

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT
YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIBAKTERI
PADA BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
YANG DIFERMENTASI SECARA SPONTAN**

***ISOLATION AND CHARACTERISATION OF LACTIC ACID
BACTERIA WHICH IS POTENTIAL TO BE USED AS AN
ANTIBACTERIAL AGENT ON THE SPONTANEOUSLY
FERMENTED COCOA SEED (*Theobroma cacao* L.)***

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi sebagian dari syarat-syarat guna
memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pangan

Oleh:

KARTIKA

10.70.0075



**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA
SEMARANG**

2014

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Kartika
NIM : 10.70.0075
Fakultas : Teknologi Pertanian
Program Studi : Teknologi Pangan

Menyatakan bahwa skripsi “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat yang Berpotensi sebagai Antibakteri pada Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang Difermentasi secara Spontan” merupakan karya saya dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi. Sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila saya tidak jujur, maka gelar dan ijazah yang saya peroleh dinyatakan batal dan akan saya kembalikan kepada Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 10 Februari 2014

Kartika



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ASAM LAKTAT
YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIBAKTERI
PADA BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
YANG DIFERMENTASI SECARA SPONTAN**

***ISOLATION AND CHARACTERISATION OF LACTIC ACID
BACTERIA WHICH IS POTENTIAL TO BE USED AS AN
ANTIBACTERIAL AGENT ON THE SPONTANEOUSLY
FERMENTED COCOA SEED (*Theobroma cacao* L.)***

Oleh:
KARTIKA
NIM: 10.70.0075

Program Studi: Teknologi Pangan

**Skripsi ini telah disetujui dan dipertahankan
dihadapan sidang pengujian pada tanggal: 10 Februari 2014**

Semarang, 28 Februari 2014

Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Katolik Soegijapranata

Pembimbing I

Dekan

Dr. Ir. Lindayani, MP.

Dr. V. Kristina Ananingsih, ST., MSc.

Pembimbing II

Dra. Laksmi Hartayanie, MP.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat rahmatnya penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi, yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat yang Berpotensi sebagai Antibakteri pada Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang Difermentasi secara Spontan”.

Laporan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memenuhi kelengkapan akademis yang bertujuan untuk mencapai program kesarjanaan strata satu (S1) program studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata Semarang. Skripsi ini dimaksudkan untuk menambah wawasan dan pengalaman kerja, serta untuk melengkapi pengetahuan dengan penerapan ilmu yang telah diterima secara langsung dalam perkuliahan.

Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan laporan skripsi ini baik secara langsung maupun tidak langsung, khususnya kepada :

1. Dr. Victoria Kristina Ananingsih, ST., MSc., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata Semarang.
2. Ir. Lindayani, MP., PhD., selaku pembimbing I dan Dra. Laksmi Hartayanie, MP., selaku pembimbing II, yang telah meluangkan waktu dan tenaga dalam membimbing, memberikan petunjuk, saran, serta semangat hingga terselesainya skripsi ini.
3. Segenap dosen Fakultas Teknologi Pertanian, UNIKA Soegijapranata yang telah membimbing dan memberikan pengetahuan yang sangat berguna bagi penulis.
4. Staf laboran (Mbak Endah, Mas Soleh, Mas Pri, dan Mas Lylyx) dan karyawan Fakultas Teknologi Pertanian, UNIKA Soegijapranata yang telah banyak membantu penulis, terutama dalam pelaksanaan penelitian di laboratorium.
5. Pihak HPS Jogjakarta yang telah menyediakan kakao sehingga penelitian dapat berlangsung dengan lancar.
6. Papa, mama, Christine, Christanto, Christandra, Ivan Septian and *family*, Ko Anton karena telah memberikan semangat, doa, dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.

7. Kakao's team (Nining Ayu Wulandari, Rendy Dhamawi, Stefanie Karsodihadjo, Yenny Permatasari, Yes'se) dan teman-teman FTP yang selalu memberi semangat dan bantuan, yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyelesaian skripsi ini masih dari jauh dari kesempurnaan baik materi maupun cara penulisannya. Namun demikian, penulis telah berupaya dengan segala kemampuan dan pengetahuan yang dimiliki sehingga dapat selesai dengan baik. Oleh karena itu, penulis dengan rendah hati menerima masukan, saran, dan usul guna penyempurnaan laporan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh pembaca.

