berbeda ketika diterapkan sebagai probiotik tunggal atau probiotik campuran dengan strain yang lain. Manfaat kesehatan juga dapat berbeda ketika probiotik diaplikasikan pada kelompok orang yang berbeda. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa komposisi mikrobiota saluran pencernaan dipengaruhi oleh usia, asal daerah, kebiasaan makan, status gizi, dan kesehatan. Oleh karena itu modulasi mikrobiota saluran pencernaan akan memerlukan mikroorganisme yang berbeda untuk setiap kondisi populasi yang berbeda (Nuraida 2016).

Manfaat kesehatan probiotik antara lain mencegah terjadinya infeksi saluran pencernaan oleh bakteri, virus dan protozoa, mencegah diare, mengurangi kolesterol serum, melindungi sistem imun, mencegah kanker, aktivitas antimutagenik, pencegahan IBD (*inflammatory bowel disease*), dan memperbaiki keseimbangan mikrobiota dalam saluran pencernaan setelah pengobatan dengan antibiotik atau karena gangguan pencernaan lainnya (Denkova dan Krastanov 2012). Mekanisme pencegahan dan pengurangan gejala diare karena virus atau diare yang diasosiasikan dengan antibiotik terjadi melalui eksklusi kompetitif, translokasi, atau menghalangi penempelan patogen serta meningkatkan respon imun (Nuraida 2016). Selain fungsi tersebut, probiotik dan mikrobiota saluran

pencernaan juga dapat menghasilkan senyawa yang dapat mempengaruhi kesehatan dalam saluran pencernaan. Mikrobiota saluran pencernaan termasuk probiotik dapat menghasilkan asam lemak rantai pendek dari karbohidrat yang tidak dapat dicerna manusia, dan merupakan sumber energi yang penting untuk mukosa usus dan memodulasi sistem imun (Shreiner *et al.* 2015). *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *L. casei* Shirota, dan *B. animalis* Bb12 telah diteliti dapat menurunkan durasi diare akut karena infeksi rotavirus, *L. rhamnosus* GG, *S. boulardii*, *L. acidophilus*, dan *B. bifidum* mengurangi *traveller diarhea* (Kechagia *et al.* 2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri* DSM 17 938 dan *L. reuteri* VSL#3 secara signifikan mengurangi sakit perut pada anak-anak yang memiliki gangguan pencernaan (Quinto *et al.* 2014).

Di dalam saluran pencernaan, mikrobiota saluran pencernaan dan probiotik dapat melakukan biokonversi senyawa sehingga menjadi lebih aktif, misalnya konversi glikosida menjadi aglikon (Eckburg *et al.* 2005). Biotransformasi senyawa fenolik oleh bakteri probiotik melalui aksi glikosil hidrolase dengan melepaskan aglikon dari senyawa fenolik terkonjugasi glikosil. Keberadaan senyawa fenolik pada saluran pencernaan juga menstimulasi pertumbuhan probiotik pada kolon (de Souza *et al.* 2021).

Pada umumnya bakteri asam laktat yang memiliki manfaat kesehatan adalah bakteri yang sudah beradaptasi dengan saluran pencernaan sehingga dapat bertahan pada kondisi ekstrem saluran pencernaan dan mencapai kolon, tempat probiotik berkolonisasi. Berbagai penelitian terbaru menunjukkan bahwa banyak isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik juga berasal dari pangan fermentasi (Nuraida 2015). Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik telah diisolasi dari pangan fermentasi tradisional seperti tempoyak, mandai, sawi asin, tape ketan, tempe, growol, dadih, gatot, dan bekasam. Sebagian besar bakteri asam laktat yang hadir pada pangan fermentasi tradisional Indonesia adalah genus *Lactobacillus* (Nuraida 2015). Namun demikian, galur tertentu dari genus lain seperti *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weisella*, dan *Leuconostoc* juga ditemukan pada pangan fermentasi tradisional Indonesia dan berpotensi sebagai probiotik.

Konsumsi pangan fermentasi yang mengandung sejumlah sel hidup BAL yang berperan sebagai probiotik dapat memberikan manfaat kesehatan sebagaimana diberikan oleh probiotik. BAL asal pangan fermentasi Indonesia telah diteliti

memiliki manfaat kesehatan, antara lain menurunkan kolesterol, menstimulasi sistem imun, mencegah diare dan infeksi patogen, serta mengendalikan DM tipe 2 (Nuraida 2016). Probiotik dalam buah-buahan dan sayuran yang difermentasi dengan bakteri asam laktat dapat membantu mencegah penyakit tertentu seperti sirosis dan diare, sedangkan antioksidan dalam buah dan sayuran yang difermentasi dapat membantu membersihkan zat radikal bebas berbahaya yang berperan dalam pembentukan penyakit degeneratif (Swain *et al.* 2014). Manfaat tambahan probiotik pada metabolisme usus adalah degradasi laktosa (gula utama yang ada dalam susu) menjadi D-glukosa dan D-galaktosa karena adanya aktivitas laktase. Manfaat yang dihasilkan sangat relevan untuk pasien laktosa intoleran sehingga dapat mengurangi sakit perut, diare, dan perut kembung dan diamati juga setelah konsumsi yoghurt (Zhong *et al.* 2004).

Perkembangan pemanfaatan bakteri asam laktat untuk kesehatan menunjukkan bahwa manfaat kesehatan bisa diperoleh tidak hanya melalui pemberian bakteri hidup atau probiotik, tetapi juga pemberian sel bakteri yang telah diinaktivasi atau komponen sel yang dapat menstimulir sistem imun (Nuraida 2016). Saat ini pemanfaatan bakteri dari pangan fermentasi tidak hanya berasal dari bakteri hidup, namun juga dari bakteri yang tidak *viable* yang disebut para-probiotik dan biomolekul/metabolit atau komponen aktif yang dihasilkan bakteri probiotik pada pangan fermentasi yang disebut postbiotik (Nataraj *et al.* 2020). Postbiotik merupakan campuran komponen seperti enzim, protein lainnya yang dihasilkan, asam lemak rantai pendek, vitamin, asam amino, peptida, asam organik, dan lain sebagainya, sedangkan para-probiotik adalah sel inaktif baik yang masih utuh maupun sudah mengalami lisis. Paraprobiotik dan postbiotik merupakan konsep baru dalam bidang pangan fungsional yang menjanjikan berbagai manfaat kesehatan.

8.3.2 Biokonversi oleh Bakteri Saluran Cerna dan Probiotik dalam Meningkatkan Fungsi Senyawa Bioaktif

Salah satu reaksi dalam saluran cerna yang dapat memengaruhi bioaktivitas senyawa polifenol adalah pemecahan ikatan glikosidik. Selain konversi glikosida melalui proses fermentasi dalam produk pangan untuk konsumsi, konversi glikosida yang terdapat dalam bahan pangan menjadi aglikon juga dapat terjadi

dalam tubuh dengan bantuan bakteri saluran cerna (probiotik). Kemampuan bakteri probiotik mengonversi suatu senyawa dipelajari menggunakan feses sebagai sampel, sebab mikrobiota feses merepresentasikan populasi mukosal dan luminal (Eckburg *et al.* 2005).

Vollmer *et al.* (2018) dalam studinya dengan sampel feses yang mengandung bakteri pencernaan dari tiga orang donor melaporkan kemampuan sampel untuk memecah ikatan pada kaempferol-*O*-diglukosida menjadi aglikon kaempferol serta vitexin (apigenin-*C*-glikosida) menjadi aglikon kaempferol. Konversi *C*-glikosida lainnya yaitu puerarin (daidzein-*C*-glikosida) oleh suspensi fekal bakteri saluran cerna manusia, dengan ataupun tanpa dikulturkan dilaporkan oleh Lee *et al.* (2002); Park *et al.* (2006); serta Braun dan Blaut (2011). Beberapa studi tersebut menunjukkan bahwa ikatan *C*-glikosil pada glikosida yang diketahui memiliki resistensi tinggi terhadap asam, basa, dan hidrolisis enzimatis terbukti dapat dipecah oleh bakteri probiotik dalam saluran cerna. Dengan demikian, bahan pangan yang mengandung *C*-glikosida dapat memberikan fungsionalitas lebih tinggi setelah reaksi *C*-deglikosilasi terjadi dalam saluran cerna dengan bantuan bakteri probiotik dan menghasilkan aglikon.

