

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT *INDIGENOUS* DARI FERMENTASI ALAMI BIJI KAKAO SEBAGAI KANDIDAT AGEN ANTIKAPANG

Nurul Isnaini Fitriyana\*, Sony Suwasono\*, dan Joni Kusnadi\*\*

\* Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, Jember

\*\* Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang

E-mail : nurulis\_fitriyana@yahoo.com

### ABSTRACT

*This research have focused on isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) with potential antifungal which candidate as biopreservative microorganisms. LAB produce bioactive compound with antifungal activity. Thus, of a total of 69 lactic acid bacteria isolated and 39 isolates further tested its antifungal activity. Indigenous moulds that will be tested for antifungal activity of LAB were obtained from unfermented cocoa beans. There were black mould (allegedly *Aspergillus niger*), green mould (allegedly *Aspergillus fumigatus*) and grayish white mold (allegedly *Mucor spp.*). Thus, 18 isolates of LAB that could inhibit all of three types of fungi further identified in a phenotype, 3 isolates of LAB with highest antifungal activity in identification with API 50 CHL method and identified as *Lactobacillus fermentum*, with a different value of ID value, ID 99,8% (FIL-6an) criteria : very good identification; ID 99.9% (FIL-6dsr), criteria : very good identification, and ID 89.8% (F3L-7P) criteria : very good identification to the genus. LAB isolates obtained can be used as starter cultures to improve the quality of fermentation to inhibit the growth of mould, mycotoxin production, and fungicide residues so as to improve quality, safety of cocoa consumption, and increase the price of Indonesian cocoa bean exports.*

**Key words :** cacao fermented, lactic acid bacteria, antifungal, API 50 CHL

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara penghasil kakao ketiga terbesar di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana. Namun tingginya tingkat produksi kakao Indonesia belum diimbangi tingkat kualitas biji kakao. Kualitas yang rendah ini disebabkan tingginya prosentase biji kakao kering yang terserang kapang sehingga menyebabkan tingginya kandungan mikotoksin. Penyebab utama masalah ini adalah proses fermentasi yang kurang optimal. Untuk mengatasi biji kakao kering yang terserang kapang, biasanya dilakukan penyemprotan menggunakan fungisida sehingga menyebabkan tingginya residu fungisida, akibatnya biji kering yang diekspor akan terkena denda atau potongan harga (*automatic detention*).

Proses fermentasi berperan penting dalam menentukan kualitas biji kakao. Karena selama proses ini berlangsung,

berbagai mikroba alami tumbuh dan berkembang menyebabkan perubahan fisikokimia sehingga didapatkan biji kakao kering yang bermutu tinggi (Wahyudi dkk., 2009). Mikroba yang mempunyai peran penting adalah bakteri asam laktat (BAL) yang merupakan mikroba pengawet alami (*biopreservative microorganism*) yang menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antimikroba. Lavermicocca *et al*, 2003 berhasil mengisolasi komponen antikapang, *phenyllactic acid* (PLA) dan *4-hydroxyphenyllactic acid* dari *Lactobacillus plantarum*.

Berdasarkan latar belakang diatas maka dilakukan penelitian ini untuk memperoleh isolat BAL *indigenous* dari fermentasi alami biji kakao yang berpotensi sebagai agen antikapang serta mengidentifikasinya. Selanjutnya isolat BAL ini dapat diaplikasikan sebagai starter untuk

fermentasi dan re-fermentasi biji kakao kering yang belum difermentasi (*unfermented*).

## METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji dan lendir kakao terfermentasi alami yang diperoleh dari PTPN XII Kebun Banjarsari Jember. Media MRS (*de Man Rogosse Sharp*)-Agar dan MRS Broth (Merck), MEA (Merck) dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Bahan kimia yang digunakan antara lain  $\text{CaCO}_3$ , akuades, KOH 3%, gram staining, pewarna malakit hijau,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, alkohol 70%, dari Laboratorium Biokimia dan Kimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember serta Kit API 50 CHL (bioMerieux, Perancis) yang terdiri dari media API 50 CHL, mineral oil, standard Mc Farland no.2; dari Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya, Malang

Alat yang digunakan dalam dalam penelitian ini adalah laminar air flow (crumair, tipe 9005FL), cawan petri, *anaerobic candle jar*, kit anaerob (*Anaerobicult*, Merck), inkubator suhu  $37^\circ\text{C}$  (Heraeus tipe B-6200), mikropipet, mikropipet tip, tabung *Eppendorf* volume 1.5 ml, neraca analitik (Denver Instrument Company, tipe AA200DS), thermometer, pH meter (Hanna), mikroskop, gelas obyek, gelas penutup, jarum ent, jarum ose, bunsen.

### Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Biji dan Lendir Kakao Terfermentasi

Metode isolasi yang digunakan adalah metode pengenceran yang dilanjutkan dengan inokulasi secara *pour plate*. Inkubasi secara anaerobik dalam *candle anaerobic jar* pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24-48 jam dan ditambahkan kit anaerob. Koloni dari kelompok BAL akan menunjukkan area bening disekitarnya karena reaksi asam organik yang diproduksi BAL dengan  $\text{CaCO}_3$  pada media MRS Agar. Selanjutnya koloni digoreskan kembali ke medium MRS Agar dengan goresan kuadran berulang-ulang sampai didapatkan koloni yang seragam. Selanjutnya koloni yang telah murni dipilih untuk diuji aktivitas antikapangnya.

### Isolasi Kapang dari Biji Kakao Kering

Kapang target untuk menguji sifat antikapang isolat BAL menggunakan sampel biji kakao kering jenis lindak (bulk) berasal dari PT Hajji Naga, Makassar, Sulawesi Selatan yang terkontaminasi kapang. Biji kakao yang terkontaminasi kapang di letakkan di atas cawan petri berisi media *Malt Extract Agar (MEA)*, dan diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 4 – 6 hari. Tiap jenis kapang yang tumbuh kemudian digoreskan kembali pada media MEA berulang kali sampai didapatkan kultur yang murni dengan warna miselium yang sama.

### Aktivitas Antikapang Kultur BAL

Pengujian aktivitas antikapang dari kultur bakteri asam laktat (BAL) dilakukan dengan metode Difusi Sumur (modifikasi *Agar Well Diffusion Method, Schnurer dan Magnusson, 2001*). Suspensi kapang target ditumbuhkan pada media MEA. Kemudian, dibuat sumuran dengan diameter sekitar 4 -5 mm menggunakan alat *cork borer* yang steril, dua kali ulangan dan satu sumuran sebagai kontrol.

Pengujian dilakukan dengan memipet 40 - 50  $\mu\text{L}$  suspensi kultur BAL dan dituangkan dalam masing-masing sumur, dibiarkan selama  $\pm 3$ - 4 jam hingga meresap. Inkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 48 jam, tanpa dibalik. Satu sumur sebagai kontrol hanya diisi dengan 40 - 50  $\mu\text{L}$  media MRS Broth saja. Aktivitas antikapang dapat diamati dengan melakukan pengukuran diameter daerah bening (tidak ditumbuhi kapang) di sekitar sumur menggunakan jangka sorong. Luas daerah bening disekitar sumuran ditentukan sebagai efek penghambatan BAL terhadap kapang yang diuji. BAL yang dilihat untuk diidentifikasi lebih lanjut adalah BAL yang mempunyai aktivitas antikapang atau mampu menghambat seluruh kapang yang di ujikan.

### Identifikasi Bakteri Asam Laktat

#### a. Pewarnaan Gram (Bell *et al.*, 2005)

Aquades steril di tetes kan diatas gelas obyek kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas obyek. Selanjut nya preparat difiksasi hingga terbentuk noda. Di atas noda tersebut diteteskan pewarna kristal violet (gram A) dan dibiarkan selama 1 menit kemudian di cuci dengan air mengalir dan

dikeringanginkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan mordan atau lugol (gram B) dan dibiarkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Tahap selanjutnya adalah ditetesi dengan alkohol-aseton (gram C) sampai cat luntur dan tidak berwarna. Tahap terakhir dari pengecatan gram ini adalah ditetesi dengan pewarna safranin (gram D) selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Objek glass ditutup dengan deck glass dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Isolat BAL menunjukkan warna ungu dibawah mikroskop.

#### **b. Uji Katalase (Bell *et al.*, 2005)**

Akuades steril di tetes kan diatas gelas obyek kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 48 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas obyek lalu ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3%, didiamkan selama 1 menit. Apabila timbul gelembung udara menunjukkan katalase positif dan apabila tidak timbul gelembung udara menunjukkan katalase negatif.

