

KARAKTERISTIK BAKTERI ASAM LAKTAT (*Lactobacillus sp*) BIJI KAKAO (*Theobroma cacao L*) YANG TELAH DIFERMENTASI

¹⁾ **Andi Fatmawati**

¹⁾ *Akademi Analis Kesehatan Muhammadiyah Makassar*
Alamat Korespondensi: fatmawati.moe@gmail.com

Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang Isolasi Dan Identifikasi bakteri asam laktat (*Lactobacillus sp*) Dari Biji Kakao (*Theobroma cacao L*) Yang Telah Difermentasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat *Lactobacillus sp* dari biji kakao yang telah difermentasi. Metode penelitian meliputi sampel biji kakao yang di encerkan dengan pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-5} dengan menggunakan medium MRS Broth, lalu di inkubasikan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 1 x 24 jam, kemudian di ambil 1 ml dari masing-masing pengenceran dan dilakukan penanaman pada medium MRS Agar (*De Man Rogosa and Sharpe Agar*) dan di inkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 2 x 24 jam. Dari hasil penelitian, sampel 10^{-1} di dapatkan koloni bakteri yang memiliki bentuk koloni yaitu bundar, bentuk tepian yang licin, bentuk elevasinya timbul dan memiliki warna koloni bakteri yaitu krem. Pada pengecatan gram, sampel 10^{-1} bersifat gram positif yang memiliki bentuk sel batang dengan warna keunguan.

Kata Kunci: Fermentasi Biji Kakao, *Lactobacillus sp*.

PENDAHULUAN

Tanaman kakao yang memiliki nama latin *Theobroma cacao* merupakan tumbuhan tahunan (perennial) berbentuk pohon. Tanaman kakao termasuk tanaman tahunan yang tergolong dalam kelompok tanaman caulifloris, yaitu tanaman yang dapat berbunga dan berbuah pada batang dan cabang. Tanaman ini pada garis besarnya dapat dibagi atas dua bagian, yaitu bagian vegetatif yang meliputi akar, batang serta daun dan bagian generatif yang meliputi bunga dan buah. Tanaman ini merupakan tanaman perkebunan untuk rakyat karena sepanjang tahun dapat berbunga dan berbuah (Kristanto. A, 2008).

Sekitar 28,26% produksi kakao nasional dihasilkan dari Sulawesi Selatan. Produksi kakao di Sulawesi Selatan memberikan sumbangsih yang cukup besar pada produksi kakao nasional, sebab lahan Sulawesi Selatan yang mendukung untuk pertumbuhan tanaman kakao ini. Namun produksi kakao yang besar di Sulawesi Selatan, tidak diimbangi dengan mutu kakao yang baik pula. (Deperinda, 2007).

Fermentasi merupakan proses produksi suatu produk dengan mikroba

sebagai organisme pemroses. Fermentasi biji kakao merupakan fermentasi tradisional yang melibatkan mikroorganisme indigen dan aktivitas enzim endogen. Fermentasi biji kakao tidak memerlukan penambahan kultur starter (biang), karena *pulp*/daging kakao yang mengandung banyak glukosa, fruktosa, sukrosa dan asam sitrat sudah dapat mengundang terbentuknya pertumbuhan mikroorganisme sehingga terjadi fermentasi. (Bahri, 2002).

Selama fermentasi, di dalam biji kakao akan terjadi penguraian senyawa polifenol, protein dan gula oleh adanya enzim yang akan menghasilkan senyawa calon aroma, perbaikan cita rasa dan perubahan warna. (Widyotomo, dkk, 2001).

