

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROBA DALAM CIDER TEH

SKRIPSI

**OLEH:
FAJAR AGNI WIJAYA
032980021**

**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT TEKNOLOGI INDONESIA
SERPONG
2005**

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MIKROBA DALAM CIDER TEH

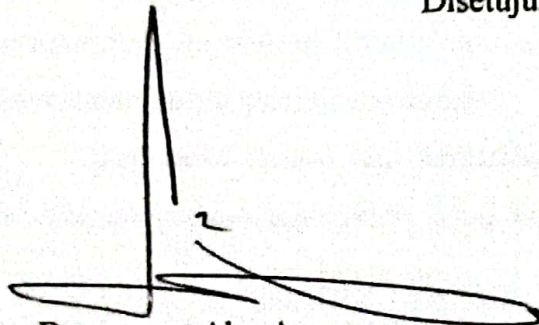
SKRIPSI

Dipersiapkan dan disusun oleh:
FAJAR AGNI WIJAYA
032980021

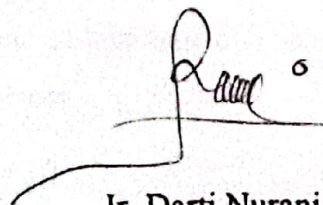
Telah dipertahankan dihadapan Dewan Penguji
Pada tanggal 20 APRIL 2005

Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar:
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
Jurusan Teknologi Industri Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Institut Teknologi Indonesia

Disetujui oleh:



Dr rer. nat Abu Amar
Dosen Pembimbing I



Ir. Darti Nurani, MSi
Dosen Pembimbing II



Dr rer. nat Abu Amar
Dekan FTT

RINGKASAN

Cider teh yang sering disebut kombucha yaitu larutan fermentasi dari larutan teh, gula, dan jamur kombu. Fermentasi merupakan proses yang menyebabkan perubahan kimiawi pada suatu senyawa organik kompleks melalui pengaruh beberapa enzim yang dihasilkan oleh mikroba.

Di beberapa daerah di Indonesia cider teh selain untuk hidangan tamu pada upacara-upacara tertentu, cider teh ini dikenal juga sebagai obat beberapa macam penyakit, bahkan ada yang mempercayai khasiatnya sebagai obat kuat (Rosberger, 1932). Untuk itulah, maka perlu dicari mikroba yang berperan dalam pembuatan cider teh ini.

Tujuan penelitian adalah mengisolasi dan mengidentifikasi jenis bakteri asal cider teh. Mikroba yang berperan dalam pembuatan cider teh adalah bakteri dan khamir. Dalam fermentasi cider teh yang terjadi adalah pengubahan gula menjadi alkohol yang dilakukan oleh khamir selanjutnya alkohol tersebut dioksidasi oleh bakteri menjadi asam asetat pada kondisi aerobik.

Analisis yang dilakukan terdiri dari analisis total mikroba dalam cider teh dan analisis yang berkaitan dengan isolasi dan identifikasi bakteri, meliputi : pengamatan morfologi koloni bakteri, bentuk sel, pewarnaan Gram, uji katalase, pewarnaan spora dan uji biokimia.

Dari hasil isolasi dan identifikasi genus didapatkan dua isolat bakteri yaitu *Bacillus coagulans* dan bakteri *Acetobacter xylinum*.

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Fajar Agni Wijaya, dilahirkan di Salatiga pada tanggal 22 Agustus 1979. Anak ke dua dari dua bersaudara putra bapak Susatyo Prahara dan Ibu Maria Mariana. Penulis menyelesaikan Sekolah Dasar di SD Pangudi Luhur Surakarta pada tahun 1992, Sekolah Menengah Pertama di SMP Pangudi Luhur Surakarta pada tahun 1995, dan sekolah Menengah Atas di SMU Ricci 2 Pondok Aren Jakarta Selatan. Pada tahun 1998 Penulis terdaftar sebagai Mahasiswa Jurusan Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Teknologi Indonesia.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya dengan Rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan judul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri dalam Cider Teh”**. Selama penelitian hingga penyelesaian skripsi, penulis tidak lepas dari bantuan semua pihak. Oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu selama penulis menyelesaikan laporan skripsi ini kepada :

1. Kedua orang tua dan kakakku yang selalu memberikan kasih sayang, dorongan, bantuan moral maupun material dalam menyelesaikan pendidikan. Saudaraku Gerard yang selalu memberikan motivasi, nasehat kepada penulis.
2. Dr.rer.nat Abu Amar selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian dan selaku dosen pembimbing I atas pengertian, arahan, serta saran yang sangat berguna kepada penulis.
3. Dra. Setiarti Sukotjo, MSc selaku Ketua Jurusan Teknologi Industri Pertanian.
4. Ir. Darti Nurani, MSi selaku kepala Laboratorium Mikrobiologi dan dosen pembimbing II atas izin, bimbingan, saran, kritik, dan perhatian yang sangat berguna kepada penulis.
5. Ir. Syahril Makosim, Msi selaku penasehat akademik yang telah memberikan ide penelitian dan arahan kepada penulis.
6. Ibu Heti atas bimbingan dan bantuan dalam analisis biokimia, Laboratorium Penelitian Bahan Pangan, Bogor.

7. Bapak Supartono atas bimbingan dan arahan dalam analisis biokimia selama penulis di Bogor.
8. Para staf Laboratorium Mikrobiologi Mas Saryadi dan Mas Yanto atas kebebasan dalam memakai laboratorium. Mas Yono atas arahnya.
9. Seluruh dosen dan staff Fakultas Teknologi Pertanian yang telah banyak membantu penulis.
10. Teman satu laboratorium Fitri, Fiqih, Bayu bemo, Tari, Uli, Bondan, Pai, masboe, masbie dalam menemani dan menghibur penulis ketika sedang di laboratorium.
11. Fajar Haryo dan Feri atas tempat dan komputer serta bantuan dalam penyelesaian pengetikan skripsi ini.
12. Sahabat dan keluarga besar angkatan 98 Feri, Alex, Ipal Roten, Yanuar H, Yudha, Yudhi, Ripai, Agung, Paul Geto, Indra, Iip, Zasli, Ranie, Ida, Upik, Vina. Indah atas kebersamaan, canda tawa, dan motifasi kepada penulis.
13. Rekan- rekan Mahasiswa khususnya Keluarga Besar Mahasiswa angkatan '93', '95', '96', '99', '00', '01', '02', '03', '04', dan seterusnya tetap kompak ye.
14. Novianti atas kasih sayang, perhatian, semangat, doa, yang diberikan kepada penulis.

15. Band Valiant dan community, Thrashline, Master Wu, Black Redemption, Tengkorak, Siksa Kubur, Panic Disorder, Bromo, Purgatory, Ronie ZR, Thoge, Iron Maiden, Halloween Salam Metal !
16. Teman-teman Even Organizer Doctorabbit, SNS, Pernik, Bee Pro, Sweet Flowers, Alam Sutera, Warna, atas bantuannya kepada penulis.
17. Semua pihak dan fans penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu, yang telah banyak membantu penulis.

Penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat dan menambah informasi wawasan IPTEK bagi pembaca pada umumnya dan mahasiswa pada khususnya, walaupun demikian penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam dalam penulisan laporan skripsi ini. Untuk itu segala saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis.

Serpong, Maret 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	ii
RIWAYAT HIDUP	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
I. PENGANTAR	
A. Latar Belakang	1
B. Identifikasi Masalah	2
C. Kerangka Pemikiran	3
D. Tujuan Penelitian	3
E. Manfaat Penelitian	3
F. Hipotesis	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Teh	4
B. Cider	6
C. Cider Teh	7
D. Fermentasi dalam Pembuatan Cider Teh	9
E. Mikroba	12

F.1. Morfologi bakteri.....	13
F.1.1. Bentuk dan pengelompokan sel	14
F.1.2. Susunan dinding sel	15
F.1.3. Kapsul	16
F.1.4. Pembentukan endospora	17
G. Bakteri yang Tumbuh pada pH Rendah.....	19
H. Metode Hitung Cawan	20
I. Isolasi dan Identifikasi Mikroba	21
I.1. Isolasi.....	21
I.2. Identifikasi bakteri.....	22
I.2.1. Struktur dan morfologi bakteri	22
I.2.2. Pewarnaan Gram dan spora	23
I.2.3 Uji katalase.....	23
I. Genus <i>Bacillus</i>	24
K.Genus <i>Acetobacter</i>	25
 III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN	
A.Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	27
B. Metode Penelitian	27
C.Alat dan Bahan	28
C.1. Alat	28
C.2. Bahan.....	28
C.3. Cara Kerja.....	28
C.3.1. Isolasi.....	30
C.3.1.1. Analisis sel.....	30
C.3.1.2. Pengamatan morfologi koloni.....	31
C.3.2. Indentifikasi kelompok bakteri.....	31
C.3.2.1. Pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel.....	31

C.3.2.2. Pewarnaan spora.....	32
C.3.2.3. Uji katalase.....	33
C.3.3. Identifikasi Genus dan Species bakteri	34
C.3.3.1. Uji fermentasi karbohidrat.....	34
C.3.3.2. Uji VP (<i>Voges Proskauer</i>).....	34
C.3.3.3. Uji indol.....	35
C.3.3.4. Uji pertumbuhan pada <i>Mac Conkey</i>	35
C.3.3.5. Uji nitrat	36
C.3.3.6. Uji sitrat.....	36
C.3.3.7. Uji oksidase	37
C.3.3.8. Uji hemolisis.....	37
C.3.3.9. Uji MR (<i>Methyl Red</i>).....	37
C.3.3.10. Uji oksidasi etanol.....	38

IV. HASIL DAN ANALISIS HASIL

A. Total Mikroba Cider Teh	39
B. Hasil Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni dalam Cider Teh	39
C. Hasil Identifikasi Isolat Bakteri dalam Cider Teh	41
C.1. Hasil pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel.....	41
C.2. Pewarnaan spora isolat bakteri asal cider teh.....	43
C.3. Uji katalase	44
D. Hasil Identifikasi Genus dan Spesies Bakteri	45
D.1. Hasil uji biokimia isolat A dalam cider teh	45
D.2. Hasil uji biokimia isolat B dalam cider teh	48

