

Isolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

*Isolation, characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the fermented cacao seed (*Theobroma cacao* L.)*

Yulia Sari Ismail¹, Cut Yulvizar² dan Putriani³

¹ Jurusan Biologi FMIPA Unsyiah, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia, Email: ysismail@unsyiah.ac.id

² Jurusan Biologi FMIPA Unsyiah, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia, Email: cut_yulvizar@unsyiah.ac.id

³ Jurusan Biologi FMIPA Unsyiah, Darussalam, Banda Aceh, Indonesia, Email: putrianiputri66@gmail.com

Abstract: : Lactic acid bacteria (LAB) is a group of bacteria that can convert carbohydrate (glucose) into lactic acid. This study aimed to isolate and determine the characteristics of the LAB that play a role in the activity of lactic acid fermentation in the seed of cacao (*Theobroma cacao* L.). Parameters measured were colony morphology (shape, edge, elevation and isolate color), cell morphology (cell shape and Gram staining), biochemical test (TSIA, indol, motility, MR-VP, fermentation type, growth at temperature 14°C and 37°C, growth in salt 5%, 6.5%, 10%, and catalase) and antimicrobial activity test. The results showed that three isolates of LAB were found, which were group of rod and coccus shaped Gram positive bacteria. The three isolates have different colony morphology that is circular shape, slippery edge, raised and flat elevation, cream and white colored. Biochemical test results showed that all three isolates included in the family Lactobacillaceae, genus *Lactobacillus* (FBK 1 and FBK 3 isolates) and genus *Enterococcus* (FBK 2 isolate). All these isolates have ability to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Cacao seed (*Theobroma cacao* L.), lactic acid bacteria, fermentation, antimicrobial activity

Abstrak: Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengetahui karakteristik BAL yang berperan dalam aktivitas fermentasi asam laktat pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.). Parameter yang diamati adalah morfologi koloni (bentuk, tepian, elevasi dan warna isolat), morfologi sel (bentuk sel dan pewarnaan Gram), uji biokimia (TSIA, indol, motilitas, MR-VP, tipe fermentasi, ketahanan suhu 15°C dan 37°C, ketahanan garam 5%, 6.5% dan 10%, serta katalase,) dan uji aktivitas antimikroba. Dari hasil penelitian ini diperoleh tiga isolat BAL yang merupakan kelompok bakteri Gram positif berbentuk basil dan kokus. Ketiga isolat secara umum memiliki morfologi koloni yang berbeda yaitu berbentuk bundar, tepian licin, elevasi cembung dan datar, berwarna krem dan putih susu. Hasil uji biokimia menunjukkan bahwa ketiga isolat termasuk famili Lactobacillaceae, genus *Lactobacillus* (isolat FBK 1 dan FBK 3) dan genus *Enterococcus* (isolat FBK2). Pada uji daya hambat (aktivitas antimikroba), ketiga isolat mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: Biji kakao (*Theobroma cacao* L.), bakteri asam laktat, fermentasi, aktivitas antimikroba

Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman perkebunan yang mempunyai nilai ekonomis. Tanaman ini menempati peringkat ketiga ekspor sektor perkebunan dalam menyumbang devisa negara, setelah komoditas *Crude Palm Oil* (CPO) dan karet. Kondisi tersebut menjadikan Indonesia menjadi produsen utama kakao dunia. Saat ini kualitas biji kakao yang diekspor oleh Indonesia dikenal sangat rendah. Hal ini disebabkan oleh pengelolaan produk kakao masih tradisional (85% biji kakao hasil produksi nasional tidak difermentasi) sehingga kualitas kakao Indonesia menjadi rendah (Ferry *et al.*, 2013).

Salah satu tahapan penting dalam pengelolaan biji kakao adalah proses fermentasi yang bertujuan untuk meningkatkan cita rasa, aroma dan warna yang baik. Proses fermentasi berlangsung secara alamiah dalam biji kakao yang melibatkan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang dan bulat, katalase negatif, non motil, bersifat anaerob dan membutuhkan suhu mesofilik (Salminen dan Von, 1998).

