

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM ASETAT DARI FERMENTASI KAKAO ACEH

Yusya Abubakar¹, Heru P. Widayat¹, Murna Muzaifa¹, dan Fitriah Atul Mega²

¹ Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

² Alumni Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

Email: murnamuzaifa@unsyiah.ac.id

ABSTRAK

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman tropis yang berasal dari hutan tropis di Amerika Selatan yang juga menjadi komoditas andalan Aceh. Pengolahan kakao menjadi cokelat membutuhkan proses fermentasi untuk meningkatkan cita rasa yang dihasilkan nantinya. Proses fermentasi tersebut melibatkan mikroorganisme, salah satunya adalah bakteri asam asetat. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui genus bakteri asam asetat yang berperan pada proses fermentasi kakao Aceh. Penelitian ini bersifat eksploratif yang dilakukan dalam 3 tahap, yaitu: fermentasi kakao, sampling serta isolasi dan identifikasi isolat bakteri secara konvensional berdasarkan sifat morfologi, sifat fisiologis dan biokimia. Pengambilan sampel untuk isolasi bakteri dilakukan pada fermentasi hari ke 2, 3 dan 4 pada 5 titik berbeda. Data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel serta dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan morfologi koloni dihasilkan 3 isolat dugaan bakteri asam asetat yaitu F1, F2 dan F3. Adapun berdasarkan hasil uji fisiologis dan biokimia, ketiga isolat teridentifikasi sebagai genus *Acetobacter* sp. dan *Gluconobacter* sp.

Kata kunci-*Acetobacter* sp. *Gluconobacter* sp, bakteri asam asetat, fermentasi, kakao

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan tanaman tropis yang berasal dari hutan tropis di Amerika Selatan. Berdasarkan jenisnya, tanaman ini diklasifikasikan menjadi 3 jenis yaitu *criollo* (kakao mulia), *forastero* (kakao lindak) dan *trinitario* yang merupakan hasil perkawinan silang antara kakao jenis *criollo* dan *forastero* (Susanto, 1994).

Salah satu provinsi yang memenuhi kebutuhan kakao negara Indonesia adalah Aceh. Luas perkebunan kakao di Aceh mencapai 102,034 Ha dengan produksi mencapai 34,795 ton. Kabupaten Aceh Tenggara, Aceh Timur dan Pidie Jaya merupakan tiga kabupaten terbesar yang berkontribusi secara signifikan terhadap produktivitas kakao di Provinsi Aceh (BPS, 2015).

Kualitas kakao di Aceh belum sepenuhnya dikaji. Diketahui bahwa mutu kakao dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah pengolahan. Proses pengolahan kakao terdiri atas beberapa tahapan dan salah satu tahapan terpenting dalam mengolah biji kakao adalah fermentasi. Fermentasi merupakan proses pemeraman biji kakao selama beberapa hari sebelum dilakukan pengeringan dengan bantuan mikroorganisme yang secara alamiah terdapat pada biji kakao tersebut. Proses yang memakan waktu cukup lama ini bertujuan untuk membentuk cita rasa yang baik, khas dan konsisten pada cokelat yang dihasilkan nantinya. Secara umum para petani di Provinsi Aceh jarang melakukan proses tersebut. Diduga lamanya proses fermentasi yang berlangsung dan tidak konsistennya kualitas hasil yang diperoleh menjadi alasan umum tidak dilakukannya proses fermentasi oleh petani. Padahal proses ini sangat penting dalam pembentukan flavor khas kakao.

Camu dkk (2008) menyatakan bahwa pembentukan flavor dalam biji kakao dipengaruhi oleh aktivitas mikroorganisme selama fermentasi. Nielsen dkk (2007) menyatakan bahwa mikroorganisme yang sering ditemukan pada kakao Ghana adalah kelompok khamir, bakteri asam asetat dan bakteri asam laktat. Disamping itu, kapang juga dapat ditemui pada fermentasi kakao (Leal dkk., 2008).