V. PEMBAHASAN DAN PENDAPAT

A. Total Mikroba dalam Cider Teh.....	50
B. Identifikasi Kelompok Bakteri dalam Cider Teh	50
C. Identifikasi Genus dan Spesies Bakteri dalam Cider Teh.....	52
C.1. Uji biokimia isolat bakteri A.....	52
C.2. Uji biokimia isolat bakteri B.....	55

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan	58
B. Saran.....	58

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel. 1. Komposisi kimia daun teh dan teh hitam.....	5
Tabel. 2. Perbedaan relatif sifat bakteri Gram positif dan negatif	16
Tabel. 3. Populasi mikroba dalam cider teh	38
Tabel. 4. Hasil pengamatan morfologi koloni.....	38
Tabel. 5. Hasil pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel.....	40
Tabel. 6. Hasil pewarnaan spora	42
Tabel. 7. Hasil uji katalase.....	43
Tabel. 8. Hasil uji biokimia isolat A dalam cider teh	44

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar. 1. Berbagai bentuk dan lokasi spora di dalam sel	18
Gambar. 2. Diagram alir identifikasi mikroba	29
Gambar. 3. Morfologi koloni isolat A	39
Gambar. 4. Morfologi koloni isolat B	40
Gambar. 5. Hasil pewarnaan Gram dan bentuk sel isolat A	41
Gambar. 6. Hasil pewarnaan Gram dan bentuk sel isolat B	41
Gambar. 7. Hasil pewarnaan spora isolat bakteri A	42
Gambar. 8. Hasil pewarnaan spora isolat bakteri B	43
Gambar. 9. Hasil uji biokimia untuk isolat bakteri A	46
Gambar. 10. Diagram alir identifikasi <i>Bacillus coagulans</i>	53
Gambar. 11. Diagram alir identifikasi <i>Acetobacter xylinum</i>	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran. 1 . Perbedaan karakteristik Spesies-spesies dari Genus <i>Bacillus</i>	61
Lampiran. 2 . Perbedaan karakteristik Spesies-spesies dari Genus <i>Acetobacter</i>	62
Lampiran. 3 . Data pengamatan uji biokimia Genus <i>Bacillus coagulans</i>	63
Lampiran 4. Data perhitungan total mikroba.....	64

I. PENGANTAR

A. Latar Belakang

Minuman teh termasuk salah satu minuman yang cukup digemari di dunia. Biasanya orang menikmati minuman ini dengan berbagai cara, antara lain mencampurnya dengan gula, susu ataupun dengan jeruk. Ada satu cara lagi yang mungkin telah dilupakan oleh orang, yaitu meminum hasil fermentasi teh yang dewasa ini dikenal dengan nama cider teh. Cider teh ini mempunyai rasa manis keasam-asaman dengan sedikit alkohol yang menyegarkan. Cider teh ini cukup berkembang dan termasuk minuman yang digemari di beberapa daerah di Indonesia.

Gadd (1933), mengatakan bahwa mikroba yang paling berperan dalam pembuatan cider teh adalah khamir *Saccharomyces ludwigii* dan bakteri *Acetobacter xylinum*, selain kedua mikroba tersebut masih mungkin ditemukan khamir lainnya. Sedangkan Hesseltine (1965), menyebutkan bahwa mikroba yang berperan dalam pembuatan cider teh adalah dua jenis khamir dan bakteri *Acetobacter xylinum*.

Cider teh juga sering disebut kombucha yaitu larutan fermentasi dari larutan teh, gula, dan jamur kombu. Fermentasi merupakan proses yang menyebabkan perubahan kimiawi pada suatu senyawa organik kompleks melalui pengaruh beberapa enzim yang dihasilkan oleh mikroba.

Cider teh sudah cukup dikenal di beberapa negara antara lain Rusia, Jepang, Polandia, Bulgaria, Jerman, Mancuria, Indonesia bahkan di negara Eropa Timur, Rusia dan Jepang, minuman ini sudah diperdagangkan (Hesseltine, 1965). Di beberapa daerah di Indonesia cider teh selain untuk hidangan tamu pada upacara-upacara tertentu, cider teh ini dikenal juga sebagai obat beberapa macam penyakit, bahkan ada yang mempercayai khasiatnya sebagai obat kuat (Setiowati, 1990).

B. Identifikasi Masalah

Banyak orang yang mengkonsumsi cider teh sebagai minuman kesehatan. Di beberapa daerah di Indonesia cider teh selain untuk hidangan tamu pada upacara-upacara tertentu, cider teh ini dikenal juga sebagai obat beberapa macam penyakit, bahkan ada yang mempercayai khasiatnya sebagai obat kuat (Setiowati, 1990). Sampai saat ini diketahui jenis mikroba yang berperan dalam proses pembuatan cider teh hanyalah khamir *Saccharomyces ludwigii* dan bakteri *Acetobacter xylinum*, maka diperlukan suatu penelitian untuk dapat lebih menggali jenis mikroba lain dengan mengidentifikasi spesies bakteri dalam cider teh.

C. Kerangka Pikir

Cider teh adalah produk fermentasi teh yang memiliki pH rendah (sekitar 3-5,5) sehingga mikroba yang dapat tumbuh pada cider teh adalah mikroba yang tahan asam. Diperkirakan kondisi keasaman yang ada dalam cider teh memungkinkan mikroba tahan asam untuk tumbuh.

D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri dalam cider teh.

E. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk dapat memberikan informasi tentang jenis spesies bakteri dalam cider teh.

F. Hipotesis

Bakteri yang berperan dalam proses pembuatan cider teh adalah bakteri tahan asam.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Teh

Teh (*Camellia sinensis*) merupakan salah satu komoditi ekspor Indonesia yang cukup terkenal di pasaran dunia. Berdasarkan cara pengolahannya teh dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu teh hitam, teh hijau dan teh oolong (Heath, 1978). Berdasarkan ukuran daun teh, teh dibedakan menjadi teh daun, teh remuk dan teh bubuk. Proses pengolahan teh dilakukan melalui tahap pelayuan, penggulungan, fermentasi dan pemeraman, pengeringan serta sortasi (Soetejo, 1970).

Pucuk teh yang baru dipetik dari tanamannya mengandung air 75% dari berat daun. Daun yang bermutu baik adalah daun yang mempunyai kandungan tanin dan aktifitas enzim yang tinggi serta sifat-sifat fisik jaringan daun yang sebaik-baiknya. Makin tua daun, makin rendah kandungan taninnya dan makin tidak elastis daun tersebut. Komposisi kimia daun teh sangat berpengaruh terhadap mutu bubuk teh yang dihasilkan. Hal ini adalah akibat dari pengaruh reaksi-reaksinya selama proses pengolahan. Komponen-komponen ini berpengaruh langsung terutama pada warna, flavor dan rangsangan seduhan teh tersebut.

Menurut Harler (1964), daun teh yang baru dipetik mengandung 77% air dan 23% bahan kering. Bahan kering ini terdiri dari bahan yang larut dalam air dan yang tidak larut dalam air. Bahan yang larut air mempengaruhi mutu seduhan teh. Daun teh mengandung 4.5 - 5.0% nitrogen dari berat kering yang tiga perempat bagiannya adalah protein dan asam amino dan sisanya kafein.

Kandungan bahan berselulosa pada daun teh tidak mempengaruhi mutu teh secara kimiawi. Gula dan pati pada daun teh jumlahnya masing-masing sekitar 0.75 - 1.400 dan 0.82 - 2.96% (berat kering). Daun teh mengandung polifenol sebanyak 30% yang merupakan turunan asam galat dan katekin dan dikenal dengan nama tanin (Eden, 1958). Komposisi kimia daun teh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia daun teh dan teh hitam^{*)}

Komponen	Jumlah (% berat kering)	
	Teh segar	Teh hitam
Selulosa, serat kasar	34,00	34,00
Protein	17,00	17,00
Klorofil, pigmen lain	1,50	1,00
Pati	0,50	0,25
Tanin	25,00	13,00
Tanin teroksidasi	0,00	4,00
Kafein	4,00	4,00
Asam amino	8,00	9,00
Gula dan gum	3,00	4,00
Mineral	4,00	4,00
Total abu	5,50	5,50
Bahan esensial	0,00	'trace'

^{*)}Harler. (1964)

Polifenol teh terdiri dari flavonoids, 1-epigallokatekin dan galat. Oksidasi epigallokatekin dan galat pada tahap pemeraman daun teh menghasilkan theaflavin yang berwarna kuning dan thearubigin yang berwarna merah coklat (Harler, 1964).

Menurut Eden (1958), vitamin yang terdapat pada daun teh adalah vitamin B₂ (riboflavin) dan vitamin C (asam askorbat). Kandungan vitamin C ini akan menurun pada tahap pelayuan dan pada fermentasi vitamin ini hilang (Soetejo, 1970).

Mineral-mineral yang terdapat di dalam daun teh sebagian besar terdapat di dalam cairan sel. Mineral yang memegang peran penting adalah tembaga, yaitu sebagai aktivator pada proses pemeraman daun teh.

B. Cider

Istilah cider mempunyai beberapa pengertian yang berbeda. Di Amerika Serikat yang dimaksud dengan cider adalah minuman sari buah (buah apel) yang tidak difermentasi dan apabila difermentasi dan mempunyai kandungan alkohol sebesar 0.5 - 8.0%, maka minuman ini dinamakan 'hard cider' atau 'applejack'. Sedangkan di Inggris yang disebut cider adalah minuman sari buah yang mengalami proses fermentasi. Menurut Ansori *et al.* (1986), cider diartikan sebagai minuman hasil fermentasi sari buah dengan kadar alkohol sebesar 0.5 - 8.0%.

Cider di Indonesia belum begitu populer dan pengertian cider di Indonesia artinya minuman beralkohol ringan yang dibuat dari buah-buahan. Selain terbuat dari buah-buahan cider juga dapat dibuat tanpa menggunakan sari buah-buahan, seperti teh cider yang terbuat dari teh manis.

Secara umum proses fermentasi cider membutuhkan gula dan mikroba. Mikroba yang umum digunakan adalah khamir *Saccharomyces sp.* Gula ini akan difermentasi oleh mikroba menjadi alkohol dan CO₂.

Pembentukan alkohol secara alami dalam pembuatan cider tergantung iklim setempat. Menurut Frank (1995), sebagian besar mikroba yang terdapat di dalam cider adalah khamir berspora, yaitu *Saccharomyces*, sisanya baru *Torulopsis*, *Kloeckera* dan *Candida*. Hal ini disebabkan *Saccharomyces* mempunyai kisaran temperatur hidup yang cukup panjang, yaitu pada suhu 9 – 37 °C.

