

TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

**IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI ANTI KAPANG DARI
FERMENTASI KAKAO DI GUNUNG KIDUL YOGYAKARTA**

*Identification of Lactic Acid Bacteria as Antifungal Agent Isolated from Cocoa Fermentation at
Gunung Kidul Yogyakarta*

Bianca Shindy Permata Putri, * Sony Suwasono, Miftahul Choiron

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121
E-mail: bianca.shindy@yahoo.co.id

ABSTRACT

Cocoa became the main source of income for farmers on Indonesia cocoa centers. One of the areas in Indonesia which is the biggest cocoa producer in the Regency of Gunung Kidul in Yogyakarta. Cocoa beans in Gunung Kidul was confronted on the issue of the quality very low, so that the selling price of cocoa beans is cheap which is about Rp 13,500 – Rp 17,500 /kg. This occurs because the dried cocoa beans produced are stricken with mold. The fermentation of cocoa beans is done still not good with the time varies. Fermentation was instrumental in determining the quality of the dried cocoa beans. Complex involving fermentation of lactic acid bacteria who has the ability to produce lactic acid which can inhibit the growth of mold. This research is focused on the isolation and identification of a potentially lactic acid bacteria antifungal. The lactic acid bacteria has the potential to isolate antifungal from the natural fermentation of cocoa beans and identified by phenotype to determine types of lactic acid bacteria with potential natural antifungal fermentation of cocoa beans. Microbes are used mould and lactic acid bacteria obtained from seeds and slime fermented cocoa in the hamlet of Sawur Gunung Kidul . This type of mold include mould is Brown (*A. ochraceus*), mold is green (*A. flavus*) and white mould (*Penicillium spp*). 10 isolates with high antifungal activity identified according to Bergey's Manual of Bacteriology Determinatives. The research results obtained that isolates L16B (3.1), (2.2), B28C(2.2) as *Leuconostoc mesenteroides*; B40B (3.2), B88C (1.1), as the *Lactobacillus plantarum*; B88C (7.2), B40B (1.2), as the *Lactobacillus fermentum*; L16B (1.1), (2.1), L16B as *Leuconostoc paramesenteroides* L16A, (2.1), (9.2), B28C as *Lactobacillus casei*. All isolates of lactic acid bacteria produce compounds that are antifungal of *A. flavus*, *A. ochraceus* and *Penicillium spp*.

Key words: lactic acid bacteria, fermentation of cocoa, antifungal, *L. mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *Lac. plantarum*, *Lac.fermentum*, *Lac. casei*

ABSTRAK

Tanaman kakao menjadi sumber penghasilan utama bagi petani sentra kakao di Indonesia. Salah satu daerah di Indonesia yang merupakan penghasil kakao terbesar yaitu Kabupaten Gunung Kidul Yogyakarta. Biji kakao di Gunung Kidul dihadapkan pada masalah mutu yang dihasilkan sangat rendah, sehingga harga jual biji kakao tergolong murah yaitu sekitar Rp 13.500,00 – Rp. 17.500,00/ kg. Hal tersebut terjadi dikarenakan biji kakao kering yang dihasilkan terserang kapang. Fermentasi biji kakao yang dilakukan masih belum baik dengan waktu yang bervariasi. Fermentasi berperan penting dalam menentukan kualitas akhir biji kakao kering. Fermentasi yang kompleks melibatkan bakteri asam laktat (BAL) yang mempunyai kemampuan menghasilkan asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan kapang. Penelitian ini difokuskan pada isolasi dan identifikasi BAL yang berpotensi anti kapang. Mengisolasi BAL yang mempunyai potensi anti kapang dari fermentasi alami biji kakao dan mengidentifikasi secara fenotipe untuk menentukan jenis bakteri asam laktat yang mempunyai potensi anti kapang dari fermentasi alami biji kakao. Mikroba yang digunakan yaitu kapang dan BAL diperoleh dari biji dan lendir kakao terfermentasi di Dusun Sawur Gunung Kidul. Jenis kapang meliputi kapang berwarna coklat (*A.ochraceus*), kapang berwarna hijau (*A. flavus*) dan kapang berwarna putih (*Penicillium spp*). 10 isolat dengan aktivitas anti kapang tertinggi diidentifikasi menurut *Bergey's Manual of Determinatif Bacteriology*. Hasil penelitian didapatkan bahwa isolat L16B(3.1), B28C(2.2), sebagai *Leuconostoc mesenteroides*; B40B(3.2), B88C(1.1), sebagai *Lactobacillus plantarum*; B88C(7.2), B40B(1.2), sebagai *Lactobacillus fermentum*; L16B(1.1), L16B(2.1), sebagai *Leuconostoc paramesenteroides*, L16A(2.1), B28C(9.2), sebagai *Lactobacillus casei*. Seluruh isolat bakteri asam laktat tersebut menghasilkan senyawa yang bersifat anti kapang terhadap *A. flavus*, *A. ochraceus*, dan *Penicillium spp*.