Ardhana dan Fleet (2003) menyebutkan bahwa kelompok bakteri asam asetat yang umum ditemui pada fermentasi biji kakao adalah genera *Acetobacter* dan *Gluconobacter*. Bakteri asam asetat mampu mengoksidasi alkohol yang dihasilkan pada awal fermentasi biji kakao oleh yeast menjadi asam asetat (Drysdale dan Fleet, 1989), sehingga bakteri tersebut dapat berperan dalam mempengaruhi citarasa kakao. Abubakar dkk (2012) telah mengkaji pengaruh pengadukan dengan interval dan lama fermentasi yang berbeda terhadap citarasa kakao Aceh. Namun kaitannya dengan

keberadaan mikroorganisme indigenus kakao Aceh belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri asam asetat yang terlibat pada proses fermentasi kakao Aceh. Lebih lanjut bakteri asam asetat ini diharapkan bisa menjadi *starter* dalam proses fermentasi kakao Aceh, sehingga dapat mempersingkat masa fermentasi biji kakao.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Industri, Laboratorium Pengolahan Hasil Hutan dan Perkebunan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh. Penelitian berlangsung selama tiga bulan sejak sampling bahan baku hingga identifikasi bakteri.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kakao yang diperoleh dari kabupaten Pidie Jaya, media *GYC* (*Glucose Yeast Carbonat*), pepton, akuades, manitol, glukosa, laktosa, strip *oxidase* dan alkohol 70%.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kotak kayu ukuran 40 x 40 cm, daun pisang, terpal, *laminar flow cabinet* (Bassair G 04HB, Bassaire), inkubator (Soft Incobator SLI-450 N, EYELA), *autoclave* (Eyela Autoclave Mac-501), oven, cawan petri, mikroskop cahaya, mikroskop foto digital (Olympus), tabung reaksi, *hot plate*, timbangan analitik, pipet tetes, pipet volum, jarum ose, gelas objek, *beaker glass*, *erlenmeyer*, lemari es, sarung tangan dan masker.

C. Prosedur Percobaan

Penelitian ini terbagi menjadi 3 tahapan, yaitu: (1) Fermentasi kakao, (2) Sampling, (3) Isolasi dan identifikasi isolat bakteri asam asetat secara konvensional berdasarkan sifat morfologi, biokimia dan fisiologis.

1. Fermentasi Kakao

Buah kakao yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari petani kakao di Kabupaten Pidie Jaya. Buah yang diperoleh dari petani sudah mengalami pemeraman. Selanjutnya, biji dan kulit (*pod*) kakao dipisahkan. Lalu biji kakao difermentasi didalam kotak kayu yang ditutupi daun pisang selama 6 hari dengan pengadukan setiap 24 jam.

2. Sampling

Pengambilan sampel biji kakao terfermentasi dilakukan pada hari ke-2, ke-3 dan ke-4. Pengambilan sampel dilakukan secara aseptis dan dimasukkan ke dalam wadah steril sebanyak 50 gram. Selanjutnya sebanyak 10 gram dari sampel tersebut dihomogenkan dalam larutan pepton 90 ml pepton dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator dengan suhu 30 °C.

3. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Asetat

Selanjutnya sampel yang telah diinkubasi tersebut digunakan sebagai sumber isolat dengan mengambil 1 ml cairan hasil inkubasi dan dilakukan pengenceran berseri. Sebanyak 0,1 ml aliquot dari pengenceran yang sesuai ditumbuhkan dalam media selektif bakteri asam asetat yaitu *Glucose Yeast Carbonat* (GYC) dengan komposisi 5% D- glukosa, 1% *yeast extract*, 0,5% CaCO₃ dan 2% agar. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap koloni yang tumbuh. Koloni yang terpisah, tunggal dan berbeda diisolasi dan dimurnikan secara berulang dengan metode *streaking* sehingga diperoleh isolat murni.

Isolat murni selanjutnya diidentifikasi dengan melakukan pengamatan terhadap karakteristik morfologi koloni dan sel serta karakteristik biokimia dan fisiologis yang terdiri atas uji pewarnaan Gram, oksidase, motilitas, fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa dan manitol), produksi H₂S dan pertumbuhan sel pada suhu 15°C.

D. Analisis data

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium eksploratif. Data yang diperoleh dari penelitian ini ditampilkan dalam bentuk gambar dan tabel. Data dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

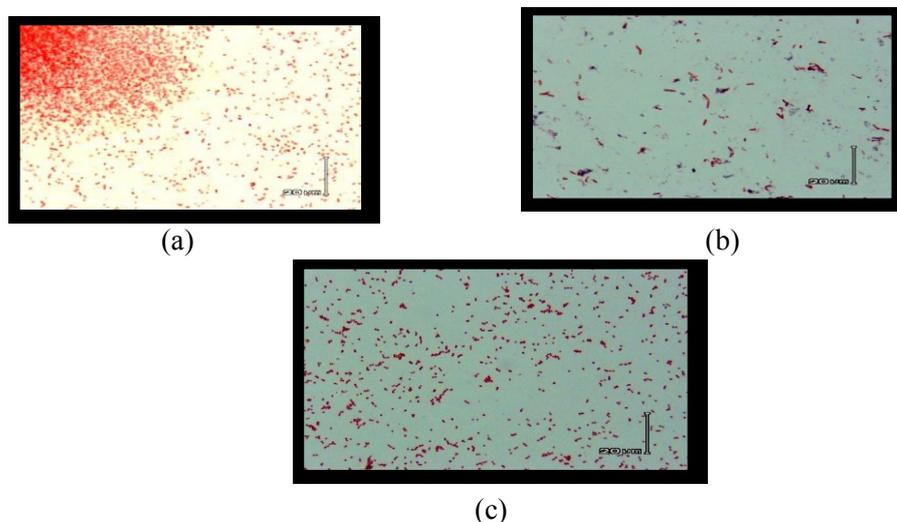
A. Karakteristik Isolat Bakteri Asam Asetat

