

Deteksi Keberadaan Bakteri Asam pada Proses Pengolahan Kakao**Detection of Acid Bacteria in the Process of Cocoa Production****Indah Rakhmawati Afrida**

Dosen Program Studi Pendidikan Biologi FPIEK IKIP Budi Utomo Malang

Corresponding author: rakhma_afrida@yahoo.com

Abstract: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi inokulum *Aspergillus niger* dan lama hidrolisis terhadap kadar bioetanol bagasse. Proses produksi bioetanol salah satunya adalah hidrolisis menggunakan kapang *Aspergillus nig*. Proses fermentasi merupakan tahap awal proses pengolahan kakao yang sangat berpengaruh terhadap hasil akhir. Proses fermentasi di PTPN XII Kebun Mumbul Jember berlangsung secara spontan. Proses ini melibatkan peranan mikroorganisme seperti khamir dan bakteri asam (bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan bakteri asam dan menguji kemampuan tumbuhnya pada medium ekstrak pulp. Penelitian ini dilakukan dengan beberapa metode, meliputi: isolasi bakteri asam, karakterisasi morfologis, sifat biokimiawi secara parsial dan pengamatan pola pertumbuhan isolat bakteri asam pada medium ekstrak pulp. Hasil isolasi bakteri asam dari sampel biji kakao di PTPN XII Kebun Mumbul Jember menunjukkan pola pertumbuhan dengan kurva yang normal. Fase adaptasi terjadi pada inkubasi 0 jam sampai 4 jam sebesar $1,86 \times 10^8$ cfu/g dan $2,19 \times 10^8$ cfu/g; fase eksponensial terjadi pada inkubasi 8 jam sebesar $6,13 \times 10^8$ cfu/g. Pola pertumbuhan optimum terjadi pada inkubasi 12 jam yaitu sebesar $7,50 \times 10^8$ cfu/g; untuk fase stasionernya terjadi pada inkubasi 8-12 jam, sedangkan fase lag (fase kematian) terjadi pada inkubasi 16 jam sebesar $3,20 \times 10^8$ cfu/g dan inkubasi 20 jam sebesar $2,65 \times 10^8$ cfu/g. Selama pertumbuhan, isolat bakteri asam mampu memproduksi asam-asam organik (asam laktat dan asam asetat) yang menyebabkan pH dalam medium ekstrak pulp menurun.

Keywords: isolasi, bakteri asam, pola pertumbuhan, medium ekstrak pulp

1. PENDAHULUAN

Tanaman kakao termasuk salah satu tanaman dari genus *Theobroma* yang berasal dari hulu sungai Amazon dan daerah-daerah tropika lain di Amerika Selatan serta Amerika Tengah. Genus ini terdiri lebih dari 22 spesies, tetapi hanya *Theobroma cacao* saja yang dibudidayakan secara intensif (Wood dan Lass, 1985: 1).

Tanaman kakao telah dikenal di Indonesia sejak tahun 1560, tetapi baru menjadi komoditi yang penting sejak tahun 1951. Indonesia memiliki peluang yang besar untuk perkembangan kakao sebab persediaan hutan cukup luas, tenaga kerja banyak dan murah. Di samping itu, pangsa pasar kakao Indonesia masih relatif kecil kurang lebih 4,6% pada tahun 1990, sehingga masih berpeluang untuk ditingkatkan. Di masa depan Indonesia diharapkan dapat menjadi produsen kakao ketiga terbesar atau bahkan kedua di dunia (Susanto, 1994: 14).

Produksi kakao Indonesia dihasilkan dari perkebunan besar negara dan swasta yang terdapat di daerah Sumatera Utara dan Jawa Timur, selain itu juga produksi yang berasal dari perkebunan rakyat yang tersebar di daerah-daerah Maluku, Sulawesi Selatan, Kalimantan Timur dan Papua. Meningkatnya usaha di bidang pembudidayaan kakao ini telah dapat

meningkatkan hasil devisa bagi negara melalui ekspor dan mendorong ekonomi daerah terutama daerah pedesaan (Heddy, 1990: 98-100). Dewasa ini perkembangan produksi cokelat yang dikelola oleh perkebunan rakyat memperlihatkan adanya peningkatan rata-rata sebesar 33,28%. Peningkatan produksi terjadi karena adanya program intensifikasi, ekstensifikasi, dan rehabilitasi. Intensifikasi yang dilaksanakan adalah berupa pemupukan, pengendalian hama dan penyakit, serta pengendalian tumbuhan pengganggu (gulma) (Siregar, dkk., 1998: 8-9).

