

Tabel 2. Hasil Pengukuran Luas Daerah Penghambatan Isolat BAL terhadap Pertumbuhan Kapang Target

F	KODE ISOLAT	Kapang Hitam (cm ²)	Kapang Hijau (cm ²)	Kapang Putih-abu (cm ²)	Rata Rata (cm ²)	Skor Antikapang	
F0	1. FO-6B P	0.7850	0.0000	0.0000	0.2617	+	
	2. FO-6L P	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-	
F1	3. F1 L-6 an	0.6218	1.6505	0.0000	0.7574	+	
	4. F1 L-5 P	0.0000	1.5386	0.0000	0.5129	+	
	5. F1 L-6 P	1.3886	0.0000	0.0000	0.4629	+	
	6. F1 L-5 an	0.5874	1.3267	11.0391	4.3177	+++++	
	7. F1 L-5 dsr	0.7850	2.2687	3.6965	2.2500	+++	
	8. F1 L-6 an*	0.7085	1.0382	0.0000	0.5822	+	
	9. F1 L-6 an **	1.6848	4.9063	6.8315	4.4742	+++++	
	10. F1 L-6 dsr	2.3494	8.5487	1.8860	4.2613	+++++	
	11. F1 L-6P*	2.4732	0.0000	0.0000	0.8244	+	
	12. F1L-5 an*	0.6010	4.7120	0.5343	1.9491	++	
	13. F1L-6 an ***	1.7079	0.0000	0.0000	0.5693	+	
	14. F1 L-6 p*	1.5386	0.0000	0.0000	0.5129	+	
	F2	15. F2 B-6 dsr	0.9759	0.0000	0.0000	0.3253	+
		16. F2 B-6 p	1.1304	0.0000	0.0000	0.3768	+
17. F2 B-6 an		1.6278	1.8860	0.0000	1.1712	++	
18. F2 B-5p		0.6359	2.2687	0.8655	1.2567	++	
19. F2 L -6p		0.7850	0.0000	0.9847	0.5899	+	
F3	20. F3 L-7 an	3.4619	1.2070	0.6079	1.7589	++	
	21. F3 L-7 p	1.3267	4.9063	0.0000	2.0776	+++	
	22. F3 L -7 p*	1.7663	4.5973	5.3066	3.8900	++++	
	23. F3 B-7 dsr	0.6359	0.0000	0.0000	0.2120	+	
	24. F3 L-5 p	1.1304	0.0000	0.0000	0.3768	+	
	25. F3 B-7 p	1.2861	0.6010	10.6019	4.1630	+++++	
	26. F3 B-7 p*	0.9072	0.4776	1.1023	0.8290	+	
	27. F3 B-7 an	1.1493	1.6505	6.6019	3.1339	++++	
	28. F3 L -7 dsr	2.4872	2.9850	3.7994	3.0905	++++	
	29. F3 L-7 an *	0.5024	1.7663	7.7152	3.3279	++++	
	30. F3 L-7 an **	1.5386	0.0000	3.7994	1.7793	++	
F4	31. F4 L-7 an	0.0000	2.4041	0.4715	0.9585	+	
	32. F4 B-5 an	0.0000	0.0000	0.5672	0.1891	+	
	33. F4 B-5 an*	0.0000	0.0000	0.3419	0.1140	+	
	34. F4 B-6 an	0.0000	2.0729	3.0620	1.7116	++	
	35. F4 B-5 p	0.7085	0.0000	0.0000	0.2362	+	
	36. F4 B-6 dsr	0.0000	0.0000	2.4041	0.8014	+	
	37. F4 L-5 dsr	0.3847	0.0000	1.1780	0.5209	+	
	38. F4 B-6dsr*	1.1780	0.0000	5.5127	2.2302	+++	
	39. F4 B-6 p	1.8860	2.7568	2.1631	2.2686	+++	

Ada kelompok BAL yang hanya menghasilkan metabolit berupa asam laktat saja dan ada kelompok BAL yang selain menghasilkan asam laktat juga menghasilkan asam-asam organik lainnya. Menurut Salminen *et al.* (2004), kelompok BAL yang hanya menghasilkan asam laktat (90%) termasuk dalam kelompok BAL homofermentatif, biasanya banyak diaplikasikan sebagai pengawet alami (*biopreservative agents*) terutama dalam pengawetan makanan, karena kemampuannya menghasilkan asam laktat dalam jumlah tinggi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan patogen dalam makanan. Sedangkan kelompok BAL yang menghasilkan asam laktat dan asam-asam organik lainnya termasuk dalam kelompok heterofermentatif. Spesies *Leuconostoc*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, termasuk dalam kelompok BAL heterofermentatif (Sharpe, 1986).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa BAL menghasilkan senyawa antikapang antara lain asam laktat, asam asetat, asam kaproat, asam format, asam fenilaktat, dan asam 4-hidroksifenilaktat, dipeptida siklik seperti siklo (Gly-L-Leu), siklo (L-Phe-L-Pro), dan siklo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), asam benzoat, methilhidantoin, mevanolakton, asam lemak berantai pendek, senyawa protein dengan BM rendah, bakteriosin, hydrogen peroksida (Lavermicocca *et al.*, 2000; Storm *et al.*, 2002; Fazeli *et al.*, 2004). Dalam penelitian Sjogren *et al.* (2003) melaporkan bahwa spesies *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 menghasilkan asam 3-[R]-hidroksidodekanoik, asam 3-hidroksi-5-cis dodesenoik, dan asam 3-[R]-hidroksitetradekanoik yang bersifat antikapang. Mekanisme penghambatan senyawa metabolit yang dihasilkan oleh beberapa kelompok BAL terhadap kapang belum diketahui secara pasti. Diduga asam-asam organik tersebut memiliki aktivitas seperti detergen yang akan mempengaruhi struktur membran sel kapang, yaitu