Konversi senyawa glikosida menjadi aglikon dapat berlangsung dalam pencernaan, namun persentase yang akan diserap bervariasi bergantung strukturnya dan bakteri pencernaan yang tersedia. Deglikosilasi *O*-glikosida oleh bakteri saluran cerna berlangsung lebih cepat daripada *C*-glikosida (Vollmer *et al.* 2018). Lebih jauh lagi, tidak semua manusia memiliki bakteri pencernaan yang dibutuhkan untuk deglikosilasi agar diperoleh manfaat kesehatan yang lebih baik. Hanya satu dari tiga donor yang bakteri pencernaannya menunjukkan kemampuan biokonversi *C*-glikosida vitexin menjadi apigenin (Vollmer *et al.* 2018). Studi lainnya menunjukkan kemampuan konversi *C*-glikosida mangiferin menjadi noratriol berbeda antar 3 donor; satu donor menunjukkan konversi dengan produk tinggi dan yang cepat, satu donor hanya dapat mengonversi 32% mangiferin dan tidak dapat bertambah lagi, dan satu donor tidak menunjukkan kemampuan konversi (Souza *et al.* 2020).

Keragaman antarindividu, di antaranya usia, lemak tubuh, tinggi, etnis, dan gender, memengaruhi perbedaan gen yang terdeteksi pada sampel feses secara signifikan (Lang *et al.* 2018). Kemampuan bakteri saluran cerna dalam konversi

glikosida diduga merupakan karakteristik yang khas dari seorang individu. Braune dan Blaut (2011) melaporkan bahwa dari 19 donor, hanya 1 donor yang bakteri saluran cernanya menunjukkan kemampuan memecah C-glikosida puerarin menjadi daidzein, dan kemampuan tersebut secara konsisten terlihat hingga bulan ke-18 setelah analisis pertama. Kemampuan dan juga ketidakmampuan bakteri saluran cerna donor yang berbeda-beda dalam pemecahan C-glikosida mangiferin menjadi noratiriol juga secara konsisten terlihat pada 3 waktu analisis yang berbeda (Souza *et al.* 2020). Ketiadaan bakteri saluran cerna yang mampu mendeglikosilasi menyebabkan perlunya mengeksplorasi mikroba dalam saluran cerna (yang bersifat probiotik) dalam rangka produksi aglikon secara *in vitro* (biokonversi), untuk kemudian dimanfaatkan dalam pengembangan pangan fungsional.

Hingga kini, terdapat 12 isolat bakteri saluran cerna (*Peptostreptococcus* YK-10, Strain PUE, *Lachnospiraceae* CG19-1, *Lactococcus* MRG-IFC-1, *Enterococcus* MRG-IFC-2, *Eubacterium rectale* A-44, *Streptococcus faecium* S-9, *Bifidobacterium longum* H-1, *Bacteroides streptocoris* HJ-15, *B. animalis* INIA P784, *E. faecalis* INIA P90, dan *E. faecalis* INIA P1) yang menunjukkan kemampuan untuk mengkonversi C-glikosida puerarin menjadi daidzein (Kim *et al.* 1998; Park *et al.* 2006; Jin *et al.* 2008; Braune dan Blaut 2011; Kim *et al.* 2015; Gaya *et al.* 2017). Selain puerarin, C-glikosida vitexin, isovitexin (apigenin-C-glikosida), orientin (luteolin-C-glikosida) juga dilaporkan dapat dikonversi menjadi bentuk aglikonnya oleh bakteri saluran cerna yang diisolasi dari feses manusia (Xu *et al.* 2014, Zheng *et al.* 2019). Dalam beberapa studi, flavonoid C-glikosida menunjukkan potensi yang lebih tinggi sebagai antioksidan dan antidiabetes dibandingkan dengan flavonoid O-glikosida dari aglikon yang sama. Namun demikian, daidzein juga dapat diproduksi dari O-glikosida daidzin yang lebih mudah untuk dideglikosilasi, misalnya oleh proses fermentasi pada pembuatan tempe. Aglikon dari vitexin, isovitexin, dan orientin, yaitu apigenin dan luteolin, juga dapat lebih mudah diproduksi dari O-glikosida masing-masing.

Noratiriol, aglikon dari polifenol xantonoid mangiferin, diketahui memiliki bioaktivitas yang berbeda dengan mangiferin. Mangiferin telah diformulasikan menjadi obat antivirus Alpirazin serta sediaan antiinflamasi dan imunomodulator Vimang di Kuba (Jyotshna *et al.* 2016). Diduga bioaktivitas mangiferin adalah

peran dari noratiriol sebagai metabolitnya (Wang *et al.* 2014; Niu *et al.* 2016; Li *et al.* 2018). Mangiferin banyak ditemukan di alam, salah satunya pada buah mangga, namun aglikon bebas noratiriol sulit ditemukan. Bentuk *O*-glikosida dari noratiriol yaitu tripteroside telah diisolasi dari tanaman herbal *Triptospermum taiwanense* (Lin *et al.* 1982) namun tidak ditemukan info lebih lanjut. Terdapat tiga isolat bakteri saluran cerna yang menunjukkan kemampuan deglikosilasi mangiferin menjadi noratiriol, yaitu *Bacteroides* sp. MANG, *Catenibacillus scindens*, dan *Bacillus* sp. KM7-1 (Sanugul *et al.* 2005; Braune dan Blaut 2011; Hasanah *et al.* 2021). Dari ketiga strain tersebut, *Bacillus* sp. KM7-1 yang diisolasi dari saluran cerna tikus memiliki karakteristik yang unik yaitu anaerob fakultatif dan tumbuh lebih baik pada kondisi aerobik, termofilik, dan dapat mengonversi mangiferin menjadi norathyriol pada kondisi aerobik (Hasanah *et al.* 2021). Semua isolat bakteri pengkonversi *C*-glikosida ditumbuhkan pada 37 °C dan bersifat anaerob obligat. Kemampuan *Bacillus* sp. KM7-1 untuk tumbuh dan melakukan biokonversi pada kondisi aerobik serta ketahanannya terhadap suhu tinggi mengindikasikan potensi strain tersebut untuk diteliti dalam produksi aglikon sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut untuk produksi pangan fungsional.

8.3.3 Pengembangan Pangan Fermentasi Probiotik

Kebanyakan bakteri probiotik dapat tumbuh baik pada susu karena memiliki enzim yang dapat memetabolisme laktosa dan sistem proteolitik yang dapat memecah kasein menjadi asam-asam amino yang diperlukan untuk pertumbuhan. Di antara produk fermentasi susu, yoghurt dan keju merupakan produk yang banyak digunakan sebagai pembawa bakteri probiotik, namun penggunaan keju sebagai pembawa probiotik tidak seintensif yoghurt. Keju memiliki kelebihan karena pHnya tinggi, lebih banyak padatan, dan kandungan lemak yang relatif lebih tinggi yang memberikan perlindungan terhadap sel probiotik ketika melewati lambung. Komposisi susu dengan pH pada kisaran 6,5–6,7 merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri probiotik. Selain itu protein dan lemak susu memberikan perlindungan kepada sel probiotik ketika terpapar pada kondisi asam, garam empedu, dan enzim-enzim pada saluran pencernaan, sehingga dapat mencapai usus dan kolon tempat probiotik diharapkan untuk berperan.

Viabilitas dan aktivitas metabolisme bakteri probiotik merupakan faktor penting dalam pengembangan pangan probiotik. Probiotik harus mempertahankan viabilitasnya selama proses produksi dan penyimpanan pangan probiotik, juga selama melewati kondisi asam pada lambung dan degradasi enzim-enzim hidrolitik serta garam empedu pada usus kecil. Untuk memastikan manfaat kesehatan terhadap konsumen, jumlah minimum pada produk selama penyimpanan adalah antara 10^6 – 10^7 cfu/ml atau dikonsumsi sebanyak 10^9 cfu per hari (Tamime *et al.* 2017; Shori *et al.* 2018). *International Dairy Federation* (IDF) merekomendasikan minimum 10^7 sel *viable* probiotik/gram atau ml harus berada dalam produk pada saat dikonsumsi. Ketika pangan fermentasi digunakan sebagai pembawa probiotik, kecocokan bakteri probiotik dengan mikroorganisme yang digunakan sebagai kultur *starter* perlu dipertimbangkan dalam pembuatan produk. Hal ini perlu disesuaikan dengan persyaratan jumlah probiotik dalam produk, yaitu tidak kurang dari 10^6 – 10^8 cfu/ml agar produk tersebut dapat dikatakan mampu memberikan manfaat kesehatan. Idealnya bakteri probiotik yang digunakan untuk pangan fermentasi bersifat multifungsi yaitu dapat tumbuh pada pangan fermentasi, tidak memberikan efek negatif terhadap sensori, dan masih memiliki sifat fungsional sebagai probiotik. Oleh karena itu, beberapa hal harus dipertimbangkan ketika mengembangkan produk pangan fermentasi probiotik, antara lain pemilihan galur dan teknologi fermentasi serta teknologi untuk mempertahankan viabilitasnya. Seleksi terhadap strain yang akan digunakan pada susu fermentasi merupakan hal yang penting karena viabilitas dan manfaat kesehatan probiotik pada susu fermentasi tergantung pada galur dan interaksi antara probiotik dengan mikroorganisme lainnya yang berperan pada proses fermentasi.