Kualitas biji kakao yang baik untuk diperdagangkan harus memenuhi kriteria-kriteria seperti kulit bijinya tidak keriput dan utuh, tidak berjamur dan berwarna coklat kemerahan, keping biji renyah dan lembaga biji tidak tumbuh, persentase biji ungu dibawah 25%, tidak berbau asap (*smoky*), tidak terdapat serangga hidup atau mati serta kadar airnya maksimal 7,5% (Anonim, 2000: 3-4).

Pada umumnya pengelolaan kakao dilakukan dengan proses fermentasi yang berlangsung secara spontan, begitu juga halnya yang terjadi di PTPN XII Kebun Mumbul Jember. Beberapa mikroorganisme terdapat dalam proses fermentasi, salah satunya adalah bakteri asam. Bakteri asam diduga mempunyai



peranan yang berbeda dan mempengaruhi kualitas hasil akhir fermentasi (Nasution, dkk., 1975: 30).

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri asam pada proses fermentasi serta mengamati pola pertumbuhannya pada medium ekstrak pulp. Kajian dari penelitian ini hanya sebatas menganalisis ada tidaknya bakteri asam pada proses fermentasi tanpa melakukan identifikasi apakah merupakan bakteri asam laktat ataukah bakteri asam asetat dan mengamati pola pertumbuhannya pada medium ekstrak pulp serta mempelajari peranannya dalam mempengaruhi kualitas kakao.

2. METODOLOGI

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua tempat yaitu di pabrik PTP Nusantara XII Kebun Mumbul Jember Jawa Timur untuk pengambilan sampel dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember untuk isolasi dan pengujian isolat.

Pengambilan sampel dilakukan selama 4 (empat) hari dimulai dari tanggal 24-28 Agustus 2015, sedangkan isolasi dan pengujian isolat dilakukan selama 18 hari terhitung mulai tanggal 24 Agustus sampai dengan 11 September 2015.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah labu Erlenmeyer, rak dan tabung reaksi, cawan Petri, tabung mikro, pipet volume, mikropipet, pipet tetes, *autoklaf*, *vortex*, *laminar air flow*, timbangan analitik, jarum ose, inkubator, blender, mikroskop, pH-meter, dan *colony counter*.

Bahan yang digunakan adalah biji kakao segar, biji kakao dari masing-masing bak fermentasi, larutan garam fisiologis 0,085% steril, medium *Glucose-Yeast Extract Peptone* (GYP) cair, medium GYP Agar dengan CaCO_3 1%, akuades steril, larutan ungu kristal (cat A), larutan yodium (cat B), alkohol asam (cat C), dan larutan safranin (cat D).

Prosedur Kerja

Sebelum melakukan tahap isolasi bakteri asam, masing-masing bak fermentasi telah diukur suhunya, suhu dari bak ini untuk pengujian selanjutnya.

Isolasi Bakteri Asam

Secara aseptis, sampel (pulp dan biji) dari empat bak fermentasi ditimbang sebanyak 20 gram kemudian diencerkan dengan larutan garam fisiologis 0,085% steril sebanyak 180 ml dalam labu Erlenmeyer dan divortex sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Hasil pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan garam fisiologis kemudian divortex dan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Hasil pengenceran 10^{-2} diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi

berisi 9 ml larutan garam fisiologis steril kemudian divortex dan diperoleh pengenceran 10^{-3} . Pengenceran 10^{-4} dibuat menggunakan tabung mikro dengan cara yang sama yaitu hasil pengenceran 10^{-3} diambil 100 μl dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi 900 μl larutan garam fisiologis, demikian seterusnya sampai diperoleh pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} .