meningkatkan permeabilitas membran dan membebaskan elektrolit serta protein intraseluler yang mengakibatkan disintegrasi sitoplasma sel kapang.

Aktivitas senyawa metabolit antikapang yang dihasilkan oleh BAL tergantung pada pH, hal ini mengindikasikan bahwa aktivitas penghambatan berkaitan dengan karakteristik lipofilik membran sel mikroorganisme yang dapat dilewati oleh senyawa yang bersifat antikapang tersebut.

Identifikasi Isolat Bakteri Asam Laktat dengan Metode API 50 CHL

Tujuh (7) isolat terpilih dengan aktivitas antikapang paling tinggi (isolat dengan kode F1 L-6 an; F1 L-6 dsr; F3 L-7 p; F3 L-7 dsr; F3 L-7 an; F1 L-5 an; serta F1 L-5 an*) diuji kembali dengan pengujian pewarnaan gram, sifat katalase, dan pewarnaan endospora untuk memastikan bahwa isolat yang akan diidentifikasi lebih lanjut dengan metode API 50 CHL benar-benar merupakan kelompok BAL. Dari tahap ini dipilihlah 3 (tiga) isolat dengan aktivitas antikapang tertinggi yaitu isolat dengan kode : F1L-6an; F1L-6dsr; serta F3L-7p.

Selanjutnya ketiga isolat diidentifikasi berdasarkan metode protokol dalam sistem API 50 CHL berdasarkan pada kemampuan bakteri asam laktat untuk memfermentasi karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber karbon dan sumber energi utama untuk pertumbuhan bakteri. Namun setiap spesies bakteri mampu memfermentasi karbohidrat jenis tertentu dan tidak mampu memfermentasi jenis karbohidrat yang lain. Oleh karena itu pengujian kemampuan memfermentasi karbohidrat dapat digunakan sebagai dasar identifikasi bakteri asam laktat (BAL).

Isolat F1L-6dsr, F1L-6an, serta F3L-7p teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* dengan nilai ID dan T yang berbeda. Isolat F1L-6an teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* dengan nilai ID 99.8% dan nilai T sebesar 1.0; kriteria identifikasi adalah *very good identification*. Nilai T (*typical index*) sebesar 1.0 menunjukkan bahwa semua pola reaksi fermentasi isolat yang diuji cocok (sesuai) dengan profil spesies yang ada di *database*.

Isolat F1L-6dsr teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* dengan nilai ID 99.9% dan nilai T sebesar 1.0 dengan kriteria identifikasi adalah *excellent identification*. Nilai ID isolat F1L-6dsr lebih tinggi daripada isolat F1L-6an menunjukkan bahwa isolat F1L-6dsr mempunyai pendekatan relatif yang lebih baik terhadap profil spesies yang ada *database*.

Isolat F3L-7p dengan ID 89.8% dan nilai T sebesar 0.91 dengan kriteria identifikasi *very good identification to the genus*. Pada lembar hasil identifikasi terdapat keterangan *complementary test(s)* yang menunjukkan perlu dilakukan uji pelengkap, karena 9.6% dari isolat yang diuji teridentifikasi sebagai *Lactobacillus buchneri*, maka diperlukan uji pelengkap untuk menentukan spesies isolat yang diuji yaitu uji pertumbuhan pada suhu 15°C dan 45°C. Apabila isolat F3L-7p mampu tumbuh pada suhu 15°C dan tidak dapat tumbuh pada suhu 45°C maka isolat ini adalah *Lactobacillus buchneri*, namun sebaliknya apabila isolat ini mampu tumbuh pada suhu 45°C dan tidak dapat tumbuh pada suhu 15°C maka isolat ini adalah *Lactobacillus fermentum*. Karena isolat ini mampu tumbuh pada suhu 45°C tapi tidak dapat tumbuh pada suhu 15°C maka isolat ini adalah *Lactobacillus fermentum*.

Roelofsen dan Giesbenger (1947); Ostovar dan Keeney (1973); Carr dan Davies (1980); Passos *et al.* (1984); Thompson *et al.* (2001); Ardhana dan Fleet (2003); Schwan dan Wheals (2004); Nielsen (2006); Kostinek *et al.* (2008) melaporkan bahwa kelompok bakteri asam laktat yang mendominasi fermentasi kakao (baik dengan metode *heapfermentation* maupun *tray fermentation*) di negara penghasil kakao di dunia (Cote d'Ivoire, Ghana, Indonesia, Nigeria, Malaysia, Brazil, Trinidad, Karibia, India) adalah *Lactobacillus fermentum*.