Kata kunci : bakteri asam laktat, fermentasi kakao, anti kapang, *L. mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *Lac. plantarum*, *Lac.fermentum*, *Lac. casei*

How to cite: Putri, Sony, Miftahul 2014. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Sebagai Anti Kapang Dari Fermentasi Kakao Di Gunung Kidul Yogyakarta*. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

PENDAHULUAN

Tanaman kakao merupakan salah satu komoditas andalan sektor perkebunan di Indonesia. Perkebunan kakao rakyat memegang peranan penting dalam peningkatan nilai ekspor biji kakao karena hampir 90% dari areal luasan kebun kakao yang ada di Indonesia adalah perkebunan kakao yang diusahakan oleh rakyat (Departemen Pertanian, 2012).

Salah satu daerah di Indonesia yang merupakan penghasil kakao terbesar yaitu Kabupaten Gunung Kidul Yogyakarta. Kabupaten Gunung Kidul memiliki unit pengolahan kakao yaitu koperasi Ngupadi Koyo. Dalam satu dekade terakhir ini, biji kakao rakyat khususnya di Gunung Kidul dihadapkan pada masalah mutu yang dihasilkan sangat rendah.

Biji kakao pada umumnya dijual dalam bentuk biji kakao kering. Harga biji kakao dengan mutu yang baik umumnya Rp 22.000,00 – Rp 25.000,00 per kg. Namun harga jual biji kakao kering yang berada di Desa Sawur tergolong rendah yaitu sekitar Rp 13.500,00 – Rp. 17.500,00 per kg. Hal tersebut dikarenakan lebih dari 50% biji kakao kering yang dihasilkan masih terserang kapang, sehingga mutu biji kakao rendah. Fermentasi biji kakao yang dilakukan belum baik dengan waktu yang bervariasi, ada yang 2 hari, 3 hari, bahkan 4 hari (Pagilaran, 2013).

Fermentasi berperan penting dalam menentukan kualitas akhir biji kakao kering. Fermentasi yang kompleks melibatkan bakteri asam laktat (BAL) yang mempunyai kemampuan menghasilkan asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan kapang (Yang dan Carol, 2004).

Berdasarkan hal tersebut, diperlukan suatu penelitian untuk isolasi dan identifikasi kultur BAL di Dusun Sawur Gunung kidul sehingga didapatkan isolat BAL yang bersifat anti kapang dan diharapkan dapat menekan kontaminasi kapang.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Rancangan Penelitian. Penelitian lapang untuk fermentasi biji kakao dilakukan di Dusun Sawur Desa Sawahan Kecamatan Ponjong Kabupaten Gunung Kidul Yogyakarta. Penelitian Laboratorium dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji dan lendir kakao. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah MRS Broth, MEA, Sukrosa Agar, PY broth dan MRS-A. Pelaksanaan penelitian ini dibagi dalam tiga tahapan, yaitu penelitian tahap pertama untuk isolasi BAL dari biji dan lendir kakao, metode isolasi yang digunakan adalah metode pengenceran yang dilanjutkan dengan inokulasi secara *pour plate*. Tahap kedua pengujian aktivitas anti kapang meliputi ketiga kapang yaitu kapang hijau (*A. flavus*), kapang coklat (*A. ochraceus*) dan kapang putih (*Penicillium spp*). Tahap ketiga identifikasi bakteri secara fenotip meliputi: pewarnaan gram, pertumbuhan pada suhu yang berbeda, pertumbuhan pada konsentrasi garam yang berbeda, pengukuran pH, produksi dekstran dari sukrosa, dan pertumbuhan pada karbohidrat yang berbeda.