Sifat penting bakteri asam laktat adalah kemampuannya untuk memfermentasi gula menjadi asam laktat. Berdasarkan penelitian Delfahedah *et al.* (2013) bakteri asam laktat mampu menghasilkan berbagai komponen antimikroba seperti asam laktat, hidrogen peroksida (H_2O_2) dan bakteriosin. Komponen ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif yang ditandai dengan terbentuknya zona bening pada uji antimikroba. Menurut Siregar (2013), genus bakteri asam laktat antara lain *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* dan *Propionibacterium*.

Bakteri asam laktat merupakan kelompok mikroba yang berperan dalam proses fermentasi pangan. Menurut Rahayu (2013) bakteri asam laktat dapat ditemukan pada berbagai jenis fermentasi buah-buahan (mangga, nangka, kedondong, durian dan sirsak), fermentasi sayuran (asinan sawi, rebung, terong, timun, bawang) dan fermentasi

makanan (beras ketan dan tempe) serta fermentasi susu. Selain meningkatkan kualitas biji kakao, bakteri asam laktat juga mempunyai manfaat untuk kesehatan dengan menghasilkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen. Isolasi bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao dilakukan untuk melihat kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengkaji karakteristik serta uji antimikroba dari bakteri asam laktat asal biji kakao tersebut terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian isolasi dan karakterisasi serta uji antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) telah dilakukan pada bulan Juni sampai Desember 2015. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Syiah Kuala.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu : cawan petri, jarum inokulasi (ose), pipet tetes, mikropipet, gelas erlenmeyer, gelas ukur, timbangan analitik, batang pengaduk, batang penyebar, autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *hotplate*, inkubator, lampu bunsen, kaca objek, kaca penutup, mikroskop, kamera digital dan alat tulis.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu : biji kakao (*Theobroma cacao* L.), akuades, reagen Kovac's, reagen alfanaftol, reagen MR, KOH 3%, kristal violet, iodin, safranin, H_2O_2 3%, NaCl fisiologis 0,9%, kertas cakram 6mm, *ciprofloxacin*, larutan McFarland, media *de man rogosa sharpe agar* (MRS Agar), media *de man rogosa sharpe broth* (MRS Broth), media *nutrient agar* (NA), media *triple sugar iron agar* (TSIA), media *methyl red* dan *voges proskauer* (MR-VP) dan media *sulphide indole and motility* (SIM). Mikroorganisme uji yang digunakan adalah bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi alat dan bahan

Prosedur penelitian ini adalah preparasi alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian. Semua alat dicuci hingga bersih dan dikeringkan di dalam oven. Alat dan bahan kemudian disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 15 Psi selama 20 menit.

2. Persiapan sampel

Buah kakao yang digunakan berasal dari Desa Pulo Kecamatan Peudada Kabupaten Bireun. Buah diambil dari satu pohon, banyaknya biji kakao yang digunakan sebanyak 200g untuk dilakukan fermentasi. Biji kakao yang digunakan sebagai sampel berasal dari buah masak, terlihat perubahan warna kulit dari hijau menjadi kuning. Buah masak juga ditunjukkan oleh tangkai yang menjadi kering, adanya rongga antar biji dan kulit. Buah kakao yang masak jika digoyangkan atau dikocok akan mengeluarkan bunyi. Fermentasi biji kakao dilakukan dalam keadaan steril dengan menggunakan botol. Sampel kakao dikupas kulit dan bijinya dimasukkan ke dalam botol dengan steril. Biji kakao difermentasi selama 7 hari secara anaerob pada suhu 37°C. Pengamatan ini dilakukan pada hari pertama sampai hari ketujuh dan selanjutnya dilakukan tahap pengenceran.

