



## ISOLASI DAN KARAKTERISASI ISOLAT BAKTERI INDIGENOUS PEMFERMENTASI PULP TIGA VARIETAS KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

(*Isolation and Characterizations of Indigenous Fermenting Bacteria from Pulp of Three Cocoa Varieties (Theobroma cacao, L.)*)

**Silmi Yusri Rahmadani, Periadnadi dan Nurmiati**

Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas,  
Jl. Limau Manis, Pauh 25163, Padang, Indonesia  
e-mail: [silmiyusrirahmadani@sci.unand.ac.id](mailto:silmiyusrirahmadani@sci.unand.ac.id)

Diterima 26 November 2019, Revisi akhir 06 April 2020, Disetujui 07 April 2020

**ABSTRAK.** Fermentasi kakao merupakan suatu proses biokimia yang melibatkan bakteri indigenous potensial pada daging buah atau pulp kakao. Bakteri ini memanfaatkan nutrisi yang terkandung pada pulp kakao seperti sukrosa serta bahan organik lain untuk metabolisme hidupnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik bakteri indigenous pada pulp tiga varietas kakao unggul di Sumatera Barat, yaitu TSH 858, ICS 60 dan Scavina. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi morfologi koloni, morfologi sel serta uji amilolitik dan selulolitik dari bakteri indigenous pemfermentasi pulp kakao. Sembilan isolat bakteri yang diperoleh merupakan kelompok bakteri gram positif dan gram negatif, berbentuk basil dan kokus serta morfologi koloni yang berbeda-beda. Pada pengujian indeks amilolitik (IA), isolat C2 dari varietas ICS 60 menunjukkan nilai IA tertinggi yaitu 24, sedangkan untuk pengujian indeks selulolitik (IS), isolat C4 menunjukkan IS tertinggi yaitu 10. Dilihat dari segi nilai indeks dan zona beningnya, isolat C2 merupakan isolat yang berpotensi untuk dijadikan starter penghasil enzim amilase.

**Kata kunci:** amilolitik, bakteri indigenous, kakao, pulp, selulolitik

**ABSTRACT.** Cocoa fermentation is a biochemistry process that involving some potential indigenous bacteria found in pulp of cocoa. These indigenous bacteria utilize nutrients contained in cocoa pulp such as sucrose and other organic materials for its metabolism. This investigation was conducted to determine the characteristics of indigenous bacteria from pulp of three superior cocoa varieties in West Sumatera, namely TSH 858, ICS 60 and Scavina. In this study, the colony and cell morphology of the indigenous isolates were characterized, amyolytic and cellulolytic tests were also conducted. Results showed that nine isolates obtained were gram positive and negative bacteria, bacilli and cocci, with different colony morphology. Isolate C2 from ICS 60 variety showed the highest Amyolytic Index (AI) with the value of 24. Meanwhile, isolate C4 showed the highest Cellulolytic Index (CI) with the value of 10. Based on the index value and clear zone results, isolate C2 is the most potential isolate to become a starter that producing amylase.

**Keywords:** amyolytic, celulolytic, cocoa, indigenous bacteria, pulp

### 1. PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao*, L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang menjadi komoditas pertanian penting di Indonesia. Indonesia merupakan negara ketiga penyumbang kakao terbesar di dunia setelah Pantai Gading dan Gana dengan persentase 15 % dari produksi kakao global (International Cocoa Organization, 2012; Tresliyana *et al.*, 2015). Selain itu, kakao menjadi

salah satu komoditas utama program revitalisasi perkebunan. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan (2008) menyebutkan target pengembangan kakao hingga tahun 2010 mencapai 200 ribu ha dengan rincian program peremajaan 54 ribu ha, rehabilitasi tanaman tua 36 ribu ha dan perluasan areal 110 ribu ha. Pada tahun 2025, sasaran Indonesia menjadi produsen utama kakao di dunia dengan perkiraan total areal perkebunan

kakao Indonesia mencapai 1,35 juta ha dengan produksi kakao mencapai 1,3 juta ton pertahun (Goenadi, 2005). Hal ini berkesinambungan dengan FAO State Data (2013) yang menyatakan bahwa Indonesia menjadi negara potensial penghasil kakao kedua secara global setelah Pantai Gading dengan produksi 712.200 ton/tahun (Depparaba & Karim, 2018).

Sumatera Barat merupakan salah satu sentra perkebunan kakao di kawasan barat Indonesia. Produksi kakao di Sumatera Barat mengalami peningkatan dalam 10 tahun terakhir dimana pada tahun 2008 produksi kakao mencapai 29.824 ton pertahun. Sementara itu, tahun 2016-2017 produksi kakao Sumatera Barat meningkat menjadi 67.843 ton pertahun. Kabupaten Pasaman merupakan daerah penghasil kakao tertinggi untuk daerah provinsi Sumatera Barat (Badan Pusat Statistik, 2018).