Pengukuran pH dan suhu fermentasi (Cahyaningsih, 2006). Suhu fermentasi diukur dengan thermometer pada tumpukan biji kakao selama fermentasi. Pengukuran pH lendir dilakukan dengan mengambil 5 ml lendir lalu diukur pH. Pengukuran pH permukaan biji kakao dilakukan dengan cara menempelkan pH meter secara langsung pada permukaan biji kakao. Pengukuran pH keping biji dilakukan dengan cara menghancurkan 5 gram biji lalu dicampur dan diaduk merata dengan 5 ml aquades.

Isolasi BAL dari Biji dan Lendir Kakao Terfermentasi (Cappucino dan sherman, 2005). Proses diawali dengan menimbang 5 gram biji kakao terfermentasi, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 45 ml aquades steril. Pengambilan 1 ml suspensi dan diencerkan dalam tabung reaksi berisi aquades steril, dikocok hingga homogen dan dibuat pengenceran 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} kemudian masing-masing diambil 1 ml suspensi kemudian di tuang ke cawan petri lalu ditambahkan media MRSa CaCO₃ 1%.

Isolasi kultur BAL dari lendir kakao terfermentasi, dilakukan dengan mengambil 5 ml lendir dan diencerkan dalam 45 ml aquades steril, kemudian dilakukan seri pengenceran 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} . Sampel suspensi biji maupun lendir kakao diinokulasikan pada media MRS Agar CaCO₃ 1%, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 48 jam.

Aktivitas Anti Kapang (Nielsen, 2007). Menginokulasikan 25 miselium kapang ke 25 ml aquades steril. 1 ml suspensi dimasukkan ke dalam cawan petri, selanjutnya secara *pour plate* ditambahkan media MEA, kemudian dibiarkan hingga memadat. Pembuatan sumuran media MEA yang telah diinokulasi dengan kapang diameter 0,25 cm menggunakan alat pipet ependorf, lima kali ulangan dan satu sumuran sebagai kontrol.

Isolat BAL yang akan diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada 1 ml MRS Broth kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian dilakukan dengan memipet 40 – 50 µL suspensi kultur BAL dan dituangkan dalam masing-masing sumur. Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Satu sumur sebagai kontrol hanya diisi dengan 40 – 50µL media MRS Broth.

Luas daerah bening di sekitar sumuran ditentukan sebagai efek penghambatan BAL terhadap kapang yang diuji. BAL yang dipilih adalah yang memiliki daerah bening yang luas mencakup ketiga kapang target yaitu kapang hijau (*A. flavus*), kapang coklat (*A. ochraceus*) dan kapang putih (*Penicillium spp*). Luas daerah penghambatan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Luas daerah penghambatan = πr^2

Keterangan : $\pi = 3,14$

$$r = \frac{\text{diameter penghambatan}}{2}$$

Setelah aktivitas anti kapang dilakukan maka menginokulasikan produksi CO₂ dengan metode agar tusuk untuk menghitung total skor aktivitas anti kapang. Menginokulasikan Satu isolat BAL pada media MRS agar steril dalam tabung reaksi. Isolat BAL tersebut ditusukkan ke media agar tegak kemudian disumbat kapas. Media yang berisi isolat diinkubasi 37°C selama 48 jam. Mengamati ada tidaknya gas CO₂ yang dihasilkan BAL. Media agar tegak yang terdorong gas CO₂ merupakan kelompok heterofermentatif. Tingginya gas CO₂ yang terdorong akan dihitung volumenya (Salminen dan Ouwehand, 2004)

Pewarnaan gram (Bell, 2005). Gelas objek dan gelas penutup dibersihkan dengan cara disemprot menggunakan etanol 70% kemudian dikeringanginkan. 1 ose bakteri umur 24 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas objek kemudian memfiksasi preparat hingga terbentuk noda lalu ditetaskan pewarna kristal violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Langkah selanjutnya yaitu dengan ditetesi larutan mordan (gram B) dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, selanjutnya ditetesi dengan alkohol (gram C) sampai luntur tidak berwarna. Tahap terakhir dari pewarnaan gram adalah ditetesi dengan pewarna safranin (gram D) selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Objek glass ditutup dengan deck glass dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

Pertumbuhan pada suhu yang berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005). Satu ose BAL umur 24 jam diinokulasikan pada media MRS Broth 1,5 ml dalam ependorf. Inkubasi dilakukan

selama 48 jam pada suhu 37°C, 45°C dan 15°C. Mengamati pertumbuhan yang ditandai dengan adanya endapan dan gas.