3. Pembuatan media

Isolasi dan karakterisasi bakteri asam laktat menggunakan beberapa media yaitu: media *de man rogosa sharpe agar* (MRS agar), media *de man rogosa sharpe broth* (MRS Broth), media *triple sugar iron agar* (TSIA), media *sulphide indole and motility* (SIM), media *methyl red* dan *voges proskauer* (MR-VP) dan media *nutrient agar* (NA)

1. Media *de man rogosa sharpe agar* (MRS Agar)

Media MRS agar ditimbang sebanyak 6,2g dan dilarutkan dalam 100ml akuades. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Media sebanyak 15ml dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

2. Media *de man rogosa sharpe broth* (MRS Broth)

Media MRS broth ditimbang sebanyak 5,2g dan dilarutkan dalam 100ml akuades. Media disterilkan

dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Media sebanyak 5 ml dituang ke dalam tabung reaksi.

3. Media *triple sugar iron agar* (TSIA)

Media TSIA ditimbang sebanyak 6,5g dan dilarutkan dalam 100ml akuades. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Sebanyak 5 ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan pada posisi miring sampai memadat.

4. Media *sulphide indole and motility* (SIM)

Media SIM ditimbang sebanyak 3,0g dan dilarutkan dalam 100 ml akuades. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Sebanyak 5 ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan pada posisi tegak.

5. Media *methyl red* dan *vogesproskauer* (MR-VP)

Media MR-VP ditimbang sebanyak 1,5g dan dilarutkan dalam 100 ml akuades. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Sebanyak 5ml media dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan pada posisi tegak.

6. Media *nutrient agar* (NA)

Media NA ditimbang sebanyak 2,8g dilarutkan ke dalam 100 ml akuades Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Media sebanyak 15ml dimasukkan ke dalam dua cawan petri dan dibiarkan sampai memadat.

4. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Isolasi bakteri asam laktat dilakukan dengan mensuspensikan 1 ml biji kakao yang telah difermentasi ke dalam 9 ml akuades (pengenceran 10^{-1}). Selanjutnya diambil 1 ml sampel dari pengenceran 10^{-1} dilarutkan dalam 9 ml akuades (pengenceran 10^{-2}) dan seterusnya sampai pengenceran 10^{-6} . Sebanyak 1 ml sampel diambil dari setiap pengenceran dan ditumbuhkan pada media agar MRS dengan metode cawan sebar, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat yang tumbuh diinokulasi pada media agar MRS lain dengan metode cawan gores untuk

mendapatkan biakan murni dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

5. Karakterisasi Bakteri Asam Laktat

1. Pengamatan morfologi koloni bakteri asam laktat

Pengamatan morfologi koloni dilakukan setelah mendapatkan biakan murni. Pengamatan makroskopis meliputi bentuk, warna, tepian, dan elevasi koloni bakteri. Permukaan koloni dapat dilihat dari samping, dan tepi koloni dapat dilihat dari atas cawan (Hadioetomo, 1993).

2. Pengamatan morfologi sel bakteri asam laktat (pewarnaan Gram)

Kaca objek yang digunakan untuk pewarnaan Gram disterilkan dengan alkohol 70%. Satu isolat bakteri diambil dan dioleskan di atas kaca objek, kemudian difiksasi beberapa kali pada api bunsen. Isolat bakteri ditetesi dua tetes kristal violet dan dibiarkan selama satu menit. Isolat bakteri dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Kemudian isolat ditetesi iodine, dibiarkan selama satu menit, kemudian dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Isolat bakteri ditetesi alkohol 95% secara perlahan-lahan selama 30 detik, kemudian dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Isolat ditetesi safranin secara perlahan-lahan selama 30 detik dan dicuci dengan akuades lalu dikeringkan. Isolat bakteri yang telah diwarnai, selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran 100x. Pengamatan meliputi warna dan bentuk sel bakteri. Bakteri Gram positif ditandai dengan warna ungu karena mampu mengikat kristal violet. Bakteri Gram negatif ditandai dengan terbentuknya warna merah muda karena tidak mampu mengikat warna kristal violet dan hanya terwarnai oleh safranin.

6. Uji Biokimia Bakteri Asam Laktat

1. Uji *triple sugar iron agar* (TSIA)

Satu koloni isolat bakteri diinokulasikan pada media TSIA dengan cara ditusuk tegak lurus pada bagian *butt* dan cara zig zag pada bagian *slant*. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna media. Apabila pada bagian *slant* media berwarna merah dan *butt* berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa. Apabila pada bagian *slant*

dan *butt* media berwarna kuning, maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, laktosa dan sukrosa.

