

**ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI KAKAO
(*Theobroma cacao* Linn.) VARIETAS FORESTERO SERTA STUDI
AKTIVITAS PROTEINASE**

Skripsi Sarjana Kimia

Oleh :

ALHADI NASUTION

06 932 012



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2010**

ABSTRAK

ISOLASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI FERMENTASI KAKAO (*Theobroma Cacao* Linn.) VARIETAS FORESTERO SERTA STUDI AKTIVITAS PROTEINASE

Oleh :

Alhadi Nasution

Sarjana Sains (S.Si) dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Andalas
Dibimbing oleh Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M. Sc dan Dra. Marniati Salim, MS

Telah diisolasi mikroba yang berupa Bakteri Asam Laktat (BAL) dari fermentasi kakao (*Theobroma cacao* Linn.) varietas Forestero (green) pada hari ketiga fermentasi bakteri ditanam ke media MRS agar tetapi sebelumnya di enrichment terlebih dahulu pada MRS broth. Dari hasil pewarnaan gram terlihat bakteri yang dihasilkan berbentuk batang (bacil) yang dapat menyerap warna violet yang menandakan bakteri itu bakteri gram positif. Isolat BAL dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Escheria Coli* dengan zona bening 15 mm, sedangkan untuk bakteri patogen *Salmonella sp.* tidak dapat dihambat pertumbuhannya. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan menurut metoda Lowry dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Aktivitas enzim optimum dengan substrat kasein sebesar 0,001290 $\mu\text{mol}/\text{menit}$, suhu 30°C dan $\text{pH} = 7$. Kation Mg^{+2} bersifat sebagai aktivator untuk isolat BAL sedangkan kation Hg^{+2} dan Co^{+2} bertindak sebagai inhibitor. Hasil SDS-PAGE menunjukkan berat molekul protein sebesar 24 kDa.

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* Lin) merupakan salah satu komoditi yang penting bagi perekonomian. Komoditas biji kakao pada suatu saat diharapkan memperoleh posisi yang sejajar dengan komoditas perkebunan lain seperti karet, kopi, dan kelapa sawit. Kakao (*Theobroma cacao* Linn) berasal dari hutan – hutan tropis di Amerika tengah dan Amerika Selatan bagian utara. Kakao pertama kali digunakan sebagai bahan makanan dan minuman oleh suku Indian Maya dan suku Aztek. Kakao berdasarkan populasinya dibagi menjadi tiga kelompok besar, yaitu *Criollo*, *Forestero* dan *Trinitario*. Populasi kakao *Forestero* lebih dominan di Indonesia dibanding jenis yang lain karena kakao jenis ini lebih tahan terhadap hama dan lebih produktif.¹

Kakao merupakan bahan makanan yang mengandung nutrisi yang relatif lengkap, karena didalamnya terdapat lemak, protein, karbohidrat, vitamin, mineral dan senyawa bioaktif yang dapat memberi efek fisiologis dan farmakologis. Kakao kaya akan asam lemak jenuh (stearat dan palmitat), tetapi tidak meningkatkan kolesterol darah karena termasuk lipoprotein densitas tinggi atau *high density lipoprotein* (HDL). Kakao juga mengandung asam lemak tak jenuh (oleat dan linoleat) yakni asam lemak yang berperan menurunkan kolesterol darah dan memberi efek positif pada kesehatan jantung. Kakao mengandung asam amino yang lengkap bagi pemeliharaan protein tubuh, kaya akan vitamin A, D, E dan sumber vitamin B seperti Tiamine, Riboflavin, dan Niasin. Pada kakao juga terdapat beberapa mineral yang sangat diperlukan tubuh seperti Kalium, Magnesium, Besi dan Fosfor.²