#### **c. Pewarnaan Endospora (Bell *et al.*, 2005)**

Gelas obyek dan gelas penutup dibersihkan menggunakan etanol 70% kemudian dikeringanginkan. Akuades steril di tetes kan diatas gelas obyek kemudian ditambahkan 1 ose bakteri umur 72 jam dan diratakan pada permukaan atas gelas obyek dengan luas sekitar 1.5 x 1.5 cm<sup>2</sup>. Preparat di fiksasi dengan melewatkannya diatas nyala api bunsen beberapa kali. Preparat yang sudah di fiksasi digenangi dengan pewarna malakit hijau dan dipanaskan diatas penangas air (diatas air mendidih) hingga timbul uap air (± 10 menit) (dijaga agar pewarna jangan sampai kering), kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop (perbesaran 1000x) untuk mengetahui adanya spora dalam sel (endospora). Isolat BAL akan menunjukkan tidak ada spora dalam sel.

#### **d. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Level Spesies dengan Metode API 50 CHL**

Identifikasi bakteri asam laktat (BAL) dapat dilakukan berdasarkan kemampuannya memfermentasi karbohidrat dalam 50 tes biokimia menggunakan kit API 50 CHL.

Tiga (3) ose koloni tunggal dari MRS Agar dalam cawan petri dimasukkan kedalam 2 ml larutan NaCl 0.85% steril dalam tabung reaksi, kemudian dihomogenisasi menggunakan vortex. Selanjutnya dari tabung ini ditetaskan perlahan ke dalam tabung reaksi lain yang berisi 5 ml NaCl 0.85% steril sampai kekeruhannya sama dengan kekeruhan pada standard Mc Farland no.2. Kemudian dimasukkan ke dalam media API 50 CHL. Setelah dihomogenisasi, media API 50 CHL dimasukkan ke dalam strip-strip *mikrotube* secara hati-hati, dijaga agar jangan sampai ada gelembung udara didalam *mikrotube*. Ujung *mikrotube* yang telah diisi dengan media API 50 CHL ditetesi dengan 2 tetes mineral oil. Selanjutnya *tray* ditutup dan diinkubasi pada 37° C selama 48 jam. Perubahan warna yang terjadi pada tiap-tiap *mikrotube* diamati pada 24 jam dan 48 jam. Hasil pengamatan dimasukkan ke dalam software APIweb untuk kemudian ditentukan spesies dari BAL tersebut.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Alami Biji Kakao**

Fermentasi alami biji kakao berlangsung selama 4 hari di dalam kotak kayu (*tray fermentation*). Satu unit kotak fermentasi terdiri dari 4 kotak kayu yang disusun secara bertingkat. Pengambilan sampel biji dan lendir kakao terfermentasi dilakukan setiap hari di beberapa titik, satu titik bagian tengah dan dua titik di bagian pinggir kotak dengan kedalaman sekitar 10 – 15 cm.

Dari fermentasi biji kakao ini berhasil di isolasi sebanyak 69 isolat yang diduga bakteri asam laktat (BAL). Isolat BAL yang berhasil diisolasi bervariasi, berasal dari biji maupun dari bagian lendir kakao, dengan tipe pertumbuhan koloni dipermukaan media, di bagian dalam media, dan dibagian dasar media MRS Agar dalam cawan petri. Berikut adalah tabel total bakteri asam laktat (BAL) dari biji dan lendir kakao terfermentasi selama 4 hari fermentasi.

Tabel 1. Total Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Biji dan Lendir Kakao Terfermentasi

| FER<br>MENTASI<br>HARI KE- | BIJI<br>(CFU/g)        |                        |                        | LENDIR<br>(CFU/g)      |                        |                        |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                            | Permukaan*             | Dalam <sup>^</sup>     | Dasar*                 | Permukaan*             | Dalam <sup>^</sup>     | Dasar*                 |
| 0 (F0)                     | 1.22 x 10 <sup>3</sup> | 1.02 x 10 <sup>3</sup> | 2.02 x 10 <sup>3</sup> | 2.18 x 10 <sup>3</sup> | 1.31 x 10 <sup>3</sup> | 2.61 x 10 <sup>3</sup> |
| 1 (F1)                     | 2.95 x 10 <sup>6</sup> | 1.87 x 10 <sup>7</sup> | 2.47 x 10 <sup>7</sup> | 2.06 x 10 <sup>7</sup> | 2.87 x 10 <sup>7</sup> | 2.57 x 10 <sup>7</sup> |
| 2 (F2)                     | 2.37 x 10 <sup>4</sup> | 2.58 x 10 <sup>5</sup> | 1.61 x 10 <sup>5</sup> | 1.10 x 10 <sup>5</sup> | 1.93 x 10 <sup>5</sup> | 1.93 x 10 <sup>5</sup> |
| 3 (F3)                     | 2.11 x 10 <sup>4</sup> | 1.44 x 10 <sup>5</sup> | 2.27 x 10 <sup>5</sup> | 2.64 x 10 <sup>4</sup> | 1.73 x 10 <sup>5</sup> | 2.33 x 10 <sup>5</sup> |
| 4 (F4)                     | 2.63 x 10 <sup>3</sup> | 1.20 x 10 <sup>3</sup> | 2.22 x 10 <sup>3</sup> | 2.12 x 10 <sup>3</sup> | 2.94 x 10 <sup>3</sup> | 2.45 x 10 <sup>3</sup> |

