

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditi pangan yang cukup banyak dimanfaatkan pada dunia industri pangan. Biji kakao merupakan bagian buah kakao memiliki nilai ekonomis dan paling banyak dimanfaatkan baik untuk produk pangan maupun kosmetik dan farmasi. Keping biji pada biji kakao dapat diolah menjadi coklat dan diambil lemaknya. Indonesia memiliki peluang yang besar untuk perkembangan buah kakao karena memiliki hutan tropis dengan curah hujan yang tinggi. Menurut Arsyad (2004), biji kakao Indonesia mempunyai kelemahan dalam hal kurang terfermentasi. Ada sekitar 80% produksi kakao rakyat yang tidak difermentasi (*unfermented*), sehingga biji kakao tidak dapat diekspor karena memiliki mutu yang rendah. Selain itu, biji kakao juga mudah mengalami kontaminasi oleh bakteri pembusuk dan bakteri patogen. Kontaminasi ini terjadi karena proses fermentasi yang kurang optimal, proses pengeringan yang kurang baik, serta masa penyimpanan sebelum diekspor.

Fermentasi spontan merupakan fermentasi yang dalam pembuatannya tidak ditambahkan mikroba dalam bentuk kultur *starter* tetapi melibatkan mikroba yang berperan aktif dalam proses fermentasi. Menurut Holzapfel (2002), proses fermentasi makanan dapat dikategorikan menjadi proses fermentasi spontan (tidak menggunakan kultur *starter*) dan proses fermentasi menggunakan kultur *starter*. Fermentasi memiliki peran penting dalam menentukan kualitas akhir biji kakao, yaitu membantu pengeringan biji dengan menghilangkan *pulp*, tetapi tujuan utamanya adalah untuk memicu reaksi biokimia yang mengarah pada pembentukan *flavour*, aroma, dan warna biji kakao (Kustyawati & Setyani, 2008).

Aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi sangat kompleks yaitu melibatkan Bakteri Asam Laktat (BAL). Bakteri asam laktat merupakan contoh mikroorganisme yang menguntungkan dan memiliki peranan penting dalam industri pangan, karena berperan aktif dalam proses fermentasi makanan dan dapat memberikan daya simpan (keawetan) produk yang lebih lama dibandingkan bahan dasarnya. Keawetan ini

disebabkan karena adanya asam laktat dan sebagian kecil asam asetat, etanol, dan CO₂ yang diproduksi oleh BAL selama proses fermentasi sehingga dapat menekan aktivitas bakteri pembusuk dan bakteri patogen (Rahayu & Margino, 1997). Hal ini menyebabkan bakteri asam laktat dapat dimanfaatkan untuk peningkatan kualitas dan keamanan bahan pangan karena memiliki kemampuan penghambatan alami terhadap mikroorganisme yang bersifat patogen.

Keberadaan bakteri pembusuk dan bakteri patogen dalam produk kakao dapat dihambat dengan cara penggunaan kultur tambahan bakteri asam laktat sebagai produsen antibakteri. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang secara alami ada dalam fermentasi kakao dan dapat diisolasi, yang selanjutnya dapat digunakan sebagai produsen antibakteri bagi komoditi kakao. Penghambatan pertumbuhan bakteri pembusuk dan bakteri patogen pada biji kakao diharapkan dapat meningkatkan kualitas dan mutu dari biji kakao. Berdasarkan penjelasan tersebut, maka perlu dilakukan penelitian mengenai *strain* bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai antibakteri pada biji kakao yang difermentasi secara spontan.