Bakteri asam laktat (BAL) digunakan untuk fermentasi yang menghasilkan berbagai produk pangan yang bertujuan selain mengawetkan, juga mempunyai efek terapeutik. Bakteri asam laktat (BAL) sering digunakan sebagai kultur probiotik dalam produk-produk fermentasi susu atau produk olahannya, fermentasi daging dan fermentasi buah seperti kakao atau sayuran. Beberapa genera bakteri dan yeast diusulkan sebagai

probiotik namun kebanyakan hanya *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* yang sejauh ini diterima untuk makanan manusia. Oleh karena itu, upaya seleksi dimulai dengan menskrining kedua bakteri ini dari sumber probiotik dan seleksi terhadap isolat untuk mendapatkan isolat paling sesuai dengan lingkungan dalam usus. Isolat bakteri asam laktat ternyata dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*, melalui pengaruh pH untuk menekan bakteri *Salmonella typhi* secara invitro (Soeharsono 2010).

Penelitian oleh Hermina (tahun 2007), dari 198 koloni bakteri asam laktat (probiotik) dari kakao yang difermentasi, lima bakteri yang daya tanggangnya cukup kuat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (bakteri jahat). Lima bakteri probiotik tersebut dikaji dan diidentifikasi karakternya. Bakteri itu diuji dengan bakteri-bakteri patogen seperti bakteri coli (penyebab diare), bakteri kolera, typhus, dan lain-lain. Dari Lima bakteri tersebut ternyata satu bakteri daya tanggangnya cukup kuat menghambat bakteri patogen. Satu bakteri itu adalah bakteri *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. (Urnemi.E, 2013).

Berdasarkan uraian di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah buah kakao yang telah difermentasi, mengandung bakteri asam laktat *Lactobacillus sp.* Sedangkan tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat *Lactobacillus sp* dari biji kakao yang telah difermentasi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan autoklaf, botol steril, cawan petri, deck glass, gelas kimia, gelas ukur, inkubator, mikroskop, jarum ose, kantong plastik, kapas, mikroskop, oven, objek glass, pipet tetes, tabung reaksi.

Bahan yang digunakan air suling, alkohol 96%, biji kakao yang telah difermentasi, kristal violet, larutan lugol,

medium MRSB (de Man, Ragosa, Sharpe Broth) merk A5810, medium MRSA (de Man, Ragosa, Sharpe Agar) merk 7543, oil imersi, safranin.

Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kakao yang di ambil dari perkebunan Bantaeng.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi Alat

Beberapa alat yang digunakan harus melalui tahap sterilisasi yang bertujuan untuk mematikan semua bentuk kehidupan mikroorganisme yang ada pada alat. Alat lebih dahulu dicuci dengan deterjen lalu dibilas dengan air suling. Alat-alat berupa gelas disterilisasi dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam.

Pembuatan Medium MRSA (de Man, Ragosa, Sharpe Agar) 200 ml

Ditimbang media MRS agar sebanyak 13 gram, lalu ditambahkan aquadest sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga larut, kemudian di sterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Perlakuan Sampel

Fermentasi Biji Kakao

Buah kakao dipilih yang tua dengan ciri-ciri berwarna kuning, lalu dipecahkan (dibelah) menggunakan batang kayu untuk memisahkan antara kulit dan biji. Biji yang masih terbungkus pulp (daging buah) ini kemudian difermentasi dengan cara di bungkus dalam kantong plastik yang telah dilubangi selama seminggu, kemudian biji akan terlepas dari pulpnya, setelah itu keringkan di bawah sinar matahari, lalu di haluskan dengan menggunakan blender atau lumpang.

Pembuatan Larutan Sampel

Biji kakao yang telah di hancurkan tadi, di timbang sebanyak 1 gram, lalu di masukkan ke dalam gelas kimia, kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 10 ml, kemudian di homogenkan.