Semarang, 5 Februari 2014

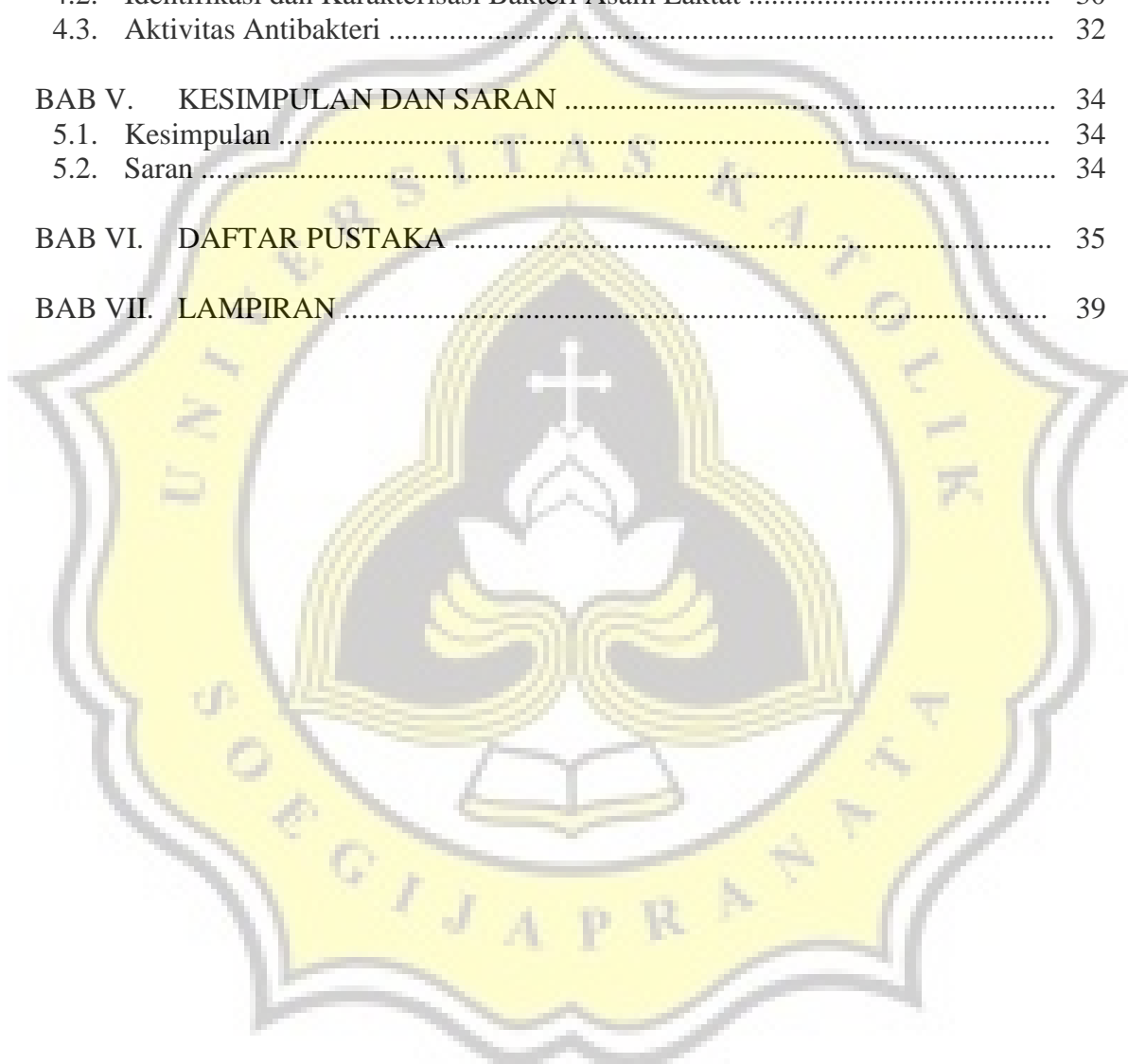
Penulis



DAFTAR ISI

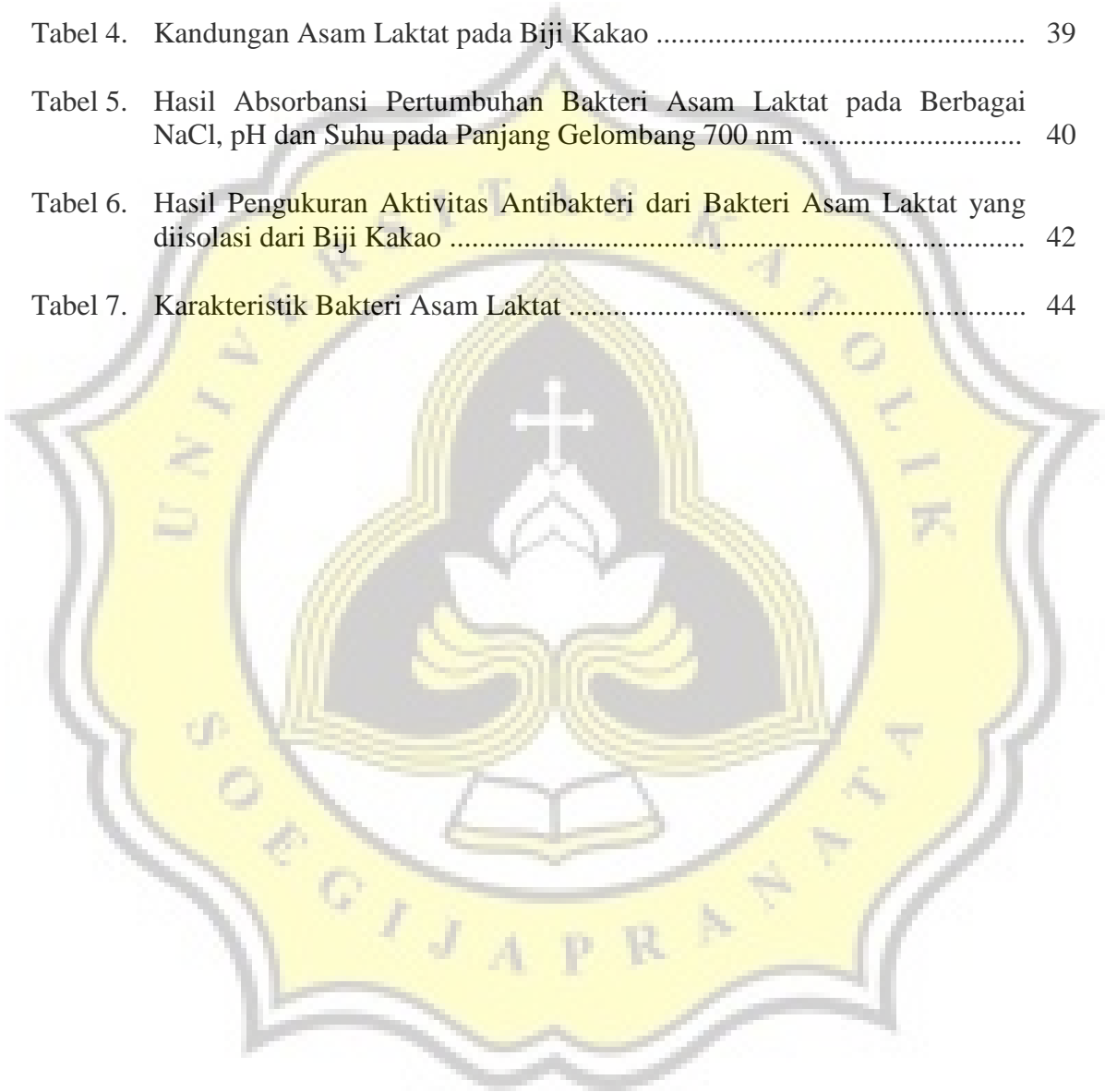
RINGKASAN	iv
SUMMARY	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tinjauan Pustaka	2
1.2.1. Fermentasi dan Bakteri Asam Laktat (BAL)	2
1.2.2. Antimikroba	6
1.2.3. Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	7
1.3. Tujuan	9
BAB II. MATERI DAN METODE	10
2.1. Waktu dan Tempat	10
2.2. Materi	10
2.2.1. Alat	10
2.2.2. Bahan	10
2.3. Metode	12
2.3.1. Fermentasi Biji Kakao	12
2.3.2. Pengujian Total Asam Titrasi	12
2.3.3. Isolasi Bakteri Asam Laktat	12
2.3.4. Karakterisasi Bakteri	13
a. Pewarnaan Gram	13
b. Pewarnaan Spora	13
c. Uji Motilitas	14
d. Uji Aktivitas Katalase	14
e. Produksi Gas	14
f. Kemampuan Pertumbuhan Bakteri pada Berbagai NaCl, pH, dan Suhu	14
1) Pertumbuhan Bakteri pada Kadar NaCl (6,5% dan 18%)	14
2) Pertumbuhan Bakteri pada pH (4,4 dan 9,6)	15
3) Pertumbuhan Bakteri pada Suhu (10°C, 45°C, dan 50°C)	15
2.3.5. Aktivitas Antibakteri	15
2.3.6. Pembuatan Stok Bakteri Asam Laktat	16
BAB III. HASIL PENELITIAN	17
3.1. Fermentasi Kakao	17
3.2. Total Asam Laktat pada Biji Kakao Fermentasi	18
3.3. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat	18
3.4. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Pewarnaan Gram	21
3.5. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Pewarnaan Spora	21