Fermentasi pembuatan cider dilakukan secara anaerob, namun sebenarnya pada awal fermentasi diperlukan juga udara. Hal ini dilakukan dengan cara memberikan sedikit ruang pada wadah (Prescott dan Dunn, 1959). Gas CO₂ yang dihasilkan pada proses fermentasi gula menjadi alkohol dikeluarkan melalui selang yang terendam pada air, sehingga akan terlihat gelembung-gelembung selama proses fermentasi berlangsung.

C. Cider Teh

Menurut Gadd (1933) cider teh adalah suatu minuman yang digambarkan mempunyai rasa yang sedap atau menyenangkan dengan rasa yang agak asam, bergas dan merupakan minuman yang terbuat dari teh manis. Sedangkan menurut Sugianto (1972) cider teh adalah minuman yang merupakan hasil fermentasi seduhan teh bergula (teh manis) yang mempunyai rasa keasam-asaman yang menyegarkan dan mengandung sedikit alkohol.

Sebenarnya cider teh ini bukanlah suatu minuman yang baru. Minuman ini telah berkembang di beberapa negara, termasuk Indonesia, sebagai salah satu minuman tradisional yang banyak digemari. Masing-masing negara tersebut

memberikan suatu julukan yang khusus untuknya, misalnya 'teekwass' atau 'teewass' di Rusia, 'fungus japonicus' di Jepang, 'cajnij' di Polandia, 'hongo' di Bulgaria, 'wunderpilz' di Jerman, 'kombucii' di Mancu-ria, 'thee-Schimmel' di Belanda dan 'teafungus' di Indonesia (Steinkraus dalam Mashudi, 1993).

Seperti telah disebutkan di atas jenis minuman ini telah lama dikenal. Pada tahun 1911 cider teh telah dikenal secara luas di Jerman dan pada tahun-tahun berikutnya tersebar lebih luas ke negara-negara lain, seperti Rusia, Tiongkok, Jepang dan lain-lain (Koolhaas dan Boedijn, 1932).

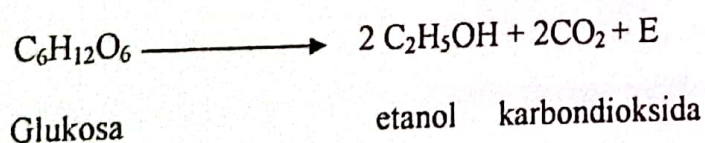
Perkembangannya di Indonesia terjadi sekitar tahun 1930, setelah seorang Jerman yang berkunjung ke Indonesia membawa jenis jamur yang diperlukan untuk membuat cider teh ini. Penyebaran jenis minuman ini dimulai dari daerah Yogyakarta dan berlangsung dengan sangat pesat dan meyakinkan. Dengan adanya jenis minuman baru ini maka penelitian segera dilakukan untuk mencari dan mengusahakan kemungkinan pengembangannya lebih lanjut. Usaha ini antara lain dilakukan secara intensif oleh Koolhaas dan Boedijn (1932).

Pada tahun-tahun berikutnya (1932-1935) banyak propaganda dilancarkan dalam rangka penyebarluasan minuman ini. Meskipun pada masa itu terasa adanya kemajuan dan popularitas minuman ini, namun pembuatannya masih terbatas pada taraf kecil-kecilan, yaitu satu keluarga membuat untuk keperluan konsumsinya sendiri. Beberapa pengusaha yang mencoba untuk mengembangkan jenis minuman ini secara industri, tidak dapat mencapai apa yang mereka harapkan (Sugianto, 1972).

Usaha untuk pengembangan minuman ini tidak mengalami suatu perkemboangan' yang menggembirakan, bahkan lambat laun popularitasnya nampak merosot. Hal ini mungkin disebabkan oleh keadaan yang tidak menguntungkan pada masa sebelum dan selama perang dunia II dan keadaan sewaktu perang kemerdekaan di tanah air. Kemunduran ini terus berlangsung dan pada saat ini dapat dikatakan jenis minuman ini tidak banyak lagi dikenal masyarakat (Sugianto, 1972).

D. Fermentasi Dalam Pembuatan Cider Teh

Fermentasi oleh Louis Pasteur didefinisikan sebagai kehidupan tanpa udara (*'life without air'*). Dalam kondisi anaerob satu molekul gula akan dikonversi menjadi dua molekul ethanol dan dua molekul CO₂, seperti persamaan reaksi di bawah ini:



Menurut persamaan reaksi diatas secara teoritis 1 mol gula akan diubah menjadi 2 mol alkohol dan 2 mol CO_2 , namun dalam kenyataannya hal ini tidak dapat tercapai. Dalam praktek hanya akan diperoleh 90-95% dari nilai teoritis. Hal ini disebabkan oleh pembentukan produk sampingan, penguapan sebagian etanol/alkohol dan penggunaan gula untuk metabolisme pertumbuhan khamir dan sebagainya.

Konsentrasi etanol maksimum yang diproduksi oleh khamir bervariasi dari 0% sampai 10% (v/v) (Amerine *et al.*, 1982). Hampir semua khamir untuk anggur dapat memfermentasi glukosa, fruktosa, maltosa, sukrosa dan beberapa dapat memfermentasi galaktosa. Rafinosa dapat difermentasi sebagian dan laktosa, melibiosa, pentosa, dekstrin dan pati sama sekali tidak dapat difermentasi. Amerine *et al.* (1982) mengatakan bahwa pada konsentrasi gula normal glukosa difermentasi lebih cepat dibandingkan fruktosa. Jika konsentrasi gula meningkat maka laju fermentasi dan jumlah maksimum alkohol yang diproduksi akan menurun. Pada konsentrasi gula yang tinggi akan terjadi peningkatan produksi asam asetat. Hal ini disebabkan oleh adanya penghambatan laju fermentasi oleh konsentrasi gula yang tinggi. Hal inilah yang akan mengakibatkan etanol secara mudah teroksidasi menjadi asam asetat.

Tidak hanya gula yang dapat digunakan oleh khamir sebagai sumber karbon. Asam asetat, asam laktat dan banyak komponen organik lain termasuk etanol dapat digunakan oleh khamir. Bahkan pada kondisi aerob penggunaan CO₂ secara langsung juga dimungkinkan (Amerine *et al.*, 1982).

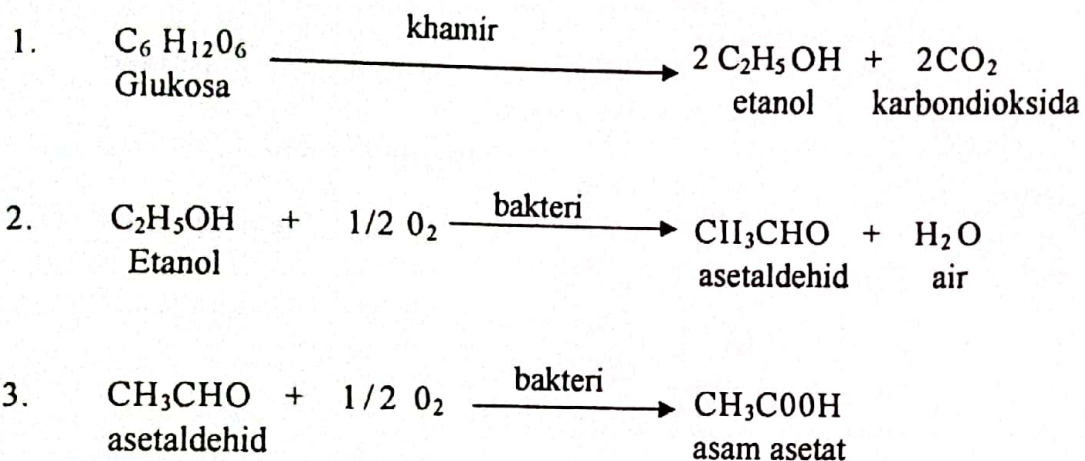
Pada konsentrasi 0.5% asam asetat fermentasi alkohol akan tertunda selama beberapa minggu. Efek ini akan terlihat pada *Saccharomyces sp.* sedangkan pada *Saccharomyces ludwigii* efek penghambatan ini lebih sedikit (Steinkraus dalam Mashudi, 1993).

Pada kondisi anaerob *S. cerevisiae* menghasilkan sejumlah kecil asam asetat. Mekanisme pembentukan asam asetat terjadi dari perubahan asetaldehid menjadi etanol dan asam, tetapi biasanya hal ini terjadi pada media yang bersifat basa. (Amerine *et al.*, 1982).

Penambahan tanin dalam pembuatan anggur antara lain bertujuan untuk mengurangi pertumbuhan khamir dan bakteri yang tidak diinginkan (Amerine *et al.*, 1982). Umumnya *Saccharomyces sp* relatif lebih tahan terhadap tanin daripada *Pichia spp*, *Hanseniaspora spp* atau *Kleeckera spp*. Pembuatan anggur merah yang mengandung tanin lebih besar dari 0,3% ini dapat membantu pembentukan film oleh khamir pembentuk film (Amerine *et al.*, 1982).

Seperti telah dikatakan di muka bahwa mikroba yang berperan dalam pembuatan cider teh adalah bakteri dan khamir. Sehingga dalam fermentasi cider teh yang akan terjadi adalah pengubahan gula menjadi alkohol yang dilakukan oleh khamir selanjutnya alkohol tersebut dioksidasi oleh bakteri menjadi asam asetat pada kondisi aerobik (Frank, 1995).

Hal ini dikatakan juga oleh Anderson (1948) bahwa *Bacterium xylinum* atau *Acetobacter xylinum* yang tumbuh bersama-sama dengan ragi pada cider teh dapat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat. Seperti persamaan reaksi dibawah ini :



E. Mikroba

Dunia mikroba terdiri atas berbagai kelompok jasad renik. Kebanyakan jasad renik bersel satu atau uniseluler. Mikroba atau jasad renik yang penting dalam mikrobiologi pangan adalah yang tergolong dalam bakteri, kapang, dan khamir (Fardiaz, 1992).

Ada yang mempunyai ciri-ciri sel tumbuhan, ada yang mempunyai ciri-ciri sel hewan, dan ada yang mempunyai ciri-ciri keduanya secara kolektif, jasad renik disebut dengan *protista* (Pelczar *et al.*, 1986).