Yoghurt difermentasi dengan dua bakteri asam laktat yang telah dikenal memiliki sifat fungsional yaitu *Streptococcus thermophilus* dan *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Namun kedua bakteri ini bukan berasal dari saluran pencernaan manusia dan tidak dapat mengkolonisasi saluran pencernaan. Demikian pula produk susu fermentasi lainnya seperti kefir, walaupun mengandung bakteri asam laktat belum tentu mengandung probiotik. Pengembangan susu fermentasi probiotik dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri probiotik yang telah terbukti memberikan manfaat kesehatan, sebagai kultur *starter* (mono atau multi kultur/strain) atau mengkombinasikannya dengan kultur *starter* yang biasa digunakan

untuk fermentasi susu. Namun demikian beberapa hal perlu dipertimbangkan seperti suhu pertumbuhan, kesesuaian antar kultur dan proses pengolahan ketika menggunakan probiotik sebagai kultur *starter* (Tamime *et al.* 2017).

Banyak galur probiotik yang tumbuh lambat pada susu sehingga memerlukan faktor pertumbuhan seperti peptida yang ditambahkan pada substrat. Suhu pertumbuhan antara kultur probiotik dan kultur *starter* tidak sama. Probiotik tumbuh optimum pada suhu 37 °C sehingga dapat dipilih pencampuran probiotik dengan kultur *starter* termofilik seperti kultur *starter* yoghurt. Alternatif lainnya adalah dengan menambahkan sejumlah besar probiotik terhadap kultur *starter* mesofilik untuk menghasilkan produk fermentasi yang mengandung probiotik. Probiotik yang ditambahkan ke dalam yoghurt atau digunakan untuk fermentasi bersama-sama dengan kultur *starter* susu fermentasi harus memiliki kesesuaian dengan kultur *starter* yang biasa digunakan untuk fermentasi (Tamime *et al.* 2017).

Penggunaan probiotik dalam pembuatan keju juga perlu mempertimbangkan beberapa faktor seperti kondisi pengolahan keju, prosedur pemasakan, kondisi aerobik, suhu pemeraman keju, dan penyimpanan yang dapat memengaruhi viabilitas bakteri probiotik dan jumlahnya pada produk akhir sehingga dapat memengaruhi efektivitasnya sebagai probiotik (Shori *et al.* 2018). Nilai pH yang rendah, keberadaan H₂O₂, dan senyawa inhibitor yang dihasilkan oleh kultur *starter* selama proses fermentasi dan selama penyimpanan dapat menurunkan jumlah probiotik pada produk akhir (Tamime *et al.* 2017, Shori *et al.* 2018). Kondisi aerob selama produksi, pengemas yang digunakan, dan suhu penyimpanan juga dapat memengaruhi viabilitas probiotik. Berbagai upaya harus dilakukan untuk mempertahankan viabilitas probiotik pada susu fermentasi, antara lain penyimpanan pada suhu refrigerator. *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* pada umumnya dapat bertahan pada susu fermentasi selama 4–8 minggu jika disimpan pada refrigerator (Mishra dan Mishra 2012). Teknik mikroenkapsulasi juga sering digunakan untuk melindungi probiotik selama penyimpanan dan ketika melewati kondisi ekstrem pada lambung (Shori *et al.* 2018).

Saito (2013) menjelaskan mengenai pengembangan pangan fungsional yoghurt yang dilakukan di Jepang. Pengembangan yoghurt dilakukan dengan menambahkan bakteri asam laktat yang fungsional (misalnya probiotik),

menambahkan senyawa fungsional sebagai bahan tambahan pangan (misalnya laktoferin pada Lactoferrin 1000 dan glukosamin pada *Glucosamin Power Yogurt*), maupun penambahan senyawa yang diproduksi dari fermentasi (misalnya laktotripeptida pada Amiel S yang diproduksi oleh *Lactobacillus helveticus*).

Bakteri dengan kemampuan biokonversi dapat diisolasi dari produk pangan fermentasi, kemudian dilanjutkan dengan pengujian-pengujian sehingga memenuhi persyaratan sebagai probiotik. Jitpakdee *et al.* (2020) mengisolasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi yang teridentifikasi sebagai *Pediococcus pentosaceus* ENM104 dan *Lactobacillus plantarum* SPS109. Pengujian lebih lanjut menunjukkan bahwa kedua strain tersebut dapat menghidrolisis susu skim, *deconjugated glycocholic acid* (GCA), *taurocholic acid* (TCA) dan *taurodeoxycholic acid* (TDCA) sebagai garam empedu, dan toleran terhadap cairan pencernaan, termasuk H₂O₂. Penggunaan kedua strain tersebut secara ko-kultur sebagai kultur *starter* fermentasi susu menunjukkan penurunan kolesterol serta peningkatan γ -aminobutyric acid (GABA) dan penghambatan *angiotensin-converting enzyme* (ACE). Kedua strain tersebut juga dimanfaatkan sebagai kultur *starter* whey terfermentasi, dan menunjukkan bioaktivitas yang sama dengan yang dilaporkan pada susu fermentasi. Selain itu, *whey* terfermentasi yang dihasilkan juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Bacillus cereus* TISTR 687, *Listeria monocytogenes* DMST 17303, dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Jitpakdee *et al.* 2022).

8.4 Komponen Bioaktif pada Pangan Fermentasi

8.4.1 Komponen Bioaktif pada Tempe

Proses fermentasi tidak hanya mengubah sifat sensori dan gizi pangan, tetapi mikroorganisme yang tumbuh selama proses fermentasi juga dapat menghasilkan senyawa yang memiliki aktivitas biologis. Dalam fermentasi bahan pangan nabati, pertumbuhan BAL meningkatkan konversi senyawa fenolik seperti flavonoid menjadi metabolit yang lebih aktif dengan peran enzim *glycosylhydrolase*, *esterase*, *decarboxylase*, dan *phenolic acid reductase*. Sebagai contoh dari *anthocyanidins* terbentuk *pyranoanthocyanidins* atau *3-desoxypranoantho-cyanidins* yang berperan melindungi kerusakan oksidatif dan kimia (Marco *et al.* 2017).

Aktivitas kapang dan mikroorganisme lainnya pada fermentasi tempe juga menghasilkan senyawa-senyawa fungsional atau bioaktif seperti isoflavon aglikon, GABA (Gamma Amino Butyric Acid), SOD (Superoksida Dismutase), peptida, dan senyawa antimikroba (Nout dan Kiers 2005). Fermentasi mampu membebaskan aglikon dari bentuk glikosidanya (deglikosilasi). Selama proses fermentasi tempe, kapang menghidrolisis isoflavon glukosida menjadi aglikon (daidzein, genistein, glisitein) sehingga kapasitas antioksidatif meningkat pada tempe (Nakajima *et al.* 2005). Athaillah *et al.* (2019) menyatakan adanya kandungan *O*-glukosida genistin, daidzin, dan glisitin, serta aglikon yang terkait yaitu genistein, daidzein, dan glisitein pada ekstrak tempe. Selama fermentasi tempe, terjadi penurunan kandungan isoflavon *O*-glikosida (daidzin dan genistin) dan peningkatan kandungan aglikon yang terkait (daidzein dan genistein) (Kuligowski *et al.* 2017), yang mengindikasikan deglikosilasi yang dilakukan oleh mikroorganisme dalam tempe. Dua strain bakteri yang diisolasi dari tempe, yang diidentifikasi sebagai *Micrococcus* atau *Arthrobacter*, menunjukkan kemampuan mentransformasi genistein dan biochanin menjadi isoflavon polihidroksilasi (Klus dan Barz 1998).