Perubahan biokimia selama fermentasi dilakukan oleh mikroorganisme. Pada 24 jam pertama enzim akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Mikrobia tumbuh pada gula ini dan suhu akan naik menjadi 4- 50 C dan terjadilah perubahan warna pada biji kakao. Berbagai mikroorganisme akan tumbuh disini. Pulp mengandung air dengan gula 10 – 15%. kandungan gula yang

tinggi dalam pulp akan memacu pertumbuhan khamir yang mengubah gula menjadi alkohol dalam suasana anaerob. Spesies khamir yang sering ada adalah: *Caccharomyces cerevisiae*, *Candida rugosa* dan *Kluyveromyces marxianus*. Selain menghasilkan alkohol juga menghidrolisis pektin yang menutupi biji. Khamir akan mati oleh alkohol yang dihasilkan dan juga oleh suhu yang makin tinggi. Bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus* dan *Streptococcus* akan tumbuh. Pulp diaduk untuk aerasi. Adanya oksigen dan Ph rendah menjadikan bakteri asam asetat tumbuh (*Acetobacter* dan *gluconobacter*). setelah 5 hari masa fermentasi dapat mengandung mikrobial 100 juta per gramnya. Biji kemudian dikerinngkan. Selama pengeringan dapat tumbuh jamur *Geotrichum* yang akan mengoksidasi asam asetat menjadi asam suksinat. Jika fermentasi dilanjutkan terus akan muncul bau yang tidak diharapkan karena pertumbuhan bacillus dan kapang (*Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Mucor*) yang menghidrolisis lipid dalam biji dan menghasilkan asam lemak rantai pendek. pH menjadi sekitar 7 dan tumbuhlah *Pseudomonas*, *Enterobacter* atau *Escherichia coli* yang menghasilkan bau dan rasa tidak enak.¹²

Fermentasi biji kakao mengandung Bakteri Asam Laktat (BAL) yang berfungsi sebagai agen probiotik yang diberikan sebagai suplementasi makanan. Pemberian probiotik dapat berpengaruh menguntungkan bagi kesehatan karena probiotik menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat yang menyebabkan suasana usus menjadi asam sehingga menurunkan pertumbuhan dan patogenitas bakteri serta memperbaiki keseimbangan mikroflora usus.³ Beberapa genus bakteri ini juga menghasilkan senyawa inhibitor lain seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan bakteriosin yang memberikan efek antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen.^{3,4}

Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. Pemanfaatan BAL oleh manusia telah dilakukan sejak lama, yaitu untuk proses fermentasi makanan. Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa BAL telah diisolasi dari dadih dan tempoyak durian. BAL merupakan kelompok besar bakteri menguntungkan yang memiliki sifat relatif sama. Saat ini BAL digunakan untuk pengawetan dan

memperbaiki tekstur dan cita rasa bahan pangan.⁵ BAL mampu memproduksi asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, hidrogen peroksida, dan bakteriosin. Dengan terbentuknya zat antibakteri dan asam maka pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *E. coli* akan dihambat.⁷ Bakteri yang termasuk kelompok BAL adalah *Aerococcus*, *Alloccoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, dan *Vagococcus*.⁹

BAL dikenal karena produksi senyawa antimikrobanya seperti bakteriosin. Bakteriosin BAL didefinisikan sebagai protein yang disintesis pada ribosom dan merupakan protein kompleks yang antagonis terhadap organisme yang secara genetik masih berdekatan. Lebih dari 300 bakteriosin yang berbeda telah dijelaskan dari genus *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* dan *Enterococcus*.¹²

BAL pada umumnya menghasilkan protease yang mampu memecah protein menjadi asam laktat. Enzim yang dihasilkan merupakan enzim yang sangat kompleks yang mempunyai sifat fisikokimia dan sifat katalitik yang berbeda-beda. Proteinase adalah enzim yang dapat mendegradasi substrat berupa protein. Penggolongan proteinase di bagi atas empat yaitu proteinase serin, proteinase thiol, proteinase, proteinase asam, dan proteinase logam.²⁴

Berdasarkan hal diatas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang bakteri asam laktat yang terdapat pada fermentasi kakao serta uji optimasi untuk mendegradasi substrat dengan parameter jenis substrat, pH, suhu, kation divalen, serta idenfikasinya dengan pewarnaan gram, uji antimikroba, dan penentuan berat molekul dengan Sodium Dodosyl Sulfate-Poliacrilamide Gel Electroforesys (SDS-PAGE).