Kategori *protista* adalah semua makhluk hidup yang tidak tergolong hewan atau tanaman, yang dapat dikelompokkan atas dua kelompok yaitu; *protista* tingkat rendah atau prokariot, dan *protista* tingkat tinggi atau eukariot (Fardiaz, 1992). Organisme yang tergolong dalam prokariot dan eukariot adalah sebagai berikut :

1. Prokariot :

- Bakteri.
- Rickettsia dan Chlamydia.
- Mikoplasma.
- Ganggang biru – hijau

2. Eukariot :

- Fungi (kapang, khamir, jamur).
- Ganggang
- Protozoa

F. Bakteri

Bakteri adalah organisme bersel tunggal yang hidup bebas tanpa klorofil dan memiliki baik DNA maupun RNA. Bakteri mampu menunjukkan semua proses-proses dasar kehidupan misalnya tumbuh, metabolisme dan reproduksi. Dinding selnya kaku dan mengandung asam muramat (Gupta, 1990).

F.1. Morfologi bakteri

Morfologi bakteri sangat penting dalam hubungannya dengan pertumbuhannya pada makanan dan ketahanannya terhadap pengolahan. Sifat-sifat tersebut misalnya bentuk dan pengelompokan sel, susunan dinding sel, pembentukan kapsul, dan pembentukan endospora.

F.1.1. Bentuk dan pengelompokan sel

Sel bakteri pada umumnya berukuran $0,5 - 1,0 \mu\text{m}$ kali $2,0 - 5,0 \mu\text{m}$, dan terdiri atas tiga bentuk dasar yaitu: bentuk bulat atau kokus, bentuk batang atau basilus, dan bentuk spiral (Fardiaz, 1992). Dengan alasan di atas maka bakteri bersifat mikroskopik atau hanya dapat dilihat dengan mikroskop. Menurut Pelczar *et al.* (1986), walaupun bakteri amat kecil ukurannya, namun dapat diukur dengan mikroskop yang dilengkapi dengan mikrometer okular, yaitu suatu piringan yang diukur dengan garis-garis berjarak sama.

Bakteri berbentuk bulat (kokus) dapat dibedakan atas beberapa pengelompokan sel, yaitu:

1. Stapilokoki : kumpulan sel yang tidak beraturan seperti buah anggur.
2. Streptokoki : rangkaian sel membentuk rantai panjang atau pendek.
3. Diplokoki : sel berpasangan (dua sel).
4. Tetrad : empat sel membentuk persegi empat.
5. Sarcinae : kumpulan sel berbentuk kubus yang terdiri dari delapan sel atau lebih.

Bakteri berbentuk batang (basil) mungkin terdapat bentuk berpasangan (diplobasili) atau membentuk rantai (streptobasili). Pengelompokan ini pada beberapa keadaan bukan merupakan sifat morfologinya, melainkan dipengaruhi oleh tahap pertumbuhan atau kondisi kultur. Bakteri berbentuk

spiral terdapat secara terpisah-pisah, tetapi masing-masing spesies berbeda dalam panjang, jumlah, dan amplitudo spiralnya, serta ketegaran dinding selnya. Sebagai contoh, beberapa spesies ukurannya pendek dengan spiral yang padat, sedangkan spesies lainnya mungkin sangat panjang dengan bentuk seperti tali berputar (bergelombang). Bakteri yang ukurannya pendek dengan spiral yang tidak lengkap disebut bakteri koma atau vibrio (Fardiaz, 1992).

Bakteri berbentuk bulat pada umumnya lebih tahan terhadap proses pengolahan, misalnya pemanasan, pendinginan dan pengeringan, dibandingkan dengan bakteri berbentuk batang. Demikian pula bakteri yang bergerombol (*stafilokoki*) lebih sukar dibunuh dengan proses pengolahan dibandingkan dengan bakteri dimana selnya terpisah-pisah atau membentuk rantai (Fardiaz, 1992).

F.1.2. Susunan dinding sel

Berdasarkan komposisi dinding sel dan sifat pewarnaan bakteri dapat dikelompokkan menjadi bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Selain perbedaan dalam sifat pewarnaan bakteri Gram positif dan Gram negatif juga berbeda dalam sensitivitasnya terhadap kerusakan mekanis/fisis terhadap enzim, desinfektan dan antibiotik (Fardiaz, 1992). Beberapa perbedaan sifat-sifat bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat dilihat pada Tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Perbedaan relatif sifat bakteri Gram positif dan Gram negatif.*

Sifat	Bakteri gram positif	Bakteri gram negatif
1. Komposisi dinding sel	- Kandungan lipid rendah	- Kandungan lipid tinggi
2. Ketahanan terhadap penisilin	- Lebih sensitif	- Lebih tahan
3. Penghambatan oleh pewarna basa	- Lebih dihambat	- Kurang dihambat
4. Kebutuhan nutrient	- Kebanyakan spesies relatif kompleks	- Relatif sederhana
5. Ketahanan terhadap perlakuan fisik	- Lebih tahan	- Kurang tahan

* Pelczar *et al.* (1986).

Bakteri Gram positif lebih sensitif terhadap penisilin, tetapi lebih tahan terhadap perlakuan fisik atau enzim dibandingkan bakteri gram negatif. Bakteri Gram negatif lebih sensitif terhadap antibiotik lainnya seperti streptomisin.

Bakteri Gram negatif bersifat lebih konstan terhadap reaksi pewarnaan, tetapi bakteri Gram positif sering berubah sifat pewarnaannya sehingga menunjukkan reaksi gram variabel (Pelczar *et al.*, 1986).

F.1.3. Kapsul

Beberapa bakteri pada permukaan selnya mengeluarkan komponen berlendir yang dapat dilihat di bawah mikroskop. Komponen tersebut disebut kapsul jika terdapat dalam bentuk kompak mengelilingi permukaan media, sedangkan jika bentuknya tidak terlalu kompak dan mudah terlepas disebut

lapisan lendir. Kapsul terdiri atas polisakarida dan polipeptida. Meskipun kapsul tidak berperan dalam pertumbuhan sel, tetapi mungkin berperan dalam menyesuaikan diri dengan lingkungan hidupnya (Fardiaz, 1992).

Bakteri pembentuk kapsul jika tumbuh pada suatu medium akan membentuk koloni yang bersifat mukoid, sedangkan jika tumbuh pada makanan menyebabkan makanan menjadi berlendir. Pembentukan kapsul oleh bakteri meningkatkan ketahanan bakteri terhadap panas, bahan kimia, maupun sel fagosit jika bakteri tersebut masuk kedalam tubuh (Fardiaz, 1992).

F.1.4. Pembentukan endospora

Endospora bakteri mulai terbentuk pada akhir fase logaritmik. Ciri-ciri endospora bakteri adalah sebagai berikut :

1. Dibentuk oleh sel basilus, misalnya yang sering ditemukan pada makanan terutama adalah dari jenis *Bacillus* dan *Clostridium*.
2. Endospora bakteri sangat tahan terhadap pemanasan, pengeringan dan disinfektan.
3. Endospora sukar untuk diwarnai, tetapi sekali diwarnai sukar untuk dihilangkan.
4. Dibentuk pada kondisi yang tidak memungkinkan untuk pertumbuhan sel vegetatif.

5. Bentuk dan posisi spora didalam sel mungkin berbeda-beda pada masing-masing spesies (Gambar 1). Spora mungkin terletak pada ujung atau ditengah sel, dan sel vegetatif yang mengandung spora mungkin mengalami pembengkakan atau ukurannya tetap sama. Sifat-sifat ini dapat digunakan untuk identifikasi bakteri.



Gambar 1. Berbagai bentuk dan lokasi spora didalam sel beberapa Genus *Bacillus* dan *Clostridium* (Pelczar *et al*, 1986).

Endospora mengandung ion kalsium dan *DPA* (*Dipicolinic Acid*) dalam jumlah relatif tinggi, karena selama pembentukan spora terjadi kenaikan absorpsi ion kalsium dan sintesis *DPA*. Endospora tidak melakukan aktivitas metabolisme oleh karena itu, bersifat dorman. Pada waktu germinasi, sifat dorman endospora hilang, sehingga sudah mulai terjadi aktivitas metabolisme yang mengakibatkan sel dapat tumbuh (Fardiaz, 1992).

Pembentukan spora dimulai dengan timbulnya daerah bening di dekat salah satu ujung sel yang lambat laun makin keruh dan membentuk permukaan spora (Gupta, 1990).

Bakteri pembentuk spora akan membentuk spora apabila zat-zat makanan telah habis dan lingkungan tidak memungkinkan bagi bakteri untuk tumbuh, sehingga bakteri akan bersiap-siap kembali untuk tumbuh apabila keadaan normal kembali (Black, 1993).

G. Bakteri yang Tumbuh pada pH Rendah

Menurut Fardiaz (1992), dalam pengolahan pangan, makanan dapat dibedakan atas beberapa grup berdasarkan pH-nya. Pembagian makanan ini bertujuan untuk mengetahui daya awet suatu makanan. Semakin rendah pH makanan, semakin kurang perlakuan pengawetan yang harus diberikan kepada makanan tersebut. Penggolongan makanan berdasarkan pH-nya adalah sebagai berikut :

1. Makanan berasam rendah, yaitu makanan yang mempunyai pH di atas 5,3 misalnya jagung, daging, ikan, dan susu
2. Makanan berasam sedang, yaitu makanan yang mempunyai pH 5,3 sampai di atas 4,5, misalnya bayam, asparagus, bit, dan waluh kuning
3. Makanan asam, yaitu makanan yang mempunyai pH 4,5 sampai di atas 3,7 misalnya tomat, pear, dan nenas
4. Makanan berasam tinggi, yaitu makanan yang mempunyai pH 3,7 atau kurang, misalnya buah-buahan yang tergolong asam (misalnya berries) dan acar-acaran.

Dari alasan di atas maka dapat dikatakan cider teh adalah minuman berasam tinggi dengan pH sekitar 3. Bakteri yang dapat tumbuh pada cider teh adalah bakteri-bakteri asidofilik. Menurut Buchanan dan Gibbons (1974), bakteri yang dapat tumbuh pada kisaran pH 2 adalah genus *Acetobacter*, *Bacillus*, dan *Beijerinckia*.