Pertumbuhan pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda (Cappucino dan Sherman, 2005). Garam NaCl dengan konsentrasi 4%, 6,5% dan kontrol (tanpa garam) disterilisasi. Konsentrasi tersebut ditambahkan pada MRS Broth lalu dimasukkan ke dalam tabung ependorf steril 1,5 ml. Inokulasi 50µL isolat BAL mur 24 jam ke dalam media MRS Broth dan dilakukan inkubasi pada 37°C selama 48 jam.

pH Fermentasi BAL (Cahyaningsih, 2006). Inokulasi 1 ose isolat BAL umur 24 jam kedalam media MRS Broth menggunakan wadah ependorf 1,5 ml dan dilakukan inkubasi pada 37°C selama 24 jam. Analisa dilakukan dengan mengambil sejumlah media yang telah ditumbuhi oleh BAL secara aseptis, kemudian diukur pH menggunakan pH meter (hanna).

Produksi dekstran dari sukrosa (Cappucino dan Sherman, 2005). BAL ditumbuhkan selama 24 jam pada MRS Broth dalam ependrof. 0,1 ml isolat BAL berumur 24 jam diinokulasikan pada cawan petri lalu dimasukkan sukrosa agar 10 ml. Inkubasi pada suhu 37° C selama 5 hari. Mengamati pertumbuhan BAL.

Kemampuan fermentasi berbagai jenis karbohidrat (Cahyaningsih, 2006). Sebanyak 0,1 ml kultur diinokulasikan ke dalam 10 ml media PY-Broth, dimana media PY-Broth ditambahkan dengan karbohidrat yang diujikan, seperti: glucose, manosa, arabinosa, manitol, galaktosa, maltosa, sukrosa, dan laktosa. Inkubasi dilakukan selama 48 jam.

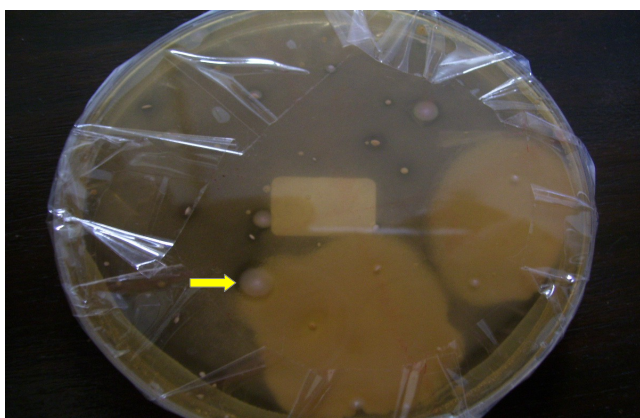
HASIL

Suhu dan pH Fermentasi Kakao. Suhu tertinggi terdapat pada fermentasi jam ke 64 sebesar 47,6 dan keasaman permukaan biji pada hari ke-0 terlihat cukup tinggi 3,30 terjadi perubahan pH permukaan biji yang menjadi pH 5,03 selama 6 hari (Tabel 1).

Tabel 1. Perubahan suhu dan pH fermentasi biji kakao

No	Pengamatan	Fermentasi jam ke -							
		0	28	40	64	88	112	136	148
1	Tempat sampling	Bak 1	Bak 1	Bak 2	Bak 1	Bak 1	Bak 2	Bak 1	Bak 1
2	Suhu (°C)	28,8	32,2	42	47,6	44,4	36,4	30	28
3	pH Permukaan Biji	3,3	3,83	3,85	3,97	4,33	4,87	5,03	5,05
4	pH Keping Biji	6,07	6,3	5,1	4,47	4,43	4,4	4,33	4,31
5	pH Lendir	3,51	Ta	Ta	Ta	Ta	Ta	Ta	Ta

Isolasi BAL dari Biji dan Lendir Kakao Terfermentasi. Didapatkan isolat BAL sebanyak 10 isolat (Gambar 1).