Setelah itu, dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} masing-masing diambil 20 μl dengan menggunakan mikropipet dan dituangkan ke dalam cawan Petri yang berisi GYP Agar + CaCO_3 . Jumlah suspensi sampel yang diinokulasikan dalam medium GYP Agar + CaCO_3 dilakukan duplo. Cawan Petri yang berisi GYP Agar + CaCO_3 dan sampel diinkubasi dalam posisi terbalik sesuai dengan suhu bak fermentasi I yaitu 30°C , sedangkan bak fermentasi II, III, dan IV suhunya 37°C .

Setelah diinkubasi, koloni bakteri yang membentuk zona bening dipindahkan ke medium GYP Agar + CaCO_3 tegak 3 ml sehingga diperoleh isolat murni. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C , isolat murni tersebut dipindahkan lagi pada medium GYP cair 10 ml (tanpa CaCO_3) sebanyak 1 ose kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C untuk peremajaan dan pembuatan inokulum pada pengujian selanjutnya.

Pewarnaan Gram

Menurut Cullimore (2000: 256) mengatakan bahwa bakteri asam, baik asam laktat maupun asam asetat merupakan bakteri Gram positif, sehingga untuk menentukan apakah isolat yang diuji telah diperoleh maka dilakukan uji pewarnaan Gram.

Uji pewarnaan Gram dilakukan mula-mula dengan membersihkan gelas benda dengan alkohol 70% kemudian di atasnya diletakkan 1 ose biakan murni dari GYP Agar + CaCO_3 yang berumur 24 jam dan dilakukan fiksasi. Hasil fiksasi tersebut ditetesi dengan cat A (larutan ungu kristal) selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Setelah dibilas dengan air mengalir, dilanjutkan dengan meneteskan larutan yodium (cat B) selama 1 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Setelah itu, biakan tersebut ditetesi dengan alkohol asam (cat C), dibiarkan selama 0,5 menit kemudian dibilas dengan air mengalir. Untuk yang terakhir kalinya meneteskan biakan dengan larutan safranin (cat D) selama 2 menit dan dibilas dengan air mengalir. Setelah itu diamati di bawah mikroskop baik warna maupun bentuk morfologi selnya.

Isolat bakteri asam menunjukkan warna ungu setelah dilakukan pewarnaan Gram, selanjutnya dilakukan pengamatan pola pertumbuhannya pada medium ekstrak pulp.

Pengamatan Pola Pertumbuhan Bakteri Asam pada Medium Ekstrak Pulp

Isolat murni yang telah ditumbuhkan pada medium GYP cair kemudian digunakan sebagai inokulum diuji dalam medium ekstrak pulp dengan pengenceran 50%. Medium ekstrak pulp tersebut dibuat dengan



menambahkan 50 g pulp segar dalam 100 ml aquades kemudian diblender dan disaring sehingga mendapatkan 100 ml volume ekstrak pulp. Pada medium ekstrak pulp ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan lama inkubasi berinterval 4 jam yaitu 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam dan 20 jam.

Setiap masa inkubasi, ada dua perlakuan yaitu perhitungan jumlah sel bakteri dengan metode *Total Plate Count* (TPC) dan pengukuran pH.

Perhitungan jumlah sel bakteri

Mengambil 1 ml medium ekstrak pulp dengan mikropipet kemudian melakukan pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-6} dalam tabung mikro. Kemudian dari pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} menumbuhkannya pada cawan Petri yang berisi GYP Agar + CaCO_3 yang dilakukan secara duplo, lalu menginkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah itu jumlah koloni bakteri yang tumbuh dan membentuk zona bening dihitung untuk tiap-tiap pengenceran tersebut dengan menggunakan *colony counter*.