Selama proses fermentasi tempe, kapang menghidrolisis dinding sel kedelai yang merupakan polisakarida menghasilkan suatu senyawa yang dapat menghambat penempelan Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) pada sel usus (Roubosvan den Hil dan Nout 2011). Komponen bioaktif yang dihasilkan merupakan senyawa karbohidrat yang berisi arabinosa. Komponen bioaktif ini diduga berasal dari rantai arabinan atau arabinogalaktan pada senyawa pektik yang berada pada dinding sel legum. ETEC merupakan bakteri yang paling banyak menyebabkan diare di negara berkembang dan menyebabkan diare pada orang yang bepergian (*traveller's diarrhoea*). Mekanisme penyembuhan diare melibatkan penghambatan penempelan bakteri pada sel epitel oleh senyawa bioaktif pada tempe, penghambatan sekresi toksin, dan penghambatan bakteri patogen terutama ETEC oleh senyawa antibakteri yang terdapat pada tempe (Roubosvan den Hil dan Nout 2011).

Kultur *starter* utama yang digunakan dalam pembuatan tempe adalah *Rhizopus oligosporus*, tetapi kapang, khamir, dan bakteri asam laktat juga berperan dalam fermentasi tempe. Senyawa-senyawa bioaktif pada tempe telah tersedia dan siap

untuk dimanfaatkan oleh tubuh melalui proses konsumsi. Isoflavon aglikon lebih mudah diserap tubuh. Isoflavon memiliki fungsi seperti estrogen sehingga dapat mencegah gejala osteoporosis pada wanita setelah menopause dan menekan terjadinya arteriosklerosis dengan memperbaiki metabolisme lemak (Nakajima *et al.* 2005). Senyawa bioaktif pada tempe membantu menurunkan berat badan, menurunkan rasio lemak tubuh, dan meningkatkan profil lipid. Dengan demikian, optimasi dan penggunaan tempe dalam menu sehari-hari dengan pengolahan yang tepat dapat menjadi solusi untuk obesitas (Astawan *et al.* 2018).

Produk fermentasi sudah diketahui merupakan sumber peptida bioaktif. Peptida bioaktif merupakan suatu fragmen protein yang memiliki efek fisiologis pada tubuh manusia dan dapat mempengaruhi kesehatan. Efek fisiologis yang dimaksud yaitu memiliki efek signifikan pada fungsi sistem tubuh manusia seperti kardiovaskular, pencernaan, kekebalan, dan sistem saraf (Shori dan Baba 2015). Peptida bioaktif dapat dihasilkan oleh sistem proteolitik kultur *starter* dan *non-starter* selama pembuatan makanan fermentasi (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Protein dalam pangan memberikan sumber peptida aktif alami yang baik. Peptida ini tidak aktif dalam struktur protein asli, tetapi dapat dibebaskan melalui hidrolisis dengan enzim pencernaan dan/atau aktivitas proteolitik mikroorganisme atau tanaman. Studi yang dilakukan terhadap peptida bioaktif pada tempe menunjukkan bahwa pada tempe yang diperoleh dari berbagai industri rumah tangga terdapat peptida Val-His dan Ala-Leu-Glu-Pro yang telah diketahui sebagai antihipertensif, antidiabetes, antioksidan, dan antitumor (Tamam *et al.* 2019). Pangan fermentasi asal kedelai yang telah dilaporkan memiliki peptida bioaktif antara lain peptida inhibitor Dipeptidyl peptidase (DPP) IV dengan sekuen Lys-Leu and Leu-Arg, berasal dari natto yang difermentasi oleh *Aspergillus oryzae*, memiliki aktivitas antidiabetik (Sato *et al.* 2018); peptida Gly-Tyr, Ala-Phe, Val-Pro, Ala-Ile, dan Val-Gly antihipertensif dari kecap kedelai yang difermentasi *Aspergillus sojae* (Nakahara *et al.* 2010); dan peptida Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro dari miso yang difermentasi oleh *A. sojae* memiliki aktivitas antihipertensif (Inoue *et al.* 2009).

8.4.2 Komponen Bioaktif pada Susu Fermentasi

8.4.2.1 Peptida Bioaktif

Sifat proteolitik BAL dapat meningkatkan konsentrasi peptida dan poliamin bioaktif. Peptida biofungsional atau bioaktif adalah peptida dengan aktivitas seperti hormon atau obat yang pada akhirnya memodulasi fungsi fisiologis melalui interaksi pengikatan dengan reseptor spesifik pada sel target yang mengarah pada induksi respons fisiologis. Beberapa peptida yang memiliki aktivitas bioaktif telah diisolasi dari pangan fermentasi seperti yoghurt, *sour milk*, kefir, dahi, dan pangan fermentasi lainnya. Beberapa rangkaian peptida telah diketahui memiliki sifat terapeutik seperti aktivitas antimikroba, antioksidan, antitrombotik, antihipertensi, dan imunomodulator (Fitzgerald dan Murray 2006). Peptida bioaktif memiliki resistensi secara alami terhadap saluran pencernaan. Senyawa tersebut dapat berpenetrasi melalui sel usus dengan berbagai moda transport, misalnya rute paraseluler, difusi pasif, endositosis, dan melalui sistem limfatik (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Ketika dilepaskan dan diabsorpsi, peptida bioaktif dapat memberikan efek fisiologis pada berbagai sistem dalam tubuh seperti kardiovaskuler pencernaan, endokrin, imun dan sistem saraf (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017).

Bioaktivitas peptida bergantung pada komposisi, urutan, dan ukuran asam amino yang melekat. Berbagai senyawa peptida dan fraksi peptida telah diisolasi dari susu fermentasi dan memiliki aktivitas seperti *immunomodulatory*, *cytomodulatory*, hipokolesterolemik, antioksidatif, antimikroba, pengikat mineral, opioid, dan pembentukan tulang (Hebert *et al.*, 2010; Pihlanto *et al.* 2013). Secara umum karakteristik peptida bioaktif tergantung dari asam amino spesifik dan panjang rantainya (biasanya 2–20 residu asam amino) dan resistensinya terhadap hidrolisis (Fernandez *et al.* 2015). Peptida bioaktif dapat dihasilkan oleh BAL yang digunakan sebagai *starter* pada proses fermentasi maupun BAL non-*starter*. Urutan asam amino spesifik yang menunjukkan lebih dari dua aktivitas biologis juga dikenal sebagai peptida multifungsi. Peptida bioaktif yang paling banyak diteliti dan memiliki prospek yang baik adalah peptida yang memiliki aktivitas sebagai inhibitor *angiotensin-1-converting enzyme* (ACE) yang terbentuk selama fermentasi susu sebagai hasil dari degradasi protein susu oleh proteinase. Gupta

dan Abu-Ghannam (2012) menyatakan peptida bioaktif dihasilkan ketika *Lb. helveticus* menguraikan kasein susu. Sejumlah uji klinis telah menunjukkan peptida ini memiliki pengaruh positif dalam menurunkan tekanan darah.

Sistem proteolitik strain tertentu dari spesies *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*, dan *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* telah dibuktikan dapat menghidrolisis protein dan menghasilkan peptida yang menghambat aktivitas ACE (ACE inhibitor) (Fernandez *et al.* 2015). Kemampuan bakteri asam laktat untuk menghasilkan peptida spesifik tergantung pada galurnya. Peptida antihipertensi yang berasal dari β -kasein telah ditemukan dalam susu yang difermentasi oleh *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* NRRLB-50571, dan NRRLB-50572, *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 dan *L. lactis* DIBCAB2. Peptida ini dilepaskan dari β dan κ -kasein selama fermentasi oleh protease dan peptidase dari strain *Lb. helveticus* (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Dua jenis peptida ACE inhibitor telah dipurifikasi dan diidentifikasi sebagai VPP and IPP (Pihlanto 2013). Peptida ini dilepaskan dari β - dan κ -kasein selama fermentasi oleh protease dan peptidase yang dihasilkan oleh *Lb. helveticus* (Rodríguez-Figueroa *et al.* 2013). Berbagai penelitian memperlihatkan bahwa VPP dan IPP juga memiliki berbagai fungsi biologis seperti antiinflamasi, antiadipogenik, antiaterosklerosis, dan antiosteoporosis (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017).

Selain dari panjang asam amino, sekuens dari suatu peptida juga menentukan kemampuan sebagai inhibitor ACE. Residu asam amino pada rantai terminal-C peptida menentukan kemampuannya sebagai inhibitor ACE, sebagai contoh prolin, lisin, dan arginin pada rantai terminal-C (Wu *et al.* 2006), asam amino hidrofobik seperti Try, Phe, Trp, Ala, Ile, Val, dan Met (He *et al.* 2012) atau asam amino bermuatan positif seperti Arg, Lys, dan Pro pada posisi terminal-C peptida (Sanjukta dan Rai 2016). Dengan demikian, efektivitas susu fermentasi dalam menurunkan tekanan darah tergantung pada strain yang digunakan dan peptida yang dihasilkan, sehingga tidak semua susu fermentasi mengandung peptida yang sama dan memiliki khasiat yang sama.