Terdapat berbagai varietas kakao yang dibudidayakan di Sumatera Barat dengan varietas utamanya adalah TSH 858, ICS 60 dan Scavina. Ketiga varietas ini adalah fenotip F0 dari varietas kakao pada umumnya dan sedang dikembangkan produktivitasnya di Sumatera Barat. Meningkatnya penanaman ketiga varietas ini disebabkan oleh varietas tersebut memiliki sifat unggul yaitu mampu hidup dengan kondisi Sumatera Barat yang memiliki kelembaban yang tinggi dengan rata-rata 80-85%, serta dapat bertahan dari penyakit busuk buah yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora palmivora* (Hutomo & Suhardjo, 1980).

Proses fermentasi biji kakao adalah proses utama yang dilakukan untuk menghasilkan biji kakao berkualitas setelah proses pasca panen (Sandhya *et al.*, 2016). Di Sumatera Barat, fermentasi kakao umumnya dilakukan secara spontan yaitu tanpa penambahan starter. Hal ini disebabkan oleh pulp kakao telah mengandung mikrobiota *indigenous* serta nutrisi yang dibutuhkan untuk metabolismenya. Pulp kakao diketahui mengandung 82-87% air, 10-15% gula (60% sukrosa dan 39% campuran dari fruktosa dan gluosa), 2-3% pentosa, 1-3% asam sitrat dan 1-5% pektin. Selain itu, adanya kandungan protein, asam amino, beberapa vitamin dan mineral menjadikan pulp kakao sebagai media yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroba (Puerari *et al.*, 2012). Sintesis nutrisi yang terdapat pada pulp oleh mikrobiota alami akan memberikan pengaruh yang sangat penting pada produk kakao akhir (Afoakwa *et al.*, 2008; Crafac *et al.*, 2014).

Bakteri *indigenous* merupakan mikroorganisme alami yang berperan dalam proses

fermentasi biji kakao. Selain bakteri, aktivitas enzim endogen yang terdapat pada pulp biji kakao juga berperan pada proses fermentasi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik dari bakteri *indigenous* yang terdapat pada pulp tiga varietas kakao serta potensi enzimatis isolat tersebut dalam hidrolisa polisakarida seperti amilum dan selulosa.

## 2. METODE PENELITIAN

Buah kakao dari tiga varietas induk (ICS 60, TSH 858 dan Scavina) diperoleh dari perkebunan kakao di Kabupaten Agam, Sumatera Barat. Buah kakao yang diambil adalah buah dengan kondisi kematangan yang sempurna yang dilihat dari warna kulit buah yang sudah matang. Medium Glukosa Tripton Agar Kalsium Karbonat (GTA+CaCO<sub>3</sub>) digunakan sebagai media selektif; penambahan kalsium karbonat bertujuan sebagai indikator bakteri penghasil asam (Balogu & Onyeagba, 2017). Bahan-bahan utama lain yang digunakan antara lain: medium Agar Pati Beras (APB), medium *Carboxymethyl Cellulose* (Daichi CMC) 1%, *crystal violet*, safranin, aquadest, alkohol, *lugol iodine* 0,5%, *congo red* 1% dan spiritus.

### Isolasi Isolat Bakteri Indigenous

Daging buah (pulp) kakao dari masing-masing varietas induk ditimbang sebanyak 10 g secara aseptis lalu dimasukkan ke labu ukur dan dicukupkan volumenya dengan akuades menjadi 100 mL. Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10<sup>-11</sup>, dari pengenceran 10<sup>-3</sup> sampai 10<sup>-11</sup> dipipet 1 mL. Selanjutnya, dimasukkan kedalam cawan petri dan dituang pada medium GTA+CaCO<sub>3</sub> dan diinkubasi pada suhu 38 °C. Pengamatan zona bening (*halo zone*) yang terbentuk dilakukan setelah 36 jam. Diameter zona bening paling luas dari bakteri yang berbeda jenis pada masing-masing varietas kakao diisolasi dan dibuat biakan miringnya pada medium GTA modifikasi (20 g/L glukosa, 5 g/L tripton, dan 20 g/L agar) (Fardiaz, 1993 dan Nurmalinda *et al.*, 2013).

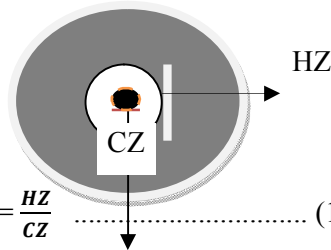
### Karakterisasi Morfologi Sel dan Koloni Isolat Bakteri Indigenous Terpilih

Sembilan isolat yang diperoleh dari tiga varietas kakao, dilakukan pengamatan morfologi sel melalui pewarnaan gram. Pewarnaan gram menggunakan larutan *crystal violet*, *lugol's iodine* dan safranin. Bakteri gram positif akan bewarna ungu, sedangkan gram negatif bewarna merah.

