

4. PEMBAHASAN

Mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata angkatan 2010 yang terdiri dari Kartika, Nining Ayu Wulandari, Rendy Dhamawi, Stefanie Karsodihadjo, Yenny Permatasari, dan Yes'se melakukan penelitian tentang buah kakao. Penelitian yang dilakukan berbeda-beda, ada yang mengenai perubahan sifat fisik, kimia, dan mikrobiologi dari biji kakao selama proses fermentasi, pengujian aktivitas antibakteri pada kulit kakao, dan pengujian kualitas bubuk kakao. Jenis buah kakao yang digunakan adalah kakao lindak (*Forastero*) yang berasal dari Kulon Progo, Jogjakarta. Buah kakao ini disediakan oleh pihak HPS Jogjakarta. Penelitian ini diharapkan dapat membantu para petani yang ada di daerah Kulon Progo, Jogjakarta sehingga dapat meningkatkan kualitas biji kakao yang difermentasi dan dapat memproduksi sendiri bubuk kakao. Setelah penelitian selesai, maka kami akan membagikan pengetahuan yang kami peroleh kepada para petani mulai dari mempersentasikan hasil penelitian hingga mempraktekkan cara memproduksi bubuk kakao.

4.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao Fermentasi

Fermentasi yang dilakukan pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan fermentasi spontan. 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*.

Proses fermentasi kakao biasanya berlangsung selama lima hari dan selama proses fermentasi terjadi penurunan pH dimana semakin lama proses fermentasi, maka pH biji kakao akan semakin menurun. Penurunan pH ini disebabkan karena terbentuknya asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat. Citarasa biji kakao yang baik dihasilkan dengan pH biji yang tidak terlalu asam (>5,0). Menurut Towaha *et al.* (2012),

keasaman biji merupakan aspek yang sangat penting dalam menjaga citarasa coklat. Pembentukan citarasa yang baik pada biji kakao berkisar pada pH 5,0-5,5.

Mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi kakao adalah golongan *yeast*, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat. Aktivitas *yeast* akan mengubah gula *pulp* menjadi alkohol selama fermentasi anaerobik fakultatif di awal fermentasi (Passos *et al.*, 1984). Proses pengubahan gula *pulp* menjadi alkohol juga menyebabkan perubahan nilai Aw sehingga menjadi lebih tinggi. Nilai Aw yang tinggi akan mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat. Menurut Buckle *et al.* (1987), bakteri umumnya memerlukan media yang memiliki nilai Aw tinggi (0,91) sedangkan *yeast* membutuhkan nilai Aw yang lebih rendah (0,87-0,91). Selain itu, kandungan alkohol yang tinggi pada saat fermentasi akan menekan pertumbuhan *yeast* dan menyebabkan bakteri asam laktat mendominasi selama proses fermentasi (Kustyawati & Setyani, 2008).

Fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berlangsung selama 5 hari. Isolat bakteri asam laktat yang diperoleh pada akhir fermentasi, diisolasi pada media MRS agar yang mengandung 1% CaCO₃ dan 10 ppm NaN₃. Tujuan ditambahkan 1% CaCO₃ adalah untuk menyeleksi bakteri asam laktat yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni setelah diinkubasi selama 2-3 hari (Rahayu & Margino, 1997). Isolat yang membentuk zona bening kemudian dimurnikan pada media yang sama hingga membentuk koloni tunggal dan diidentifikasi lebih lanjut.

Berdasarkan hasil pemurnian, diperoleh 36 isolat bakteri asam laktat. Isolat-isolat tersebut menunjukkan karakter bakteri asam laktat (Tabel 2), antara lain memiliki katalase negatif, non-motil, memiliki bentuk *bacillus*, Gram positif, tidak membentuk spora, bersifat homofermentatif karena tidak memproduksi gas selama fermentasi. Menurut Battcock & Azam-Ali (1998), 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).