Pada tahap isolasi awal diperoleh 14 isolat murni dugaan bakteri asam asetat. Seluruh isolat selanjutnya dikarakterisasi lebih lanjut. Berdasarkan karakteristik morfologi koloni dan sel serta karakteristik biokimia dan fisiologis sel, diperoleh tiga kelompok isolat murni yaitu F1, F2 dan F3. Secara keseluruhan karakteristik ketiga isolat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik morfologi, biokimia dan fisiologis isolat bakteri asam asetat asal kakao Aceh

Uji morfologi, biokimia dan fisiologis	Isolat		
	F1	F2	F3
Koloni:			
▪ Bentuk	sirkular	sirkular	sirkular
▪ Permukaan	halus	halus	halus
▪ Tepi	rata	berlekuk	rata
▪ Elevasi	timbul	timbul	timbul
▪ Warna	krem	krem	Krem pekat
Sel:			
▪ Bentuk	kokobasil	basil	kokus
▪ Gram	-	-	-
▪ Motilitas	non motil	motil	Non motil
▪ Oksidase	-	-	-
▪ H ₂ S	-	-	-
▪ Karbohidrat:			
- Glukosa	+	+	+
- Laktosa	-	-	-
- Manitol	+	-	-
▪ Pertumbuhan pada suhu 15°C	+	-	-

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa bentuk koloni yang dihasilkan seluruhnya berbentuk sirkular (melingkar) dengan permukaan halus. Karakteristik morfologi koloni ini merupakan upaya pengujian awal (*preliminary evaluation*) dalam mengidentifikasi jenis bakteri dan tentu saja tidak dapat langsung mengidentifikasi jenis bakteri yang dimaksud. Identifikasi selanjutnya dilakukan secara mikroskopis dengan melihat bentuk sel dan pewarnaan Gram. Uji Gram merupakan Dengan pewarnaan Gram bentuk sel juga dapat terlihat dengan jelas. Dalam penelitian ini bentuk sel yang diperoleh bervariasi yaitu kokus, basil hingga kokobasil sebagaimana terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi sel isolat bakteri asam asetat (a) kokus (F1); (b) basil (F2); (c) Kokus (F3)

Bentuk bakteri asam asetat memang bervariasi mulai dari bentuk ellipsoidal (kokobasil), kokus hingga basil serta karakteristik pentingnya adalah bersifat Gram negatif (Hanmounjai dkk., 2007; Klawpiyapamornkun, 2015). Gram negatif, artinya dinding sel bakteri asam asetat tidak mampu mempertahankan warna kristal violet pada saat pewarnaan gram sehingga akan berwarna merah saat diamati dengan mikroskop. Hal ini dipengaruhi oleh komponen kimia dinding sel bakteri terutama kandungan peptidoglikan dan lipid. Berdasarkan komposisi kimia dinding sel dan permeabilitas membran selnya, bakteri dibagi menjadi dua kelompok yaitu Gram positif dan Gram negatif. Proses dekolorisasi pelarut pada saat uji pewarnaan menyebabkan kerusakan signifikan pada permukaan sel bakteri Gram-negatif dan hanya kerusakan terbatas pada bakteri Gram-positif. Hal ini menunjukkan bakteri Gram-negatif lebih "bocor," yang menyebabkan sel-sel kaya lipid ber dinding tipis ini kehilangan pewarnaan kristal violet. Bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis (10% dari dinding sel) dan kehilangan kompleks CV-iodine selama dekolorisasi (Thairu dkk., 2014).