Pengamatan morfologi koloni dilakukan dengan mengamati bentuk, warna dan permukaan koloni dari masing-masing isolat (Assani, 1993).

**Indeks Amilolitik dan Indeks Selulolitik Bakteri Indigenous Terpilih**

Kemampuan bakteri indigenous dalam menghidrolisa amilum dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri yang berumur 48 jam pada medium agar pati beras (20/L g pati beras, 1/L g ekstrak khamir dan 20 g/L agar) (Periadnadi, 2005), sedangkan untuk hidrolisis selulosa dilakukan pada medium CMC 1% (10 g/L CMC, 20 g/L agar, dan 1/L g Pepton) (Hidayat, 2005). Kultur murni isolat bakteri *indigenous* ditumbuhkan pada masing-masing medium dengan metode *pour plate* sebanyak 1 mL. Setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C, visualisasi daerah halo isolat bakteri indigenous pada medium APB dilihat dengan penambahan larutan *lugol's iodine* (1 g iodine dan 2 g kalium iodat dalam 300 mL akuades) (Pelczar and Reid, 1958). Sementara itu, isolat pada medium CMC ditetesi larutan 1% (b/v) *congo red* (Pointing, 1999). Penghitungan indeks amilolitik (IA) dan Indeks Selulolitik (IS) bakteri indigenous sesuai dengan Persamaan 1 (Jamilah *et al.*, 2009).



$(IA) \text{ atau } (IS) = \frac{HZ}{CZ} \dots\dots\dots (1)$

Keterangan :

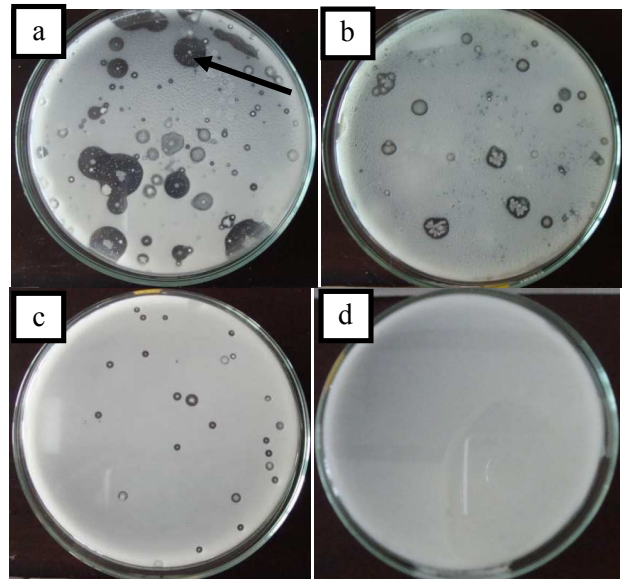
- IA : Indeks Amilolitik
- IS : Indeks Selulolitik
- HZ : Diameter Daerah Halo (*halo zone*)
- CZ : Diameter Koloni

**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Total Mikrobiota Indigenous Pulp Kakao**

Mikrobiota *indigenous* merupakan sekelompok konsorsium mikroba lokal alami yang terdapat pada suatu ekosistem tertentu. Buah-buahan tropis mengandung mikrobiota *indigenous* yang keberadaannya memiliki peran pada saat pematangan buah. Apabila buah telah matang, maka mikrobiota *indigenous* akan beraktivitas dalam menghidrolisis bahan organik dalam bentuk proses fermentasi. Studi yang dilakukan Paramithotis (2017) menunjukkan bahwa proses fermentasi sayuran bergantung pada mikroba

indigenous karena adanya variabilitas komposisi substrat yang sangat baik.



Gambar 1. Daerah halo (*halo zone*) bakteri *indigenous* pada *pulp* tiga varietas kakao (bakteri penghasil asam ditunjukkan tanda panah); a) Varietas ICS 60; b) Varietas Scavina; c) Varietas TSH 858; d) Kontrol

Gambar 1 menunjukkan bahwa terdapat mikrobiota *indigenous* pada pulp kakao. Salah satu buah tropis yang telah dilacak keberadaan bakteri *indigenous* adalah buah durian (Nurmalinda *et al.*, 2013). Adanya bakteri *indigenous* pemfermentasi kakao dibuktikan dengan penambahan kalsium karbonat ( $CaCO_3$ ) dalam medium GTA dengan terbentuknya daerah halo (*halo zone*) sebagai hasil dari hidrolisa bakteri tersebut terhadap asam. Kalsium karbonat berfungsi dalam menetralsir kapur yang ada pada daerah koloni sehingga terbentuklah daerah halo. Selain bakteri pembentuk asam, keberadaan khamir juga terlacak pada medium yang sama (Tabel 1). Mikrobiota *indigenous* pemfermentasi hadir dan memiliki aktivitas yang lebih tinggi apabila proses pematangan pada buah telah terjadi secara sempurna (Iflah *et al.*, 2015).