4.2. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat yang berjumlah 36 isolat, diidentifikasi lebih lanjut berdasarkan sifat morfologi, biokimia, dan fisiologi. Berdasarkan sifat morfologinya, seleksi bakteri asam laktat diuji berdasarkan pewarnaan Gram, pewarnaan spora, dan motilitasnya. Berdasarkan pewarnaan Gram, diperoleh hasil bahwa 36 isolat yang diisolasi merupakan bakteri Gram positif. Menurut Pelczar & Chan (1986), bakteri Gram positif dapat mempertahankan warna ungu disebabkan karena saat ditetesi alkohol 95%, dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori menciut, daya rembes dinding sel, dan membran menurun sehingga membuat zat pewarna kristal violet tidak dapat keluar dari sel. Pemberian pewarna safranin yang berwarna merah tidak akan berpengaruh karena tidak masuk ke dalam dinding sel sehingga akan tampak berwarna ungu ketika dilihat di bawah mikroskop (Gambar 7).

Pada pewarnaan spora, dilakukan pengamatan bentuk sel dan pembentukan spora. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa 36 isolat yang diwarnai memiliki bentuk batang dan tidak membentuk spora karena sel bakteri tidak berwarna hijau tetapi berwarna merah ketika dilihat di bawah mikroskop (Gambar 8). Menurut Rahayu & Margino (1997), bakteri asam laktat yang memiliki bentuk batang termasuk genus *Lactobacillus* dan *Carnobacterium* (*Lactobacillus* atipikal).

Bakteri asam laktat memiliki sifat non-motil sehingga isolat bakteri asam laktat hanya tumbuh pada daerah tusukan dan tidak menyebar pada media MRS *broth* yang telah ditambahkan agar 0,5% (Gambar 9). Motilitas merupakan kemampuan untuk bergerak. Motilitas dibagi menjadi 2 yaitu motil dan non-motil. Motil artinya bergerak atau dapat tumbuh menyebar. Hal ini dikarenakan sel bakteri memiliki flagela yang tumbuh dari dalam membran sel sedangkan non-motil artinya tidak bisa bergerak karena tidak memiliki flagela (Gaman & Sherrington, 1994).

Berdasarkan sifat biokimianya, isolat bakteri asam laktat diseleksi berdasarkan aktivitas katalase. Hasil pengujian menunjukkan bahwa 36 isolat yang diisolasi memiliki katalase negatif (Gambar 10). Menurut Suryani *et al.* (2010), bakteri asam laktat termasuk

bakteri katalase negatif, sehingga hasil reaksi uji katalase tidak terbentuk gelembung udara. Menurut Hendriksen *et al.* (2003), gelembung gas merupakan indikasi bahwa bakteri tersebut menunjukkan ciri katalase positif. Gelembung gas yang terbentuk merupakan O₂ yang dihasilkan dari pemecahan hidrogen peroksida oleh enzim katalase yang terdapat dalam isolat.

Pada pengujian kemampuan memproduksi gas, semua isolat bakteri asam laktat termasuk bakteri asam laktat homofermentatif karena tidak membentuk gas di dalam tabung Durham (Gambar 11). Bakteri asam laktat homofermentatif merupakan bakteri yang hanya menghasilkan asam laktat selama proses fermentasi dan tidak membentuk gas (Wee *et al.*, 2002). Rahayu & Margino (1997), juga mengatakan bahwa beberapa genus *Lactobacillus* termasuk dalam kelompok homofermentatif.

Berdasarkan sifat fisiologinya, kemampuan isolat untuk tumbuh diuji dengan memberikan pengaruh NaCl, pH, dan suhu (Tabel 3). Kemampuan isolat bakteri asam laktat untuk tumbuh pada NaCl (6,5% dan 18%), pH (4,4 dan 9,6), serta suhu (10°, 45°, dan 50°C) ditunjukkan secara kualitatif, dimana isolat yang mampu tumbuh akan menimbulkan kekeruhan pada media MRS broth (Gambar 12). Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan, dapat diketahui bahwa bakteri asam laktat tidak termasuk ke dalam kelompok *halotolerant* karena tidak dapat tumbuh pada kadar NaCl lebih dari 10% (Ray & Bhunia, 2007). Pada pengujian pH, sebagian besar bakteri asam laktat dapat tumbuh pada pH 4,4 dan tumbuh pada pH 9,6. Berdasarkan pengujian suhu, isolat bakteri asam laktat termasuk dalam bakteri *psychrofilic* dan *thermophilic*, karena sebagian besar isolat dapat tumbuh pada 10-50°C. Menurut Ray & Bhunia (2007), genus *Lactobacillus* dapat tumbuh pada kisaran suhu yang luas yaitu 10-50°C.