Pada uji motilitas, masing-masing isolat yang diuji ditusukkan ke dalam agar menggunakan *needle*. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 30°C. Hasil yang diperoleh dari pengujian motilitas bakteri menunjukkan bahwa hanya isolat F2 yang bersifat motil dan isolat F1 dan F2 bersifat non motil. Hal ini dapat dilihat dari pertumbuhannya yang tidak menyebar pada medium pertumbuhan tersebut. Motilitas isolat bakteri asam asetat dapat bervariasi dari motil hingga non motil. Namun pada penelitian Arifuzzaman dkk (2014) seluruh isolat bakteri asam asetat yang diuji bersifat motil. Motilitas berkaitan dengan keberadaan flagel yang dimiliki oleh suatu bakteri, dengan kata lain yang bertanggung jawab terhadap motilitas bakteri adalah flagel. Flagela ini dapat terlihat diluar sel atau tersembunyi dalam sel (Minamino dan Imada, 2015; Terashima dkk., 2017). Motilitas dapat menjadi atribut virulensi penting untuk bakteri patogen dan juga berperan dalam simbiotik mutualisme (Nakamura dan Minamino, 2019).

Hasil uji oksidase menunjukkan bahwa seluruh isolat bersifat oksidase negatif. Uji oksidase dilakukan untuk menentukan adanya sitokrom oksidase yang ditemukan pada mikroorganisme tertentu. Pada penelitian ini digunakan strip oksidase (*dimetil-p-fenillendiamin oksalat*). Isolat bakteri yang bersifat oksidase positif, maka strip oksidase akan berwarna ungu dalam waktu 5 detik. Namun jika strip tidak mengalami perubahan warna, maka koloni bakteri tersebut bersifat oksidase negatif. Hasil yang diperoleh pada isolat bakteri F1, F2 dan F3 seluruhnya adalah oksidase negatif. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh isolat adalah benar sebagai bakteri asam asetat yang dikonfirmasi dengan hasil uji Gram (Arifuzzaman dkk., 2014).

Produksi H₂S oleh mikroorganisme dapat terlihat dengan menggunakan media yang mengandung polipeptida, asam amino yang mengandung sulfur dan ion Fe²⁺. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah TSIA yang mengandung senyawa FeSO₄. Pada media ini H₂S (asam disulfida) akan bereaksi dengan logam Fe²⁺ yang terdapat dalam medium, menjadi FeS (ferro sulfida) yang berwarna hitam (Lay, 1994). Hasil uji terhadap ketiga isolat yaitu F1, F2 dan F3 menunjukkan bahwa pada medium TSIA tidak terbentuk endapan berwarna hitam dibagian bawah tabung. Hal ini berarti, semua isolat bakteri tersebut tidak mempunyai enzim desulfurase yang berfungsi untuk memecah sistin dengan menghasilkan H₂S. Sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri hasil fermentasi biji kakao ini tidak mampu menggunakan asam amino sistin sebagai sumber energinya.

Fermentasi merupakan salah satu aktivitas fisiologis atau biokimia sel yang dilakukan oleh mikroba untuk menghasilkan energi. Uji fermentasi karbohidrat merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memfermentasi berbagai jenis gula yang digunakan dalam pengujian sehingga dapat ditentukan jenisnya. Setiap bakteri mempunyai kemampuan berbeda dalam memfermentasi gula yang digunakan sebagai sumber energinya dan fermentasinya dapat menghasilkan berbagai senyawa akhir seperti asam-asam organik, asam laktat, propionate, ester dan keton (Pelczar, 2008). Dalam penelitian ini jenis karbohidrat yang digunakan adalah glukosa, laktosa dan manitol yang berupa larutan gula berwarna ungu. Bakteri dianggap mampu memfermentasi berbagai gula jika larutan gula tersebut berubah menjadi warna kuning. Hasil pengujian fermentasi karbohidrat ini, isolat F1 dan F2 mampu memfermentasi glukosa sedangkan isolat F3 tidak mampu memfermentasi glukosa. Untuk jenis gula laktosa, ketiga isolat bakteri tidak mampu memfermentasi gula tersebut. Sedangkan untuk manitol, hanya isolat F1 yang mampu mengubah larutan manitol menjadi warna kuning.

Pada pengujian terakhir, dilakukan uji fisiologis untuk melihat kemampuan isolat tumbuh pada suhu 15^oC. Hasil uji menunjukkan bahwa isolat F1 mampu tumbuh pada suhu 15^oC, sedangkan isolat F2 dan F3 tidak mampu beradaptasi pada suhu 15^oC. Suhu pertumbuhan dapat menjadi pembeda jenis bakteri karena setiap bakteri mempunyai suhu optimal pertumbuhan yang berbeda-beda. Kadere dkk (2011) menyebutkan bahwa bakteri asam asetat yang dominan ditemukan pada fermentasi kakao adalah dari genus *Acetobacter* dan *Gluconobacter*. Perbedaan kedua genus ini dapat diketahui dari kemampuan tumbuhnya pada suhu 15^oC.