Proses fermentasi kakao melibatkan peranan dari mikrobiota *indigenous* yang terdapat pada pulp masing-masing varietas. Tahapan sintesa bahan organik yang akan dicapai selama proses fermentasi kakao bergantung pada jenis dan total mikrobiota yang dominan pada proses tertentu. Perhitungan total mikrobiota pada tiga varietas kakao bertujuan melihat dominasi mikrobiota tertentu pada tahap awal fermentasi kakao. Pada perhitungan total mikrobiota diketahui bahwa

dominasi bakteri indigenous melebihi khamir (Tabel 1).

Tabel 1. Total Mikrobiota Indigenous *Pulp* Tiga Varietas Kakao

Varietas Kakao	Total mikrobiota Indigenous ( $10^9$ cfu mL <sup>-1</sup> )	
	Bakteri Pembentuk Asam	Khamir
TSH 858	156	5
ICS 60	87	20
Scavina	63	28

Total mikrobiota *indigenous* masing-masing pulp dari tiga varietas kakao menunjukkan bahwa kakao varietas TSH 858 memiliki total bakteri pembentuk asam yang tertinggi, diikuti oleh varietas ICS 60 serta varietas scavina (Tabel 1). Varietas TSH 858 mengandung total bakteri dua kali lipat dari total bakteri *indigenous* varietas lainnya sedangkan untuk total khamirnya, varietas ini mengandung 4 sampai 5 kali lebih sedikit dari dua varietas lain. Perbedaan total mikrobiota *indigenous* yang ditemukan pada masing-masing varietas disebabkan karena perbedaan jumlah serta kandungan senyawa organik yang terdapat pada pulp kakao. Beberapa klon nasional memiliki kadar senyawa organik yang bervariasi, pada varietas TSH 858 mengandung kadar lemak sebesar 56% sedangkan pada varietas scavina mengandung 49,6% (Iswanto *et al.*, 2001). Kehadiran mikrobiota *indigenous* akan tergantung pada keberadaan senyawa organik tersebut, sedangkan khamir, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat merupakan mikrobiota utama dalam proses keberhasilan fermentasi biji kakao (Lima *et al.*, 2011). Tahap awal dari fermentasi kakao akan didominasi oleh mikrobiota aerobik mesofilik seperti khamir dan bakteri asam asetat dengan total  $1.5 \times 10^6$  cfu g<sup>-1</sup> dan  $9.7 \times 10^5$  cfu g<sup>-1</sup>, kemudian

disusul oleh bakteri asam laktat (Galves *et al.*, 2007).

Kondisi lingkungan serta nutrisi yang terdapat pada pulp kakao menjadi salah satu faktor kecendrungan aktivitas mikrobiota *indigenous* dalam proses metabolisme pulp. Tiga varietas kakao yang diambil merupakan kakao yang ditanam pada waktu dan lahan yang sama serta dipanen pada saat kondisi matang sempurna dan siap dilakukan fermentasi. Kondisi matang penuh atau sempurna pada buah kakao ditandai dengan perubahan warna kulit kakao dimana kakao berkulit hijau berubah menjadi kuning dan kakao berkulit merah berubah menjadi jingga serta mengeluarkan bunyi nyaring apabila diketuk (Iflah *et al.*, 2015). Varietas Scavina (Tabel 1) memiliki total khamir tertinggi (yaitu  $28 \times 10^9$  cfu mL<sup>-1</sup>) dibandingkan dua varietas lain. Hal ini diduga berhubungan karena varietas Scavina memiliki pulp dengan rasa yang lebih manis dari pada varietas TSH 858 dan varietas ICS 60. Taiga (2010) melaporkan pada pulp kakao yang panaskan selama 10 menit memiliki komposisi gula yang sebanding dengan madu. Rasa manis yang lebih mengindikasikan bahwa khamir juga akan berpotensi besar dalam proses fermentasi kakao. Khamir akan memfermentasi karbohidrat yang terdapat pada pulp kakao dan merubah gula menjadi alkohol dan karbondioksida (Galves *et al.*, 2007).

#### Karakterisasi Morfologi Sel dan Koloni Isolat Bakteri Indigenous Terpilih

Berdasarkan pengamatan perwarnaan gram dan morfologi sel, isolat A3, B1, B4 dan C4 termasuk bakteri gram negatif, berbentuk bulat dan sel berwarna orange sampai merah. Camu *et al.*, (2007) melaporkan bahwa 382 isolat bakteri yang diisolasi pada fermentasi kakao spontan 240 diantaranya diketahui termasuk pada golongan bakteri asam asetat dengan ciri fenotip bakteri