2. Uji indol

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi ke dalam media SIM dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan hasil uji indol dilakukan dengan menambahkan 10-12 tetes reagen Kovac's. Uji positif ditandai dengan terbentuknya lapisan berwarna merah di bagian atas biakan (Hadioetomo, 1993).

3. Uji motilitas

Uji motilitas dilakukan dengan menusukkan satu koloni isolat bakteri ke dalam media SIM kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Pertumbuhan bakteri di sekitar tusukan menunjukkan hasil uji negatif. Pertumbuhan bakteri yang menyebar pada media menunjukkan hasil uji positif (Lay, 1994).

4. Uji *methyl red* dan *voges proskauer* (MR-VP)

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MR-VP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengamatan uji MR dilakukan dengan menambahkan tiga tetes reagen MR ke dalam media. Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi merah, artinya terbentuk asam (Hadioetomo, 1993). Uji VP dilakukan dengan menambahkan tiga tetes KOH 3% dan lima tetes alfa-naftol, lalu dikocok selama 30 detik.

5. Uji tipe fermentasi

Satu koloni isolat bakteri ditumbuhkan pada media MRS *broth* dalam tabung reaksi yang diberi tabung Durham. Selanjutnya biakan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang menampung gas dalam tabung Durham dinyatakan sebagai heterofermentatif, sedangkan yang tidak menampung gas dinyatakan homofermentatif.

6. Uji katalase

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan dua tetes H₂O₂ 3% pada isolat bakteri yang berumur 24 jam di atas kaca objek. Reaksi positif katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Terbentuk gelembung udara menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase yang dapat

mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Hadioetomo, 1993).

7. Uji ketahanan suhu

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MRS *broth* dan diinkubasi pada suhu $14^\circ C$ dan $37^\circ C$. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

8. Uji ketahanan garam

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi ke dalam media MRS *broth* dengan konsentrasi NaCl 5%, 6.5% dan 10%. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 7 hari. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

7. Uji Antimikroba

Uji antimikroba menggunakan metode difusi kertas cakram. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Antimikroba yang digunakan adalah bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao. Kontrol positif terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* menggunakan antibiotik *ciprofloxacin*.

Bakteri uji disuspensikan ke dalam dua ml larutan NaCl fisiologis 0,9% sehingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan *McFarland* 0,5. Sebanyak 25 μl bakteri *E.coli* dan *S.aureus* ditumbuhkan pada media *nutrien agar* (NA) dengan metode cawan sebar. Kertas cakram yang berukuran 6mm direndam dalam larutan suspensi bakteri asam laktat selama 25 menit. Kertas cakram yang telah berisi bakteri asam laktat dan *ciprofloxacin* diletakkan di permukaan media uji, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam (Volk dan Wheeler, 1993).

Pengamatan terbentuknya zona bening dilakukan setelah 24 jam inkubasi. Diameter zona bening diukur secara vertikal dan horizontal menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan uji atau antibiotik yang dinyatakan dengan lebar diameter zona bening (Vandepitte, 2005).

8. Analisis Data

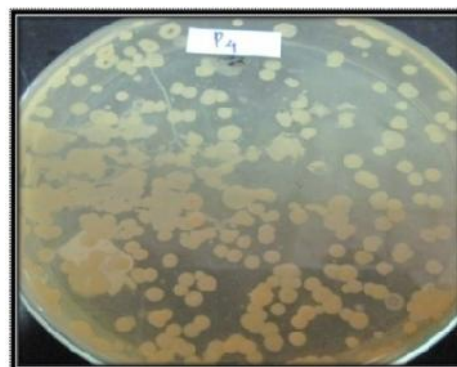
Data disajikan secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar,

meliputi isolat bakteri asam laktat yang telah diidentifikasi berdasarkan morfologi koloni, morfologi sel, sifat fisiologis bakteri dari hasil uji biokimia, serta sebagai antimikroba.