3.6. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Uji Motilitas	22
3.7. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Aktivitas Katalase	22
3.8. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Uji Produksi Gas	23
3.9. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Fisiologi	23
3.10. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Kemampuan Aktivitas Antibakteri	26
BAB IV. PEMBAHASAN	28
4.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao Fermentasi	28
4.2. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat	30
4.3. Aktivitas Antibakteri	32
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1. Kesimpulan	34
5.2. Saran	34
BAB VI. DAFTAR PUSTAKA	35
BAB VII. LAMPIRAN	39



DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Komposisi Kimia <i>Pulp</i> Biji Kakao	8
Tabel 2.	Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Morfologi dan Biokimia	20
Tabel 3.	Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Fisiologi	24
Tabel 4.	Kandungan Asam Laktat pada Biji Kakao	39
Tabel 5.	Hasil Absorbansi Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat pada Berbagai NaCl, pH dan Suhu pada Panjang Gelombang 700 nm	40
Tabel 6.	Hasil Pengukuran Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Biji Kakao	42
Tabel 7.	Karakteristik Bakteri Asam Laktat	44

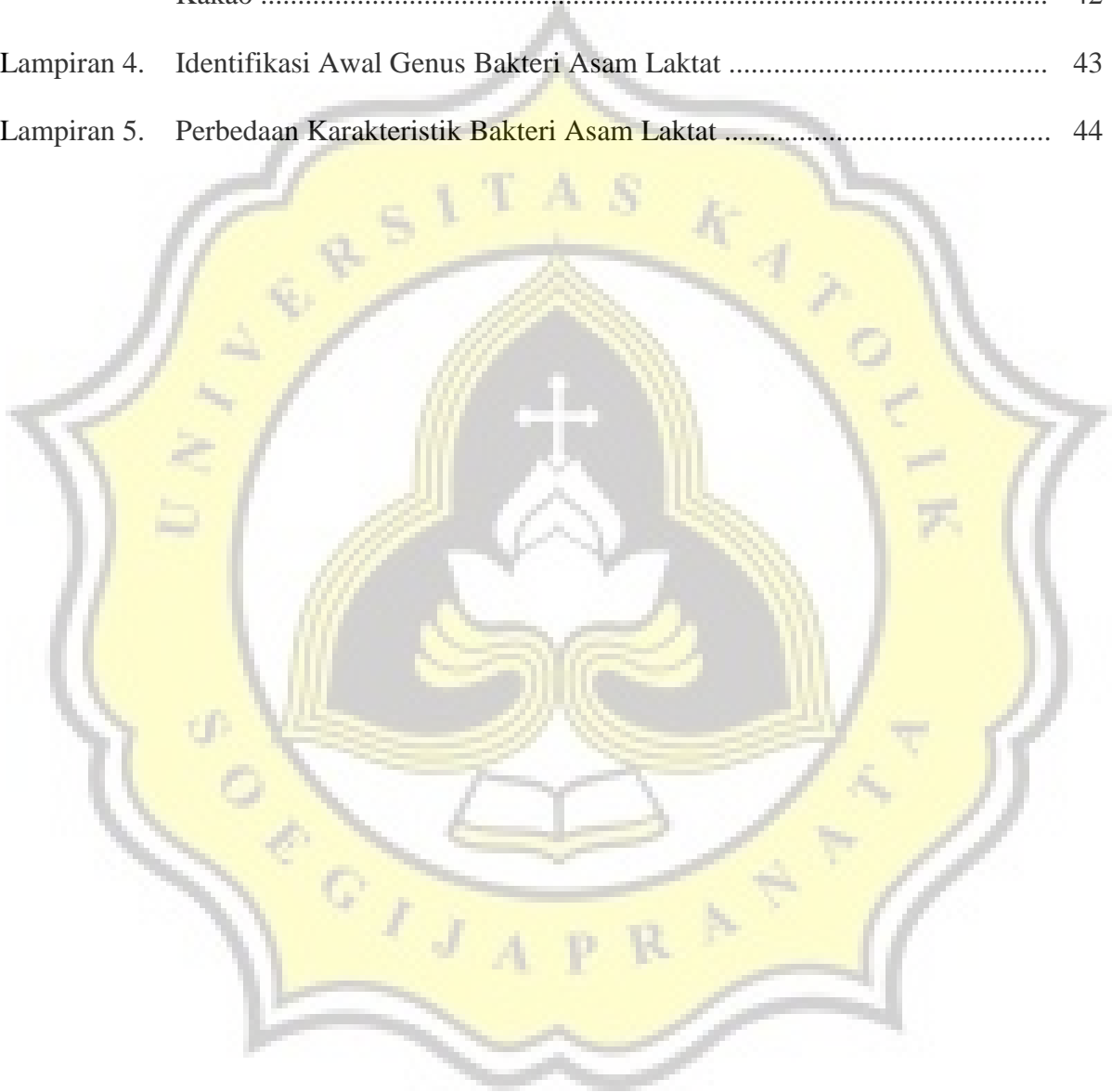


DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Jalur Metabolisme Bakteri Homofermentatif dan Heterofermentatif	3
Gambar 2.	Buah kakao lindak (Dokumentasi pribadi, 2013)	7
Gambar 3.	Tahapan isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat yang memiliki kemampuan aktivitas antibakteri pada biji kakao fermentasi	11