Tabel 2. Karakteristik isolat bakteri indigenous terpilih

Kode Isolat	Morfologi Koloni			Pewarnaan Gram	Morfologi Sel
	Margin	Permukaan	Warna Koloni		
A1	Rata	Licin dan datar	Kuning	Gram (+)	Basil
A3	Rata	Licin dan cembung	Kuning kehijauan	Gram (-)	Kokus
A4	Rata	Licin dan cembung	Krem	Gram (+)	Basil
B1	Rata	Licin dan cembung	Putih	Gram (-)	Kokus
B2	Rata	Licin dan cembung	Krem	Gram (+)	Basil
B4	Rata	Licin dan datar	Putih	Gram (-)	Kokus
C2	Rata	Licin dan datar	Putih	Gram (+)	Basil
C4	Rata	Licin dan cembung	Krem kekuningan	Gram (-)	Kokus

gram negatif dan morfologi sel berbentuk batang atau bulat. Selama proses fermentasi kakao, bakteri asam asetat melakukan biokonversi etanol yang diproduksi khamir menjadi asam asetat (Camu *et al.*, 2008). Genus *Acetobacter* merupakan golongan bakteri asam asetat yang berperan dalam proses fermentasi biji kakao (Galves *et al.*, 2007).

Bakteri asam asetat merupakan bakteri gram negatif, umumnya berbentuk bulat panjang dan dapat ditemukan dalam keadaan soliter, berpasangan atau berantai. Bakteri asam asetat ini terdapat pada substrat yang mengandung gula, beralkohol dan sedikit asam seperti pada buah-buahan, bir, anggur, cuka, dan madu. Pada substrat ini, bakteri asam asetat mengoksidasi gula dan alkohol dan menghasilkan suatu timbunan asam organik sebagai produk akhir. Ketika substratnya adalah etanol, maka asam asetat akan terbentuk. Akan tetapi, kelompok bakteri ini juga dapat mengoksidasi glukosa menjadi asam glukonat, galaktosa menjadi asam galaktonoat, arabinosa menjadi asam arabinoat (Benito, 2005).

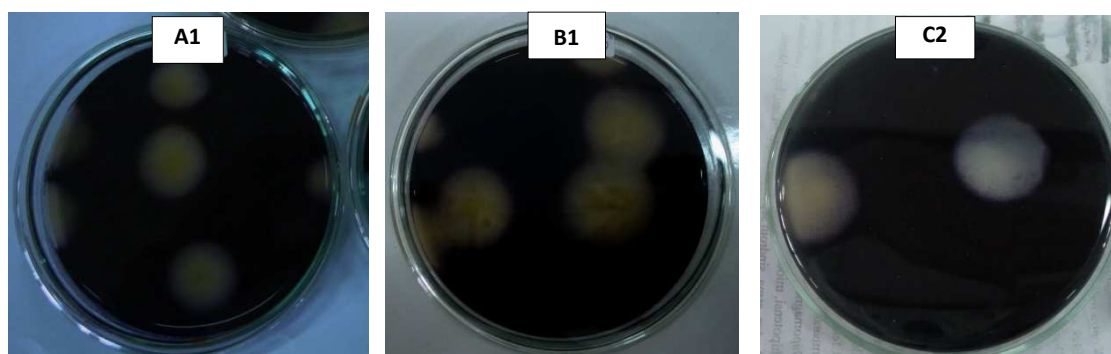
Lima isolat lainnya yaitu A1, A4, B2, C2 dan C5 dari ketiga varietas kakao menunjukkan ciri-ciri bakteri gram positif bentuk morfologi sel batang dan berwarna ungu. Camu *et al.*, (2007) menyatakan 132 isolat bakteri dari 170 yang diisolasi pada fermentasi kakao spontan termasuk pada golongan bakteri asam laktat dengan ciri-ciri bakteri gram positif, morfologi sel berbentuk batang atau kokus. Bakteri ini mensintesis glukosa dan asam sitrat yang terdapat pada pulp kakao menjadi asam laktat dan manitol. Bakteri asam laktat akan menghasilkan asam laktat dengan mengkonsumsi gula sebagai molekul penting pada saat fermentasi yang ada pada pulp kakao (Adler *et al.*, 2014). Golongan bakteri asam laktat yang berperan pada fermentasi kakao adalah genus *Lactobacillus* (Galves *et al.*, 2007). Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang bersifat gram positif, tidak membentuk spora, basil atau batang,

katalase negatif, non-motil atau sedikit motil, mikroaerofilik sampai anaerob dan toleran terhadap asam (Pabanga *et al.*, 2019).

### Potensi Amilolitik dan Selulolitik Bakteri Indigenous Terpilih

Kandungan gula yang dominan pada pulp kakao mengindikasikan bakteri yang dominan berperan pada fermentasi kakao adalah bakteri penghidrolisis gula. Untuk itu, pada isolat bakteri terpilih dilakukan uji potensi amilolitik dan selulolitik untuk mengetahui potensi enzimatis serta preferensi bakteri dalam hidrolisis kedua jenis gula tersebut. Pengujian potensi amilolitik terhadap sembilan isolat bakteri pulp tiga varietas kakao dilakukan pada medium APB. Visualisasi kemampuan amilolitik bakteri ini diketahui dengan menggunakan larutan *lugol iodine* 0,5% sebagai larutan indikator, sedangkan untuk pengujian potensi selulolitik dilakukan pada medium CMC. Visualisasi selulolitik bakteri ini diketahui dengan menggunakan larutan *congo red* 1% sebagai larutan indikator.