Pengukuran pH

Mengambil 3 ml medium ekstrak pulp dengan menggunakan mikropipet dan memasukkannya ke dalam labu Erlenmeyer 50 ml, kemudian mengukur pH-nya. Pengukuran pH tersebut dengan cara memasukkan ujung katoda dari pH-meter ke dalam Erlenmeyer yang selanjutnya pada layar akan tampak angka yang menunjukkan pH dari sampel yang diukur.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

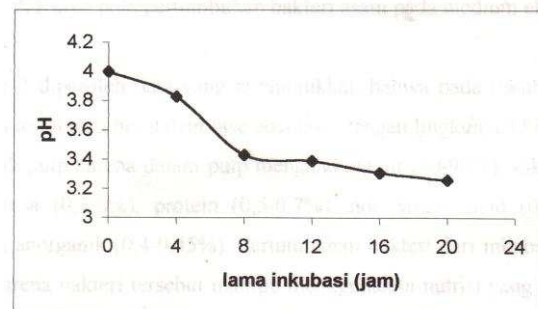
Proses fermentasi merupakan tahap awal proses pengolahan kakao yang sangat berpengaruh terhadap hasil akhir. Proses yang terjadi adalah reaksi biokimiawi, sehingga diperlukan suatu kondisi yang sesuai agar prosesnya berjalan dengan baik. Pada proses fermentasi terjadi pembentukan cita rasa coklat, pengurangan rasa pahit, rasa sepat, dan perbaikan kenampakan fisik biji kakao. Keberhasilan fermentasi biji kakao dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain lama fermentasi, jumlah biji, pembalikan dan aerasi, kematangan buah dan cuaca (Yusianto, 1994: 24).

Dalam proses fermentasi, mikroorganisme berperan aktif terutama selama proses pemecahan gula menjadi alkohol dan perubahan alkohol menjadi asam asetat. Hasil sampel yang diambil berasal dari empat bak fermentasi dengan lama fermentasi dan suhu yang berbeda. Pada bak I lama fermentasinya 12 jam dengan suhu 30°C, sedangkan bak II, III, dan IV lama fermentasinya sama yaitu 24 jam dengan suhu berturut-turut 37°C, 46°C, dan 51°C. Sampel tersebut dilakukan seri pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-6} kemudian ditumbuhkan dalam medium cawan Agar GYP + CaCO_3 hanya untuk seri pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} saja dengan suhu yang berbeda (untuk bak I suhunya 30°C sedangkan untuk bak II, III, dan IV suhunya 37°C). Ternyata setelah diinkubasi selama

24-48 jam bakteri dari sampel bak II lebih cepat tumbuh yang ditandai dengan terbentuknya zona bening karena bakteri tersebut mampu menggunakan glukosa sebagai sumber karbon utama.

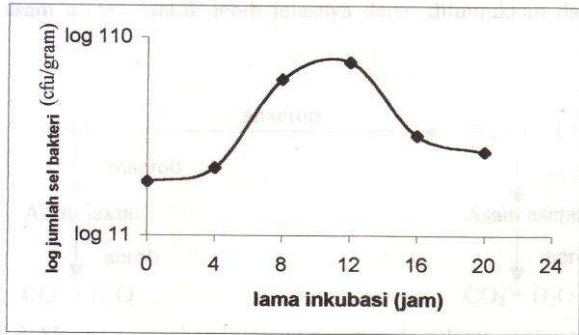
Menurut Holt *et.al* (1994: 204) bakteri asam mempunyai kisaran suhu optimum antara 28-40°C dimana bakteri asam bisa tumbuh dengan baik. Untuk bakteri asam laktat suhu optimumnya antara 30-40°C sedangkan bakteri asam asetat suhu optimumnya antara 28-30°C. Kemudian koloni yang membentuk zona bening tersebut ditumbuhkan lagi pada medium Agar tegak GYP + CaCO_3 sebagai isolat murni yang sebelumnya telah diuji dengan pewarnaan Gram pada saat biakan berumur 24 jam. Dari uji pewarnaan Gram diperoleh hasil bahwa biakan itu merupakan bakteri Gram positif yang ditandai dengan warna ungu dan selnya berbentuk batang.

