

Isolasi Bakteri Asam Laktat Pada Perendaman Biji Gude (*Cajanus cajan* (L) Millsp.)

Yuni Sine^a Gergonius Fallo^b

^a Fakultas Sains dan Teknologi, Program Studi Biologi Universitas Timor, Kefamenanu, TTU-NTT, 85613, Indonesia email:yuni_sine@yahoo.com

^b Fakultas Ilmu Pendidikan, Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Timor, Kefamenanu, TTU-NTT, 85613, Indonesia

Article Info

Article history:

Received 27 Agustus 2015

Received in revised form 12Desember 2015

Accepted 11Januari 2016

Keywords:

Bakteri Asam laktat

Fermentasi

Biji gude (*Cajanus cajan* (L) Millsp.)

Abstrak

Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang berperan sangat penting dalam proses fermentasi tempe, terutama pada proses perendaman substrat untuk fermentasi, dan bakteri asam laktat berperan dalam penurunan pH dan menjadi inhibitor bagi mikroorganisme yang menyebabkan kontaminan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri asam laktat yang terdapat dalam air rendaman biji gude (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) yang digunakan sebagai substrat fermentasi tempe. Bakteri asam laktat diisolasi dengan metoda pengenceran secara *pour plate*, dan diinokulasikan ke dalam medium deMann Rogosa Sharpe Agar (MRSA). Kemudian karakter morfologi koloni dianalisis secara kualitatif. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa didapatkan dua isolate bakteri yaitu bakteri dengan kode BAR1 dan BAR2. BAR1 yang diisolasi adalah berbentuk bulat, memiliki elevasi cembung, tepian licin, berwarna putih susu, bentuk sel basil pendek, gram positif, spora negatif, katalase negatif, non motil, menghasilkan gas, reduksi nitrat negatif, mirip dengan *Lactobacillus* sp. Sedangkan isolat BAR2 berbentuk bulat, memiliki elevasi cembung, tepian licin, berwarna putih susu, bentuk sel coccus, gram positif, spora negatif, katalase negatif, non motil, tidak menghasilkan gas, reduksi nitrat negatif, mirip dengan *Pediococcus* sp.

1. Pendahuluan

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang memiliki kontribusi yang besar dalam dunia pangan terutama sebagai pengawet alami dari suatu produk pangan fermentasi. Penggunaan BAL dikarenakan bakteri asam laktat disebut sebagai food grade microorganisms yang merupakan mikroba yang tidak berisiko terhadap kesehatan karena tidak menghasilkan racun berbahaya pada pangan melainkan mempunyai fungsi sebaliknya yang baik bagi kesehatan. Hal ini karena bakteri asam laktat dapat menghambat secara alami mikroba patogen.

Metabolit aktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat yaitu etanol, hidroperoksida, bakteriosin, dan asam laktat. Metabolit yang dihasilkan merupakan agen yang dapat digunakan dalam membunuh bakteri. Salah satu yang digunakan sebagai antimikroba yaitu bakteriosin. Dilaporkan bahwa bakteriosin memegang peranan paling penting dalam menanggulangi infeksi akibat mikroorganisme. Selain itu asam laktat yang diproduksi oleh BAL dapat menurunkan pH lingkungan. pH yang rendah dapat menghambat kontaminasi bakteri pembusuk dan juga membunuh mikroba patogen terutama yang ada di dalam tubuh.

Penelitian tentang isolasi BAL telah banyak dilakukan terutama pada produk-produk fermentasi (tape, tempe), namun belum ada yang diisolasi dari rendaman biji gude atau kacang turis. Di Nusa Tenggara Timur (NTT) biji gude atau kacang turis (*Cajanus cajan* L.) banyak tumbuh dan cukup melimpah. Biji gude pada umumnya toleran terhadap kekeringan, polong tidak mudah pecah dan sesuai untuk berbagai jenis tanah, sehingga tanaman gude telah dikembangkan di daerah-daerah kering dan tandus. Biji gude juga bisa digunakan sebagai substrat fermentasi tempe. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri asam laktat yang terdapat dalam air rendaman biji gude (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) yang digunakan sebagai substrat fermentasi tempe.