Kemampuan amilolitik sembilan isolat bakteri tiga varietas kakao berada kisaran 17 sampai 24 (Tabel 3). Isolat C2 (varietas ICS 60) memiliki nilai indeks amilolitik tertinggi yaitu 24 diikuti oleh isolat A1 dan A3 (varietas TSH 858) dengan nilai indeks amilolitik 20. Kesembilan isolat ini memiliki kemampuan memecah amilum akan tetapi besarnya kemampuan tersebut tergantung pada masing-masing jenis. Dalam hal ini, semua bakteri *indigenous* dapat menggunakan amilum sebagai sumber energi. Pemanfaatan amilum oleh bakteri *indigenous* dengan cara menghasilkan enzim amilase ekstraseluler yang dikeluarkan ke medium fermentasi untuk keberlangsungan hidup bakteri tersebut. Aktivitas enzim amilase diketahui dengan adanya daerah halo pada medium pati setelah ditetesi cairan indikator (Gambar 2). Sutiamiharja (2008)



Gambar 2. Visualisasi potensi amilolitik dari tiga isolat tertinggi *pulp* tiga varietas kakao di Sumatera Barat A1 (TSH 858), B1 (Scavina), dan C2 (ICS 60)



Tabel 3. Nilai Indeks Amilolitik isolat bakteri *indigenus* pulp tiga varietas kakao (TSH 858, ICS 60 dan Scavina)

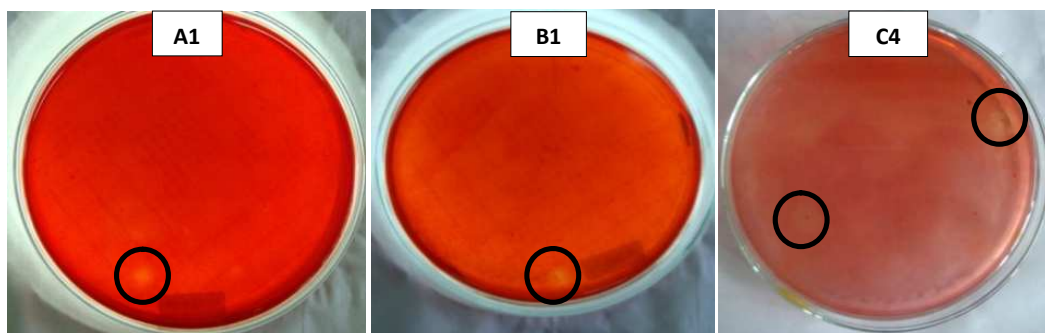
Varietas Kakao	Isolat	Diameter (cm)		Indeks Amilolitik
		Koloni	Zona Bening	
TSH 858	A1	0,05	1,0	20
	A3	0,10	2,0	20
	A4	0,07	1,2	17
Scavina	B1	0,10	1,9	19
	B2	0,10	1,8	18
	B4	0,05	0,9	18
ICS 60	C2	0,10	2,4	24
	C4	0,05	0,9	18
	C5	0,10	2,0	20

menyatakan kemampuan amilolitik suatu isolat ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium yang mengandung pati.

Besarnya diameter daerah halo yang dihasilkan pada pendegradasian amilum oleh tiga isolat bakteri *indigenus* pulp kakao A1, A3, C2 dan C5 adalah  $\geq 2$  cm (Tabel 3). Hal ini mengindikasikan bahwa ketiga isolat ini berpotensi besar dalam menghasilkan enzim amilase. Menurut Jamilah (2011) apabila disekitar koloni menghasilkan daerah bening  $\geq 2$  cm, maka dapat dikatakan bakteri tersebut termasuk galur yang baik untuk menghasilkan enzim. Oleh karena itu, ketiga isolat ini perlu dilakukan pengujian lanjutan

untuk mengetahui kemampuan produksi amilasena.

Degradasi pati yang dilakukan oleh bakteri *indigenus* dilakukan melalui enzim amilase ekstraseluler yang dihasilkannya (Gambar 2). Enzim ini memecah ikatan polimer pati yang terdapat pada medium agar pati beras menjadi rantai yang lebih pendek. Ikatan polimer yang lebih pendek ini menyebabkan warna pada penambahan medium dengan iodine akan menjadi transparan atau lebih muda (Murphy, 2000). Perubahan warna transparan atau zona bening disebabkan karena perubahan ikatan kompleks antara iodine dengan pati pada daerah yang telah terhidrolisis oleh isolat bakteri *indigenus*.