H. Metode Hitung Cawan (*Standard Plate Count*)

Menurut Fardiaz (1992), prinsip dari metode hitung cawan adalah jika mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan mata tanpa menggunakan mikroskop.

Metode hitung cawan adalah cara yang paling sensitif untuk menentukan jumlah jasad renik karena beberapa hal, yaitu :

1. Hanya sel yang masih hidup yang dihitung.
2. Beberapa jenis mikroba dapat dihitung sekaligus.
3. Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroba karena koloni yang terbentuk dari suatu mikroba akan mempunyai penampakan yang spesifik.

Dalam metode hitung cawan perlu dilakukan pengenceran karena diperkirakan mengandung lebih dari 300 sel jasad renik per ml atau per gram atau per cm. Jumlah koloni dalam sampel dapat dihitung sebagai berikut :

$$\text{Total mikroba} = \text{Jumlah koloni per cawan} \times 1/\text{Faktor pengenceran}$$

Untuk melaporkan hasil analisis mikrobiologi dengan cara hitungan cawan digunakan suatu standar yang disebut *Standard Plate Count* (SPC) sebagai berikut :

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 sampai 300
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloni diragukan dapat dihitung menjadi satu koloni
3. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

I. Isolasi dan Identifikasi Mikroba

I.1. Isolasi

Mikroba yang ada didalam suatu bahan sangat bervariasi, dimana kita dapat memisahkan mikroba dari bahan tersebut melalui tahapan isolasi. Untuk memudahkan mempelajari jenis dan sifat mikroba, maka mikroba tersebut harus kita isolasi dari lingkungannya dan dipelihara pada medium yang sesuai untuk pertumbuhannya. Isolasi adalah suatu cara untuk memisahkan mikroba tertentu dari lingkungannya, sehingga diperoleh biakan yang tidak tercampur dengan jenis lain. Biakan yang sudah tidak tercampur dengan jenis lain ini disebut biakan murni. Adapun teknik-teknik

isolasi tersebut, diantaranya :

1. Teknik agar tuang (*Pour plate*)
2. Teknik agar sebar (*Spread plate*)
3. Teknik penggoresan agar (*Streak plate*)

I.2. Identifikasi bakteri

Kegiatan pengklasifikasian, penamaan, dan pengidentifikasian disebut sistematika mikroba. Setiap organisme ditandai dengan nama genus dan istilah biasa atau deskriptif yang disebut spesies (Pelczar, 1986). Dalam Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, bakteri dapat dikelompokkan berdasarkan grup menurut bentuk dan struktur morfologi sel, pewarnaan Gram dan kebutuhan akan oksigen.

I.2.1 Struktur dan morfologi bakteri

Untuk mengetahui nama genus dan spesies suatu mikroba, perlu dilakukan identifikasi. Tahap pertama untuk melakukan identifikasi adalah pengenalan ciri-ciri morfologi mikroba tersebut. Pengamatan morfologi biasanya dilakukan baik secara makroskopik (dengan mata telanjang), maupun mikroskopik. Karena panca indera manusia memiliki kemampuan yang terbatas, banyak masalah mengenai mikroba yang ingin dipecahkan dengan menggunakan alat-alat.

Salah satu alat yang paling sering digunakan adalah mikroskop, yang memungkinkan seseorang dapat mengamati obyek-obyek dan gerakan yang sangat halus yang tidak dapat dilihat oleh kekuatan mata telanjang.

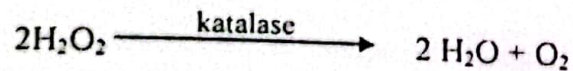
1.2.2 Pewarnaan Gram dan spora

Bakteri sulit dilihat dengan mikroskop cahaya, karena tidak mengadsorpsi ataupun membiaskan cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai bakteri atau latar belakangnya. Pewarnaan yang digunakan untuk membedakan bakteri disebut pewarnaan diferensial. Pewarnaan Gram merupakan contoh pewarnaan diferensial yang mengelompokkan bakteri menjadi kelompok Gram positif dan Gram negatif.

Bakteri Gram positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut sewaktu pemberian larutan pemucat dan kemudian mengambil zat warna kedua yang berwarna merah. Pewarnaan spora bertujuan untuk mengetahui apakah mikroba yang didapat menghasilkan endospora atau tidak.

1.2.3. Uji katalase

Kebanyakan bakteri aerobik dan anaerobik fakultatif yang menggunakan oksigen menghasilkan *hidrogen peroksida* yang sesungguhnya bersifat racun bagi sistem enzimnya sendiri. Namun mereka dapat tetap hidup dengan adanya antimetabolit tersebut karena dihasilkannya enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen :



Matinya bakteri-bakteri anaerobik obligat bila ada oksigen, disebabkan karena tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga H_2O_2 meracuni bakteri itu sendiri. Ada tidaknya pembentukan enzim katalase dapat membantu perbedaan kelompok-kelompok bakteri tertentu (Hadioetomo, 1985)

J. Genus *Bacillus*

Bacillus termasuk dalam keluarga *Bacillaceae*. Bentuk selnya batang, ukuran lebar 0,3-2,2 μm dengan panjang 1,27-7,0 μm . Sebagian besar dari genus *Bacillus* motil. Genus *Bacillus* dapat membentuk endospora, tidak lebih dari satu dalam sel sporangium. Kebanyakan dari genus *Bacillus* bersifat Gram positif, aerob sejati atau anaerob fakultatif. Metabolisme genus *Bacillus* dengan respirasi sejati, fermentasi sejati, atau kedua-duanya, yaitu respirasi dan fermentasi, Genus *Bacillus* sering dijumpai dalam tanah (Buchanan dan Gibbons, 1974). Jenis *Bacillus* terdiri atas 22 spesies, banyak diantaranya ditemukan pada makanan. *Bacillus* bersifat aerobik sampai anaerobik fakultatif, katalase positif, dan kebanyakan bersifat Gram positif, hanya beberapa yang bersifat Gram variabel. Spesies dari jenis *Bacillus* juga berbeda-beda dalam sifat pertumbuhannya. Beberapa genus *Bacillus* bersifat mesofilik, yang lainnya bersifat termofilik fakultatif atau termofilik (Fardiaz, 1992). Perbedaan karakteristik spesies-spesies dari genus *Bacillus* dapat dilihat pada Lampiran 1. Untuk mengidentifikasi spesies

dari genus *Bacillus* diperlukan beberapa pengujian. Pengujian tersebut mencakup produksi asam, gas, dan aseton dari biakan tersebut pada media-media yang telah ditentukan (Buchanan dan Gibbons, 1974).

K. Genus *Acetobacter*

Genus *Acetobacter*, bentuk selnya elips atau batang (lurus atau sedikit bengkok), Ukuran lebar 0,6 - 0,8 μm dengan panjang 1,0 - 4,0 μm . Perubahan bentuk sel menjadi bulat, bercabang, seperti kurva dan lain sebagainya dapat terjadi pada beberapa spesies. *Acetobacter* bergerak dengan flagella di seluruh permukaan (*peritrichous*) atau lateral (samping). *Acetobacter* tidak pernah membentuk endospora. Sifat-sifat yang khas pada *Acetobacter* bersifat Gram negatif, aerob sejati (obligat aerob) karena pengambilan energinya melalui sistem respirasi tidak melalui proses fermentasi. Warna koloni dari genus *Acetobacter* pucat dan jarang membentuk pigmen (bahan warna). Sebagian kecil dari genus *Acetobacter* membentuk pigmen coklat yang larut dalam air, atau koloni berwarna merah muda karena adanya *forfirin* (Buchanan dan Gibbons, 1974).

Menurut Buchanan dan Gibbons (1974), bakteri ini dapat mengoksidasi etanol menjadi asam asetat pada kondisi normal atau asam (pH 4,5). Asam asetat dan asam laktat akan teroksidasi menjadi CO_2 dan H_2O pada kondisi *overoxidizers* (kelebihan oksigen). Suhu optimum untuk pertumbuhan *Acetobacter* adalah 30 $^{\circ}\text{C}$ dengan kisaran suhu antara 5 - 42 $^{\circ}\text{C}$. pH optimum 5,6 - 6,3, tetapi dapat menyesuaikan diri sampai pH 2.

Acetobacter tidak ada yang berbahaya bagi manusia atau hewan. Beberapa jenis *Acetobacter* beracun bagi beberapa khamir. *Acetobacter* lebih suka substrat beralkohol (Gadd 1933). Perbedaan karakteristik spesies spesies dari genus *Acetobacter* dapat dilihat pada Lampiran 2.

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Teknologi Indonesia dan Laboratorium Pengolahan Bahan Pangan, Cimanggu Bogor. Dilaksanakan pada bulan April 2004 sampai bulan Oktober 2004.

B. Metode Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif. Penelitian deskriptif adalah melukiskan keadaan objek atau peristiwa saja, tanpa kesimpulan yang berlaku secara umum.