Sejauh ini belum ada laporan penelitian mengenai isolasi dan identifikasi *Lactobacillus fermentum* dari fermentasi kakao yang mempunyai potensi antikapang serta aplikasinya sebagai kultur starter. Fazeli *et al.* (2004) melaporkan telah mengisolasi *Lactobacillus fermentum* dari adonan roti pada pembuatan roti secara tradisional di Iran. Isolat *Lactobacillus fermentum* yang didapatkan mempunyai sifat antikapang yang

mampu menghambat pertumbuhan kapang sehingga produk roti yang dihasilkan mempunyai umur simpan yang lebih panjang.

Aplikasi *Lactobacillus fermentum* sebagai kultur starter masih perlu diteliti lebih lanjut. Beberapa penelitian melaporkan penggunaan khamir sebagai kultur starter dalam fermentasi kakao yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (Samah *et al.*, 1992), *Saccharomyces theobromae* (Dzogbefia *et al.*, 1999). Schwan (1998) melaporkan penggunaan inokulum campuran khamir dan bakteri asam laktat (BAL) sebagai kultur starter yaitu *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, serta *Lactobacillus lactis* untuk mengontrol dan meningkatkan kualitas fermentasi kakao.

Isolat BAL yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi adalah *Lactobacillus fermentum* yang berpotensi antikapang. Isolat BAL ini dapat digunakan sebagai kultur starter untuk mengoptimalkan proses fermentasi biji kakao sehingga diperoleh biji kakao yang tahan terhadap serangan kontaminasi kapang. Dengan demikian akan meningkatkan kualitas biji kakao ekspor Indonesia.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Isolat BAL dari fermentasi alami biji kakao di PTPN XII Kebun Banjarsari, Jember (F1L-6an; F1L-6dsr, dan F3L-7p) teridentifikasi sebagai *Lactobacillus fermentum* merupakan kandidat agen antikapang. Isolat BAL ini dapat digunakan sebagai kultur starter untuk proses fermentasi yang lebih optimal dan fermentasi kembali (*re-fermentation*) biji kakao yang tidak mengalami fermentasi (*unfermented*), sehingga menekan kontaminasi oleh kapang dan menurunkan kandungan mikotoksin. Dengan demikian keamanan, kualitas, serta harga ekspor biji kakao Indonesia akan meningkat.

Saran

Isolat BAL yang telah teruji mempunyai sifat antikapang perlu diidentifikasi lebih lanjut dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang mengamplifikasi gen penyandi 16s rRNA, sehingga didapatkan informasi sampai ke

level strain nya. Serta isolasi dan identifikasi senyawa bioaktif antikapang yang dihasilkannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous^a. 2010. Mycology BookWeb. <http://www.mycology.adelaide.edu.au.html>; diakses pada 21 oktober 2010.
- Ardhana dan Fleet. 2003. The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentation in Indonesia. *International Journal of food Microbiology* 86 (2003) p.87-99
- Bell, C., P. Neaves, A.P. Williams. 2005. *Food Microbiology : Laboratory Practice*, Blackwell Publishing, USA
- Cahyaningsih, H.E. .2006. *Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar serta Aplikasinya dalam Mereduksi Salmonellathypimurium dan Aspergillusflavus pada Biji Kakao*, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Cappucino dan Sherman. 2005. *Microbiology : A Laboratory Manual*, Dary, The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc. New York
- Fazeli MR. 2004. Sourdough-isolated *Lactobacillus fermentum* as a potent anti-mould preservative of a traditional Iranian bread. *Eur Food Res Technol* (2004) 218:554-556
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, and M. Gobbetti. 2000. *Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B*. *Appl. Environ. Microbiology*.66:4084-4090.
- Lavermicocca, P, F. Valerio, dan A. Visconti. 2003. *Antifungal Activity of Phenylactic Acid Against Mold Isolated From Bakery Products*. *Applied and Env. Microbiology*, Vol 69, 1 : 634 – 640.
- Magnusson, J. dan J. Schnurer. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. *Applied and Env. Microbiology*, Vol 67, 1 : 1 – 5.
- Nielsen, D.S.2006. *The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations*, Department of Food Science, Food Microbiology The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark
- Nielsen, D.S. et.al. 2007. *The Microbiology of Ghanaian Cocoa Fermentations Analysed Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods*, *International Journal of Food Microbiology*
- Ostovar, K dan P.G Keeney.1973. *Isolation and Characterization of Microorganisms Involved in the Fermentation of Trinidad's Cacao Beans*. *Journal of Food Science*, 38.
- Passos, P.M.L., D.O. Silvia, A. Lopez, C.L.F. Ferreira, dan W.V. Guimaraes. 1984. *Characterization and Distribution of Lactic Acid Bacteria From Traditional Cocoa Bean Fermentation in Bahia*. *J. Food Sci.* 49.