Berdasarkan Tabel 1. diatas dapat dilihat bahwa isolat BAL terdapat pada biji dan lendir kakao terfermentasi selama 4 hari fermentasi. Kelompok BAL terlihat paling sedikit pada tahap awal fermentasi (F0), kemudian menjadi dominan pada tahap akhir dari fermentasi hari ke-1 (F1). Populasi kelompok BAL selanjutnya mengalami penurunan pada fermentasi hari ke-2 (F2), ke-3 (F3) dan semakin menurun pada hari ke-4 (F4)

Pada awal fermentasi mikrobiota didominasi oleh kelompok khamir. Pulp kakao merupakan media yang baik untuk pertumbuhan khamir. Menurut Ardhana dan Fleet (2003), komposisi pulp menentukan keberhasilan proses fermentasi. Oleh karena itu buah kakao yang dipetik adalah buah kakao yang telah matang sempurna di pohon. Pulp pada buah yang belum matang banyak mengandung sukrosa, sedangkan pada buah kakao matang didominasi oleh glukosa dan fruktosa. Glukosa dan fruktosa adalah monosakarida yang mudah digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan khamir. Khamir akan memetabolisme gula menjadi alkohol dan CO<sub>2</sub> dalam reaksi eksotermis yang menghasilkan panas. Selanjutnya kondisi lingkungan yang anaerob dan suhu yang meningkat menyebabkan kelompok bakteri asam laktat (BAL) akan mengambil alih dominasi pertumbuhan. BAL akan memetabolisme gula menjadi asam laktat dan asam-asam organik lainnya.

Isolat yang didapatkan (69 isolat) digoreskan kembali (*re-streaking*) pada media MRS Agar dengan goresan kuadran. Pemurnian dilakukan sebanyak dua (2) kali sampai didapatkan koloni tunggal dengan kenampakan yang sama. Setelah tahap pemurnian didapatkan 39 isolat dengan

pertumbuhan yang bagus, selanjutnya 39 isolat ini diuji aktivitas antikapangnya dan dipilih lagi sebanyak 18 isolat BAL yang mempunyai sifat antikapang tertinggi, kemudian diuji secara fenotip. Pemberian kode isolat berdasarkan asal isolat, lama fermentasi, tingkat pengenceran, dan letak pertumbuhannya pada media MRS Agar. Misal nya F1L-6 dsr : isolat dari fermentasi kakao hari ke-1, diisolasi dari lendir (pulp) kakao, dari hasil inokulasi suspensi pada tingkat pengenceran 10<sup>-6</sup>, dan letak pertumbuhannya di dasar atau di bagian bawah media MRS Agar pada cawan petri.

#### Isolasi Kapang dari Biji Kakao Kering Tidak Terfermentasi (*unfermented*) yang Terserang Kapang

Kapang target diisolasi dari biji kakao kering asal PT Haji Naga, Makassar, Sulawesi Selatan. Setelah melalui pemurnian, maka diperoleh 3 spesies kapang dominan Selanjutnya dilakukan pengamatan secara visual kapang yang ditumbuhkan pada media MEA dalam cawan petri kemudian dibandingkan dengan kunci identifikasi dari "Mycology BookWEB" dari Anonymous, 2010, maka kapang yang dominan menyerang biji kakao kering diduga adalah *Mucor spp.* (berwarna putih keabuan), *Aspergillus fumigatus* (berwarna hijau) dan *Aspergillus niger* (berwarna hitam). Seperti yang dilaporkan Betina, dalam Cahyaningsih (2006) kapang patogen yang umumnya menyerang biji kakao adalah *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*, dan *Mucor spp.* Demikian juga seperti halnya dalam penelitian Bunting (1928); Dade (1928); Roelofsen dan Giesberger (1947);