Isolasi dan identifikasi bakteri yang dilakukan pada penelitian ini melalui tahapan sebagai berikut :

- a. Isolasi :
 - Analisa total mikroba
 - Pengamatan morfologi koloni
- b. Identifikasi kelompok bakteri :
 - Pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel
 - Pewarnaan spora
 - Uji katalase
- c. Identifikasi Genus bakteri :
 - Fermentasi karbohidrat
 - Uji VP (*Voges Proskauer*)

- Uji indol
- Uji pertumbuhan pada Mac Conkey
- Uji nitrat
- Uji sitrat
- Uji hemolisis
- Uji oksidase
- Uji MR (*Methyl Red*)

C. Alat dan Bahan

C.1. Alat

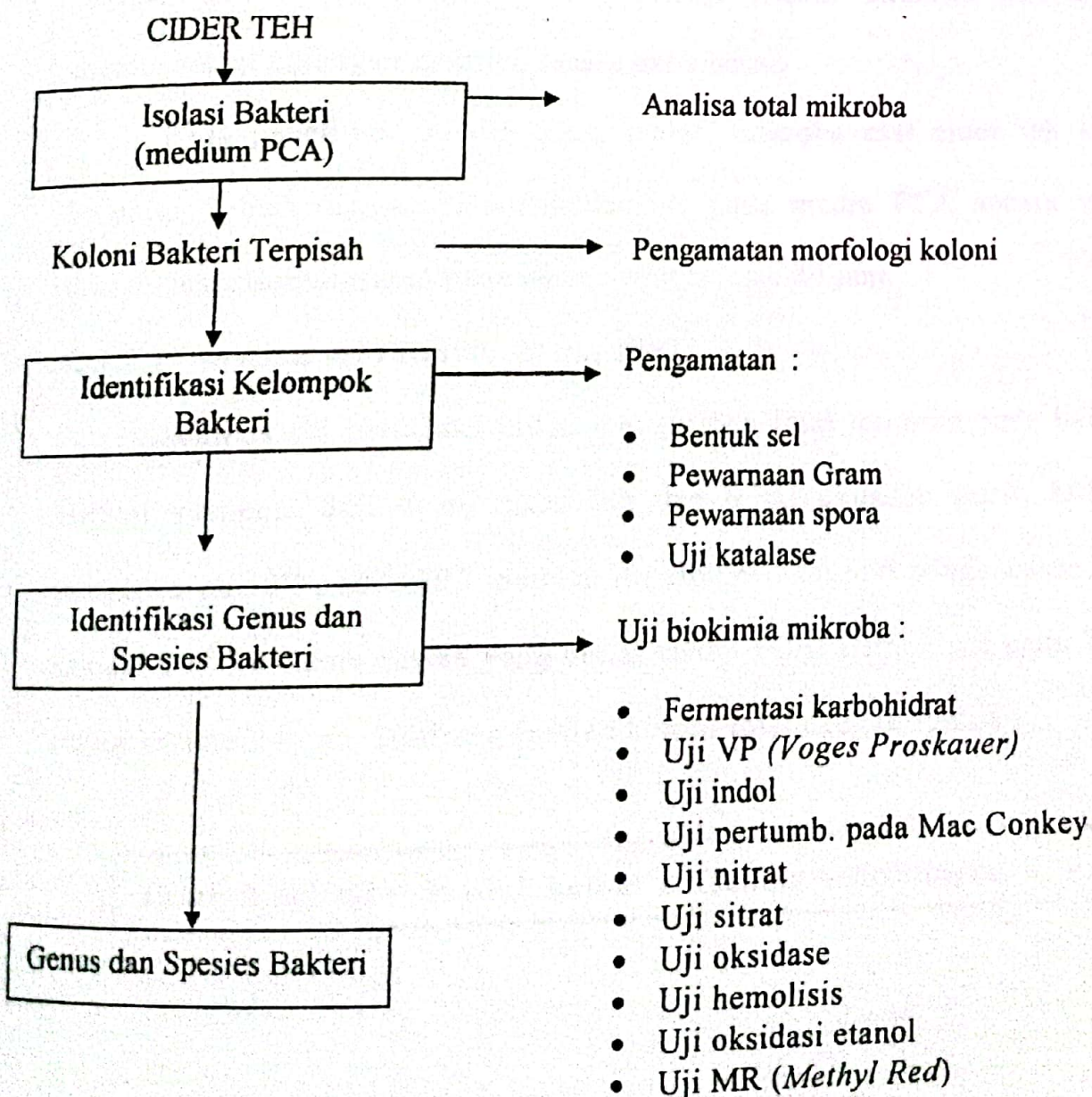
Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, oven, *laminair air flow*, lampu spirtus, jarum ose, *beaker glass*, pipet ukur, cawan petri, *erlenmeyer*, kaca preparat, kamera mikroskop, pipet, spatula, tabung reaksi, timbangan.

C.2. Bahan

Bahan-bahan lain yang digunakan adalah akuadest steril, *Plate Count Agar (PCA)*, *Nutrient Broth (NB)*, alkohol, spirtus, larutan violet kristal (gram A), Larutan *lugol's iodine* (Gram B), larutan etil alkohol 96% (Gram C), larutan safranin (Gram D), H₂O₂ 3%, glukosa, manitol, xylosa, arabinosa, *Menlen Red-Voges Proskauer (MR-VP)*, *reagen barritt*, pepton, *reagen kovac*, media Mac Konkey, nitrat, larutan asam sulfanilat, larutan dimetil-a-naftilamin, agar *sitrat Simmons*, Cider teh.

C.3. Cara Kerja

Cara kerja untuk mengidentifikasi bakteri yang terdapat dalam cider teh adalah sebagai berikut, pertama melakukan isolasi, identifikasi kelompok bakteri, dan identifikasi Genus bakteri yang diperoleh. Gambar 2 berikut ini adalah diagram alir cara kerja dari identifikasi bakteri :



Gambar 2. Diagram Alir Identifikasi mikroba (Buchanan dan Gibbons, 1974)

C.3.1. Isolasi

Isolasi bertujuan untuk memisahkan mikroba tertentu dari lingkungannya, sehingga diperoleh biakan yang tidak tercampur dengan jenis lain. Teknik isolasi yang digunakan adalah teknik agar tuang (*pour plate*). Dengan teknik isolasi ini kita dapat sekaligus menganalisis jumlah sel mikroba, mengamati morfologi koloni mikroba dan dapat membedakan golongan mikroba secara garis besar.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi mikroba asal cider teh yang berumur 7 hari dengan menumbuhkannya pada media PCA secara *pour plate* yang diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam.

C.3.1.1. Analisis sel (Thayib, *et al.*, 1997)

Analisis sel bertujuan untuk menghitung total mikroba pada bahan. Dibuat suspensi dari 1 ml cider teh dan 9 ml akuades steril. Dibuat pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Setelah itu dipipet 1 ml dari pengenceran 10^{-4} sampai 10^{-6} ke dalam cawan yang berisi media PCA. Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Dihitung jumlah koloni total dengan rumus :

$$\text{Jumlah sel/ml} = \text{Jumlah koloni} \times 1/\text{faktor pengenceran}$$

C.3.1.2. Pengamatan morfologi koloni

Koloni hasil isolasi kemudian dipilih, dimurnikan (*purifikasi*) dengan metoda teknik gores (*streak plate*). Dari hasil isolasi dan *purifikasi* ini akan diperoleh biakan murni. Penggoresan dilakukan secara kuadran sehingga akan tumbuh koloni-koloni yang terpisah. Selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi koloni biakan murni yang meliputi pengamatan bentuk, warna, tepian dan elevasi dari koloni yang tumbuh.

C.3.2. Identifikasi kelompok bakteri

Identifikasi bertujuan untuk mengetahui penataan sistematik mikroba ke dalam kelompok dengan menandakan nama Genus dan Spesies (Buchanan dan Gibbons, 1974). Pengelompokan bakteri dapat dilakukan berdasarkan perbedaan bentuk sel, hasil pewarnaan Gram, dan kebutuhan akan oksigen.

C.3.2.1. Pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel (Thayib, *et al.*, 1997)

Bakteri sulit dilihat dengan mikroskop cahaya, karena tidak mengadsorpsi ataupun membiaskan cahaya. Alasan inilah yang menyebabkan zat warna digunakan untuk mewarnai bakteri atau latar belakangnya. Tujuan dari pewarnaan Gram ini adalah untuk mengamati morfologi bakteri yang sukar diwarnai oleh pewarna-pewarna sederhana.

Dibuat lapisan tipis dari satu ose biakan yang berumur 24 jam pada kaca preparat kemudian difiksasi. Ditetesi dengan larutan Gram A, dibiarkan selama 60 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Ditetesi dengan larutan Gram B, dibiarkan selama 60 detik,

kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Ditetesi dengan larutan Gram C, dibiarkan selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Ditetesi dengan larutan Gram D, dibiarkan selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan setelah itu diamati bentuk sel serta responnya terhadap reaksi pewarnaan Gram bakteri di bawah mikroskop. Apabila sel mikroba yang dihasilkan berwarna merah maka mikroba tersebut bersifat Gram negatif, sedangkan apabila warna sel mikroba berwarna ungu maka mikroba tersebut bersifat Gram positif.

C.3.2.2. Pewarnaan spora (Hadinotomo, 1985)

Pewarnaan spora bertujuan untuk mengetahui apakah mikroba yang didapat menghasilkan endospora atau tidak.

Disiapkan preparat apusan bakteri berumur tua (di atas 24 jam) dan ditutup dengan sepotong kertas hisap. Kemudian kertas hisap tadi ditetesi dengan larutan malakit hijau sampai jenuh. Preparat diletakkan di atas penangas air selama 2-3 menit dan dijaga jangan sampai larutan kering. Kertas hisap diangkat dan preparat dicuci pada air mengalir. Ditetesi dengan larutan safranin selama 30 detik. Dicuci kembali dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kertas hisap. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dengan menggunakan minyak imersi. Di gambar letak, bentuk dan ukuran spora.

Dari hasil pewarnaan spora yang dilakukan, terdapat mikroba yang memiliki spora sudah dapat dideteksi maka pengecatan spora tidak dilakukan. Diamati dengan mikroskop yaitu bentuk, pembengkakan dan posisi dominan dari spora tersebut.

C.3.2.3 Uji katalase (Thayib, *et al.*, 1997)

Dengan banyaknya oksigen bebas dilingkungannya, kebanyakan bakteri akan memproduksi H_2O_2 yang bersifat toksik terhadap bakteri yang masih hidup. Untuk menjaga kelangsungan hidupnya beberapa bakteri mampu menghasilkan enzim katalase yang memecah H_2O_2 menjadi air dan oksigen, sehingga sifat toksiknya hilang maka dari itu perlu dilakukan adanya uji katalase.

Disiapkan biakan yang akan diuji yang berumur 24 jam. Kaca preparat dibersihkan dengan alkohol. Ditetaskan beberapa larutan H_2O_2 3%. Diambil biakan dengan ose dan diletakkan dalam tetesan H_2O_2 3%. Diamati adanya gelembung gas oksigen yang dihasilkan. Hasil uji katalase positif apabila terbentuk gelembung gas oksigen.

C.3.3. Identifikasi Genus dan Spesies bakteri

Identifikasi selanjutnya dilakukan untuk menentukan Genus dan Spesies bakteri dengan melakukan tahapan uji biokimia yang meliputi uji-uji : fermentasi karbohidrat, uji VP (*Voges Proskauer*), uji indol, uji hidrolisa urea, uji nitrat, uji oksidase, uji hemolisis, uji sitrat, uji MR (*Methyl Red*), dan uji oksidasi etanol.