2. Metode

2.1 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan untuk membuat tempe adalah: Biji gude (*Cajanus cajan* L.) yang berasal dari Desa Binaus Kabupaten Timor Tengah Selatan-Nusa Tenggara Timur. Media pertumbuhan bakteri: Media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), Media Uji pertumbuhan Bakteri: media yang digunakan untuk menguji pertumbuhan bakteri adalah *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), dengan komposisi *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Nutrient agar*(NA), *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), *Peptone*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *Laminary air flow* (Mimmert), timbangan analitik (ANDGR-200), Sentrifuge (Heraeus Sepatect-Biofuge 13), spektrofotometer (Genesis 20 Thermo Spectronic), Penangas (Mimmert), pipet mikro 1000 µl (*Eppendorf*), mikroskop cahaya (Boeco, Germany), seperangkat alat gelas (*glassware*) untuk mengkulturkan bakteri.

2.2 Pengamatan Keberadaan Isolasi BAL

Pengamatan keberadaan BAL dilakukan terutama pada proses penyiapan biji gude sebagai substrat fermentasi. BAL diisolasi dari air rendaman biji gude melalui pengenceran serimenggunakan akuades steril (seri pengenceran 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, dan 10⁻⁴) dan ditanam secara taburan. Masing-masing suspensi pengenceran sampel yang dimulai dari 10⁻³ dan 10⁻⁴, dipipet 0,1 ml dan diinokulasikan ke dalam cawan petri steril yang kemudian dituangi medium MRSA yang sedang mencair (55°C), diratakan, diinkubasi pada suhu 30°C selama 24–48 jam. Koloni yang tumbuh terpisah dan berbeda diambil secara aseptik dan dipindahkan ke medium agar miring untuk pengamatan lebih lanjut (makroskopik atau mikroskopik).

2.3 Karakterisasi BAL

Karakterisasi bakteri asam laktat dilakukan menurut standar identifikasi bakteri (*Bergeys Manual Determinative*) yang meliputi karakteri morfologis koloni dan selular, serta sifat fisiologis. Karakter morfologi koloni (bentuk, warna, tepian, elevasi, ukuran koloni) dan morfologi sel secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram, spora dan motilitas bakteri, sedangkan

karakter fisiologis BAL dilakukan dengan uji katalase, kemampuan tumbuh BAL pada berbagai konsentrasi garam (0%, 4% dan 6%) dan suhu (5, 15, 37, dan 45 °C).

a. Pewarnaan Gram (Soetarto, et al., 2009)

Secara aseptis dibuat lapisan tipis dari suspensi bakteri di atas gelas objek dan dilakukan fiksasi pada udara terbuka. Pada lapisan tipis ini ditetesi zat warna gram A dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air dengan cara memegang gelas objek pada posisi miring. Sisa air yang tertinggal pada gelas objek dibuang dan ditetesi dengan Gram B serta dibiarkan selama 1 menit. Setelah dicuci kembali dengan air, kemudian Gram C dan dibiarkan selama 10-20 detik. Setelah dicuci sebentar dengan air, kemudian diwarnai dengan safranin (gram D) dan dibiarkan selama 10-20 detik. Kaca objek selanjutnya dibilas dengan air dan dikeringkan dengan kertas serap (tisu). Preparat ini diamati dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif yang telah diolesi minyak immersi. Dengan pengamatan secara mikroskopik, dapat ditentukan bentuk sel bakteri serta reaksi Gramnya. Bakteri Gram positif akan ditunjukkan dengan warna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif akan ditandai dengan warna merah atau merah muda.

b. Pewarnaan Spora (Soetarto, et al., 2009)