Gambar 4.	Fermentasi spontan biji kakao; biji kakao sebelum fermentasi (a), proses fermentasi anaerob fakultatif (b), proses aerasi (c), fermentasi dilanjutkan hingga har ke-5 (d), dan setelah difermentasi 5 hari (e)	17
Gambar 5.	Total asam laktat selama Fermentasi	18
Gambar 6.	Isolat bakteri penghasil asam yang membentuk koloni tunggal dan membentuk zona bening	19
Gambar 7.	Isolat bakteri asam laktat (37) termasuk kelompok bakteri Gram positif diamati pada perbesaran 10x100	21
Gambar 8.	Isolat bakteri asam laktat (48) termasuk kelompok bakteri yang tidak membentuk spora diamati pada perbesaran 10x100	21
Gambar 9.	Isolat bakteri asam laktat memiliki sifat non-motil (tidak bergerak)	22
Gambar 10.	Isolat bakteri asam laktat memiliki katalase negatif (tidak membentuk gelembung)	22
Gambar 11.	Isolat bakteri asam laktat bersifat homofermentatif	23
Gambar 12.	Isolat bakteri asam laktat dapat tumbuh pada NaCl 6,5% (a-1) dan tidak tumbuh pada NaCl 18% (a-2); tumbuh pada pH 4,4 (b-1) dan tidak tumbuh pada pH 9,6 (b-2); tumbuh pada suhu 10°C (c-1), 45°C (c-2), dan 50°C (c3)	25
Gambar 13.	Zona hambat dari aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari biji kakao fermentasi	26
Gambar 14.	Zona hambat isolat bakteri asam laktat terhadap <i>Escherichia coli</i> (a) dan <i>Staphylococcus aureus</i> (b)	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Total Asam Titrasi	39
Lampiran 2.	Kemampuan Bakteri Asam Laktat Tumbuh pada Berbagai NaCl, pH dan Suhu	40
Lampiran 3.	Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Biji Kakao	42
Lampiran 4.	Identifikasi Awal Genus Bakteri Asam Laktat	43
Lampiran 5.	Perbedaan Karakteristik Bakteri Asam Laktat	44