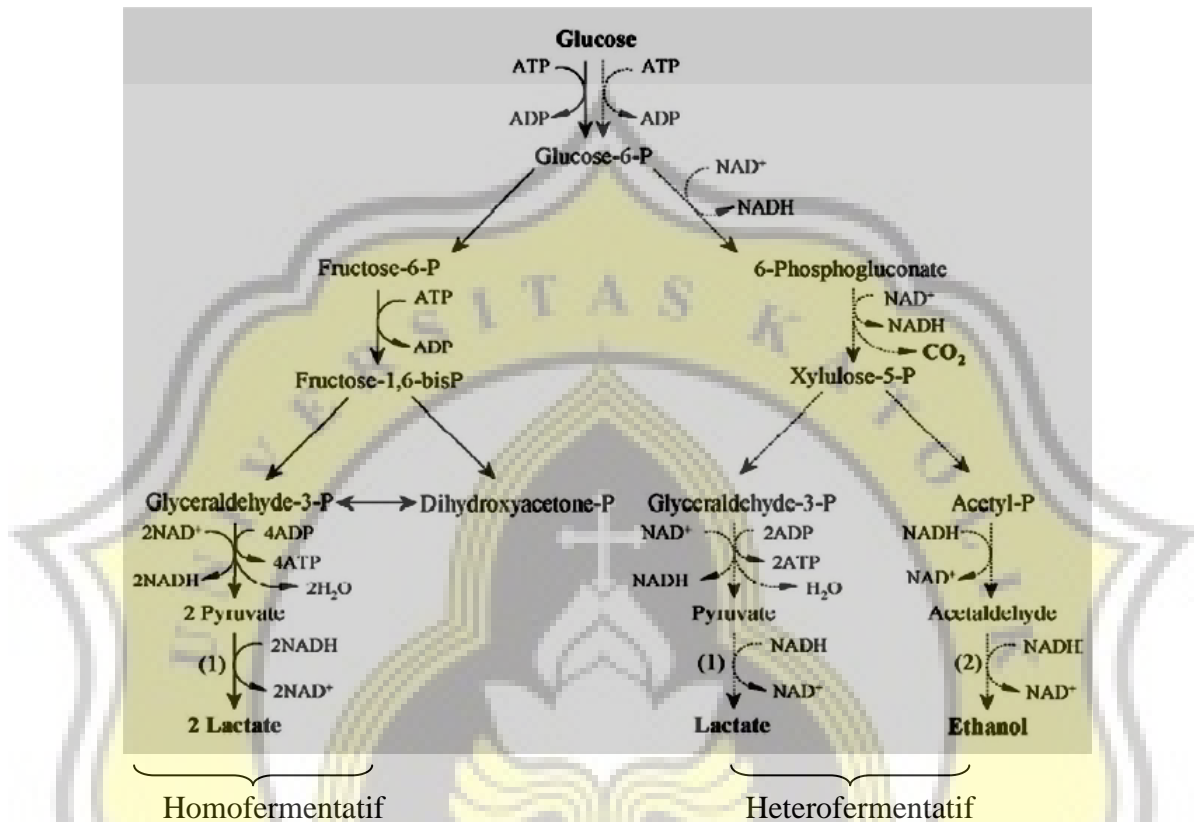
1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Fermentasi dan Bakteri Asam Laktat (BAL)

Fermentasi merupakan suatu proses pemecahan senyawa oleh mikroba yang bersifat katabolik. Mikroba katabolik akan memecah komponen-komponen kompleks menjadi zat yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna. Selain itu, mikroba ini juga dapat mensintesis beberapa vitamin yang kompleks dan faktor-faktor pertumbuhan bahan lainnya, misalnya produksi dari beberapa vitamin seperti riboflavin, vitamin B12, dan provitamin A (Winarno *et al.*, 1984). Proses fermentasi makanan dapat dikategorikan menjadi proses fermentasi spontan (tidak menggunakan kultur *starter*) dan proses fermentasi menggunakan kultur *starter*. Kultur *starter* yang digunakan dapat berupa isolat tunggal atau kultur campuran (Holzapfel, 2002).

Salah satu jenis bakteri yang berperan dalam proses fermentasi adalah bakteri asam laktat. Berdasarkan produk yang dihasilkan, bakteri asam laktat secara umum dibagi

menjadi dua kelompok, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri homofermentatif, hanya menghasilkan asam laktat selama proses fermentasi gula. Bakteri heterofermentatif, menghasilkan asam laktat dan senyawa lain seperti CO₂ dan etanol selama proses fermentasi (Wee *et al.*, 2002).