B. Pendugaan Jenis Bakteri

Berdasarkan hasil uji Gram dan oxidase maka benar bahwa isolat yang diuji adalah bakteri asam asetat. Hasil pengujian lanjut secara biokimia dan fisiologis menunjukkan bahwa karakteristik isolat F1 adalah mampu memfermentasi glukosa dan manitol, tidak mampu memfermentasi laktosa serta dapat tumbuh pada suhu 15^oC. Isolat bakteri F1 diduga merupakan jenis bakteri *Gluconobacter* sp., dimana sifat spesifik dari bakteri *Gluconobacter* sp. adalah isolat yang dapat tumbuh pada suhu 15^oC dan bereaksi positif pada jenis gula manitol Kadere dkk. (2011). Dengan menggunakan pengujian sifat fisiologis yang sama, isolat F2 dan F3 diduga merupakan jenis bakteri *Acetobacter* sp. Dugaan ini diperkuat dengan sifat fisiologis isolat bakteri yang tidak mampu tumbuh pada suhu 15^oC serta tidak mampu memfermentasi gula manitol.

KESIMPULAN

Diperoleh tiga isolat murni F1, F2 dan F3 asal kakao Aceh dengan karakteristik morfologi, biokimia dan fisiologis yang bervariasi. Berdasarkan hasil uji tersebut, isolat F1 teridentifikasi sebagai genus *Gluconobacter* sp., sedangkan isolat F2 dan F3 adalah genus *Acetobacter* sp. Perlu dilakukan uji molekuler untuk dapat mengidentifikasi bakteri hingga tingkat spesies serta perlu dilakukan karakterisasi kemampuan ketiga isolat sebagai starter dalam fermentasi kakao Aceh.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, Y., Anhar, A., Nurhayati, Indarti, E. 2012. Effect of mixing techniques and intervals during fermentation on cocoa bean quality in Aceh, Indonesia. Proceeding of International Conference on Food Science and Nutrition. Kinabalu. Malaysia
- Ardhana, M.M, G.H. Fleet. 2003. The Microbial Ecology of Cocoa Bean Fermentation in Indonesia. International Journal of Food Microbiology. 86: 87-89
- Arifuzzaman, Md., Md Z. Hasan., S.M.B. Rahman., Md K Pramanik. 2014. Research & Reviews in BioSciences RRBS, 8(9): 359-365.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2015. Aceh Dalam Angka 2015. BPS, Banda Aceh.
- Camu, N., T.D. Winter., S.K. Addo., J.S. Takrama., H. Bernart dan L.D. Vuyst. 2008. Fermentation of Cocoa Beans: Influence of Microbial Activities and Polyphenol Concentrations on the Flavour of Chocolate. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 88: 2288-2297.
- Drysdale, G.S. dan Fleet, G.H. 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. Journal of Applied Bacteriology 67: 471-481
- Hanmoungjai, W., E Chukeatirote, W Pathom-aree, Y Yamada & S Lumyoung. 2007. Identification of Acidotolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Thailand Source. Reasearch Journal of Microbiology, 2(2): 194-197.
- Kadere T.T., T. Miyamoto, R.K. Oniang'o, P.M. Kutima dan S.M. Njoroge. Isolation and dentification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). African Journal of Biotechnology, 7 (16), 2863-2971.
- Klawpiyapamornkun, T., Bovonsombut, S. Bovonsombut. 2015. Isolation and Characterization of Acetic Acid Bacteria from Fruits and Fermented fruit juices for Vinegar Production. Food and Applied Bioscience Journal, Vol 3 (1): 30-38.
- Lay B.W. 1994. Analisis Mikroorganisme di Laboratorium. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Leal, G. A., Gomes, L. H., Efraim, P., de Almeida Tavares, F. C., dan Figueira, A. 2008. Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus*

- strain improved product quality attributes. Federation of European Microbiological Societies, Yeast Research 8:788-798.
- Minamino, T dan K. Imada. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. Trends Microbiol. 2015, 23, 267–274
- Nakamura, S dan T. Minamino. 2019. Flagella-driven Motility of Bacteria. Biomolecules 9 (7): 279.
- Pelczar, M.J. 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi Djambatan, Malang.
- Susanto F.X. 1994. Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Terashima, H., A. Kawamoto, Y.V. Morimoto, K. Imada, T. Minamino. 2017. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. Biophys. Physicobiology 14:191–198
- Thairu, Y., I.A Nasir. Y. Usman. 2014. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases Sub-Saharan African Journal of Medicine. Vol 1(4): 168-174