Gambar 1. Zona bening BAL

Aktivitas Anti Kapang. Didapatkan 10 isolat pilihan hasil pengukuran aktivitas anti kapang isolat BAL dengan skor tertinggi 8,10

dengan kode isolat L 16 B (3.1) dan terendah 3,40 dengan kode isolat B 28 C (2.2) (Tabel 2)

Tabel 2. Luas penghambatan terhadap pertumbuhan kapang oleh isolat BAL dan produksi CO₂ isolat BAL pada MRSA tegak

No	Kode	Luas (CM2)			Volume CO ₂ (CM3)	Skor anti kapang
		(A)	(B)	(C)		
1	L 16 A (2.1)	2,41	5,74	3,57	6,60	4,58
2	L 16 B (1.1)	1,78	6,96	2,93	2,70	3,59
3	L 16 B (2.1)	2,59	6,98	3,13	2,20	3,73
4	L 16 B (3.1)	10,68	10,02	9,00	2,70	8,10
5	B 28 C (2.2)	2,34	2,89	2,58	5,80	3,40
6	B 28 C (9.2)	3,55	7,50	3,70	1,70	4,11
7	B 40 B (1.2)	6,86	7,39	5,83	7,30	6,85
8	B 40 B (3.2)	2,14	7,00	2,14	6,80	4,52
9	B 88 C (1.1)	4,97	7,83	4,06	2,50	4,84
10	B 88 C (7.2)	7,63	10,01	3,99	2,30	5,98

Keterangan : Luas daerah penghambatan = πr² ; dimana π = 3,14 ; Total skor = (0,25x luas A)+(0,25x luas B)+(0,25 x luas C)+ (0,25 x CO₂)

Pewarnaan gram. Didapatkan 10 isolat gram positif dengan pewarnaan gram warna ungu dengan bentuk kokus dan batang.6 bakteri berbentuk batang dan 4 bakteri berbentuk kokus (Tabel 3)

Tabel 3. Pengamatan gram

No	Kode isolat	Bentuk
1	L 16 A (2.1)	Batang
2	L 16 B (1.1)	Kokus
3	L 16 B (2.1)	Kokus
4	L 16 B (3.1)	Kokus
5	B 28 C (2.2)	Kokus
6	B 28 C (9.2)	Batang
7	B 40 B (1.2)	Batang
8	B 40 B (3.2)	Batang
9	B 88 C (1.1)	Batang
10	B 88 C (7.2)	Batang

Pertumbuhan pada suhu yang berbeda. Terdapat beberapa isolat yang mampu tumbuh pada suhu 15°C diduga *micrococcus*. Pertumbuhan suhu 37°C diduga kelompok homofermentatif dan pertumbuhan 45°C diduga kelompok heterofermentatif (Tabel 4)

Tabel 4. Hasil uji pertumbuhan pada suhu yang berbeda

No	Kode Isolat	Pertumbuhan 48 jam		
		15°C	37°C	45°C
1	L 16 A (2.1)	+++	+++	-
2	L 16 B (1.1)	++	+++	-
3	L 16 B (2.1)	++	+++	-
4	L 16 B (3.1)	-	+++	+++
5	B 28 C (2.2)	-	+++	+++
6	B 28 C (9.2)	+++	+++	-
7	B 40 B (1.2)	-	+++	+++
8	B 40 B (3.2)	-	+++	+++
9	B 88 C (1.1)	-	+++	++
10	B 88 C (7.2)	-	+++	++

Pertumbuhan pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda. Terdapat beberapa bakteri mampu tumbuh pada konsentrasi garam tinggi diduga *Pediococcus cerevisiae* karena mampu tumbuh pada konsentrasi garam 6,5% (w/v), sedangkan beberapa bakteri yang mampu tumbuh pada konsentrasi garam 4% diduga jenis *leuconostoc*. Semakin + maka pertumbuhan bakteri yang berupa endapan semakin banyak (Tabel 5)

Tabel 5. Uji pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi garam NaCl yang berbeda dan produksi CO₂

No	Kode Isolat	Endapan dan Kekeruhan (48 Jam)			CO ₂
		Kontrol	NaCl 4 %	NaCl 6,5 %	
1	L 16 A (2.1)	++	+++	++	-
2	L 16 B (1.1)	+++	++	++	-
3	L 16 B (2.1)	++	++	++	-
4	L 16 B (3.1)	++	++	-	-
5	B 28 C (2.2)	++	++	-	-
6	B 28 C (9.2)	++	+++	++	-
7	B 40 B (1.2)	+++	+++	+++	-
8	B 40 B (3.2)	++	++	++	-
9	B 88 C (1.1)	++	+++	++	-
10	B 88 C (7.2)	++	+++	+++	-

pH Fermentasi BAL. pH fermentasi terendah yaitu 4,1 dengan kode isolat B 40 B (3.2) dan tertinggi 4,9 dengan kode isolat B 28 C (2.2) (Tabel 6)