Gambar 3. Visualisasi potensi selulolitik dari tiga isolat tertinggi masing-masing varietas kakao pada medium CMC 1%, zona bening selulolitik (lingkaran hitam); A1 (Isolat dari TSH 858), B1 (Isolat dari Scavina), C2 (Isolat dari ICS 60)

Besarnya nilai indeks selulolitik isolat bakteri pulp kakao berada pada kisaran nilai 1,33 sampai 10. Isolat C4 dari pulp varietas ICS 60 memiliki indeks selulolitik tertinggi yaitu 10. Isolat A4 dari varietas TSH 858 memiliki indeks selulolitik terendah yaitu 1,33. Perbedaan kemampuan dari isolat bakteri dalam sintesis selulosa disebabkan karena pada masing-masing isolat bakteri menghasilkan kadar enzim yang berbeda-beda. Setiap bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda tergantung dari gen yang dimiliki

dan sumber karbon yang digunakannya (Meryandini *et al.*, 2009). Sumber karbon yang digunakan oleh isolat bakteri terpilih adalah substrat CMC yang merupakan sumber selulosa murni berbentuk *amorphous* sehingga aktivitas enzim selulase pada substrat tersebut merupakan aktivitas enzim endo-1,4- $\beta$ -glukanase. Enzim endo-1,4- $\beta$ -glukanase bekerja pada rantai dalam substrat CMC yang menghasilkan oligosakarida atau rantai selulosa yang lebih pendek (Lynd *et al.*, 2002).

Tabel 4. Nilai Indeks Selulolitik Isolat Bakteri Indigenous Pulp Tiga varietas kakao (TSH 858, ICS 60 dan Scavina)

Varietas Kakao	Isolat	Diameter		Indeks Amilolitik
		Koloni (cm)	Zona Bening	
TSH 858	A1	0,01	0,3	3,00
	A3	0,30	0,5	1,67
	A4	0,30	0,4	1,33
Scavina	B1	0,10	0,7	7,00
	B2	0,05	0,2	4,00
	B4	0,05	0,2	4,00
ICS 60	C2	0,20	1,1	5,50
	C4	0,10	1,0	10,0
	C5	0,05	0,4	8,00

Berdasarkan kemampuan hidrolisa selulosa, isolat bakteri *indigenus* terpilih pulp kakao tidak bisa dijadikan galur yang baik untuk menghasilkan enzim selulase. Ukuran diameter daerah bening yang dihasilkan oleh sembilan isolat bakteri *indigenus* selulolitik kurang dari 2 cm. Ukuran diameter daerah bening  $\geq 2$  cm merupakan standar yang digunakan untuk menentukan bakteri tersebut baik untuk di jadikan galur bakteri penghasil enzim (Kurniawan, 2011).

#### 4. KESIMPULAN

Pigmen Pada pulp tiga varietas kakao (TSH 858, ICS 60 dan Scavina) telah diisolasi bakteri *indigenus* yang berperan pada proses fermentasi spontan biji kakao. Berdasarkan pengamatan morfologi sel, pewarnaan gram dan morfologi koloni karakteristik isolat A3, B1, B4 dan C4 yang diperoleh dari tiga veritas kakao memiliki ciri-ciri bakteri gram negatif berbentuk bulat dan berwarna orang sampai merah. Sementara itu, lima isolat lainnya A1, A4, B2, C2 dan C5 adalah bakteri gram positif berbentuk batang dan sel berwarna ungu. Dilihat dari indeks amilolitik dan ukuran diameter daerah halo, isolat C2 dari varietas ICS 60 merupakan isolat galur potensial penghasil enzim amilase.

#### DAFTAR PUSTAKA

Adler, P., Frey, L. J., Berger, A., Bolten, C. J., Hansen, C. E., & Wittmann, C. (2014). The key to acetate: metabolic fluxes of Acetic Acid Bacteria under cocoa pulp fermentation-simulating conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(15), 4702-16.

Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Critical*

*Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(9), 840–857.

- Assani, S. (1993). *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran (Edisi Revisi)*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Badan Pusat Statistik. (2018). *Produksi Kakao Perkebunan Rakyat*. Retrived November 10, 2020, from <https://sumbar.bps.go.id>
- Balogu, T. V., & Onyeagba, A. R. (2017). Polyphenol and microbial profile of on-farm cocoa beans fermented with selected microbial consortia. *Applied Food Biotechnology*. 4(4),229-240.
- Benito, A.G. (2005). *Application of Molecular Techniques for Identification and Enumeration of Acetic Acid Bacteria*. Doctoral Disertation. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809–1824.
- Camu, N., Winter, T. D., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J.Sci Food Agric*. 88, 2288–2297.
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Nielsen, D. S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*. 63, 306-316.
- Depparaba, F., dan Karim, H. A. (2018). Prospek kakao nasional dalam perspektif kebijakan. *Agrovital* 3 (1), 14-17.
- Fardiaz, S. (1993). *Analisis Mikrobiologi Pangan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.