Selain peptida dengan sekuens VPP dan IPP, peptida dengan sekuens asam amino lainnya juga telah dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap ACE, misalnya YQEPVLGPVRGPFPIIV (Rojas-Ronquillo *et al.* 2012), SKVVP

(Ashar dan Chand 2004). Susu yang difermentasi dengan berbagai bakteri asam laktat, seperti dahi (yoghurt India), greek yoghurt, koumiss, dan kefir telah diteliti mengandung peptida bioaktif dengan berbagai sekuen asam amino yang berperan sebagai inhibitor ACE, antimikroba, *immunomodulating*, opioid, pengikat mineral, antioksidan, dan antitrombotik. Aktivitas inhibitor ACE juga sudah dideteksi terdapat pada keju (Lu *et al.* 2016). Penelitian yang dilakukan oleh Rubak *et al.* (2020) menunjukkan bahwa susu yang difermentasi oleh bakteri asam laktat yang berasal dari berbagai pangan fermentasi memiliki aktivitas inhibitor ACE. Sebanyak 30 peptida yang sebagian besar dari β -kasein dilepaskan oleh *Lb. kefir* asal kefir, memiliki aktivitas inhibitor ACE. Karena adanya peptida bioaktif pada susu fermentasi, terutama valyl-prolyl-proline (VPP) dan isoleucyl-prolyl-proline (IPP), produk pangan fermentasi susu direkomendasikan sebagai strategi non-farmakologi untuk mengelola hipertensi (Sanlier *et al.* 2017).

8.4.2.2 Enzim β -galaktosidase

Aktivitas enzim dari mikroorganisme yang berperan selama proses fermentasi dapat mengubah nilai gizi dan sifat bioaktif pangan yang bermanfaat terhadap kesehatan. Sebagai contoh, susu yang telah difermentasi seperti keju dan yoghurt dapat dikonsumsi oleh penderita intoleransi laktosa tanpa menyebabkan masalah karena laktosa pada susu telah digunakan oleh BAL dan bakteri tersebut menyediakan enzim β -galaktosidase untuk memecah laktosa. Intoleransi laktosa merupakan suatu kondisi yang ditandai dengan ketidakmampuan mencerna laktosa yang disebabkan karena rendahnya enzim laktase (β -galaktosidase). Aktivitas laktase menurun dengan bertambahnya usia sehingga menyebabkan laktosa tidak dapat diserap tubuh dan menjadi substrat untuk pertumbuhan bakteri kolon yang menghasilkan gas, di samping asam lemak rantai pendek (Mattar *et al.* 2012). β -galaktosidase yang dihasilkan oleh bakteri tahan terhadap kondisi asam dalam lambung.

Yoghurt merupakan susu fermentasi yang banyak dikenal, dibuat dengan menggunakan kultur *starter Lb. bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Kultur *starter* yoghurt telah diketahui membantu metabolisme laktosa pada penderita intoleransi laktosa dengan cara melepaskan enzim β -galaktosidase pada susu fermentasi (Fernandez dan Marette 2018). Ketika susu difermentasi, laktosa

pada susu dimetabolisme oleh kedua bakteri tersebut, menghasilkan asam dan menurunkan pH serta menciptakan aroma dan rasa khas yoghurt. Laktosa yang berada pada yoghurt lebih mudah dicerna karena keberadaan enzim laktase yang dihasilkan oleh bakteri yang memfermentasi yoghurt. Secara tradisional orang dengan intoleransi laktosa dapat mengkonsumsi yoghurt tanpa menderita gejala intoleransi laktosa (Saviano 2014).

8.4.2.3 Senyawa Bioaktif Lainnya

Selama proses fermentasi peran utama BAL adalah memproduksi asam untuk mengasamkan susu dan berperan sebagai senyawa antimikroba. Asam laktat yang merupakan hasil metabolisme BAL diketahui dapat mengurangi sekresi *pro-inflammatory cytokine* dari TLR yang diaktivasi. Asam laktat juga dapat mengubah status redoks dengan mengurangi oksigen reaktif dalam usus halus. Senyawa lain yang dihasilkan selama fermentasi adalah vitamin B, termasuk folat, riboflavin, dan B12. Namun sintesis senyawa ini tergantung pada strain bakteri yang tumbuh selama fermentasi (Marco *et al.* 2017). Selain itu BAL menghasilkan produk metabolit lain yang bermanfaat untuk kesehatan. Beberapa BAL dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti vitamin, peptida, dan senyawa lainnya seperti polisakarida ekstraseluler serta asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid* (SCFA), *conjugated linoleic acid* (CLA)). BAL yang memiliki enzim linoleat isomerase dapat menghasilkan asam linoleat terkonjugasi yang memiliki fungsi *atheroprotective* (Marco *et al.* 2017).

BAL dapat memproduksi eksopolisakarida (EPS), suatu polimer gula yang dibentuk dari unit berulang monosakarida. Selain berperan dalam aspek teknologi, EPS juga memiliki manfaat kesehatan (Castellone *et al.* 2021). EPS dibagi menjadi dua kategori berdasarkan pada rantai utamanya, yaitu heteropolisakarida (HePS) dan homopolisakarida (HoPS). HoPS terdiri atas glukukan dan fruktan. Umumnya HePS diasosiasikan dengan efek antioksidan dan modulasi sistem imun, sementara HoPS diasosiasikan dengan prebiotik, yaitu suatu senyawa yang tidak dapat dicerna oleh pencernaan bagian atas manusia dan menjadi substrat bagi probiotik pada kolon. Prebiotik digunakan oleh probiotik dan bakteri menguntungkan lainnya dalam kolon untuk memproduksi asam lemak rantai pendek dan asam organik yang menghambat pertumbuhan

bakteri patogen dan memperbaiki metabolisme inangnya. Mikrobiota saluran pencernaan sangat dipengaruhi oleh keberadaan EPS terutama HoPS (Castellone *et al.* 2021). Selain berperan sebagai antioksidan dan memodulasi sistem imun, EPS juga mengurangi kolesterol darah serta memiliki aktivitas antikanker dan antidiabetes (Castellone *et al.* 2021).

8.4.3 Pangan Fermentasi Lainnya

Selain tempe, produk fermentasi kedelai lainnya juga merupakan sumber peptida bioaktif (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Cheonggukjang, yaitu produk fermentasi *Bacillus licheniformis* memiliki beberapa dipeptida (LE, EW, SP, VE, VL, VT, dan EF) yang memiliki aktivitas menyensitifkan insulin. Peptida yang diisolasi dari douchi (LIVTQ dan LIVT), tofuyo (WL dan IFL), dan pasta kedelai (HHL) memiliki aktivitas inhibitor ACE secara *in vitro*. Tofuyo dan kecap kedelai mengandung berbagai peptida bioaktif yang berperan sebagai inhibitor ACE yang ditunjukkan dapat menurunkan tekanan darah pada tikus hipertensif. Susu kedelai yang difermentasi oleh *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* NTU dan *Lb. plantarum* NTU 102 memiliki aktivitas antiosteoporotik pada tikus Balb/c yang diduga karena keberadaan peptida bioaktif.

Serealia merupakan sumber karbohidrat, protein, serat pangan, vitamin, dan mineral. Proses fermentasi meningkatkan nilai gizi serealia. Roti, idli, dosa, kishk, ogi, kenkey, tape, bir, dan *wine* merupakan produk fermentasi pangan. Pada kebanyakan pangan fermentasi ini kultur campuran khamir, bakteri, dan kapang berperan secara paralel atau sekuensial. Pada pangan fermentasi serealia telah diidentifikasi senyawa-senyawa yang memiliki manfaat kesehatan sebagai hasil dari fermentasi, seperti antioksidan, antihipertensif, dan antidiabetik (Melini *et al.* 2019). Senyawa fenolik, GABA (*Gamma amino butyric acid*), peptida dan CLA (*conjugated linoleic acid*) yang berperan sebagai antioksidan telah diidentifikasi berada pada gandum, barley, rye, bekatul, dan *sourdough* yang difermentasi dengan berbagai bakteri asam laktat dan khamir.

Kenaikan total fenolik telah diamati pada quionona dan *buckwheat* yang difermentasi oleh *P. pentosaceus* dan *Lb. paracasei*, pada lembaga gandum, barley, rye, dan *buckwheat* yang difermentasi oleh *Lb. rhamnosus* dan *S. cerevisiae*, serta pada gandum utuh dan oat yang difermentasi oleh BAL. Aktivitas enzim hidrolisis

yang diproduksi oleh mikroorganisme memecah dinding sel sereal sehingga meningkatkan bioaktivitasnya dan melepaskan senyawa fenolik. Aktivitas BAL pada sereal juga telah diketahui dapat memproduksi asam ferulat. Peptida inhibitor ACE dan GABA sebagai anti-hipertensif telah diisolasi dari *sourdough* yang difermentasi oleh *Lb. brevis* CECT 8183 dan protease (Melini *et al.* 2019).

