



KARAKTERISTIK BAKTERI ASAM LAKTAT PENGHASIL SENYAWA ANTIKAPANG PADA FERMENTASI KAKAO

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Strata Satu Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas
Teknologi Pertanian, Universitas Jember

Oleh :

Widi Putih Yuliani
NIM 031710101045

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2007

RINGKASAN

Karakteristik Bakteri Penghasil AntiKapang Pada Fermentasi Kakao, Widi Putih Yuliani, 031710101045; 2007, 90 Halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Kakao merupakan komoditi ekspor yang memiliki nilai ekonomis tinggi, namun karena kurangnya pengolahan industri kakao menyebabkan biji kakao ekspor mudah terkontaminasi oleh serangga, kapang, dan kotoran lain. Beberapa mikroba yang berperan dalam fermentasi kakao adalah khamir, bakteri, dan kapang. Jumlah mikroba dan waktu fermentasi berbeda sesuai dengan perbedaan negara penghasil kakao. Pada proses fermentasi, pertama-tama tumbuh koloni dari khamir, kemudian diikuti oleh bakteri asam laktat (BAL), selanjutnya asam asetat dan yang terakhir adalah kapang. Pasca fermentasi biji kakao mudah sekali terkontaminasi oleh kapang jenis *Aspergillus* dan *Penicillium* selama proses pengeringan, penyimpanan, pengiriman, dan perdagangan. Kedua jenis kapang ini dapat menghasilkan mikotoksin (aflatoksin dan ochratoksin) yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia karena bersifat karsinogenik. Dalam perdagangan ekspor komoditi kakao keberadaan kapang dan mikotoksin akan menurunkan kualitas yang berdampak pada penurunan volume penjualan dan penurunan harga jual.

Keberadaan kapang dan mikotoksin dalam produk kakao dapat dihambat dengan cara penggunaan kultur tambahan bakteri asam laktat produsen agensia antikapang. Bakteri asam laktat ini secara alami ada dalam fermentasi kakao dan dapat diisolasi, yang selanjutnya dapat dipacu sebagai penghasil agensia antikapang bagi komoditi kakao ekspor. Penghambatan pertumbuhan kapang pada biji kakao diharapkan mampu menghambat pembentukan mikotoksin.

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah produksi antikapang bagi penghambat pertumbuhan kapang dan penghambat pembentukan mikotoksin dalam produk biji kakao ekspor. Tujuan utama dari penelitian ini untuk memproduksi agensia antikapang yang merupakan salah satu senyawa pengawet

alami (*biopreservatives*) dari bakteri asam laktat. Hal ini dapat dicapai dengan identifikasi bakteri asam laktat fermentasi alami biji kakao dan eksploitasi potensi bakteri tersebut sebagai penghasil agensia antikapang alami (*antifungal agents*).

Penelitian tentang karakteristik bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang pada fermentasi kakao perlu dilakukan dengan ruang lingkup eksplorasi bakteri asam laktat dari fermentasi alami kakao dan identifikasi agensia antikapang (*antifungal agents*) yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat serta pemanfaatannya sebagai penghambat pertumbuhan kapang dan pembentukan mikotoksin dalam produk biji kakao.

Dari 16 isolat bakteri yang diduga bakteri asam laktat, 5 diantaranya kemudian diuji sifat fisiologisnya. Selanjutnya diuji aktivitas antikapangnya terhadap kapang berwarna hijau, kapang berwarna hitam, kapang berwarna biru, dan kapang berwarna putih dengan dugaan kapang tersebut adalah *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, dan *Penicillium*.

Dari hasil identifikasi didapatkan dugaan sementara bahwa isolat BK 02 (02) adalah *Leuconostoc mesenteroides*, Isolat BK 25 (23) adalah *Lactobacillus plantarum*, isolat BK 33 (32) adalah *Lactobacillus plantarum*, isolat LK 23 (2.1.1.12) adalah *Leuconostoc paramesenteroides*, dan isolat BK 43 (2.1.1.15) adalah *Lactobacillus plantarum*. Zona penghambatan yang paling baik ditunjukkan oleh penghambatan isolat BK 43 terhadap kapang berwarna hitam yang diduga sebagai kapang *A. niger*, sedangkan zona penghambatan yang paling kecil ditunjukkan oleh penghambatan isolat BK 02 terhadap kapang berwarna biru yang diduga sebagai kapang *A. ochraceus*. Identifikasi ini berdasarkan pada buku Bergey's Manual (Gibbons, 1974).