C.3.3.1. Uji fermentasi karbohidrat (Thayib, *et al.*, 1997)

Berbagai macam karbohidrat dapat difermentasi oleh bakteri. Karena setiap kelompok bakteri tertentu mempunyai pola fermentasi karbohidrat yang khas, maka sifat-sifat bakteri dalam memfermentasi karbohidrat ini merupakan salah satu yang penting dalam identifikasi.

Uji fermentasi karbohidrat ini diawali dengan membuat suspensi dari satu ose biakan umur 24 jam dalam 9 ml akuades steril. Diinokulasi pada medium yang mengandung 1 ml glukosa 1 ml manitol, 1 ml xylosa, 1 ml dan arabinosa pada suhu ruang selama 48 jam. Diamati terjadinya perubahan warna dari merah menjadi kuning yang menandakan suasana asam karena adanya indikator *phenol red*.

C.3.3.2 Uji VP (*Voges Proskauer*) (Hadioetomo, 1985)

Uji VP (*Voges Proskauer*), bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri menghasilkan asam atau tidak. Dengan mendeteksi adanya *asetoin* (asetil-metil karbinol) yang merupakan precursor 2,3- butandiol di dalam biakan menggunakan reagen *Barritt*. Reagen ini terdiri dari α -naftol dan KOH.

Uji VP (*Voges Proskauer*) dilakukan dengan menyiapkan biakan yang berumur 24 jam dan kemudian diinokulasikan 1 ose dalam medium (*metilen red*) MR – VP, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam lalu ditambahkan reagen *Barritt* 10 tetes.

Dikocok tabung tersebut keras-keras selama 20-30 detik. Bila terlihat warna merah artinya dalam biakan tersebut terdapat *asetoin*. Karena *asetoin* dan 2,3-butandiol hampir selalu bersama-sama maka uji ini dianggap sah atau

reaksi *VP* positif. Kadang-kadang diperlukan waktu 2 jam untuk memperoleh hasil dari uji ini.

C.3.3.3. Uji indol (Thayib, *et al.*, 1997)

Asam amino diperoleh sebagai hasil hidrolisa protein, pepton, dan peptida. Triptofan adalah suatu asam amino yang penting untuk mengetahui jenis bakteri tertentu, karena beberapa bakteri mampu menghidrolisa asam amino ini. Hasil hidrolisa triptofan adalah senyawa indol, yang dapat diamati dengan melalui uji indol.

Uji indol dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose biakan dalam medium pepton kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu ruang, diamati perubahan yang terjadi, lalu tambahkan 10-12 tetes *reagen kovac*. Bila didalam medium pepton yang telah diberi biakan terdapat indol, maka dibagian atas medium akan segera terbentuk lapisan berwarna merah, yang berarti bakteri yang diuji dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat melalui kerja enzim triptofanase.

C.3.3.4. Uji pertumbuhan pada *Mac Conkey*

Tujuan uji pertumbuhan pada *Mac Conkey* adalah untuk mengetahui pertumbuhan bakteri Gram negatif dan mengetahui apakah bakteri tersebut dapat memfermentasikan laktosa atau tidak. Bakteri yang tidak dapat memfermentasikan laktosa biasanya bersifat patogen. Persenyawaan utama dalam media ini adalah laktosa, garam empedu, dan merah netral.

Uji ini diawali dengan menginokulasikan satu ose biakan pada agar miring *Mac Conkey*, kemudian diinkubasi 24 jam. Diamati perubahan yang terjadi. Uji ini positif jika terbentuk warna merah bata pada media.

C.3.3.5. Uji nitrat (Hadioetomo, 1985)

Uji ini ditujukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit. Bakteri yang tumbuh aktif akan menghabiskan oksigen yang tersedia terlebih dahulu, baru kemudian menggunakan nitrat untuk kelangsungan hidupnya.

Uji nitrat diawali dengan menginokulasikan 1 ose biakan kedalam medium nitrat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Diamati perubahan yang terjadi dengan cara menambahkan 2-3 tetes larutan asam sulfanilat dan 2-3 tetes larutan dimetil-a-naftilamin. Bila dalam biakan yang diuji terdapat nitrit maka segera terbentuk warna merah, yang berarti uji ini positif yang berarti terjadi pembentukan nitrit.

C.3.3.6. Uji sitrat (Hadioetomo, 1985)

Uji ini ditujukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya di dalam medium Agar *sitrat Simmons*.

Uji sitrat diawali dengan menginokulasikan satu ose biakan pada agar miring *sitrat simmons*, kemudian diinkubasi 24 jam - 72 jam pada suhu ruang, lalu diamati apakah ada perubahan warna dan apakah ada pertumbuhan. Uji ini positif jika ditunjukkan dengan berubahnya warna hijau menjadi biru bila keadaan menjadi alkalin dan adanya pertumbuhan pada permukaan agar miring yang digores.

C.3.3.7. Uji oksidase (Hadioetomo, 1985)

Uji ini ditujukan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri menghasilkan oksidase atau tidak. Uji ini diawali dengan menggenangi koloni bakteri dalam cawan dengan menggunakan reagen uji oksidase (larutan *dimetil-p-fenildiamin hidrokloride* 1%). Uji ini positif jika ditandai dengan adanya perubahan warna koloni menjadi merah muda, lalu merah tua, merah gelap, dan akhirnya hitam.

C.3.3.8. Uji hemolisis (Hadioetomo, 1985)

Uji hemolisis diawali dengan menginokulasikan 1 ose biakan kedalam medium agar darah, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, lalu diamati area di sekitar koloni atau pertumbuhan. Bila area tersebut jernih artinya terjadi hemolisis sel-sel darah secara lengkap, atau hemolisis *beta*. Bila area tersebut berwarna hijau artinya terjadi hemolisis sebagian pada sel-sel darah, atau hemolisis *alfa*, namun bila area tersebut tidak menunjukkan perubahan warna artinya tidak terjadi hemolisis pada sel-sel darah, atau disebut hemolisis *gamma*.

C.3.3.9. Uji MR (*Methyl Red*) (Hadioetomo, 1985)

Sejumlah besar bakteri Gram negatif dapat dikenali berdasarkan produk akhir yang dihasilkannya bila memfermentasi glukosa di dalam medium MR-VP. Uji ini ditujukan untuk mengetahui kemampuan bakteri memfermentasi asam campuran (*mixed acid fermenter*) dengan berubahnya indikator merah metil pada biakan menjadi merah.

Uji MR diawali dengan menginokulasikan 1 ose biakan kedalam medium *MR-1 P* pada tabung yang bersih. Di tambahkan 3-4 tetes indikator merah metil. Bila warna medium berubah menjadi merah, menunjukkan terbentuknya asam pada tabung.

C.3.3.10. Uji oksidasi etanol (Hadioetomo, 1985)

Tujuan dari oksidasi ini adalah untuk menguji apakah bakteri tersebut dapat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat.

Uji oksidasi etanol diawali dengan membuat suspensi dari 1 ose biakan dan 9 ml akuades steril, kemudian menginokulasikannya pada medium *Nutrient Broth* yang mengandung etanol kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 72 jam. Hasil positif ditunjukkan jika terjadi perubahan warna medium dari biru kehijauan menjadi kuning yang berarti bakteri tersebut dapat mengoksidasi etanol menjadi CO_2 .

IV. HASIL DAN ANALISIS HASIL

A. Total Mikroba Cider Teh

Hasil total mikroba yang terdapat dalam cider teh dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Populasi mikroba dalam cider teh

No	Keterangan	Jumlah sel/ml
1	Total mikroba	$2,95 \times 10^7$

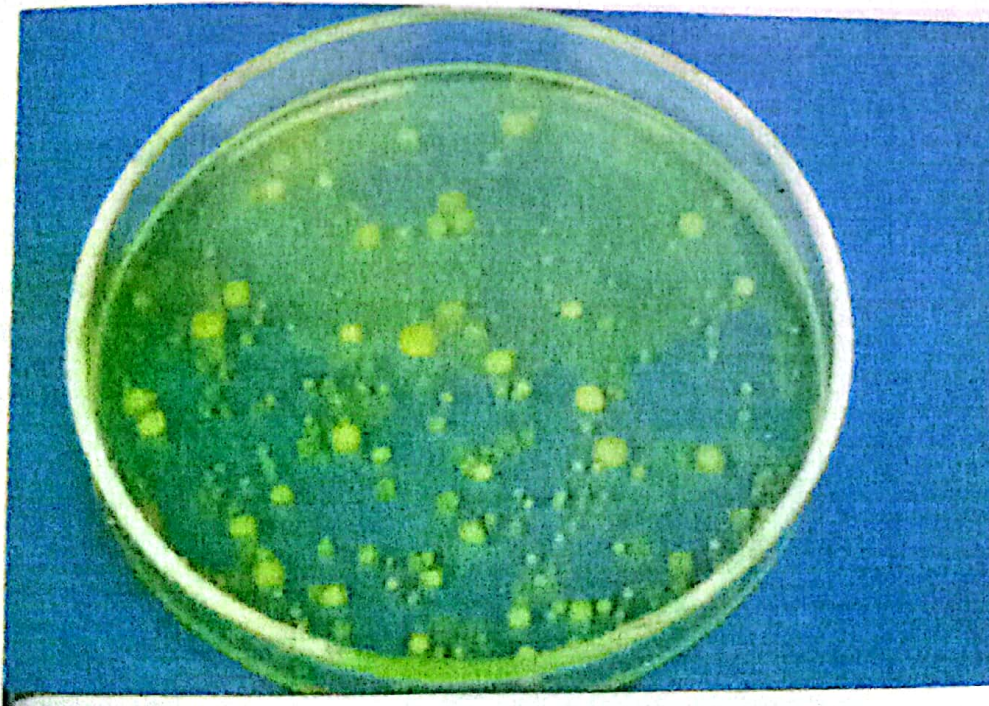
Hasil total mikroba dalam cider teh yaitu $2,95 \times 10^7$ sel/ml.