RINGKASAN

Kakao merupakan salah satu komoditi pangan yang cukup banyak dimanfaatkan pada dunia industri pangan. Biji kakao Lindak yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Kulon Progo, Jogjakarta. Proses fermentasi merupakan salah satu faktor yang menentukan kualitas dari biji kakao. Fermentasi pangan merupakan salah satu cara untuk memproduksi berbagai produk pangan menggunakan biakan mikroba. Mikroba yang biasanya berperan dalam proses fermentasi adalah Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri asam laktat berperan aktif dalam proses fermentasi makanan, sehingga dapat meningkatkan kualitas (memberikan keawetan) dan keamanan bahan pangan karena memiliki kemampuan penghambatan alami terhadap mikroorganisme yang bersifat patogen. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari biji kakao yang difermentasi secara spontan terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Fermentasi biji kakao ini dilakukan selama 5 hari dan selama proses fermentasi dilakukan pengukuran kandungan asam laktat yang ada pada biji kakao. Isolasi bakteri dari biji kakao dilakukan pada media agar *de Man Rogosa Agar* (MRS) dengan penambahan 1% CaCO_3 dan 10 ppm NaN_3 . Setiap isolat yang membentuk zona bening dan koloni tunggal dikarakterisasi berdasarkan sifat morfologi (pewarnaan Gram, pewarnaan spora, dan motilitas bakteri), biokimia (uji aktivitas katalase dan produksi gas), dan fisiologisnya (pengujian NaCl, pH, dan suhu). Berdasarkan hasil uji sifat morfologi, biokimia, dan fisiologi diperoleh karakteristik bakteri asam laktat yaitu Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang, katalase negatif, aerotoleran atau anaerob, kelompok homofermentatif atau heterofermentatif, sehingga dapat disimpulkan 36 isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari biji kakao termasuk ke dalam genus *Lactobacillus*. Pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diketahui bahwa bakteri asam laktat memiliki zona penghambatan yang lebih baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* daripada *Escherichia coli*. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa isolat-isolat bakteri asam laktat yang difermentasi dari biji kakao memiliki potensi sebagai antibakteri.

SUMMARY

Cocoa is one of the food commodities which are widely used in the food industrial world. The Lindak cocoa seeds used in this study were derived from Kulon Progo, Jogjakarta. The fermentation process is one of the factors that determine the quality of cocoa seeds. Fermentation means a process to produce various food products using some of microbial cultures. The microbe that normally play role in the fermentation process is Lactic Acid Bacteria (LAB). The lactic acid bacteria have an active role in food fermentation processes which could improve the quality and food security of a food product due to their natural ability to inhibit the pathogenic microorganisms. The objective of this study was to determine the antibacterial activity from LAB isolate obtained from cocoa seeds which spontaneously fermented against the pathogenic microbes, Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Fermentation of the cocoa seeds was done in 5 days and during the fermentation process, the lactic acid content of the cocoa seeds was measured. The cocoa seeds bacteria isolation was done using de Man Rogosa Agar (MRS) with the addition of 1% CaCO₃ and 10 ppm NaN₃. Each isolate that formed a clear zone and a single colony was characterized based on the morphological properties (Gram coloring, spore coloring, and bacterial motility), biochemical properties (catalase activity test and gas production), and physiological properties (NaCl test, pH, and temperature). Based on the morphological, biochemical, and physiological properties test, it is obtained that LAB has the characteristics of Gram-positive, non-forming spore, rod-shaped or round rods (coccobacilli), negative catalase, aerotolerant or anaerobic, and homofermentative or heterofermentative group, so they can be concluded that 36 LAB isolates obtained from cocoa seeds are belong to the Lactobacillus genus. Based on the antibacterial activity test against the Escherichia coli and Staphylococcus aureus, it is known that LAB has better inhibition zone for Staphylococcus aureus than for Escherichia coli. Based on the results, it can be concluded that the LAB's isolates derived from the fermented cocoa seeds have a potential as an antibacterial agent.