Secara aseptis dibuat lapisan tipis dari suspensi bakteri di atas gelas objek dan difiksasi. Pada lapisan tipis ini ditetesi pewarna hijau malaisit dan dibiarkan selama 20 menit tanpa pemanasan. Selanjutnya, preparat dibilas dengan air dengan cara memegang gelas objek pada posisi miring dan dikeringkan dengan kertas serap (*tissue*). Setelah kering, kemudian ditambahkan beberapa tetes zat warna safranin dan dibiarkan selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir serta dikeringkan. Preparat ini diamati di bawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif yang telah diolesi minyak immersi. Dengan cara ini endospora yang masih terdapat dalam sel vegetatif maupun spora bebas akan berwarna hijaubiru, sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah sampai merah muda.

c. Uji Motilitas (Fardiaz 1989)

Pengujian motilitas bakteri dilakukan dengan cara sebagai berikut: secara aseptis dengan menggunakan jarum ose yang lurus bagian ujungnya, isolat bakteri ditusukkan ke dalam *nutrient broth* yang mengandung agar 0,5 % (agar lunak). Inkubasi dilakukan pada suhu 35°C selama 2 hari. Bila pertumbuhan menyebar, maka bakteri tersebut bersifat motil dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar, hanya berupa garis saja, maka bakteri tersebut bersifat non motil.

d. Uji Katalase (Soetarto, et al., 2009)

Secara aseptis diambil 1 loop isolat bakteri dan dipindahkan pada gelas objek. Preparat tersebut ditetesi dengan larutan 3 % H₂O₂. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung oksigen yang menunjukkan bahwa organisme yang bersangkutan menghasilkan enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Hadioetomo, 1993).

e. Uji Kemampuan tumbuh pada Berbagai Suhu (Pisol, et al., 2013)

Kemampuan tumbuh isolat pada berbagai suhu diuji dengan menggunakan medium cair (MRSB), diinkubasi pada suhu 5°C, 15°C dan 45°C selama 24- 48jam. Pertumbuhan bakteri dipantau berdasarkan kekeruhan diukur secara spektrofotometri (A_{600nm}).

f. Uji Kemampuan tumbuh pada Berbagai Konsentrasi Garam (Pisol, et al., 2013)

Kemampuan tumbuh isolat pada berbagai konsentrasi garam diuji dengan menggunakan MRSB yang ditambahkan NaCl 0%, 4% dan 6,5%, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24- 48jam. Pertumbuhan yang terjadi pada bakteri dipantau berdasarkan kekeruhan diukur secara spektrofotometri (A_{600nm}).

g. Uji Reduksi Nitrat (Hadioetomo, 1985)

Kemampuan isolat bakteri dalam mereduksi nitrat dilakukan dengan menggunakan *nitrate broth*. Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam pada kultur cair, kemampuan mereduksi nitrat bagi masing-masing isolat

bakteri dideteksi dengan membubuhkan tiga tetes larutan asam sulfanilat dan tiga tetes larutan dimetil *alpa-naphthylamin* ke dalam kultur cair tersebut. Reduksi nitrat menjadi nitrit, ditandai dengan terbentuk warna merah (reduksi nitrat positif).

h. Kemampuan Fermentasi Gula dan Pembentukan Gas isolat bakteri (Soetarto, *et al.*, 2009)

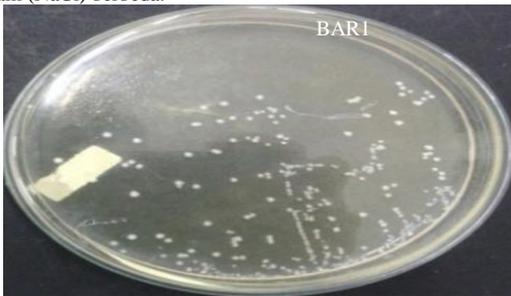
Uji kemampuan fermentasi dilakukan menggunakan medium *triple sugar iron agar* (TSIA) yang diberi glukosa, sukrosa atau laktosa. Fermentasi gula tersebut ditunjukkan dengan adanya perubahan pH medium dengan perubahan warna, pembentukan gas darigula sederhana (glukosa) dan produksi H₂S. Isolat bakteri diinokulasi pada agar miring TSIA dengan cara menusukannya sampai bagian bawah agar kemudian ditarik ke permukaan agar, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam.