Untuk selanjutnya, hasil penelitian ini memberikan dasar kepada penelitian berikutnya untuk mengidentifikasi senyawa antikapang melalui tahap purifikasi dan karakterisasi. Dari penelitian lanjutan ini diharapkan adanya senyawa antikapang dengan struktur dan jumlah yang jelas bagi penghambatan pertumbuhan kapang dan penghambatan produksi aflatoksin.

Kata kunci : Kakao, bakteri asam laktat, kapang, khamir, senyawa antikapang, mikotoksin

DAFTAR ISI

	Hal
Judul	i
Persembahan.....	ii
Motto.....	iv
Halaman Pernyataan.....	v
Halaman Pembimbingan.....	vi
Halaman Pengesahan	vii
Ringkasan	viii
Prakata	x
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xiv
Daftar Gambar	xv
Daftar Lampiran.....	xvi
Bab I. Pendahuluan	1
Bab II. Tinjauan Pustaka	5
2.1. Tanaman Kakao.....	5
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kakao.....	5
2.1.2 Anatomi Buah Kakao.....	6
2.1.3 Fermentasi.....	7
2.2. Kondisi Mikrobiologis	8
2.2.1 Aktivitas Mikrobiologis.....	8
2.2.2 Khamir.....	8
2.2.3 Bakteri.....	9
2.2.4 Kapang.....	17
2.3. Kapang dan Produksi Mikotoksin.....	17
2.3.1. <i>Aspergillus</i>	19
2.3.2. <i>Penicillium</i>	22
2.4. Aktivitas Antikapang (Antifungal Effect).....	23
2.5. Senyawa Pengawet Alami (<i>Biopreservatives Agents</i>).....	24
2.6 Hipotesa.....	25

Bab III. Metode Penelitian	26
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	26
3.3 Metode Penelitian.....	27
3.3.1 Pengukuran Suhu dan pH Fermentasi Kakao.....	27
3.3.2 Isolasi dan Identifikasi Kapang.....	27
3.3.3 Kultur Bakteri Asam Laktat (BAL), Kapang dan Khamir.....	28
3.3.4 Pengembangan BAL Pada Media Agar Tegak.....	29
3.3.5 Identifikasi Bakteri Asam Laktat.....	29
3.3.6 Aktivitas Antikapang Filtrat Kultur BAL.....	32
3.3.7 Stabilitas Antikapang Terhadap Dingin, Panas dan Enzim Protease.....	32
Bab IV. Hasil dan Pembahasan	34
4.1 Proses Fermentasi Kakao.....	34
4.2 Mikroba Dalam Fermentasi Kakao.....	37
4.3 Isolasi dan Identifikasi Mikroba	49
4.4 Aktivitas Antikapang.....	51
4.5 Stabilitas Senyawa Antikapang.....	54
Bab V. Kesimpulan dan Saran.....	58
Daftar Pustaka	59
Lampiran.....	64

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditi hasil pertanian yang memiliki nilai ekonomi tinggi pada perdagangan tingkat internasional. Indonesia merupakan produsen kakao terbesar ketiga di dunia bersama-sama dengan Ghana dengan produksi pada tahun 1993/1994 sebesar 245.000 ton. Prospek yang cerah tersebut diantisipasi dengan semakin luasnya areal pertanaman di Indonesia (Anonim, 1998). Produksi kakao Indonesia selama ini didominasi oleh kakao rakyat yang secara umum masih bermutu rendah yang bercirikan kadar air tinggi, kandungan lemak rendah, citarasa kurang, dan mutu biji tidak konsisten (Wahyudi, 1994). Kondisi semacam itulah yang menyebabkan diberlakukannya pengenaan diskon atas nilai ekspor biji kakao Indonesia (Aziz, 1996).

Sesungguhnya Indonesia memiliki peluang mendapatkan devisa dari kakao sebesar 1,2 miliar dollar AS. Tetapi, hingga kini baru sekitar 600 juta dollar AS yang bias diperoleh. Rendahnya devisa negara dari eksport kakao ini karena seluruh produk kakao Indonesia masih diekspor dalam bentuk biji (Anonim, 2003). Potensi devisa ini baru bisa diperoleh seluruhnya bila industri pengolahan kakao dalam negeri ditumbuhkan mengingat nilai jual kakao olahan tiga kali lipat lebih besar daripada kakao biji. Kurang berkembangnya industri pengolahan kakao di Indonesia selain karena biaya produksi yang besar juga kebanyakan industri yang ada terkendala dengan modal kerja dan mesin-mesin yang sudah tua, belum lagi dengan kebijakan pemerintah mengenai pengenaan Pajak Pertambahan Nilai (PPN) yang makin membebani pengusaha.