Penanaman pada Media MRS Broth

Di siapkan lima tabung reaksi yang telah berisi 9 ml medium MRS broth lalu pada tabung pertama dimasukkan 1 ml sampel biji kakao (10^{-1}), lalu dari tabung pertama, dipipet 1 ml ke tabung kedua (10^{-2}), dari tabung kedua dipipet lagi 1 ml ke tabung yang ketiga (10^{-3}), sampai tabung ke lima (10^{-5}) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Penanaman pada Media MRS Agar

Di siapkan lima cawan petri diberi etiket dan label masing-masing 10^{-1} sampai 10^{-5} , lalu dimasukkan 9 ml medium MRS Agar, dari medium MRS broth dipipet masing-masing 1 ml dan di tanam pada medium MRS Agar dengan metode tuang (pour plate) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Pengamatan Morfologi Koloni

Setelah di inkubasi selama 48 jam, dilakukan pengamatan morfologi terhadap koloni yang tumbuh. Pengamatan ini meliputi bentuk, tepian, elevasi dan warna koloni bakteri. sedangkan pengamatan morfologi sel meliputi uji pewarnaan Gram, dan bentuk sel.

Pengamatan Morfologi sel

Disiapkan reagen larutan kristal violet (ungu), larutan lugol-mordan, larutan alkohol-larutan pemucat (tidak berwarna), larutan safranin (merah).

Tabel 1. Hasil Pengamatan Morfologi Bakteri pada Sampel Biji Kakao

Pengenceran	Bentuk koloni	Tepian	Elevasi	Warna koloni	Pewarnaan gram	Bentuk sel	Jenis bakteri
10^{-1}	Bundar	Licin	Timbul	krem	Positif	batang warna keunguan	<i>Lactobacillus sp</i>
10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-

Pada penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan sampel biji kakao yang telah di encerkan dengan menggunakan medium MRS Broth dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} dan kemudian di inkubasi pada suhu 37°C

Dilakukan pengecata Gram. Kaca objek dibersihkan dengan menggunakan alkohol 96%, untuk membebaskan lemakkan. Diambil 1 ose NaCl 0,9% sehingga merata. Preparat kemudian di biarkan mengering. Fiksasi di atas api spiritus. Preparat yang telah difiksasi dan telah dingin dicat dengan larutan kristal violet, di biarkan selama 1 menit (cat A). Dicuci dengan air mengalir kemudian dikering-anginkan. Diberikan larutan lugol, biarkan selama 1 menit (cat B). sediaan dicuci dengan Alkohol asam (Cat C), kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dikering-anginkan. Dicat dengan larutan safranin, biarkan selama 15 detik (Cat D).dicuci dengan air mengalir, kemudian dikering-anginkan. Diberikan 1 tetes oil imersi, lalu diamati bentuk selnya secara mikroskopik menggunakan lensa objektif 100x pada kaca preparat sehingga dapat diketahui bentuknya (kokus, batang atau spiral). Bakteri gram positif ditandai dengan warna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mengikat warna kristal violet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan koloni bakteri sampel biji kakao yang ditanamkan media MRS Agar, di dapatkan morfologi bentuk koloni sebagai berikut :

selama 1 x 24 jam, dengan tujuan supaya bakteri dapat tumbuh baik dalam suatu media. Setelah dilakukan penanaman pada media MRS Broth di ambil masing-masing 1 ml dari media MRS Broth kemudian di tanam menggunakan media MRS Agar,

kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam lalu dari koloni yang timbul di ambil 1 ose dilakukan pengecatan dan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 60x.

Dari hasil penelitian di dapatkan koloni bakteri pada pengenceran 10^{-1} . Sedangkan pada pengenceran 10^{-2} 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} tidak di temukan koloni karena semakin tinggi pengencerannya, semakin sedikit jumlah sampel yang ada sehingga tidak ditemukan koloninya. Morfologi koloni yang diamati pada isolat bakteri meliputi bentuk, tepian, elevasi dan warna koloni. Keseluruhan morfologi koloni dari bakteri *Lactobacillus* memiliki bentuk koloni bundar, tepian yang licin elevasinya timbul dan memiliki warna koloni bakteri yaitu krem. Bentuk koloni dari suatu bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu. Variasi bentuk bakteri yang terjadi juga dipengaruhi oleh lingkungan (faktor biotik dan abiotik). Faktor makanan (medium tumbuh) dan suhu (minimum, optimum dan maksimum) (Ilyas, 2001).