Biakan murni tersebut ditumbuhkan pada medium cair GYP tanpa CaCO_3 dengan waktu inkubasi 18 jam, kemudian ditumbuhkan kembali dalam medium ekstrak pulp pengenceran 50% yang lama inkubasinya dengan interval 4 jam dimulai pada jam ke-0 sampai jam ke-20. Pada perlakuan ini ada dua hal yang dilakukan yaitu pengukuran pH dan menghitung jumlah bakteri asam dengan metode TPC. Hasil pengukuran pH diperoleh data seperti ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hubungan antara lama inkubasi dengan pH pertumbuhan isolat bakteri asam pada medium ekstrak pulp

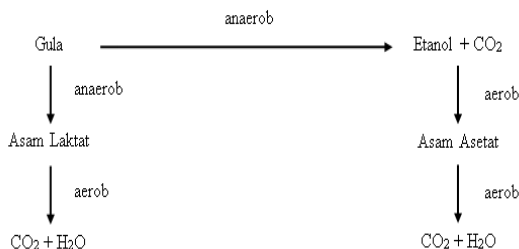
Dari gambar di atas dapat diketahui bahwa semakin lama waktu inkubasinya maka pH semakin turun (bersifat asam). Menurut Nasution dkk (1975: 79), penurunan pH pulp terjadi karena adanya aktivitas bakteri asam yang mampu mengubah gula menjadi asam laktat (untuk bakteri asam laktat) dan mengubah alkohol (etanol) menjadi asam asetat (untuk bakteri asam asetat). Untuk mengetahui jumlah sel bakteri asam yang tumbuh pada medium ekstrak pulp diperoleh data seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Pola Pertumbuhan Bakteri Asam pada Medium Ekstrak Pulp

Pada Gambar 2 diperoleh data yang menunjukkan bahwa pada inkubasi 0 jam dan 4 jam bakteri asam tersebut dalam fase adaptasi dengan lingkungan hidupnya, dalam hal ini ekstrak pulp karena dalam pulp mengandung air (80-90%), sukrosa (0,4-1%), glukosa-fruktosa (0,7-8%), protein (0,5-0,7%), non volatil acid (0,2-0,4%), serta garam-garam anorganik (0,4-0,45%). Pertumbuhan bakteri dari inkubasi 8 jam terus meningkat karena bakteri tersebut mampu menggunakan nutrisi yang tersedia dalam medium untuk menunjang aktivitasnya dimana jumlah selnya mencapai $6,13 \times 10^8$ cfu/g. Pertumbuhan ini akan terus berlangsung hingga mencapai pertumbuhan optimal pada inkubasi 12 jam yaitu sebesar $7,5 \times 10^8$ cfu/g, hal ini disebabkan nutrisi yang tersedia dalam medium masih banyak sehingga aktivitas bakteri asam terus meningkat. Pada kurva pertumbuhan tersebut, untuk fase stasionernya berada pada interval waktu inkubasi 8 sampai 12 jam. Pada inkubasi jam ke-16 dan ke-20 jumlah sel bakteri beranjak menurun seiring dengan semakin menipisnya persediaan nutrisi yang mendukung bakteri asam dengan jumlah bakteri masing-masing sebesar $3,2 \times 10^8$ cfu/g dan $2,65 \times 10^8$ cfu/g yang pada akhirnya akan menuju ke fase kematian karena kehabisan nutrisi.

Berdasarkan data hasil pengamatan dapat dijelaskan bahwa proses fermentasi tidak bisa lepas dari peran serta bakteri asam, terutama bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Untuk lebih jelasnya dapat ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema Perubahan Kimiawi dalam Pulp selama Proses Fermentasi