Menurut Utami (1995) rendahnya mutu biji kakao disebabkan rendahnya kadar lemak dan kandungan asam yang relatif tinggi yang berakibat rendahnya intensitas aroma. Dengan adanya proses fermentasi yang berlangsung secara optimal dapat memperbaiki mutu biji kakao dimana akan terjadi proses pembentukan flavor yang baru dimulai setelah biji mati yang disebabkan adanya aktivitas mikroba yang

berperan dalam proses fermentasi dengan menghasilkan asam asetat, alkohol dan panas.

Secara umum, proses fermentasi biji kakao terdiri atas 2 macam proses, yaitu fermentasi eksternal dan internal (Susijahadi dkk., 1998a, 1998b). Fermentasi eksternal bertujuan untuk melepaskan pulp dari keping biji, melonggarkan kulit biji sehingga setelah proses pengeringan kulit mudah dilepaskan dari kulit biji. Fermentasi internal terjadi karena biji sudah mati. Beberapa mikroba yang berperan dalam fermentasi kakao adalah khamir, bakteri, dan kapang. Jumlah mikroba dan waktu fermentasi berbeda sesuai dengan perbedaan negara penghasil kakao. Pada proses fermentasi, pertama-tama tumbuh koloni dari khamir, kemudian diikuti oleh bakteri asam laktat (BAL), selanjutnya asam asetat dan yang terakhir adalah kapang. Pasca fermentasi biji kakao mudah sekali terkontaminasi oleh kapang jenis *Aspergillus* dan *Penicillium* selama proses pengeringan, penyimpanan, pengiriman, dan perdagangan. Kedua jenis kapang ini dapat menghasilkan mikotoksin (afolatoksin dan ochratoksin) yang sangat berbahaya bagi kesehatan manusia karena bersifat karsinogenik. Dalam perdagangan ekspor komoditi kakao keberadaan kapang dan mikotoksin akan menurunkan kualitas yang berdampak pada penurunan volume penjualan dan penurunan harga jual.

Keberadaan kapang dan mikotoksin dalam produk kakao dapat dihambat dengan cara penggunaan kultur tambahan bakteri asam laktat produsen agensia antikapang. Bakteri asam laktat ini secara alami ada dalam fermentasi kakao dan dapat diisolasi, yang selanjutnya dapat dipacu sebagai penghasil agensia antikapang bagi komoditi kakao ekspor. Penghambatan pertumbuhan kapang pada biji kakao diharapkan mampu menghambat pembentukan mikotoksin.

1.2 Permasalahan

Kakao merupakan komoditi ekspor yang memiliki nilai ekonomis tinggi, namun karena kurangnya pengolahan industri kakao menyebabkan biji kakao ekspor mudah terkontaminasi oleh serangga, kapang, dan kotoran lain serta menyebabkan komoditi ekspor terkena denda. Untuk mengurangi masalah tersebut dilakukan produksi agensia antikapang yang merupakan salah satu senyawa pengawet alami (*biopreservatives*) dari bakteri asam laktat. Hal ini dapat dicapai dengan identifikasi bakteri asam laktat yang berperan dalam fermentasi alami biji kakao dan eksploitasi potensi bakteri tersebut sebagai penghasil agensia antikapang alami (*antifungal agents*). Untuk mengidentifikasikan hal tersebut masih belum diketahui produsen antikapang dalam proses fermentasi karena pada proses fermentasi menghasilkan asam asetat, asam laktat, hidrogen peroksida, bakteriosin dan protein yang kesemuanya bersifat antikapang. Untuk mengidentifikasinya secara lebih jauh perlu dilakukan penelitian.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah produksi antikapang bagi penghambat pertumbuhan kapang dan penghambat pembentukan mikotoksin dalam produk biji kakao ekspor. Agensia antikapang ini merupakan metabolit bakteri asam laktat hasil isolasi dari fermentasi kakao secara alami. Tujuan utama dari penelitian ini untuk memproduksi agensia antikapang yang merupakan salah satu senyawa pengawet alami (*biopreservatives*) dari bakteri asam laktat. Hal ini dapat dicapai dengan identifikasi bakteri asam laktat fermentasi alami biji kakao dan eksploitasi potensi bakteri tersebut sebagai penghasil agensia antikapang alami (*antifungal agents*).