Reaksi-reaksi yang terjadi pada medium TSIA adalah jika bagian bawah agar agar berwarna merah bagian atas agar berwarna oranye maka tidak terjadi fermentasi glukosa, jika bagian bawah agar berwarna kuning, bagian atas agar berwarna merah maka terjadi fermentasi glukosa, jika bagian bawah tabung kuning bagian atas tabung kuning terjadi fermentasi laktosa dan sukrosa. Jika agar terangkat atau pecah maka ada produksi gas.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Bakteri Asam Laktat Saat Perendaman

Bakteri yang berasal dari sampel air rendaman biji gude ditumbuhkan ke dalam media MRSA. Media tersebut merupakan medium selektif bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Untuk mengurangi jumlah populasi mikroba yang terdapat dalam media, terlebih dahulu dilakukan pengenceran. Larutan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades steril. Hasil isolasi bakteri asam laktat yang diperoleh dimurnikan, kemudian diidentifikasi dengan berpedoman Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). Pengamatan pada morfologi koloni meliputi bentuk, tepian, elevasi dan warna koloni (Hadioetomo, 1993). Pengamatan morfologi sel yang meliputi uji pewarnaan Gram, bentuk sel dan uji motilitas, serta uji sifat fisiologis yaitu uji katalase, dilakukan uji pertumbuhan pada suhu dan konsentrasi garam (NaCl) berbeda.



Gambar 1. Koloni Bakteri Asam Laktat. Ket: Strain BAR1= bakteri air rendaman koloni 1

Koloni bakteri strain BAR1 (gambar 15) menunjukkan koloni bakteri berwarna putih susu, berbentuk bulat, memiliki tepian yang licin serta permukaan yang cembung, karakter yang sama juga terlihat pada koloni bakteri strain BAR2 (Gambar 16) akan tetapi ukuran koloni keduanya berbeda.



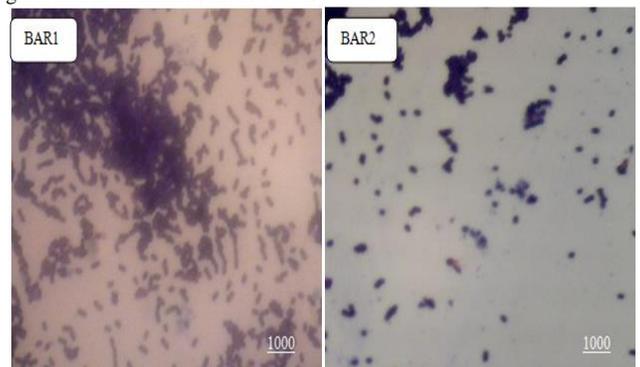
Gambar 2. Koloni Bakteri Asam Laktat. Ket: Strain BAR2= bakteri air rendaman koloni 2