Warna koloni yang tampak menunjukkan adanya pigmen. bahwa pigmen yang terdapat pada bakteri diantaranya adalah pigmen karotenoid, antosianin, melanin, Tripirilmethene dan Phenazin. (Savitri, 2006).

Pada pengecatan gram, dari pengenceran 10^{-1} didapatkan sel yang berbentuk batang dengan warna keunguan, hal ini mengindikasikan bahwa bakteri tersebut termasuk gram positif. Bakteri gram positif terlihat berwarna ungu karena asam-asam ribonukleat pada sitoplasma sel-sel gram positif membentuk ikatan yang lebih kuat dengan kompleks ungu kristal violet, sehingga ikatan kimiawi tersebut tidak mudah dipecahkan oleh pemucat warna (Hadioetomo, 1993). Reaksi tersebut didasarkan atas perbedaan komposisi kimiawi dinding sel. Sel gram positif mempunyai dinding dengan lapisan peptidoglikan yang tebal (Sunatmo, 2007).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa pada biji kakao yang telah difermentasi, ditemukan adanya bakteri *Lactobacillus sp*, pada pengenceran 10^{-1} , memiliki bentuk koloni bundar, tepian yang licin, bentuk elevasinya timbul dan memiliki warna koloni bakteri yaitu krem. Bentuk sel bakteri yang didapatkan dari hasil pengecatan gram 10^{-1} adalah berbentuk batang warna keunguan, termasuk bakteri gram positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraeni, P , 2001. *Probiotik untuk Kesehatan Optimum* (ejournal.unri.ac.id). Diakses 19 April.
- Bahri, Syamsul., 2002. *Bercocok Tanaman Perkebunan Tahunan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Buckle, K., A., Edwards, Fleet, Wootton. 1985. *Ilmu Pangan*. Universitas Indonesia Jakarta hal 94, 95, 273, 274, 275, dan 276.
- Departemen perindustrian, 2007. *Kakao*. Penerbit Pusat Data dan Informasi. Jakarta
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Holtj,G.,Kreign.R, moreSneath.p.H.A. 1994. *Bergeys Manual Determinative Bacteriology*, baltimore. William dan wilkins baltimore
- Ilyas, S. 2001. *Mikrobiologi Dasar Diklat Kompilasi* 28. Universitas Sumatera Utara Press, Medan
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi Menguk Dunia Mikrobiologi*. Bandung,hal 61 dan 62
- Kristanto A. S. P, 2008. *Panduan Budidaya Kakao*. Penerbit Pustaka Baru Press, Yogyakarta. Hal 110.
- Pelczar. M.J., dan Chan, E. S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*.

- Universitas Indonesia Press.
Jakarta.
- Purwanti, S., 2008. *Bakteri Laktat, Pengawet Sayuran Penghambat Kolesterol*.
<http://suamerdeka.com/v1/index.php/read/cetak/2008/03/13/46>
Bakteri.Laktat..Pengawet.Sayuran.Penghambat.Kolesterol
(diakses pada 9 April 2012)
- Savitri, S. D. N. 2006. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Halotoleran Pada Ikan Kembung (*Rastrelliger sp.*)*.
Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Susanto, F.X., 2001. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil*.
Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Tjahjadi P, 2007. *Fisiologi Mikroba*.
Penerbit Bumi Aksara, Jakarta.
Hal 194-205
- Wahyudi, T, Pangabean dan Pujiyanto. 2008. *Panduan Lengkap Kakao*.
Penerbit swadaya. Jakarta.
- Waluyo, Lud, Drs.M.Kes, 2004. *Mikrobiologi Umum*. Universitas Muhammadiyah. Press: Malang