1.4 Manfaat penelitian

1. Digunakan dalam bidang teknologi pangan terutama dalam pengembangan produk agensia antikapang dari bakteri asam laktat untuk menghambat pertumbuhan kapang dan pembentukan mikotoksin.
2. Meningkatkan manfaat dan nilai ekonomis dari produksi biji kakao.

II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao

Tanaman Kakao berasal dari lembah sungai Amazon dan Orinoco di Amerika Serikat, mulai menyebar ke negara-negara lain setelah bangsa Spanyol menduduki Amerika Selatan. Oleh bangsa Spanyol tanaman kakao dikembangkan ke benua Afrika dan Asia. Di Afrika tanaman kakao diperkenalkan pada abad ke 15 dengan daerah penanaman terutama di Nigeria, Ghana, Pantai Gading dan Kongo (Siregar, dkk. 1989).

Tanaman kakao dapat tumbuh subur dan berbuah banyak di daerah tropis. Terletak antara 20°LU – 20°LS dengan ketinggian 1– 600 m dari permukaan laut, tetapi kadang-kadang juga masih bisa tumbuh pada ketinggian 900 m dari permukaan air laut. Tanaman kakao tidak tahan terhadap kekeringan yang panjang, curah hujan yang dibutuhkan adalah 1.600 – 3000 mm per tahun. Suhu harian yang baik untuk pertumbuhan adalah 24 – 28 °C dengan kelembaban 80% (Sunanto, 1994).

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Kakao

Tanaman kakao (*Theobroma cacao Linn*) merupakan tanaman penghasil biji kakao yang utamanya dipergunakan sebagai bahan dasar industri makanan coklat. Menurut Soenaryo dan Situmorang (1986), sistematika tanaman kakao adalah sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Dicotyledoneae
Kelas	: Angiospermae
Anak Kelas	: Dilypetalae
Bangsa	: Malvales
Suku	: Sterculiaceae
Jenis	: <i>Theobroma cacao</i>

Jenis tanaman kakao cukup banyak, tetapi jenis yang sering ditanam untuk produksi cokelat secara besar-besaran menurut Sunanto (1994) hanya tiga jenis yaitu :

- a) Jenis *Criollo*, merupakan jenis tanaman kakao yang menghasilkan biji cokelat yang mutunya sangat baik dan dikenal sebagai: cokelat mulia, *fine flavour cocoa*, *choiced cocoa*, dan edel cocoa. Buahnya berwarna merah atau hijau, kulit buahnya tipis berbintil-bintil kasar dan lunak. Biji buahnya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada waktu basah.
- b) Jenis *Forastero*, merupakan jenis tanaman kakao yang menghasilkan biji cokelat yang mutunya sedang atau *bulk cocoa*, atau dikenal juga sebagai *ordinary cocoa*. Buahnya berwarna hijau, kulitnya tebal. Biji buahnya tipis atau gepeng dan kotiledon berwarna ungu pada waktu basah.
- c) Jenis *Trinitario*, merupakan hybrida dari jenis *Criollo* dengan jenis *Forastero* secara alami. Kakao Trinitario menghasilkan biji yang termasuk *fine flavour cocoa* dan ada yang termasuk *bulk cocoa*. Buahnya berwarna hijau atau merah dan bentuknya bermacam-macam. Biji buahnya juga bermacam-macam dengan kotiledon berwarna ungu muda sampai ungu tua pada waktu basah.

2.1.2 Anatomi Buah Kakao

Buah kakao terdiri atas tiga komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Kulit buah merupakan komponen terbesar dari buah kakao, yaitu lebih dari 70% berat buah masak. Prosentase biji kakao didalam buah hanya sekitar 27-29%, sedangkan sisanya adalah plasenta yang merupakan pengikat dari 30-40 biji (Mulato dan Widyotomo, 2004). Permukaan biji kakao diselimuti pulp yang berwarna putih. Pulp merupakan jaringan halus berlendir dan melekat ketat pada biji kakao. Pulp sebagian besar terdiri atas air dan sebagian kecil berupa gula.