Hasil dan Pembahasan

1. Hasil Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao

Tingkat pengenceran tertinggi dilakukan dalam penelitian ini adalah 10^{-6} . Koloni yang terpilih berasal dari kultur bakteri dengan tingkatan pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} karena mempermudah dalam mengidentifikasi morfologi koloni. Isolasi bakteri asam laktat dilakukan dengan metode pengenceran dan ditumbuhkan pada media MRS agar menggunakan metode cawan sebar pada suhu $37^\circ C$. Bakteri yang diisolasi dari fermentasi biji kakao pada media agar MRS menunjukkan pertumbuhan di setiap pengenceran (Gambar 1). Media agar MRS merupakan medium selektif bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Sebanyak tiga isolat FBK 1, FBK 2 dan FBK 3 didapatkan dari fermentasi biji kakao (FBK = Fementasi Biji Kakao; 1, 2, 3 = sistematika penomoran).

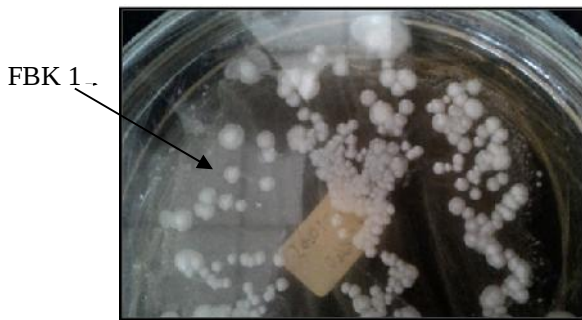


Gambar 1. Hasil isolasi bakteri asam laktat pada pengenceran 10^{-4} di media agar MRS

2. Karakterisasi Morfologi Bakteri Asam Laktat

Ketiga isolat berhasil tumbuh dengan baik pada media agar MRS. Morfologi yang diamati pada penelitian ini adalah morfologi koloni dan morfologi sel. Morfologi koloni diamati secara makroskopik meliputi bentuk, tepian, elevasi dan warna. Morfologi sel diamati secara mikroskopik

meliputi bentuk sel dan pewarnaan Gram. Karakterisasi dapat dilakukan berdasarkan sifat morfologi koloni, morfologi sel dan biokimia (Purwoko, 2007). Hasil pemurnian bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil pemurnian bakteri asam laktat

Berdasarkan Tabel 1, menunjukkan bahwa FBK 1, FBK 2 dan FBK 3 yang diisolasi dari fermentasi biji kakao memiliki morfologi koloni yang berbeda. Terdapat tiga koloni isolat berbentuk bundar (100%), tepian licin (100%) dengan elevasi cembung (66,6%), datar (33,3%), berwarna putih susu (33,3%) dan krem (66,6%). Koloni bakteri yang memiliki warna krem dan putih susu diduga bahwa tidak mempunyai pigmen. Sesuai dengan hasil penelitian Delfahedah *et al.* (2013) bahwa ditemukan beberapa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari buah sirsak yaitu dengan bentuk koloni bulat dan bundar, tepian licin, elevasi cembung dan warna putih susu dan krem.

Tabel 1. Karakteristik morfologi isolat FBK 1, FBK 2 dan FBK 3

No	Kode Isolat	Karakteristik					
		Morfologi Koloni				Morfologi Sel	
		Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna	Bentuk Sel	Pewarnaan Gram
1	FBK 1	Bundar	Licin	Cembung	Putih susu	Batang	Positif
2	FBK 2	Bundar	Licin	Datar	Krem	Bulat	Positif
3	FBK 3	Bundar	Licin	Cembung	Krem	Batang	Positif