Tabel 1. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Karakteristik	Isolat		<i>Lactobacillus</i> sp*	<i>Pediococcus</i> sp*
	BAR1	BAR2		
Morfologi koloni:				
Bentuk	Bulat	Bulat	Bulat	Bulat
Ukurankoloni	2,9 mm	2,5 mm	2,0-5,0 mm	1,0-2,5 mm
Ukuran sel	0,6 µm	0,3 µm	0,5-1,2 x 1,0-10,0 µm	1,0-2,0 µm
Elevasi	Cembung	Cembung	Cembung	Cembung
Tepian	Licin	Licin	Licin	Licin
Wama	Putih Susu	Putih Susu	Krem, putih	Putih keabu-abuan, putih susu.
Produksi gas	Positif	Negatif	Positif	Negatif
Bentuk sel	Basil	Coccus (berpasangan)	Basil	Coccus (berpasangan, tidak memanjang)
Pengecatan Gram	Positif	Positif	Positif	Positif
Pengecatan Spora	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Katalase	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
Motilitas	Non motil	Non motil	Non motil	Non motil
Fermentasi	Positif	Positif	Positif	Positif
Pertumbuhan pada suhu (°C):				
5°C	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
15°C	Positif	Positif	Positif	Positif
37°C	Positif	Positif	Positif	Positif
45°C	Positif	Positif	Positif	Positif
Konsentrasi Garam (%):				
0%	Positif	Positif	Positif	Positif
4%	Positif	Positif	Positif	Positif
6,5%	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif/positif (jarang)
Nitrat	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

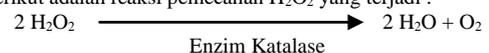
Sumber=Bergey's manual of determinative bacteriology (Holt *et al.*, 1994)*.

Untuk memastikan ada bakteri asam laktat pada air rendaman keping gude, dilakukan pengecatan spora, berdasarkan hasil pengecatan spora diketahui bahwa isolate bakteri yang diperoleh merupakan bakteri yang tidak memiliki spora (spora negatif), yang merupakan karakter dari bakteri asam laktat, selanjutnya dilakuakn pengecatan gram untuk menentukan sifat gram isolate bakteri. Hasil yang diperoleh adalah bakteri dengan kode strain BAR1 dan BAR2 merupakan bakteri gram positif, yaitu kedua isolat bakteri berwarna ungu kebiruan, bentuk bakteri terlihat BAR1 memiliki bentuk basil pendek sedangkan BAR2 memiliki bentuk coccus.



Gambar 3. Morfologi sel bakteri asam laktat dari air rendaman keping gude (Strain BAR1=Gram+, Strain BAR2=); Bar= 1000µm, pembesaran 10x100.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan uji katalase, didapatkan hasil negatif terhadap isolat bakteri uji. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya gelembung udara yang terbentuk pada saat isolat bakteri dicampurkan kedalam tetesan H₂O₂. Pada hasil positif, akan terbentuk gelembung udara saat isolat dicampurkan ke dalam zat H₂O₂. Hal ini merupakan indikasi terjadinya pemecahan H₂O₂ menjadi molekul air dan oksigen yang diperantarai oleh enzim katalase. Berikut adalah reaksi pemecahan H₂O₂ yang terjadi :



Sifat katalase negatif yang ditunjukkan oleh isolat bakteri uji merupakan salah satu karakter kunci bakteri asam laktat. Karakter katalase negatif yang dimiliki oleh bakteri asam laktat disebabkan oleh sifat kelompok bakteri asam laktat yang merupakan jenis bakteri *mikroaerofilik*.

Lahtinen *et al.* (2012) menyatakan bahwa bakteri asam laktat mempunyai karakter morfologis, metabolis, dan fisiologis tertentu. Bakteri asam laktat tidak melakukan respirasi namun bersifat *aerotoleran*, selnya menghasilkan asam laktat sebagai salah satu produk utama fermentasi karbohidrat. Bakteri yang dikelompokkan ke dalam bakteri asam laktat merupakan bakteri yang bersifat non-motil. Isolat bakteri ditumbuhkan pada medium MRS semi padat atau agar lunak tegak dengan konsentrasi agar sebesar 0,8%. Isolat ditumbuhkan dengan cara tusukan. Dari hasil penelitian isolat bakteri yang diuji merupakan bakteri non-motil. Hal tersebut terlihat dari pertumbuhan koloni yang hanya ada pada area sekitar tusukan dan tidak menyebar ke bagian medium yang lain.