1.2. Perumusan Masalah

Masih belum adanya penelitian tentang Bakteri Asam Laktat (BAL) yang di dapatkan dari fermentasi kakao yang tumbuh di Indonesia, sedangkan di Indonesia banyak tumbuh kakao sebagai hasil perkebunan rakyat.

BAB V KASIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan :

1. Hasil isolasi Bakteri Asam Laktat dari fermentasi kakao varietas Forestero di dapatkan isolat yang potensial menghasilkan enzim laktase yang terbukti mampu mendegradasi kasein dengan baik. Koloni tunggal isolat BAL yang di dapatkan berwarna putih, mengkilat, dan cembung.
2. Dari hasil pewarnaan gram isolat BAL yang didapatkan berbentuk basil (batang) yang merupakan bakteri gram positif.
3. Hasil uji antimikroba menunjukkan isolat BAL mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella sp.*
4. Bakteri Asam Laktat yang dihasilkan mempunyai aktivitas enzim yang baik dengan substrat kasein, pada suhu 30 °C, dan pH 7. Kation Mg^{+2} bersifat aktivator bagi isolat BAL, sedangkan kation Hg^{+2} dan Co^{+2} bersifat inhibitor.
5. Adapun berat molekul protein yang didapatkan adalah sebesar 24 kDa.

5.2. Saran

1. Disarankan untuk memurnikan ekstrak kasar enzim dengan kolom sephadex agar enzim yang diukur lebih murni.
2. Disarankan untuk melakukan uji aktivitas enzim menurut lama waktu inkubasi dan konsentrasi substrat agar kondisi optimum lebih lengkap.
3. Disarankan untuk melakukan identifikasi bakteri melalui 16S RNA untuk mengetahui jenis bakteri yang di dapatkan.
4. Disarankan untuk melakukan identifikasi ikatan peptida dengan menggunakan HPLC dan LCMS agar diketahui jenis-jenis asam amino yang didapatkan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ardiyansya, Heru, SP, 2009. *Jenis-Jenis Kakao Yang Tumbuh di Indonesia*. Blogger Indonesia. www.kakaoindonesia.blogspot.com. 29 Desember 2009. 20.00 WIB.
2. Khomsan, Ali. 2006. *Cokelat Baik Untuk Jantung Dan Suasana Hati*. IPB. Bogor
3. Syukur, S. Purwati, Endang. Husmaini. Y. Murni, F. Othman, *Lactobacillus sp. Isolasi dari Blondo Virgin Cocomut Oil Efektif sebagai Probiotik, pada Prosiding Badan Kerja Sama Universitas Wilayah 3. Jambi, 26-28 April 2006.*
4. Syukur, S. Purwati, Endang. *Peranan Pangan Probiotik untuk Mikroba Patogen dan Kesehatan*. Dharma wanita Persatuan Propinsi Sumatera Barat. Padang. 8 Agustus 2006.
5. Afrianto, E., dan E. Liviawaty. 1989. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta
6. Syukur, S. Purwati, Endang. Z. Hidayat. *Lactobacillus sp. Isolasi dari Biovicophitomega sebagai Probiotik*. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta. 24 -25 Januari 2005
7. Pelczar MJ, Chan ECS. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Diterjemahkan oleh Hadioeomo RS. Imas T, Tjirosomo SS, Angka, SL. Jakarta. Penerbit Universitas Indonesia.
8. Cho, Il Jae. Nam Keun Lee. and Young Tae Hahm. Characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. VOL. 108 No. 3, 194–198, 2009. Pdf.
9. Ali G.R.R. and S. Radu. 1998. *Isolation and Screening of Bacteriocin Producing LAB from Tempeh*. University of Malaysia.
10. Jamsari. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Unri Press. Riau. 2007
11. Feliatra, Irwan Efendi. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Probiotik dari Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus fuscogatus*) dalam Upaya Efisiensi Pakan Ikan*. Jurnal Natur Indonesia . Pekan Baru. 2004.
12. Purwati, Endang. S. Radu. Antimicrobial Drug Resistance and Resistance Factor Transfer Among *Listeria* Species. *Journal of Asian Fisheries Science* 11: 261-270. 1998.