Berdasarkan Tabel 1, hasil menunjukkan bahwa isolat bakteri memiliki bentuk batang dan bulat. Bentuk sel yang mendominasi yaitu bentuk batang (66,6%) dan bulat (33,3%). Sesuai dengan hasil penelitian Surono (2004) bahwa ditemukan beberapa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari fermentasi susu berbentuk batang dan bulat. Hasil pewarnaan Gram ketiga isolat menunjukkan warna ungu pada sel bakteri. Hal ini menandakan bahwa isolat bakteri asam laktat yang diperoleh dari hasil fermentasi biji kakao bersifat Gram positif (100%). Cullimore (2000) menyatakan bahwa bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif. Sunatmo (2007); Madigan *et al.* (2011); dan Hadioetomo (1993) menyatakan bahwa perbedaan reaksi pewarnaan Gram berdasarkan komposisi dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri Gram positif mengandung 90% peptidoglikan dan selebihnya adalah asam tekoat. Sel bakteri Gram positif terlihat berwarna ungu karena dapat membentuk ikatan kompleks dengan pewarna utama (kristal violet) yaitu ungu (Gambar 3). Dinding sel bakteri Gram negatif terdiri dari 5-20% peptidoglikan, selebihnya adalah polisakarida. Pemberian larutan alkohol 95% pada sel dapat meningkatkan porositas dinding sel dengan melarutkan lipid pada membran luar, sehingga kompleks ungu akan terlepas dan sel menjadi tidak berwarna. Selanjutnya sel akan berwarna merah karena terwarnai oleh warna pembanding yaitu safranin.



Gambar 3. Hasil pewarnaan Gram isolat FBK 3 menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10x40

3. Uji Biokimia

Uji aktivitas biokimia ini dilakukan untuk mengetahui karakteristik yang dimiliki oleh ketiga isolat bakteri asam laktat. Tahapan uji biokimia ini sangat mempengaruhi dalam membedakan spesies yang ditemukan. Adapun uji biokimia yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi uji TSIA, indol, motilitas, MR, VP, tipe fermentasi, katalase, ketahanan suhu dan ketahanan garam. Hasil uji biokimia bakteri yang diisolasi dari fermentasi biji kakao dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji biokimia bakteri isolat FBK 1, FBK 2 dan FBK 3

No	Jenis Uji	Isolat		
		FBK 1	FBK 2	FBK 3
1	Uji TSIA	r/y	y/y	y/y
2	Uji Indol	-	-	-
3	Uji motilitas	-	-	-
4	Uji MR	+	+	+
5	Uji VP	-	-	-
6	Uji Tipe Fermentasi	Ho	Ho	Ho
7	Uji Katalase	-	-	-
8	Uji ketahanan suhu			
	Suhu 14°C	+	+	+
	Suhu 37°C	+	+	+
	Uji ketahanan garam			
9	NaCl 5%	+	+	+
	NaCl 6,5%	+	+	+
	NaCl 10%	+	+	+

Keterangan:

- +
 -
 - r/y
 - y/y
 - Ho
- : Terjadi reaksi menghasilkan hasil positif
: Tidak terjadi reaksi menghasilkan hasil negatif
: Slant merah/butt kuning
: Slant kuning/butt kuning
: Homofermentatif

Klasifikasi isolat bakteri ke dalam genus dan spesies didasarkan pada sifat morfologi koloni, morfologi sel dan uji biokimia dengan mengacu pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hasil identifikasi menunjukkan dua isolat bakteri termasuk kelompok bakteri dari famili Lactobacillaceae, genus *Lactobacillus*, yaitu isolat FBK 1 dan FBK 3. Sedangkan bakteri isolat FBK 2 termasuk kelompok bakteri dari famili Lactobacillaceae, genus *Enterococcus*.