Bakteri asam laktat dapat tumbuh pada konsentrasi NaCl 4% tetapi tidak dapat tumbuh pada konsentrasi 6,5 %. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 15°C, dan tumbuh dengan baik pada suhu 37°C namun pada suhu 45°C tidak selalu dapat tumbuh dengan baik, hal ini karena kondisi lingkungan sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikrobia, jika suhu terlalu dingin, panas atau pun dengan kadar garam yang tinggi akan menciptakan kondisi yang ekstrim pada lingkungan pertumbuhan dari mikrobia (Guerra *et al.*, 2007).

Morfologi koloni terpilih dari BAL isolat BAR1 yang diisolasi adalah berbentuk bulat, memiliki elevasi cembung, tepian licin, berwarna putih susu, bentuk sel basil pendek, gram positif, spora negatif, katalase negatif, non motil, menghasilkan gas, reduksi nitrat negatif, mirip dengan *Lactobacillus* sp. Sedangkan isolat BAR2 berbentuk bulat, memiliki elevasi cembung, tepian licin, berwarna putih susu, bentuk sel coccus, gram positif, spora negatif, katalase negatif, non motil, tidak menghasilkan gas, reduksi nitrat negatif, mirip dengan *Pediococcus* sp. Menurut Ashenafi (1991) bakteri asam laktat memberikan kontribusi dalam proses fermentasi tempe. Bakteri asam laktat juga dapat menghilangkan pertumbuhan jamur seperti *Aspergillus*, *Fusarium* dan *Penicillium* (Magnusson *et al.*, 2003). Pada saat perendaman bakteri asam laktat akan berperan sebagai inhibitor sehingga mikrobia yang lain tidak tumbuh. Dari hasil penelitian ini, diketahui bahwa pada air rendaman biji gude terdapat bakteri asam laktat yang tumbuh, hal ini sesuai dengan Mulyowidarso *et al* (1991) yang melaporkan bahwa BAL memiliki peranan yang sangat penting pada saat perendaman, dengan menurunkan pH dan karena itu mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen. Penurunan pH biji gude memberi kesempatan jamur tempe tumbuh lebih lama dan menjamin kualitas tempe yang baik. Karena BAL menjadikan pH biji gude turun sehingga memberikan kondisi yang baik bagi pertumbuhan jamur. Menurut Hermana dan Karmini (1996) keuntungan lain dari kondisi asam yang disebabkan oleh BAL dalam biji adalah menghambat kenaikan pH sampai di atas 7,0 karena adanya aktivitas proteolitik jamur dapat membebaskan amonia sehingga dapat meningkatkan pH dalam biji. Pada pH di atas 7,0 dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan atau kematian jamur tempe.

4 Simpulan

Bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi adalah isolat BAR1 mirip dengan *Lactobacillus* sp. Sedangkan isolat BAR2 mirip dengan *Pediococcus* sp. Bakteri asam laktat berperan penting dalam fermentasi tempe, terutama pada saat perendaman biji gude, yang menyebabkan penurunan pH, yang menjadi inhibitor bagi mikrobia kontaminan.

Pustaka

- Adam. 2009. *Tempe dan Proses Pembuatannya*. <http://www.ad4msan.com/> Diakses pada tanggal 21 april 2015.
- Ashenafi, M., 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology*, vol 8 hal. 303-310.
- Ashenafi, M dan Busse, M. 1991. The Microflora of Soaking During Tempeh Production from Various Beans. *J of Food Science and Technology*. Hal. 501-506.
- Buckle, KA., Edwards, RA, Fleet, GH, Wootton, M. 1985. *Ilmu Pangan*. Penerjemah: Purnomo, H. dan Adiono). Jakarta: UI Press
- Desmazeaud, M. 1996. Lactic Acid Bacteria in Food: Use and Safety, *Cahiers Agricultures*, vol 5, no 5. hal. 331-342.
- Downes, DF, Ito, K. 2001. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. Fourth Edition. American Public Health Association Washington DC. p.656.
- Feng, XM, Eriksson, Anders R.B., and Schnurer Johan. 2005. Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation. *J of Food Microbiology* vol 104, hal. 249-256.
- Guerra, P.N., Bernárdez, F., Méndez, P., Cachaldora, J., Pastrana, P., Pastrana, L. 2007. Production of Four Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria and their Evaluation as Feed Additives for Weaned Piglets. *Animal Feed Science and Technology* vol. 134 hal. 89-107.
- Hermana, M. Karmini, Karyadi, D. 1996. Health significance of tempe for human nutrition. Proceedings of the Second International Soybean Processing and Utilization Conference. Funny Publishing Limited Partnership. Bangkok Thailand. 391-394.
- Holt, John. G., Noel, RK., Peter, HAS., James, TS., Stanley, TW. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. United States of America: A Waverly Company.