Tabel 6. pH Fermentasi BAL

No	Kode Isolat	pH
1	L 16 A (2.1)	4,6
2	L 16 B (1.1)	4,6
3	L 16 B (2.1)	4,5
4	L 16 B (3.1)	4,6
5	B 28 C (2.2)	4,9
6	B 28 C (9.2)	4,8
7	B 40 B (1.2)	4,3
8	B 40 B (3.2)	4,1
9	B 88 C (1.1)	5,1
10	B 88 C (7.2)	4,1

Produksi dekstran dari sukrosa. Dari semua isolat, ada 2 isolat yang mampu tumbuh pada media Sukrosa Agar, dan diduga adalah bakteri dari genus *Leuconostoc* spesies *Leuconostoc mesenteroides* dengan kode isolat L 16 B (3.1) dan B 28 C (2.2) (Tabel 7)

Tabel 7. Kemampuan BAL dalam memproduksi dextran dari sukrosa

No	Kode Isolat	Pertumbuhan
1	L 16 A (2.1)	Tidak ada pertumbuhan
2	L 16 B (1.1)	Tidak ada pertumbuhan
3	L 16 B (2.1)	Tidak ada pertumbuhan
4	L 16 B (3.1)	Ada pertumbuhan
5	B 28 C (2.2)	Ada pertumbuhan
6	B 28 C (9.2)	Tidak ada pertumbuhan
7	B 40 B (1.2)	Tidak ada pertumbuhan
8	B 40 B (3.2)	Tidak ada pertumbuhan
9	B 88 C (1.1)	Tidak ada pertumbuhan
10	B 88 C (7.2)	Tidak ada pertumbuhan

Kemampuan fermentasi berbagai jenis karbohidrat. Terdapat beberapa isolat yang mampu memfermentasi berbagai jenis karbohidrat L 16 B (1.1) dan L 16 B (2.1) (Tabel 8)

Tabel 8. Pertumbuhan pada berbagai jenis karbohidrat

No	Kode Isolat	Kemampuan Fermentasi Gula					
		Sukrosa	Maltosa	Fruktosa	Manitol	Glukosa	Arabinosa
1	L 16 A (2.1)	+	+	++	++	++	-
2	L 16 B (1.1)	++	+++	++	++	++	++
3	L 16 B (2.1)	++	+++	++	++	++	++
4	L 16 B (3.1)	++	++	+++	++	++	++
5	B 28 C (2.2)	++	++	++	++	++	++
6	B 28 C (9.2)	+	+	++	++	+++	-
7	B 40 B (1.2)	+++	++	++	-	++	+
8	B 40 B (3.2)	+	++	++	-	++	++
9	B 88 C (1.1)	+	+++	++	-	++	++
10	B 88 C (7.2)	+	+	++	-	++	+

Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Kakao. Berdasarkan hasil identifikasi 10 isolat BAL terpilih dari fermentasi kakao dapat diperkirakan bahwa; L16 B(3.1), B 28C(2.2), *Leuconostoc mesenteroides*; B88 B (3.2), B88 C (1.1) *Lactobacillus plantarum*; B88 C (7.2), B 40 B(1.2), *Lactobacillus fermentum*; L 16 B(1.1), L 16 B (2.1), *Leuconostoc pamesenteroides*, L 16A(2.1), B 28C(9.2), *Lactobacillus casei* (Tabel 9)