4. Uji Antimikroba

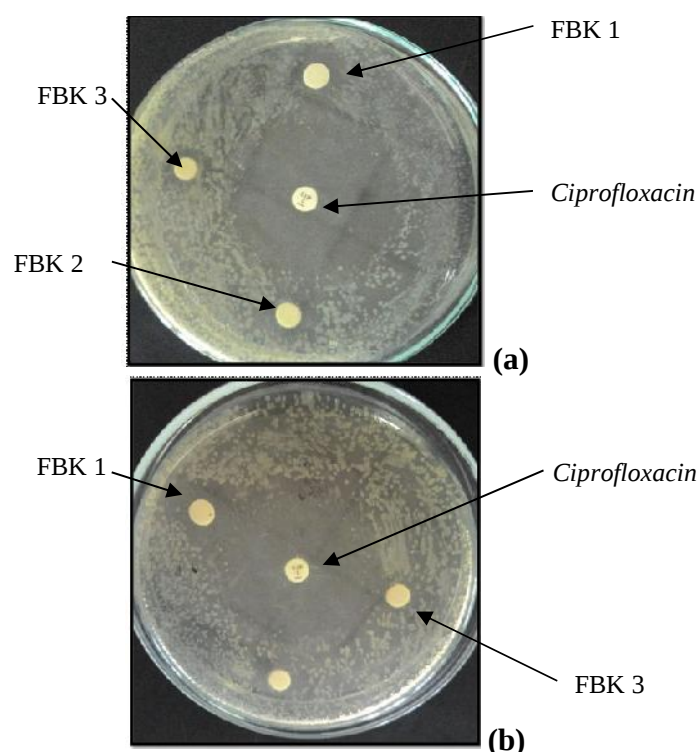
Berdasarkan hasil uji antimikroba, isolat bakteri asam laktat mampu menghambat *E. coli* dan *S. aureus*. Dalam pengujian antimikroba ini digunakan dua bakteri patogen yaitu *E. coli* dan *S. aureus* yang masing-masing mewakili kelompok bakteri Gram positif dan negatif. Dalam Tabel 3 disajikan diameter penghambatan tiga isolat yang diisolasi dari fermentasi biji kakao terhadap bakteri patogen. Adanya aktivitas hambat ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram. Zona bening terbentuk dengan ukuran yang bervariasi. Kemampuan ketiga isolat bakteri asam laktat dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji berbeda-beda.

Tabel 3. Uji antimikroba ketiga isolat terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

No	Antimikroba	Diameter (mm)		Kategori berdasarkan Morales <i>et al.</i> , (2003)
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
1	FBK 1	17	15	Kuat
2	FBK 2	15	12	Kuat
3	FBK 3	16	13	Kuat
4	Ciprofloxacin	34	32	Sangat kuat

Isolat FBK 1 merupakan isolat yang memiliki kemampuan penghambatan tinggi terhadap pertumbuhan bakteri patogen *E. Coli* dengan diameter 17mm dan *S. aureus* dengan diameter 15mm (Gambar 4). Kontrol positif ciprofloxacin menunjukkan aktivitas hambat yang

paling besar terhadap bakteri uji dibandingkan dengan isolat bakteri asam laktat yaitu dengan luas zona hambat 34mm terhadap *E.coli* dan 32mm terhadap *S. aureus*.



Gambar 4. Hasil uji antimikroba pada media *nutrient agar* (NA) dengan (a) bakteri indikator *S. aureus* dan (b) bakteri indikator *E. coli*.

Menurut Morales *et al.* (2003), aktivitas zona hambat dikelompokkan menjadi empat kategori yaitu: aktivitas lemah (<5mm), sedang (5–10mm), kuat (>10–20mm), sangat kuat (>20–30mm). Penelitian Syukur (2011) menemukan 11 isolat bakteri asam laktat hasil isolasi dari fermentasi biji kakao dengan diameter zona hambat yang paling tinggi terhadap lima bakteri patogen, yaitu 11 sampai 12mm. Hasil penelitian yang telah dilakukan Fatimawali (2004) menemukan isolat bakteri asam laktat dengan diameter zona hambat yang bervariasi 8 sampai 12mm terhadap bakteri *S. aureus*, sedangkan terhadap *E. coli* dengan

diameter zona hambat 9 sampai 14mm. Menurut Kusmarwati dan Ninoek (2008), aktivitas daya hambat bakteri dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm.