Pada seleksi dan karakterisasi yang telah dilakukan, diketahui bahwa dari 36 isolat bakteri asam laktat, hanya 7 isolat yang termasuk ke dalam genus *Lactobacillus* yang mengacu pada Rahayu & Margino (1997), yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* tidak bisa tumbuh pada pH 9,6 (Lampiran 5). Menurut Tanasupawat *et al.* (1992), *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus pentosus*, memiliki peranan dalam fermentasi daun teh, ikan, dan pickel serta memiliki ketahanan

terhadap pH yang tinggi (9,0-9,6), maka dapat disimpulkan 29 isolat bakteri yang lain (Tabel 3) diduga sebagai *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus pentosus*.

Menurut Sneath *et al.* (1984), berdasar Bergey`s *Manual of Systematic Bacteriology*, kelompok bakteri asam laktat berbentuk batang yang mempunyai katalase negatif dan hasil pengecatan Gram bersifat positif merupakan bakteri asam laktat genus *Lactobacillus*. Genus *Lactobacillus* memiliki ciri, yaitu Gram positif, tidak membentuk spora, berbentuk batang atau bulat batang (*coccobacilli*), katalase negatif, aerotoleran atau anaerob, kelompok homofermentatif atau heterofermentatif (Rahayu & Margino, 1997). *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 (Ray & Bhunia, 2007).

4.3. Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap 36 isolat yang diisolasi bakteri dari biji kakao yang sudah difermentasi. Hasil pengujian menunjukkan adanya senyawa antimikroba yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar daerah sumuran (*well assay*). Menurut Çadirci & Çitak (2005), kelebihan metode difusi sumur adalah seluruh metabolit yang dihasilkan bakteri asam laktat dapat diproduksi selama pengujian antimikroba. Kultur bakteri asam laktat yang membentuk zona bening menunjukkan ketahanan terhadap bakteri patogen yang diujikan, sedangkan supernatan netral yang memberikan zona bening merupakan supernatan bakteri asam laktat penghasil antimikroba. Menurut Sari *et al.* (2013), terbentuknya zona bening karena adanya penghambatan senyawa antimikroba terhadap sel-sel mikroba. Mekanisme kerja dari suatu senyawa antimikroba adalah dengan mengganggu atau merusak senyawa penyusun dinding sel, bereaksi dengan membran sel yang menyebabkan peningkatan permeabilitas seluler, inaktivasi enzim-enzim esensial, dan desktruksi atau inaktivasi fungsi dari materi genetik.

Bakteri patogen yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini merupakan bakteri yang

menyebabkan penyakit diare dan biasanya penularannya melalui makanan (*food borne disease*). Secara umum, semua isolat bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap 2 jenis bakteri patogen hanya daya hambatnya bervariasi yang ditunjukkan dengan besar kecilnya zona bening yang terbentuk. Isolat *Lactobacillus* nomor 35 dan 47 masing-masing memiliki penghambatan paling besar terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, yang ditunjukkan dengan zona hambat masing-masing sebesar 1,6 cm dan 2,6 cm. Aktivitas antimikroba yang ditunjukkan oleh bakteri asam laktat disebabkan karena kemampuan bakteri asam laktat menghasilkan asam-asam organik, hidrogen peroksida, dan bakteriosin yang merupakan zat antimikroba. Bakteri asam laktat sangat cepat dalam memproduksi asam laktat sehingga dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme bakteri patogen (Yudianto & Kusnadi, 2011).

Pada pengujian aktivitas antibakteri ini, bakteri asam laktat memiliki kemampuan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus* daripada *Escherichia coli* (Gambar 13). Bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam kelompok bakteri Gram negatif sedangkan bakteri *Staphylococcus aureus* termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Widiasih (2008), dilaporkan bahwa bakteri asam laktat yang diisolasinya memiliki aktivitas antimikroba yang lebih tinggi terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan *Escherichia coli*. Pelezar & Chan (1986), menyatakan bahwa bakteri Gram positif cenderung lebih sensitif terhadap komponen antibakteri. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel dan menemukan sasarannya, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dan berlapis tiga, yaitu lapisan luar (lipoprotein), lapisan tengah (lipopolisakarida), dan lapisan dalam (peptidoglikan).