Tabel 9. Identifikasi bakteri asam laktat dari fermentasi kakao

Karakteristik	L 16 B (1.1)	B 40 B (3.2)	B 88 C (7.2)	L 16 B (3.1)	L 16 A (2.1)
	L 16 B (2.1)	B 88 C (1.1)	B 40 B (1.2)	B 28 C (2.2)	B 28 C (9.2)
Bentuk sel	Kokus	Batang	Batang	Kokus	Batang
Gram	+	+	+	+	+
Katalase	-	-	-	-	-
Produksi CO ₂	-	-	-	-	-
Asam dari:					
Sukrosa	+	d	+	+	d
Mannitol	+	+	-	+	+
Maltosa	+	+	+	+	d
Fruktosa	+	+	+	+	+
Glukosa	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	d	+	-
Pertumbuhan 15°C	+	-	-	-	+
Pertumbuhan 37°C	+	+	+	+	+
Pertumbuhan 45°C	-	+	+	+	-
Pertumbuhan NaCl 4%	+	+	+	+	+
Pertumbuhan NaCl 6.5%	+	+	+	-	+
Pembentukan dekstran	-	-	-	+	-
Identifikasi spesies	<i>Leuconostoc pamesenteroides</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>L. casei</i>

PEMBAHASAN

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil suhu dan pH fermentasi kakao. Tingkat keasaman biji bagian luar pada hari ke-0 terlihat cukup tinggi dengan pH 3,30. Gula yang ada dalam pulp dirubah menjadi alkohol oleh khamir, kemudian dioksidasi menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat sehingga terjadi perubahan pH permukaan biji yang dimulai dari pH 3,30 menjadi pH 5,03 selama 6 hari. Hasil metabolisme bakteri asam asetat dan bakteri asam laktat akan mempengaruhi tingkat keasaman di permukaan biji maupun di keping biji. Keasaman keping biji akan meningkat yang ditunjukkan dengan perubahan nilai pH dari 6,07 (hari ke-0) menjadi 4,33 (hari ke-6). Saat kandungan lendir makin berkurang, reaksi fermentasi dilanjutkan dengan reaksi enzimatis di dalam keping biji yang akan menghasilkan senyawa pembentuk cita rasa dan aroma khas coklat pembentuk warna (Cahyaningsih, 2006).

Pada isolasi BAL dari biji dan lendir kakao terfermentasi didapatkan isolat BAL sebanyak 10 isolat. Isolat yang diduga BAL dipilih dari sampel biji dan lendir kakao dengan adanya zona bening disekitar isolat. Selanjutnya 10 isolat tersebut akan diuji kemampuannya sebagai anti kapang.

Pada aktivitas anti kapang didapatkan skor akhir terendah yaitu 3,40 dan skor tertinggi 8,10. 10 isolat mampu menghambat ketiga jenis kapang dengan daerah penghambatan yang besar dan juga produksi gas CO₂ pada MRS agar tegak. Aktivitas anti kapang BAL dapat diamati dengan mengukur diameter daerah bening disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi kapang, dan dihitung secara matematis menjadi luas daerah bening (penghambatan). 10 isolat bakteri yang didapatkan dari fermentasi kakao memiliki aktivitas hambatan terhadap kapang *A. flavus*, *A. ochraceus*, dan *Penicillium Spp*.

Pada hasil pengecatan gram, bakteri gram positif memiliki membran sel dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal daripada gram negatif, lapisan ini dapat menyerap warna ungu hasil reaksi antara yodium dan kristal violet. 10 isolat berwarna ungu dengan bentuk batang dan kokus.

Pada uji pertumbuhan suhu yang berbedaSemakin banyak + maka semakin banyak pertumbuhan bakteri yang tumbuh. Terdapat beberapa isolat yang mampu tumbuh pada suhu 15°C diduga *micrococus*. Pertumbuhan suhu 37°C diduga kelompok homofermentatif dan

pertumbuhan 45°C diduga kelompok heterofermentatif (Jacobsen, 2007).

Pertumbuhan pada konsentrasi garam NaCl yang berbeda diuji menggunakan media MRS Broth dengan konsentrasi garam 4% (w/v) dan 6,5% (w/v). Uji CO₂ juga dilakukan untuk mengetahui mikroba mana yang pertumbuhannya menghasilkan CO₂. Dengan mengetahui kemampuan tersebut, maka dapat diidentifikasi jenis bakteri yang menjadi contoh atau sampel. Semakin banyak + maka semakin banyak endapan atau bakteri yang tumbuh semakin banyak. Isolat bakteri yang diduga *Leuconostoc* yaitu mampu memproduksi CO₂ dalam jumlah yang banyak ++ dan +++. Bakteri yang diduga *Pediococcus* yaitu yang mampu tumbuh dengan baik pada konsentrasi garam 6,5% (w/v) (Wood dan Lass, 1989).