- Hui, YH., Meunier-Goddik, L. Hansen, AS., Josephsen, J., Nip, W., Stanfield, PS., Torlora, F., 2004. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Marcel Dekker Inc. New York
- John K. 2002. *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (*PigeonPea*). www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/Cajanus%20cajan.pdf.
- Lahtinen, SP., Guimonde, M., Ouwhend, AC., Reinikainen, JP., Salminen, SJ., 2005. *Comparison of Four Methods to Enumerate Probiotic Bifidobacteria in Fermented Food Product*. Department of Food Chemistry and Biochemistry. University of Turku.
- Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., Schnurer, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*. vol 219, hal. 129 – 135.
- Mulyowidarso, RK, Fleet GH, Buckle, KA. 1989. The microbial ecology of soybean soaking for tempe production. *Int J Food Microbiol*. Vol 8, no 1, hal. 35–46.
- Pisol, B., Nuraida, L., Abdullah, Suliantari, N., Khalil, KA. 2013. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Soybean Tempe. 4th International Conference on Biology, Environment and Chemistry *IPCBE* vol. 58 (2013). IACSIT Press, Singapore. DOI: 10.7763/IPCBE. 2013. V58. 7.
- Ryan, J. G. 1998. *Pigeonpea Improvement*. ACIAR Projects 8201 and 8567. Trendsetting. Canberra.
- Singh, F and Diwakar, B. 1993. *Nutritive Value and Uses of Pigeonpea and Groundnut*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. India. <http://www.icrisat.org/Training/sds.14.pdf>. Diakses 4 maret 2015.
- Soetarto, ES., Nastiti, SJ., Suharni, T., Sembiring, L., 2009. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*. Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi UGM, Yogyakarta.
- Steinkraus, KH., Hand, DB., Van Buren, JP., Heckler, LR. 1961. *Pilot Plant Studies On Tempeh*. Proc. Conf. Soybean Products for Proteins in Human Food. USDA, Peoria. Hal. 71-22.
- Sujaya, I. N., Nocianitri, K. A. and Asano, K. 2010. *Diversity of bacterial flora of Indonesian ragi tape and their dynamics during the tape fermentation as determined by PCR-DGGE*. *J research food*. Vol 17, hal. 239-245.
- Tadasse, G., Ephraim, E., Ashenafi, M. 2005. Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolates from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some food-borne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Journal of Food Safety*.
- Tamang, JP., Shin, DH., Jung, SJ., Chae, SW. 2016. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.* 7:578. doi: 10.3389/fmicb.2016.00578
- Taylor, L. 2005. *Tropical Plant Database: GUANDU (Cajanus cajan)*. www.raintree.com/guandu.htm. Diakses pada Senin, 14 april 2015.
- Van der maesen, LJG. 1980. *Taxonomy of Cajanus*. Proceedings of the international workshop on pigeonpeas. ICRISAT center. India. Vol 2. hal 9-14.
- Wang, HL., Ruttle, DL., Hesseltine, CW. 1969. Antibacterial Compound from a Soybean Product Fermented by *Rhizopus oligosporus*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* vol 131, hal. 579-583.