Aktivitas proteolitik BAL mentransformasi matriks protein pada sereal menjadi peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antihipertensi. Fermentasi *sourdough* dari rye menggunakan *Lb. reuteri* menghasilkan peptida dengan aktivitas antioksidan dan inhibitor ACE (Sanlier *et al.* 2017). Sebanyak 24 peptida antioksidan yang berisi 8–57 asam amino telah diidentifikasi sebagai fraksi aktif pada *sourdough* yang dibuat dari berbagai jenis tepung (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Selain itu, pada *sourdough* yang dibuat dari tepung terigu utuh dan tepung rye dengan menggunakan berbagai jenis BAL, telah diidentifikasi inhibitor ACE yaitu DPVAPLQRSGPEI, PVAPQLSRGLL, ELEIVMASPP, QILLPRPGQAA, dan VPFQGVG pada *sourdough* tepung terigu utuh dan LQP, IPP, LLP, dan VPP pada *sourdough* rye. Proses pembuatan roti memodifikasi konsentrasi peptida sebagai hasil reaksi enzimatis dan pemanggangan (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Fermentasi sereal juga mengurangi senyawa-senyawa non gizi seperti fitat dan tanin serta meningkatkan asam amino bebas dan turunannya. Penurunan tanin dan asam fitat meningkatkan penyerapan besi dan menghilangkan senyawa non-gizi yang memengaruhi kapasitas pengikatan, daya cerna, absorpsi, dan kelarutan mineral (Sanlier *et al.* 2017).

Senyawa fenolik, GABA, peptida, asam folat, dan CLA yang memiliki aktivitas antioksidan juga telah diidentifikasi pada fermentasi sayuran dan buah-buahan dengan menggunakan bakteri asam laktat, terutama *Lb. plantarum* (Melini *et al.* 2019). Aktivitas BAL melepaskan senyawa bioaktif dari senyawa fitokimia terkonjugasi seperti senyawa fenolik. Peptida inhibitor ACE diproduksi pada *wine* merah oleh *Saccharomyces cerevisiae* dan *Oenococcus oeni* (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Peptida dari *wine* merah ini juga memiliki aktivitas antioksidan. Sekuen asam amino diduga dilepaskan oleh *S. cerevisiae* selama autolisis dan oleh *O. oeni* selama fermentasi malolaktat.

Fermentasi daging dapat dilakukan secara spontan atau dengan penambahan kultur *starter*. Meskipun fermentasi spontan memberikan karakter sensori produk yang lebih baik, jenis fermentasi ini memiliki kelemahan yaitu memberikan peluang tumbuhnya patogen yang dapat menghasilkan senyawa amin biogenik, sehingga saat ini banyak fermentasi daging dilakukan menggunakan kultur *starter*. Bakteri asam laktat berperan penting pada fermentasi daging untuk mengurangi pH dan memproduksi senyawa penghambat seperti asam organik. Beberapa BAL juga dapat menghasilkan bakteriosin, suatu peptida yang bersifat sebagai antimikroba sehingga meningkatkan keamanan dan kualitas daging fermentasi. Bakteri asam laktat yang digunakan sebagai *starter* selama fermentasi daging dapat menghasilkan peptida inhibitor ACE, menghambat aktivitas proteolitik dan oksidasi lemak, serta menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen (Sanlier *et al.* 2017). Peptida inhibitor ACE dan antioksidan telah diisolasi dari berbagai jenis sosis (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017). Senyawa fenolik, GABA, peptida, CLA, dan folat terdapat pada sosis yang difermentasi oleh bakteri asam laktat probiotik dan *Bifidobacterium longum* (Melini *et al.* 2019). Produk fermentasi perikanan juga mengandung peptida bioaktif sebagai inhibitor ACE dan antioksidan. Ikan tuna fermentasi yang merupakan produk tradisional Jepang yang disebut katsuobushi dan pasta udang fermentasi, serta saus kerang biru produk fermentasi mengandung peptida inhibitor ACE (Martinez-Villaluenga *et al.* 2017).

Daftar Pustaka

- An SY, Lee MS, Jeon JY, Ha ES, Kim TH, Yoon JY, Ok CO, Lee HK, Hwang WS, Choe SJ, Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, Lee K *et al.* 2013. Beneficial effects of fresh and fermented kimchi in prediabetic individuals. *Ann Nutr Metab.* 63(1-2):111-119.
- Ashar MN, Chand R. 2004. Fermented milk containing ACE inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *J Milk Sci Int Milchwissenschaft.* 59:363-366.
- Athaillah ZA, Muzdalifah D, Lestari A, Devi AF, Udin LZ, Artanti N, Lioe HN. 2019. Phenolic compound profile and functionality of aqueous overripe tempe extracts. *Curr Res Nutr Food Sci J.* 7(2):382-392.

- Braune A, Blaut M. 2011. Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by newly isolated human intestinal bacterium. *Environ Microbiol.* 13(2):482-494.
- Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B. 2021. Eating fFermented: Health bBenefits of LAB-fFermented fFoods. *Foods* 10(11):2639.
- Denkova Z dan Krastanov A. 2012. Development of new products: probiotics and probiotic foods. *Intech Open.* 81-120.
- D'Argenio V, Salvatore F. 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta.* 451:97-102.
- De Souza EL, de Albuquerque TMR, dos Santos AS, Massa NML, de Brito Alves JL. 2018. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health promoting properties and food functionalities – A review. *Critical Rev Food Sci Nutr.* 17 hal.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 308(5728):1635-1638.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization [online]. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- Fernandez M, Hudson JA, Korpela R, Reyes-Gavilan CG. 2015. Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: an overview. *BioMed Research International Article ID 412714.*
- Fernandez MA, Marette A. 2018. Novel perspectives on fermented milks and cardiometabolic health with a focus on type 2 diabetes. *Nutr Rev.* 76(S1):16–28.
- Fitzgerald RJ, Murray BA. 2006. Bioactive peptide and lactic fermentations. *Int J Dairy Technol.* 59(2):118-125.
- Gaya P, Peiroten A, Landete JM. 2017. Transformation of plant isoflavones into bioactive isoflavones by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Funct Foods.* 39:198-205.

- Gu C, Yang M, Zhou Z, Khan A, Cao J, Cheng G. 2019. Purification and characterization of four benzophenone derivatives from *Mangifera indica* L. leaves and their antioxidant, immunosuppressive and α -glucosidase inhibitory activities. *J Funct Foods*. 52:709-714.
- Gupta S, Abu-Ghannam N. 2012. Probiotic fermentation of plant-based products: possibilities and opportunities. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52(2):183-199.
- Hasan MN, Sultan MZ, Um ME. 2014. Significance of fermented food in nutrition and food science. *J Sci Res*. 6(2):373-386.
- Hasanah U, Miki K, Nitoda T, Kanzaki H. 2021. Aerobic bioconversion of C-glycoside mangiferin into its aglycone norathyriol by an isolated mouse intestinal bacterium. *Biosci Biotech Biochem*. 85(4):989-997.
- He R, Ju X, Yuan J, Wang L, Girgih AT, Aluko RE. 2012. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Res Int*. 49:432-438.
- Hebert EM, Saavedra L, Ferranti P. 2010. Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. Di dalam: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM. (Eds.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Oxford (UK): John Wiley & Sons, hlm 233-249.
- Hwang J, Kim J, Moon H, Kang J, Kim M. 2017. Determination of sodium contents in traditional fermented foods in Korea. *J Food Compos Anal*. 56:110-114.
- Inoue K, Gotou T, Kitajima H, Mizuno S, Nakazawa T, Yamamoto N. 2009. Release of antihypertensive peptides in miso paste during its fermentation, by the addition of casein. *J Biosci Bioeng*. 108:111-115.
- Jin JS, Nishihata T, Kakiuchi N, Hattori M. 2008. Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull*. 31(8):1621-1625.
- Jitpakdee J, Kantachote D, Kanzaki H, Nitoda T. 2022. Potential of lactic acid bacteria to produce functional fermented whey beverage with putative health promoting attributes. *LWT* 160:113269.
- Jitpakdee J, Kantachote D, Kanzaki H, Nitoda T. 2021. Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. *LWT*. 135:110061.