Pada uji pH Fermentasi BaL Asam organik memiliki aktivitas penghambatan yang ditentukan oleh jumlah asam tak teroksidasi. Konsentrasi tersebut tergantung pada pH rendah. Konsentrasi asam tak terdisosiasi dari asam laktat tinggi pada pH rendah, yaitu kisaran pH 3 – 4 (sebesar 86,6%) sehingga aktivitas anti mikroba asam tersebut juga tinggi (Biehl, 1984).

Pada uji produksi dekstran dari sukrosa, isolat ditumbuhkan pada media Sukrosa Agar untuk mengidentifikasi adanya bakteri dari genus *Leuconostoc*. Bakteri dari genus *Leuconostoc* dapat memanfaatkan sukrosa sebagai sumber karbon, dengan bantuan enzim dekstran sukrase akan menghasilkan dekstran. Produksi dekstran ditandai dengan adanya pertumbuhan berlendir pada cawan (Gibbons, 1974).

Pada uji kemampuan fermentasi berbagai jenis karbohidrat Glukosa, fruktosa, dan arabinosa termasuk golongan monosakarida. Sukrosa dan maltosa termasuk golongan disakarida. Setiap mikroorganisme memiliki kemampuan yang beragam dalam memfermentasi berbagai karbohidrat. Spesies *Leuconostoc* dapat memfermentasi semua jenis karbohidrat adalah *Leuconostoc mesenteroides*. Bakteri *Leuconostoc* dapat menggunakan sukrosa lebih banyak sebagai sumber karbon dengan bantuan enzim dextranase untuk dirubah menjadi dextran (Waluyo, 2004).

Pada identifikasi bakteri asam laktat dari fermentasi kakao dapat diperkirakan bahwa; L16 B(3.1), B 28 C(2.2), *Leuconostoc mesenteroides*; B88 B (3.2), B88 C (1.1) *Lactobacillus plantarum*; B88 C (7.2), B 40 B(1.2), *Lactobacillus fermentum*; L 16 B(1.1), L 16 B (2.1), *Leuconostoc paramesenteroides*, L 16 A (2.1), B 28 C (9.2), *Lactobacillus casei*.

Seluruh isolat bakteri asam laktat tersebut menghasilkan senyawa yang bersifat anti kapang terhadap *A. flavus*, *A. ochraceus*, dan *Penicillium spp.* 5 spesies tersebut berpotensi sebagai starter kultur pada proses fermentasi biji kakao

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak terimakasih kepada Pengurus koperasi Ngupadi Koyo dan Petani kakao di Gunung Kidul Yogyakarta dan semua pihak yang telah mendukung terselesainya penelitian yang dilakukan oleh penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Biehl, B. T. 1984. *Cocoa fermentation and problem of acidity*. New York and Bassel: Marcel Dekker Inc. Bell, C. 2005. *Food Microbiology Laboratory Practice*. USA: Blackwell Publishing.
- Cahyaningsih, H. 2006. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar serta Aplikasinya dalam Mereduksi *Salmonella thypimurium* dan *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao. *J. Agric. Bakteri Asam Laktat*, Vol. 48 : 3806-3816.
- Cappucino and Sherman. 2005. *Microbiology*. New York: A Laboratory Manual, Dary, The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc.

Departemen Pertanian. 2012. *Basis Data Statistik Pertanian dari Departemen Pertanian RI*. Jakarta.

Gibbons, N. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th*. USA: The William and Wilkins Company.

Jacobsen, C. 2007. Screening of Prebiotik Activities of fourty Seven Strain *Lactobacillus spp* in Vitro Techniques and Evaluation of The Colonization Ability of five Strains in Humas. *J. Appl and Environ Microbiol*. 65: 4949-4956.

Nielsen, M. 2007. *Lactobacillus ghanaensis sp a motile lactic acid bacterium from Ghanaian cocoa fermentations*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57 1468-1472.

Pagilaran. 2013. *Basis Data Pertanian*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

Salminen, S and Ouwehand. 2004. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker Inc.

Waluyo, A.W. 2004. *Penelitian Fermentasi Biji Kakao dan Penerapannya*. Bogor: IPB Press.

Wood, G and Lass. 1989. *Cocoa*. Singapore: Longman Singapore Publisher (Pte) Ltd.