Gambar 1. Jalur Metabolisme Bakteri Homofermentatif dan Heterofermentatif (Wee *et al.*, 2002).

Bakteri asam laktat memiliki ciri-ciri yaitu Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk *cocci* atau *bacilli*, tidak bergerak (*non-motil*), bereaksi negatif dengan hidrogen peroksida (H₂O₂). Enzim katalase merupakan enzim yang mengkatalisasi penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Bakteri yang memproduksi enzim katalase akan bertahan hidup dalam kondisi aerobik. Bakteri asam laktat hanya membutuhkan sedikit bahkan cenderung tidak membutuhkan oksigen dalam proses fermentasi, sehingga bakteri ini tidak memproduksi enzim katalase (Battcock & Azam-Ali, 1998).

Revisi Klasifikasi Bakteri Asam Laktat Berdasarkan Karakter Molekular (*sequence* gen 16S rRNA) diketahui bahwa, terdapat 12 genus yaitu *Aerococcus*, *Carnobacterium*

(*Lactobacillus* atipikal), *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* (*Pediococcus halophilus*), *Vaganococcus*, dan *Weisella* (Rahayu & Margino, 1997).

Menunjuk pada pendekatan fenotip konvensional dan peranannya dalam industri pangan, bakteri asam laktat diklasifikasikan menjadi 4, yaitu:

- Genus *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri, yaitu Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang atau bulat batang (*coccobacilli*), aerotoleran atau anaerob, membutuhkan nutrisi yang kompleks (karbohidrat, asam amino, peptida, ester, asam lemak, garam-garam, derivat asam nukleat, dan vitamin). *Lactobacillus* dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok homofermentatif atau heterofermentatif (Rahayu & Margino, 1997). Menurut Ray & Bhunia (2007), genus *Lactobacillus* memiliki ciri-ciri bakteri gram positif, berbentuk batang, *non-motil*, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, dan katalase negatif. *Lactobacillus* dapat tumbuh pada kisaran suhu yang luas yaitu 10-50°C. Habitat *Lactobacillus* adalah pada tanaman, sayuran, biji-bijian, susu maupun pada produk olahan susu, serta saluran pencernaan manusia maupun hewan.
- Genus *Pediococcus* memiliki ciri-ciri, yaitu berbentuk bulat atau *cocci* dengan susunan *tetrad*, asidofilik, homofermentatif, sel bulat dengan ukuran seragam (diameter 0,36-1,43 µm), tidak pernah memanjang (kadang tampak berpasangan namun tidak membentuk rantai seperti *Lactococci*, *Streptococci*, dan *Leuconostoc*), *non-motil*, tidak membentuk spora, dan kapsula (Rahayu & Margino, 1997). Menurut Hutkins (2006), *Pediococcus* mirip dengan bakteri asam laktat lainnya yaitu bersifat fakultatif anaerob, tumbuh optimal pada suhu 25°C-40°C, tapi beberapa spesies dapat tumbuh pada temperatur di atas 50°C, dapat tumbuh pada pH 4,2 dan media yang mengandung 6,5% NaCl. Habitat alami *Pediococcus* terdapat pada tumbuhan, susu, urin hewan, dan bir (Hutkins, 2006).
- Genus *Leuconostoc* memiliki ciri-ciri, yaitu Gram positif, tidak membentuk spora, *non-motil*, fakultatif anaerob, berbentuk bulat dan terkadang terlihat berbentuk batang tergantung pada komposisi media dan bentuk media pertumbuhan. Pada

media glukosa, sel memanjang dan lebih mirip *Lactobacilli* daripada *Streptococci* (Rahayu & Margino, 1997). Menurut Hutkins (2006), bakteri ini memiliki perbedaan yang sangat mencolok dengan genus *Lactobacillus* dan *Streptococcus* karena bersifat heterofermentatif yaitu memfermentasi gula menjadi asam laktat, asam asetat, etanol, dan CO₂.