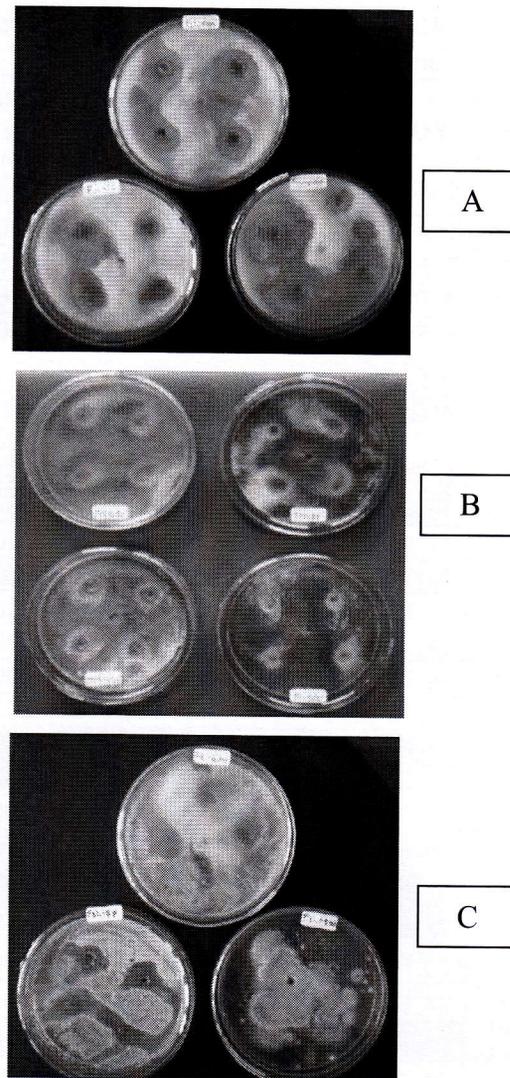
Maravalhas (1966); Lehrian dan Patterson (1983); serta Nielsen (2006) kelompok kapang dominan yang menyerang biji kakao adalah *Aspergillus fumigatus* dan *Mucor spp.*

#### Aktivitas Antikapang

Aktivitas antikapang isolat BAL dapat diamati dengan mengukur diameter daerah bening di sekitar sumuran yang tidak ditumbuhi kapang, dan dihitung secara matematis menjadi luas daerah bening (penghambatan). Hasil pengukuran daerah bening dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2, isolat BAL yang berasal dari tahap awal fermentasi (F0) ternyata tidak mampu menghambat ketiga jenis kapang. Bahkan isolat BAL yang diisolasi dari lendir kakao tidak mempunyai kemampuan menghambat ketiga jenis kapang. Isolat BAL dari fermentasi kakao hari ke-1 (F1) menunjukkan aktivitas antikapang yang cukup besar. BAL dari fermentasi kakao hari ke-2 (F2) secara umum mengalami penurunan aktivitas antikapang dibandingkan isolat BAL dari F1. Dari 5 isolat yang diuji, dipilih 2 isolat yang akan diidentifikasi. Isolat BAL dari fermentasi kakao hari ke-3 mengalami peningkatan aktivitas antikapang kembali. Dari 11 isolat yang diuji aktivitas antikapangnya dipilih 8 isolat dengan aktivitas antikapang lebih besar daripada yang lain. Selanjutnya 9 isolat BAL dari fermentasi kakao hari ke-4 yang diuji, dipilih 3 isolat untuk diidentifikasi. Sehingga berdasarkan aktivitas antikapang nya, dari 39 isolat BAL yang diuji dipilih 18 isolat BAL dengan aktivitas antikapang yang besar untuk diidentifikasi.

Kemampuan beberapa isolat yang berbeda terhadap 3 kapang yang diujikan dapat dilihat pada Gambar 1. Dari Gambar 1. dapat dilihat bahwa kemampuan isolat BAL dalam menghambat kapang berbeda-beda tergantung pada spesies BAL. Spesies BAL yang berbeda akan menghasilkan penghambatan dan aktivitas yang berbeda karena perbedaan metabolit yang dihasilkan.



Gambar 1. Aktivitas Antikapang isolat BAL terhadap kapang putih (A); kapang hitam (B); dan kapang hijau (C).

Hasil pengujian aktivitas antikapang yang dinyatakan dalam luas daerah penghambatan menunjukkan bahwa kemampuan isolat BAL dalam menghambat kapang berbeda-beda tergantung pada spesies BAL. Spesies BAL yang berbeda akan menghasilkan penghambatan dan aktivitas yang berbeda karena perbedaan metabolit yang dihasilkan.