- Galves, S. I., Loisenu, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J. P. (2007). Study on Microflora and Biochemistry of Cocoa Fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*. 114,124-130.
- Goenadi, H.D, B.Baon, Herman dan A. Purwoto. (2005). *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kakao di Indonesia*. Badan Litbang Pertanian: Departemen Pertanian.
- Hidayat, I. (2005). Pengaruh pH terhadap Aktivitas Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase *Bacillus sp.* AR 009. *Biodiversitas*. 6(4), 242-244.
- Hutomo, T. & Suhardjo. (1980). Program pemuliaan tanaman cokelat bulk di Sumatera Utara. *Kumpulan Makalah Konferensi Cokelat Nasional*, Medan, 16-18 September 1980. 1,56-65.
- Iflah, T., Towaha, J., dan Balittri. (2015). Perbedaan tingkat kematangan buah dan lama pemeraman terhadap kualitas biji kakao. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. 12(3),14-17.
- International Cocoa Organization. (2012). *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistic*. Retrived January 18, 2020, from [http://www.icco.org/about-us/international-cocoaagreements/cat\\_view/30-related-documents/46-statistics-production.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoaagreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html)
- Iswanto, A., Suhendi, D., Susilo, A.W. (2001). Hasil seleksi dan persilangan genotype penghasil biji kakao lindak dan mulia. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao*. 17(1),46-59
- Jamilah, I., A. Meryandini, I. Rusmana, A. Suwanto, N.R. Mubarik. (2009). Activity Proteolytic and Amylolytic Enzymes From *Bacillus* spp. Isolated from Shrimp Ponds. *Journal Microbiology Indonesia*. 3(2),67-71.
- Jamilah, I. (2011). *Penapisan bacillus dan karakterisasi protease dan amilase ekstraseluler yang dihasilkan untuk degradasi pakan pada budidaya udang*. Dissertation Doctoral. IPB.Bogor
- Kurniawan, H.M. (2011). *Isolasi dan optimasi ekstrinsik bakteri termo-proteolitik isolat sumber air panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi*. Thesis Pasca Sarjana Universitas Andalas. Padang
- Lima, L., J.R., Almeida, M. H., Noit, M. J. R., & Zwietering, M. H. (2011). *Theobroma cacao*, L., "The food of the gods"; quality detremnants of commercial cocoa beans with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51, 731-761.
- Lynd, L.R., J.W. Paul., H. Willem., S.P. Isak. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamental and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66, 506-577
- Meryandini, A., W. Widosari, B. Maranatha, T.C. Sunarti, N. Rachmania, H. Satria. (2009). Isolasi bakteri selulolitik dan karakteristik enzimnya. *Makara Sains*. 13(1), 33-38.
- Murphy, P. (2000). *Handbook of Hydrocolloids*. New York :Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.
- Nurmalinda, A., Periadnadi & Nurmiati. (2013). Isolasi dan karakterisasi parsial bakteri indigenous pemfermentasi dari buah durian (*Durio zibethinus*, Murr). *J. Bio. UA*. 2(1),8-13.
- Pabanga, A.E., Budiharjo, A., Suprihadi, A. (2019). Aktivitas antibakteri dan uji antioksidan serta identifikasi molekuler isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Inasua. *Jurnal Akdemika Biologi*. 8(1),10-20.
- Paramithiotis, S. (2017). *Lactid acid fermentation of fruits and vegetables*. CRC Press. Taylor and Francis Group. United States.
- Periadnadi. (2005). Hubungan antara komposisi ragi tapai dan beberapa daerah di sumatera barat dengan tapai yang dihasilkannya. "Regularly Scientific Seminar" TPSDP Batch III. FMIPA: Universitas Andalas
- Pelczar, M, J., and R. D. Reid. (1958). *Microbiology*. Mc Graw Hill Book Company. Inc. New York. Toronto. London
- Pointing, S.B. (1999). Qualitative Methods fot the Determiration of Lignocellulolitic Enzyme Production by Tropical Fungi. *Fungi Diversity* 2,17-33.
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*. 48,634-640.
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. (2008). Indonesia berhasil menerapkan teknik embriogenesis somatik pada kakao skala komersial. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 30(1),18-19.
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., & Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*, L.) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*. 65,731-738.
- Sutiamiharja, N. (2008). *Isolasi bakteri dan uji aktivitas amilase kasar termofilik dari sumber air panas Gurukinayan Karo Sumatera Utara*. Thesis



- Pasca Sarjana Biologi Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Taiga, A., S.I. Afolabi and C.O.C. Agwu. (2010). Comparative study of cocoa sweat and that of pure honey. *African Journal of Biotechnology*. 9(20),2923-2925.
- Tresliyana, A., Fariyanti, A., dan Rifin, A. (2015). Daya saing kakao Indonesia di pasar internasional. *Jurnal Manajemen dan Agribisnis*. 12(2),150-162.