- Genus *Streptococcus* memiliki ciri-ciri, yaitu Gram positif, sel berbentuk bulat (*cocci*) dan ovoid dengan ciri rantai atau berpasangan, fakultatif anaerob, katalase negatif, bersifat homofermentatif (Rahayu & Margino, 1997). Genus *Streptococcus* dibagi menjadi 6 kelompok besar yaitu: *Pyogenic Streptococci*, *Oral Streptococci*, *Enterococci*, *Lactic Streptococci*, *Anaerobic Streptococci* dan *other Streptococci*. Revisi 1984, memasukkan *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, dan *Streptococcus durans* masuk dalam genus *Enterococcus*. Kemudian revisi 1985, spesies *Streptococcus lactic* dan *Streptococcus cremoris* dimasukkan ke dalam genus baru yaitu *Lactococcus* (Hutkins, 2006).

Bakteri asam laktat yang dihasilkan pada fermentasi kakao diantaranya *Lactobacillus cellobiosus* yang tumbuh baik pada suhu 45-47°C, *Lactobacillus plantarum* yang tumbuh baik pada suhu 40-45°C dan *Lactobacillus hilgardii* yang tumbuh baik pada suhu 40°C (Ardhana & Graham, 2003). *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, dan *Enterococcus casseliflavus* merupakan bakteri asam laktat yang diisolasi dari fermentasi kakao Ghanaian (Camu *et al.*, 2007).

Sauerkraut adalah asinan kubis yang diperoleh dari fermentasi spontan dengan penambahan garam 2-3%. Penambahan garam bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif. Serangkaian bakteri asam laktat yang berperan pada awal proses fermentasi adalah *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc fallax*, dan *Lactobacillus plantarum*. Kegiatan *Leuconostoc* akan berhenti ketika kadar asam meningkat hingga 0,7-1%. Tahap akhir fermentasi *sauerkraut* dipengaruhi oleh *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus brevis*. *Pediococcus cerevisiae* dan *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri asam laktat yang juga ditemukan pada fermentasi *sauerkraut*. *Pediococcus cerevisiae* dan *Enterococcus faecalis* memegang

peranan apabila proses fermentasi berada pada temperatur atau kadar garam sangat tinggi (Pundir & Jair, 2010).

1.2.2. Antimikroba

Zat antimikroba adalah senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba. Beberapa kelompok senyawa kimia utama yang bersifat antimikrobial adalah fenol dan senyawa fenolik, alkohol, senyawa halogen, logam berat dan senyawanya, zat warna, deterjen, senyawa amonium kuartener, asam dan basa, serta gas khemosterilen. Mekanisme penghambatan pertumbuhan mikroba oleh senyawa antimikroba antara lain:

- 1) Perusakan dinding sel sehingga mengakibatkan sel menjadi lisis atau menghambat pembentukan dinding sel pada sel yang sedang tumbuh,
- 2) Mengubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrien di dalam sel,
- 3) Denaturasi protein sel,
- 4) Perusakan sistem metabolisme dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler

(Pelczar & Chan, 1986).

Antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* (Gram positif) dan *Escherichia coli* (Gram negatif). Bakteri patogen dapat menyebabkan bahaya karena memiliki kemampuan menginfeksi dan menimbulkan penyakit serta merusak kualitas bahan pangan. Bakteri asam laktat memproduksi senyawa asam organik dan hidrogen peroksida (jika terjadi kelebihan oksigen pada lingkungan sekitar) yang bersifat antibakteri (Yudianto & Kusnadi, 2011).

Escherichia coli merupakan bakteri patogen famili *Enterobacteriaceae*, Gram negatif, tidak mempunyai kapsul, bersifat motil atau non-motil dengan flagella peritrikat, bersifat fakultatif anaerob, tunggal atau berpasangan, mempunyai suhu optimum pertumbuhan 37°C, tetapi dapat tumbuh pada rentang suhu 15-45°C. Nilai Aw optimum

adalah 0,96. Bakteri ini sangat sensitif terhadap panas dan dapat dinaktifkan pada suhu pasteurisasi atau selama pemasakan makanan (Supardi & Sukamto, 1999).