Menurut Pelczar and Chan (2008), semakin besar zona bening yang terbentuk, maka semakin besar aktivitas penghambatan isolat bakteri asam laktat terhadap bakteri patogen. Aktivitas bakteri asam laktat dalam menghambat bakteri Gram negatif *E. coli* lebih peka bila dibandingkan terhadap bakteri Gram positif *S. aureus*. Hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan struktur dinding sel kedua jenis bakteri tersebut.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteri Asam Laktat (BAL) yang didapatkan sebanyak tiga isolat (FBK 1, FBK 2 dan FBK 3).
2. FBK 1 dan FBK 3 termasuk kelompok bakteri genus *Lactobacillus*, sedangkan FBK 2 termasuk kelompok bakteri genus *Enterococcus*.
3. Diameter zona hambat untuk isolat FBK 1, FBK 2 dan FBK 3 termasuk kategori aktivitas kuat, sedangkan antibiotik *ciprofloxacin* termasuk kategori aktivitas paling kuat.

Ucapan terima kasih

Ucapan terima kasih juga kepada Jurusan Biologi Unsyiah yang telah mengizinkan tim untuk melakukan kegiatan penelitian serta semua pihak yang telah membantu kesuksesan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Cullimore, R.D. 2000. *Principal Atlas For Bacterial Identification*. Lewis Publisher, United States of America.
- Delfahedah, Y., Syukur, S., dan Jamsari. 2013. *Isolasi Karakterisasi dan Identifikasi DNA*

- Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid (Trinitario). *Jurnal Kimia Unand*. 2(4): Halaman.
- Fatimawali., Deby, A. M. dan Weny I. W. 2004. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus*) *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* Secara In-Vitro. *Jurnal kimia*. 1(9): Halaman.
- Ferry, E.S., Onny S.S., dan Balonggu, S. 2013. Respons Pertumbuhan Bibit Kakao Terhadap Vermikompos dan Pupuk P. *Jurnal Online Agroekoteknologi*. 1(4)
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Gramedia, Jakarta.
- Kusmarwati, A., dan Ninoek, I. 2008. Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium Edule* Reinw.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3(1):2.
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., and Clark, D. 2011. *Biology of Microorganisms* Thirteenth Edition. Pearson Education International. USA.
- Morales, G., Sierra, P., Mancilla, Paredes, A., Loyola, L.A., Gallardo, O., and Borquez, J. 2003. Secondary metabolites from four medicinal plants from Northern Chile, antimicrobial activity, and biotoxicity against *Artemia salina*. *J. Chile Chem*. 48(2).
- Pelczar, M. J. dan Chan, E.C.S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi 2*, Alih bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S. L. UI Press, Jakarta.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara, Jakarta.
- Rahayu, S.R. 2003. Lactid Acid Bacteria in Fermented Food of Indonesia Origin. *Agritech, Majalah Ilmu dan Teknologi Pertanian* 23(2): 75-84.
- Rahayu, S.R. 2004. *Makanan Fermentasi dan Probiotik*. Pusat Studi Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Salminen and Von. 1998. The Lactic Acid Bacteria. *Microbes of Diversity. J. Food Technol*. 1: 60 – 65.
- Siregar, A.A. 2013. Kemampuan Antimikroba Susu Kambing Fermentasi Akibat Perlakuan Suhu dan Lama Pasteurisasi Yang Berbeda. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.
- Sunatmo, T.I. 2007. *Eksperimen Mikrobiologi Dalam Laboratorium*. Penerbit ArdyAgency, Bogor.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Tri Cipta Karya, Jakarta.
- Syukur, S., Urnemi, Endang, P., Sanusi, I. D. Jamsari. 2011. Potensi Bakteri Asam Laktat Dalam Menghasilkan Bakteriosin Sebagai Antimikroba Dan Pengukuran Berat Molekulnya Dengan Sds-Page Dari Isolat Fermentasi Kakao. *Jurnal Kimia*. 4(2): Halaman.
- Volk, W. A., dan Wheeler. M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan dari Basic Biology oleh Adisoemarto. Erlangga, Jakarta.
- Volk, W. A., dan Wheeler, M. F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Erlangga, Jakarta.
- Vandepitte. 2005. *Prosedur Laboratorium Dasar untuk Bakteriologi Klinis*. Edisi 2. Buku kedokteran EGC, Jakarta.