- Jyotshna, Khare P, Shanker K. 2016. Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. *Biofactors*. 42(5):504-514.
- Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopolou K, Skarmoutsou N, Fakiri SM. 2013. Health Benefits of Probiotics: A Review. *SRN Nutr*. 2013: 481651.
- Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. 1998. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*. 21(1):17-23.
- Kim M, Lee J, Han J. 2015. Deglycosylation of isoflavone C-glycosides by newly isolated human intestinal bacteria. *J Sci Food Agric*. 95:1925-1931.
- Klus K, Barz W. 1998. Formation of polyhydroxylated isoflavones from the isoflavones genistein and biochanin A by bacteria isolated from tempe. *Phytochemistry*. 47(6):1045-1048.
- Kuligowski M, Pawlowska K, Jasinka-Kuligowska I, Nowak J. 2017. Isoflavone composition, polyphenols content and antioxidative activity of soybean seeds during tempeh fermentation. *CyTA – J Food*. 15(1):27-33.
- Lang JM, Pan C, Cantor RM, Tang WHW, Garcia-Garcia JC, Kurtz I, Hazen SL, Bergeron N, Krauss RM, Lusic AJ. 2018. Impact of individual traits, saturated fat, and protein source on the gut microbiome. *mBio*. 9(6):e01604-18.
- Lee D, Kim Y, Ko C, Cho K, Bae H, Lee K, Kim J, Park E, Kim D. 2002. Fecal metabolic activities of herbal components to bioactive compounds. *Arch Pharm Res*. 25(2):165-169.
- Li J, Liu M, Yu H, Wang W, Han L, Chen Q, Ruan J, Wen S, Zhang J, Wang T. 2018. Mangiferin improves hepatic lipid metabolism mainly through its metabolite-norathyriol by modulating SIRT-1/AMPK/SREBP-1c signaling. *Front Pharmacol*. 9:201.
- Lin C, Chang C, Arisawa M, Shimizu M, Morita N. 1982. A xanthone glycoside from *Triptospermum taiwanense* and rutin from *Gentiana flavo-maculata*. *Phytochemistry*. 21(4):948-949.
- Lu Y, Govindasamy LS, Lucey JA. 2016. Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J Dairy Sci*. 99:1-12.

- Marco ML, Dustin HD, Sylvie BS, Christopher CJ, Paul PD., Benoit FB, Ganzle MKR., Pasin G, Pihlanto A, Smid, EJ, Hutkin R. 2017. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 44:94–102.
- Martinez-Villaluenga C, Peñas E, Frias J. 2017. Bioactive Peptides in Fermented Foods: Production and evidence for health effects. Di dalam: Frias J, Martinez-Villaluenga C, Peñas E (Eds). *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Cambridge (US): Academic Press, hlm 23–47.
- Mattar R, Mazo DFC, Carrilho FJ. 2012. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin Exp Gastroenterol.* 5:113-21.
- Mayo B, Vázquez L, Flórez AB. 2019. Equol: A bacterial metabolite from the daidzein isoflavone and its presumed beneficial health effects. *Nutrients.* 11:2231.
- Melini F, Melini V, Luziatelli F, Ficca AG, Ruzzi M. 2019. Health-promoting components in fermented foods: an up-to-date systematic review. *Nutrients.* 11(5):1189.
- Mishra S, Mishra HN. 2012. Technological aspects of probiotic functional food development. *Nutrafoods.* 11(4):117-130.
- Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, Sugimoto K, Chikata H, Kinoshita E, Uchida R. 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *J Agric Food Chem.* 58(2):821-827.
- Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, Yadaf H. 2020. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact.* 19:168.
- Niu Y, Liu J, Liu H, Gao L, Feng G, Liu X, Li L. 2016. Hypouricaemic action of mangiferin results from metabolite norathyriol via inhibiting xanthine oxidase activity. *Pharm Biol.* 54(9):1680-1686.
- Nout MJR, Kiers JL. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *J Appl Microbiol.* 98(4):789-805.
- Nuraida L. 2015. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Sci Hum Wellness.* 4(2):47-55.

- Nuraida L. 2016. Probiotik lokal dan pangan fermentasi tradisional untuk meningkatkan kesehatan masyarakat di Indonesia: Peluang dan tantangan pengembangannya. Di dalam: Wijaya CH, Khomsan A (Ed). *Pangan Bermartabat bagi Kedaulatan Bangsa*. Bogor (ID): IPB Press, hlm 87-130.
- Park EK, Shin J, Bae EA, Lee YC, Kim DH. 2006. Intestinal bacteria activate estrogenic effect of main constituents puerarin and daidzin of *Pueraria thunbergiana*. *Biol Pharm Bull*. 29:2432-2435.
- Peñas E., Martínez-Villaluenga C, Frias CJ. 2017. Chapter 24 - Sauerkraut: Production, composition, and health benefits fermented foods in health and disease prevention. Di dalam: Frias J, Martínez-Villaluenga C, Peñas E (Eds). *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Cambridge (US): Academic Press, hlm 557-576.
- Pihlanto A. 2013. Lactic fermentation and bioactive peptides. Di dalam: Kongo M (Ed). *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. London (UK): Intertech Open, hlm 309-332.
- Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. 2014. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr Sci*. 5:1765-1775.
- Rodríguez-Figueroa JC, González-Córdova AF, Astiazaran-García H, Vallejo-Cordoba B. 2013. Hypotensive and heart rate-lowering effects in rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Br J Nutr*. 109(5):827-833.
- Roubos-van den Hil PJ, Nout MJR. 2011. Anti-diarrhoeal aspects of fermented soya beans. Di dalam: El-Shemy H (Ed). *Soybean and Health*. London (UK): Intech Open, hlm 383-406.
- Rubak YT, Nuraida L, Iswantinti D, Prangdimurti, E. 2020. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Vet World*. 13(27):345-353.
- Saito T. 2013. New Japanese yogurt using functional probiotic lactic acid bacteria and future strategies to protect human gut. *Curr Top LAB Probiotics*. 1(1):20-27.
- Sanjukta S, Rai AK. 2016. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in Food Sci & Technol*. 50:1-10.

- Sanlier N, Gokcen BB, Sezgin AC. 2017. Health benefits of fermented foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 590(30):5061-52722.
- Sanugul K, Akao T, Li Y, Kakiuchi N, Nakamura N, Hattori M. 2005a. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme that cleaves a C-glucosyl bond. *Biol Pharm Bull*. 28(9):1672-1678.
- Sato K, Miyasaka S, Tsuji A, Tachi H. 2018. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPPiV) inhibitory activity from natto using DPPiV from *Aspergillus oryzae*. *Food Chem*. 261:51-56.
- Saviano DA. 2014. Lactose digestion from yogurt: Mechanism and relevance. *Am J Clin Nutr*. 99(suppl):1251S-5S.
- Shreiner AB, Kao JY, Vincent B, Young VB. 2015. The gut microbiome in health and disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 31(1):69-75.
- Shori AB, Aboufazli F, Hj Baba AS. 2018. Viability of probiotics in dairy products: A review focusing on yogurt, ice cream, and cheese. Di dalam: *Advanced in Biotechnology vol. 3*, hlm 1-25.
- Shori AB, Baba AS. 2015. Fermented milk derives bioactive peptides with antihypertensive effects. *Integr Food Nutr Metab*, 2(3):180-183.
- Souza JRR, Trevisan MTS, Feitosa JPA, Ricardo NMPS, Hull WE, Erben G, Wurtele G, Breuer A, Frei E, Ulrich CM, Owen RW. 2020. Transformation of mangiferin to norathyriol by human fecal matrix in anaerobic conditions: Comprehensive NMR of the xanthone metabolites, antioxidant capacity, and comparative cytotoxicity against cancer cell lines. *Nat Prod Commun*. 15(3):1-9.
- Swain MR, Anandharaj M, Ray RC, Parveen Rani RPR. 2014. Fermented fruits and vegetables of Asia: a potential source of probiotics. *Biotechnol Res Int*. 250424.
- Tamam B, Syah D, Suhartono MT, Kusuma WA, Tachibana S, Lioe HN. 2019. Proteomic study of bioactive peptides from tempe. *J Biosci Bioeng*. 182(2):241-248.
- Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. 2016. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front Microbiol*. 7:377.