Pada Gambar 3 dapat diketahui bahwa bakteri asam laktat mengubah gula menjadi asam laktat dalam keadaan anaerob, sedangkan bakteri asam asetat

mengubah etanol (alkohol) menjadi asam asetat dalam keadaan aerob karena proses perombakannya membutuhkan oksigen (O₂). Bakteri asam asetat aktivitasnya dipengaruhi oleh keberadaan oksigen melalui aerasi atau pembalikan tumpukan biji kakao selama fermentasi. Hal ini disebabkan jumlah atau populasi bakteri asam asetat mempengaruhi produksi asam asetat yang selanjutnya berpengaruh pada proses-proses di dalam biji kakao selama fermentasi (Anonim, 1991). Dengan pertimbangan itu, PTP Nusantara XII Kebun Mumbul menggunakan bak fermentasi terbuat dari kayu yang banyak lubang kecilnya berfungsi untuk mempermudah aerasi supaya air yang terkandung dalam biji kakao bisa keluar dari bak sehingga fermentasinya bisa maksimal. Pembentukan asam asetat menurut Nasution dkk (1975) merupakan faktor yang sangat penting karena berpengaruh pada pembentukan aroma cokelat. Hal ini terjadi akibat pembentukan ester dan hidrolisis theobromin yang terikat oleh asam asetat tersebut. Di samping itu, untuk mempercepat proses fermentasi bak yang telah berisi biji kakao harus ditutup dengan karung goni atau plastik transparan yang telah diberi lubang-lubang kecil untuk mempermudah aerasi.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diketahui bahwa bakteri asam dapat ditemukan pada medium ekstrak pulp yang berperan dalam proses fermentasi, terutama pada pembentukan cita rasa dan aroma cokelat. Hal ini ditandai dengan adanya penurunan pH pulp akibat aktivitas bakteri asam. Pada inkubasi 0 jam pH-nya 4; inkubasi 4 jam pH-nya 3,83; inkubasi 8 jam pH-nya 3,43; inkubasi 12 jam pH-nya 3,39; inkubasi 16 jam pH-nya 3,31; dan pada inkubasi 20 jam pH-nya 3,26.

Pola pertumbuhan bakteri asam pada medium ekstrak pulp menunjukkan kurva pertumbuhan normal yang ditandai dengan adanya fase adaptasi antara inkubasi 0 jam sebesar $1,86 \times 10^8$ cfu/g dan inkubasi 4 jam sebesar $2,19 \times 10^8$ cfu/g; fase eksponensial pada inkubasi 8 jam sebesar $6,13 \times 10^8$ cfu/g; untuk fase stasioner terjadi pada inkubasi antara 8-12 jam sedangkan pertumbuhan optimumnya pada inkubasi 12 jam sebesar $7,50 \times 10^8$ cfu/g; fase lag (fase kematian) terjadi pada inkubasi 16 jam sebesar $3,20 \times 10^8$ cfu/g dan inkubasi 20 jam sebesar $2,65 \times 10^8$ cfu/g.

5. SARAN

Pada penelitian ini, interval inkubasinya terlalu lama (4 jam) yang menyebabkan hasil tidak maksimal. Oleh karena itu, sebaiknya interval inkubasi diperpendek menjadi 1 jam.

6. DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 1991. *Panduan Pengolahan Kakao*. Jember: Pusat Penelitian Perkebunan Jember

- Anonim. 2000. *Pengolahan Biji Kakao di PTP Nusantara XII Surabaya*. (tidak dipublikasikan)
- Cullimore, D. R. 2000. *Practical Atlas for Bacterial Identification*. New York: Lewis Publisher.
- Heddy, S. 1990. *Budidaya Tanaman Cokelat*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Holt, G.H., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Stanley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th ed.* USA: The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Nasution, Z.B.S., Laksmi dan Wahyu C. 1975. *Pengolahan Cokelat*. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Pertanian Kopi dan Kakao.
- Siregar, T.H.S., Slamet Riyadi dan Laeli Nuraeni. 1998. *Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Cokelat*. Jakarta: PT. Penebar Swadaya.
- Sunanto, H. 1992. *Cokelat: Budidaya, Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Susanto, F.X. 1994. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wood, G.A.R dan R.A. Lass. 1985. *Cocoa 4th ed.* New York: Longman Scientific and Technical.
- Yusianto. 1994. Beberapa Metode Fermentasi Biji Kakao Skala Kecil. Dalam *Warta Puslit Kopi dan Kakao*. Bogor: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao.