Struktur buah kakao secara garis besar terdiri atas empat bagian yaitu kulit, plasenta, pulp, dan biji. Buah kakao masak berisi 30 – 40 biji yang masing-masing diselimuti oleh pulp, sedangkan biji kakao terdiri atas dua bagian yaitu kulit biji dan

keping biji. Keping biji meliputi 86% sampai 90% dari berat kering keping biji, sedangkan kulit biji sekitar 10 – 14 % (Syarief dkk, 1988).

Menurut Nasution (1976), pulp biji kakao sebagian besar terdiri atas air dan sebagian kecil gula, yang merupakan medium yang baik untuk pertumbuhan mikroba. Komposisi kimia pulp kakao secara lengkap dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia pulp kakao

Komposisi	Kandungan (%)
Air	80 – 90
Albuminoid	0,5 – 0,7
Glukosa	8 – 13
Pati	Sedikit
Asam yang tidak menguap	0,2 – 0,4
Besi oksida	0,03
Sukrosa	0,4 – 1,0
Garam-garam	0,4 – 0,45

Sumber : Nasution (1976)

2.1.3 Fermentasi

Proses fermentasi memiliki dua tujuan yaitu eksternal dan internal. Tujuan eksternal fermentasi adalah untuk menghancurkan pulp yang membungkus biji coklat dengan bantuan mikroorganisme yang diperoleh dari udara terbuka, dan untuk mematikan keeping biji. Sedangkan tujuan internal fermentasi adalah mengadakan perubahan bentuk dalam sehingga komponen kimia dari keping biji diubah.

Pulp yang masih segar pHnya relative rendah yaitu 3,6, kandungan gula dan jumlah oksigen yang rendah menyebabkan kondisi tersebut sesuai untuk pertumbuhan khamir dimana khamir akan bertambah jumlahnya selama 12 jam pertama fermentasi kemudian konstan pada 12 jam berikutnya (Ostovar dan Keeny, 1973).

Selama proses fermentasi akan terjadi perubahan kimia dan fisik karena bekerjanya mikroba. Perubahan tersebut meliputi perubahan luar dan dalam biji. Perubahan tersebut menyebabkan suasana massa yang terfermentasi menjadi aerob dan suhu menjadi lebih tinggi. Perubahan kimia pada biji terjadi apabila asam asetat

yang terbentuk selama fermentasi 37 jam masuk ke dalam biji yang menyebabkan kematian biji dan perubahan pH (Manurung dan Soenaryo, 1978).

2.2 Kondisi Mikrobiologis

2.2.1 Aktivitas Mikrobiologis

Saat kulit buah kakao dibelah berisi massa biji dan pulp yang steril menjadi terkontaminasi secara cepat oleh mikroba yang beragam dari dinding kulit dan tangan pekerja. Tempat yang digunakan untuk biji sampai tempat fermentasi yang dalam biji memberikan sumber-sumber inokulasi. Secara kimia dan fisik pulp merupakan medium yang ideal untuk pertumbuhan khamir dan kapang. Selama proses fermentasi akan terjadi perubahan mikroba yang bekerja. Adapun gambaran komposisi mikroba yang berperan dalam fermentasi antara lain:

Hari-1 : infeksi awal secara cepat oleh khamir, dibawah kondisi anaerobik dimana merubah gula menjadi alkohol dan melonggarkan pulp.

Hari-2 : Bakteri asam laktat tumbuh pada kondisi anaerobik, agar bakteri asam asetat tumbuh dan mengubah alkohol menjadi asam asetat diperlukan aerasi. Biji kakao mati akibat panas dan asam asetat.

Hari-3 : Adanya kerjasama antara bakteri asam asetat, khamir *aerophilik* dan *Bacillus aerophilus* (Forsyth dan Rombouti, 1963) dalam Rohan (1963).

2.2.2 Khamir

Selama proses fermentasi berlangsung maka berbagai macam mikroorganisme tumbuh dan berkembang. ada yang memang sangat diharapkan seperti khamir dan bakteri karena berguna mendapatkan biji coklat kering yang bermutu tinggi. Jenis khamir yang sering dijumpai selama fermentasi antara lain: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. theobromae*, *S. ellipsoideus*, *S. apiculatus*, dan *S. anomalus* (Manurung dan Soenaryo, 1978).

Ada dua perubahan besar yang terjadi selama fermentasi yaitu perubahan gula menjadi alkohol sebagai hasil kerja beberapa jenis khamir dan bakteri asam