- Tamime AY, Saarela M, Wszolek M, Ghoddousi H, Linares DM, Shah NP. 2017. Production and maintaining viability of probiotic micro-organisms in dairy products. Di dalam: Tamime AY, Thomas LV. (Ed). *Probiotic Dairy Products*. New Jersey (US): Wiley-Blackwell, hlm 67–164.
- Vollmer M, Esders S, Farquharson FM, Neugart S, Duncan SH, Schreiner M, Louis P, Maul R, Rohn S. 2018. Mutual interaction of phenolic compounds and microbiota: Metabolism of complex phenolic apigenin-*C*- and kaempferol-*O*-derivatives by human fecal sample. *J Agric Food Chem*. 66:485–497.
- Vyas U, Ranganathan N. 2012. Review Article: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond. *Gastroenterol Res Practice*. Article ID 872716.
- Wang F, Yan J, Niu Y, Li Y, Lin H, Liu X, Liu J, Li L. 2014. Mangiferin and its aglycone, norathyriol, improve glucose metabolism by activation of AMP-activated protein kinase. *Pharm Biol*. 52(1):68-73.
- Wilkinson AS, Taing M, Pierson JT, Lin C, Dietzgen R, Shaw PN, Gidley MJ, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. 2015. Estrogen modulation properties of mangiferin and quercetin and the mangiferin metabolite norathyriol. *Food Funct*. 6:1847-1854.
- Wu J, Aluko RE, Nakai S. 2006. Structural requirements of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides: Quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4-10 amino acid residues. *J Agric Food Chem*. 54(3):732-738.
- Xu J, Qian D, Jiang S, Guo J, Shang E, Duan J, Yang J. 2014. Application of ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to determine the metabolites of orientin produced by human intestinal bacteria. *J Chromatogr B*. 944:123-127.
- Zheng S, Geng D, Liu S, Wang Q, Liu S, Wang R. 2019. A newly isolated human intestinal bacterium strain capable of deglycosylating flavone *C*-glycosides and its functional properties. *Microb Cell Fact*. 18:94.
- Zhong Y, Priebe MG, Vonk RJ, Huang CY, Antoine JM, He T, Harmsen HJ, Welling GW. 2004. The role of colonic microbiota in lactose intolerance. *Dig Dis Sci*. 49(1):78-83.

BIODATA PENULIS BUKU

Lilis Nuraida

Prof. Lilis Nuraida adalah dosen di Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor. Beliau menamatkan pendidikan S1 di Program Studi Teknologi Pangan IPB pada 1985, dan meneruskan studi S-2 dan S-3 di Reading University, United Kingdom dengan spesialisasi Food Microbiology dari tahun 1987–1992. Beliau juga merupakan peneliti senior di Southeast Asia Food & Agricultural Science & Technology (SEAFAST) Center IPB. Sebagai peneliti, ia memfokuskan penelitiannya di bidang manfaat bakteri asam laktat untuk kesehatan manusia dan penggunaan bakteri asam laktat dalam fermentasi dan pengawetan pangan. Hasil penelitiannya telah dipublikasikan pada berbagai jurnal nasional dan internasional serta dipresentasikan dalam berbagai konferensi nasional dan internasional. Prof. Lilis Nuraida aktif memberikan pelatihan tentang mikrobiologi, sanitasi dan keamanan pangan untuk industri pangan dan institusi pemerintah. Ia juga aktif sebagai pakar untuk bidang mikrobiologi pangan di Badan Pengawas Obat dan Makanan, tim pakar untuk pangan fungsional di Kementerian Kesehatan dan sebagai advisory board untuk Southeast Asia Probiotics Scientific and Regulatory Experts Network (SEA Probiotics SREN). Beberapa buku yang telah ditulis Prof. Lilis Nuraida bersama-sama penulis lainnya diantaranya Keamanan Pangan (2009), Menuju Kantin Sehat di Sekolah, Panduan Pelaksanaan Usaha Makanan Jajanan yang Aman, Tinjauan Ilmiah Teknologi Pengolahan Tempe Kedelai (2015), HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) untuk Industri Pangan Siap Saji (2015), Pangan Tradisional sebagai Basis bagi Industri Pangan Fungsional dan Suplemen (2001, Editor), Current Issues and Challenges in Food Safety (2009, Editor), *Investing in Food Quality Safety and Nutrition* (2009, Editor) dan *Science Based Ingredients: The Future for Food in Asia* (2019, Editor). Beliau juga menulis *Chapter Starter cultures, Lactic vegetable and fruit fermentations, Sweet, sour, alcoholic solid substrate fungal fermentations* dalam buku *Indigenous Fermented Foods of Southeast Asia* (2014), *Chapter Health Benefit of Tempe* dalam buku *Tempe Indonesian Exotic*

Fermented Food (2015), *Chapter Fermented protein-rich plant-based foods* dalam buku *Fermented Food Products* (2020), dan *Chapter Tempe* dalam buku *The Uniqueness of ASEAN Foods* (2020).

Uswatun Hasanah

Uswatun Hasanah lahir di Bogor, 17 November 1989. Setelah memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian dari Institut Pertanian Bogor pada 2011, penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Ilmu Pangan di institusi yang sama dan memperoleh gelar Magister pada 2014. Penulis bekerja sebagai Asisten Peneliti di Laboratorium Evaluasi Sensori Pangan, SEAFAST Center IPB pada tahun 2013-2015. Pada tahun 2015, penulis diterima sebagai dosen di Departemen ITP, Fateta, IPB. Penulis berkesempatan melanjutkan studi mengenai mikrobiologi pangan di Laboratory of Chemistry and Biochemistry of Bioactive Compound, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, Jepang pada tahun 2018 dan memperoleh gelar Ph.D pada tahun 2021. Selama studi S3, penulis memperoleh beasiswa dari JASSO (2018) dan The Japan Food Chemical Research Foundation (2019-2020). Penghargaan yang diperoleh penulis di antaranya Dean's Scientific Award on Excellent Research Completion in 2020, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University pada tahun 2021. Di bawah bimbingan Prof. Hiroshi Kanzaki, penulis menjadi anggota tim pengajuan paten *New method of producing norathyriol and its application* di Jepang. Selain menjadi dosen di Departemen ITP IPB, penulis juga bekerja menjadi staf peneliti di SEAFAST Center IPB, dan secara aktif melakukan pengembangan diri, serta melakukan penelitian dan pengabdian masyarakat. Bidang ilmu yang ditekuni penulis yaitu konversi senyawa bioaktif pangan oleh mikroba, fermentasi pangan, pangan fungsional, senyawa bioaktif alami, dan evaluasi sensori pangan.

Dinda Rana Athaya

Dinda Rana Athaya lahir di Kebumen, 5 Juli 1998. Penulis lulus dari SMA N 1 Kebumen pada tahun 2016 dan telah menyelesaikan studi di Program Studi Teknologi Pangan, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor pada tahun 2020. Beberapa kontribusi penulis selama kuliah diantaranya yaitu menjadi ketua tim Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) Gagasan Tertulis pada tahun 2018 dan sebagai anggota tim PKM Karsa Cipta dan lolos pendanaan

pada tahun 2019. Selain itu, penulis semasa kuliah juga mengikuti *The 6th FiA Conference 2020 on Food Science, Nutrition, and Health* sebagai salah satu *presenter* dengan topik '*Awareness of Millennials Consumers in Kebumen Regency Towards Information on Label and Expire Date of Food Product*'. Setelah memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian, penulis memulai pekerjaan sebagai fasilitator UMKM Pangan Olahan wilayah Jabodetabek di BPOM selama 3 bulan. Penulis menikah pada tahun 2022 dengan Wahyu Prihantoro. Saat ini, penulis sedang menekuni usaha di bidang kuliner, pengajar privat piano, dan usaha di bidang fotografi dan videografi.

Krisa Refita

Krisa Refita dibesarkan di Jakarta dan menempuh pendidikan tinggi di Institut Pertanian Bogor (IPB) sejak 2016. Salah satu kontribusi akademis penulis semasa kuliah yaitu mengikuti *The 6th FiA Conference 2020 on Food Science, Nutrition, and Health* sebagai salah satu *presenter* dengan topik '*Knowledge and Perception about Probiotics among University Students in Jakarta Metropolitan Area*'. Penulis lulus dari program studi Teknologi Pangan dengan gelar Sarjana Teknologi Pertanian pada 2021. Setelah lulus, penulis memulai pekerjaan penuh waktu pertama sebagai Asisten Dosen selama 6 bulan di Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB untuk mata kuliah S1 Teknologi Fermentasi Pangan dalam rangka Program Kompetisi Kampus Merdeka 2021. Saat ini, penulis menempuh pendidikan informal intensif di RevoU mendalami bidang *Data Analytics*. Di samping itu penulis menyalurkan bakat musik melalui kegiatan paduan suara di Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) PSM IPB Agria Swara sejak 2016 dan pekerjaan sampingan sebagai Pelatih Vokal untuk kegiatan lomba tingkat kampus, dan pekerja tetap di Delon Vocal Studio sejak 2022.