Staphylococcus aureus termasuk famili *Micrococcaceae*, Gram positif, berbentuk *coccus* yang terdapat dalam bentuk tunggal, berpasangan tetrad, atau berkelompok seperti buah anggur, memiliki suhu optimum 35-37°C, memiliki pH optimum sekitar 7,0-7,8. Kebanyakan galur *Staphylococcus aureus* bersifat patogen dan memproduksi enterotoksin yang tahan panas (Supardi & Sukamto, 1999).

1.2.3. Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao merupakan salah satu komoditi pangan yang cukup banyak dimanfaatkan pada dunia industri untuk diolah menjadi coklat. Menurut Susanto (1994), terdapat 3 jenis kakao yang paling banyak ditanam untuk produksi coklat, yaitu :

- Jenis *Criollo*

Jenis *Criollo* menghasilkan biji coklat yang mutunya sangat baik dan dikenal sebagai kakao mulia atau *edel cacao* atau *fine flavour cacao*. Buahnya berwarna merah atau hijau, kulit buahnya tipis dan berbintil-bintil kasar dan lunak. Biji buahnya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada waktu basah.

- Jenis *Forastero*

Jenis *Forastero* umumnya termasuk kakao bermutu rendah atau disebut kakao curah atau kakao curai atau *bulk cacao*. Buahnya berwarna hijau, kulitnya tebal, biji buahnya tipis atau gepeng dan kotiledon berwarna ungu tua pada waktu basah.

- Jenis *Trinitario*

Jenis ini merupakan hasil persilangan antara jenis *Criollo* dengan jenis *Forastero*. Hasil persilangan ini menghasilkan kakao yang bermutu baik dimana buah dan bijinya besar. Coklat *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.



Gambar 2. Buah kakao lindak (Dokumentasi pribadi, 2013)

Menurut Wahyudi *et al.* (2008), bentuk buah dan warna kulit buah kakao tergantung pada kultivarnya. Pada dasarnya terdapat dua macam warna, yaitu : buah yang ketika muda berwarna hijau atau hijau agak putih, bila sudah masak berwarna kuning, dan buah yang ketika masih muda berwarna merah, bila sudah masak berwarna oranye.

Proses fermentasi biji kakao berlangsung dengan bermacam-macam cara, misalnya ditumpuk diatas alas tertentu, dimasukkan ke dalam keranjang, dimasukkan ke dalam peti atau bak dan diletakkan di atas rak. Pada perusahaan perkebunan umumnya fermentasi kakao dilakukan di dalam peti fermentasi yang disusun beberapa baris sesuai dengan waktu proses fermentasi dan frekuensi pengadukan (Nasution *et al.*, 1985). Biji dalam kotak fermentasi ditutup dengan daun pisang atau karung goni. Tujuannya untuk mempertahankan panas. Pengadukan dilakukan cukup sekali saja setelah 48 jam (2 hari) proses fermentasi berlangsung. Fermentasi sebaiknya diakhiri setelah 5 hari dan tidak boleh lebih dari 7 hari (Wahyudi *et al.*, 2008).

Proses fermentasi pada biji kakao akan menyebabkan dua perubahan besar pada *pulp* yaitu aktivitas *yeast* akan mengubah gula *pulp* menjadi alkohol selama fermentasi anaerobik di awal fermentasi dan aktivitas bakteri asam asetat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat. Sel *pulp* akan terurai atau hancur bersamaan dengan peragian gula menjadi alkohol dan menyebabkan cairan yang dikandungnya akan mengalir keluar peti fermentasi secara lambat (Passos *et al.*, 1984).

Tabel 1. Komposisi Kimia *Pulp* Biji Kakao

| Komponen | Satuan (%) |
|------------------------------------|-----------------------|
| Air | 80 - 90 |
| Albuminoid, bahan-bahan yang pahit | 0,5 - 0,7 |
| Glukosa | 8 - 13 |
| Sukrosa | 0,4 - 1,0 |
| Pati | <i>trance element</i> |
| Asam tidak menguap | 0,2 - 0,4 |
| Besi oksida | 0,03 |
| Garam-garam | 0,4 - 0,45 |

Sumber : Nasution (1976)

1.3. Tujuan

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*.