B. Hasil Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni dalam Cider Teh

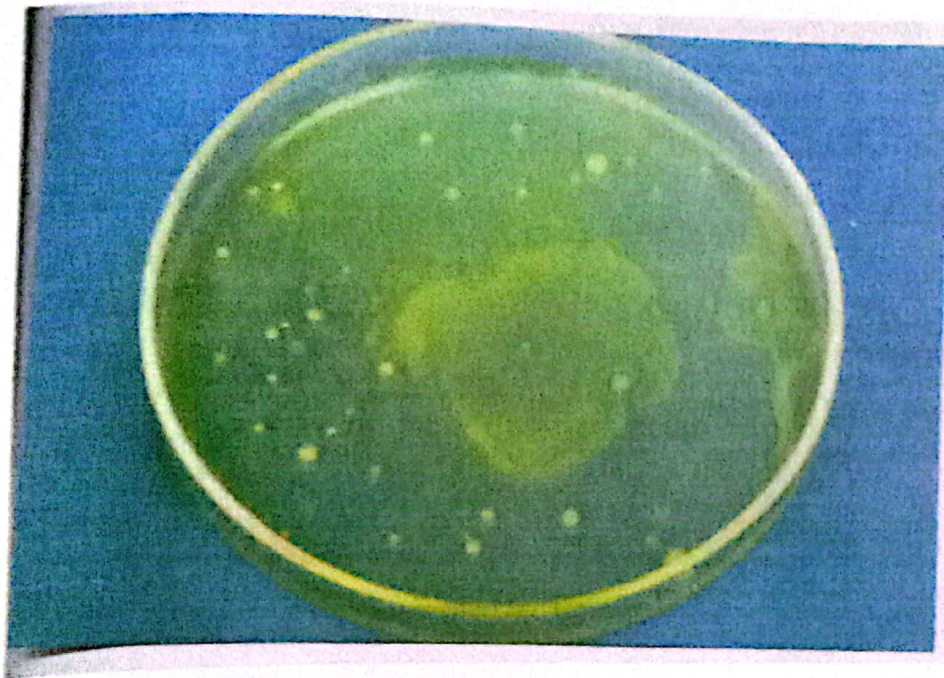
Dari hasil isolasi mikroba pada media PCA, diambil dua koloni bakteri yang memiliki morfologi yang berbeda dan diamati masing-masing warna, bentuk, tepian, dan elevasinya (Tabel 4). Untuk memudahkan identifikasi selanjutnya, mikroba tersebut diberi kode abjad isolat A, dan isolat B. Morfologi koloni isolat A dan B masing-masing dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4.

Tabel 4. Hasil pengamatan morfologi koloni

Isolat	Warna	Bentuk	Tepian	Elevasi
A	Krem	Tidak beraturan	Berlekuk	Datar
B	Krem	Bundar	Licin	Cembung



Gambar 3. Morfologi koloni isolat A
Umur : 24 jam ; Medium : PCA



Gambar 4. Morfologi koloni isolat B
Umur : 24 jam; Medium : PCA

C. Hasil Identifikasi Isolat Bakteri dalam Cider Teh

C.1. Hasil Pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel

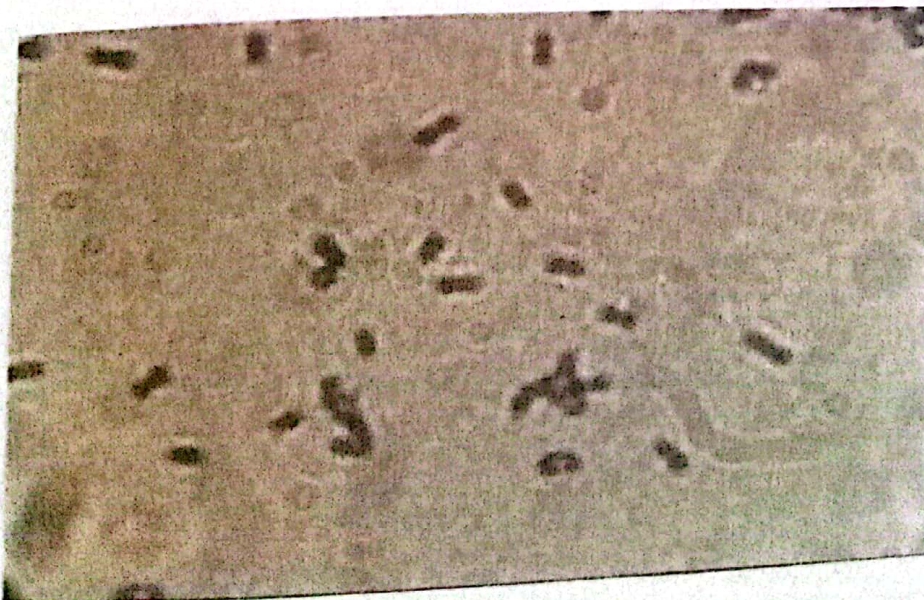
Hasil pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel asal cider teh dapat dilihat pada Tabel 5 serta Gambar 5 dan Gambar 6.

Tabel 5. Hasil Pewarnaan Gram dan pengamatan bentuk sel

Isolat	Gram	Bentuk Sel
A	+	Batang Panjang
B	-	Batang pendek



Gambar 5. Hasil pewarnaan Gram dan bentuk sel isolat A
Umur : 24 Jam; Medium : PCA;Pembesaran : 1000 x



Gambar 6. Hasil pewarnaan Gram dan bentuk sel isolat B
Umur : 24 Jam; Medium : PCA;Pembesaran : 1000 x

C.2. Pewarnaan spora isolat bakteri dalam cider teh

Hasil pewarnaan spora isolat bakteri A dan B dalam cider teh dapat dilihat pada Tabel 6 serta Gambar 7 dan Gambar 8.

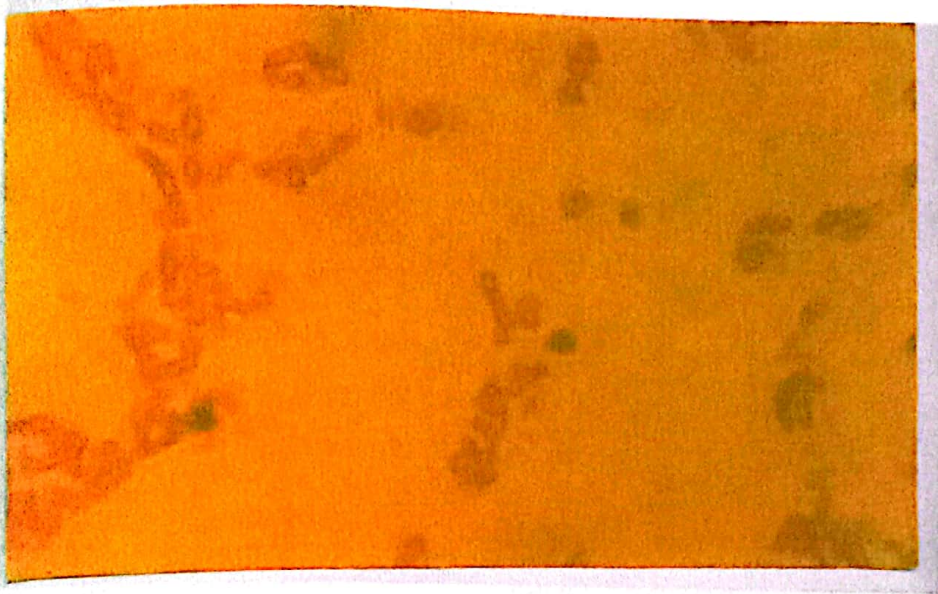
Tabel 6. Hasil pewarnaan spora isolat bakteri dalam cider teh

Isolat	Endospora
A	+
B	-

Ket : (+) = terdapat endospora
(-) = tidak terdapat endospora



Gambar 7. Hasil pewarnaan spora isolat bakteri A
Umur : 36 Jam; Medium : PCA;Pembesaran : 1000 x



Gambar 8. Hasil pewarnaan spora dan bentuk sel isolat bakteri B
Umur : 36 Jam; Medium : PCA;Pembesaran : 1000 x

C.3. Hasil uji katalase

Hasil uji katalase dari mikroba dalam cider teh dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil uji katalase

Isolat	Katalase
A	+
B	+

Ket : (+) = Terbentuk gelembung gas oksigen
 (-) = Tidak terbentuk gelembung gas oksigen

D. Hasil identifikasi Genus dan Spesies bakteri

D.1. Hasil uji biokimia isolat A dalam cider teh

Hasil uji Biokimia untuk identifikasi mikroba isolat A dalam cider teh di perlihatkan pada Tabel 8 dan Gambar 9.

Tabel 8. Hasil uji biokimia isolat A dalam cider teh

Uji Biokimia		Isolat A
Uji fermentasi karbohidrat :	Glukosa	+
	Arabinosa	d
	Manitol	+
	Xylosa	d
Uji indol		-
Uji VP		+
Uji pertumbuhan pada <i>Mac Conkey</i>		-
Uji nitrat		-
Uji sitrat		-
Uji oksidase		-
Uji hemolisis		+
Uji MR		+

Ket : (+) = terbentuk asam yang ditandai dengan perubahan warna
 (-) = tidak terbentuk asam yang ditandai dengan tidak ada perubahan warna
 (d) = 11-89 % positif, d = reactions differ, (+) for 11-89% of strains
 + = for 90-100% of strains

Hasil uji fermentasi karbohidrat yang dilakukan pada isolat A menunjukkan hasil positif pada penggunaan sumber karbon dari glukosa, xylosa, arabinosa dan mannitol. Hal ini ditandai dengan adanya perubahan warna dari merah menjadi kuning pada masing-masing sumber gula tersebut. Perubahan warna ini menandakan adanya produksi asam yang merubah warna merah pada phenol red sebagai indikator menjadi warna kuning.

Pengujian indol menunjukkan hasil negatif dengan tidak terlihatnya cincin yang berwarna merah pada permukaan media setelah ditambahkan reagen *kovac*. Dari hasil uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A yang diuji tidak dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat melalui kerja enzim triptofanase.

Hasil uji *VP (Voges Proskauer)* menunjukkan hasil positif dengan terjadinya perubahan warna dari warna kuning menjadi warna merah pada media setelah ditambahkan *reagen Barritt*. Dari hasil uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A yang kita uji menghasilkan asam.

Hasil uji pertumbuhan pada *Mac Conkey* menunjukkan hasil yang negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada media. Dari hasil uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A tidak dapat memfermentasikan laktosa dan termasuk golongan bakteri Gram positif.

Untuk pengujian reduksi nitrat menunjukkan hasil negatif dengan tidak adanya perubahan warna medium menjadi merah setelah ditambahkan reagen uji nitrit. Dari pengujian nitrit ini mendandakan bahwa isolat bakteri A tidak dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit.

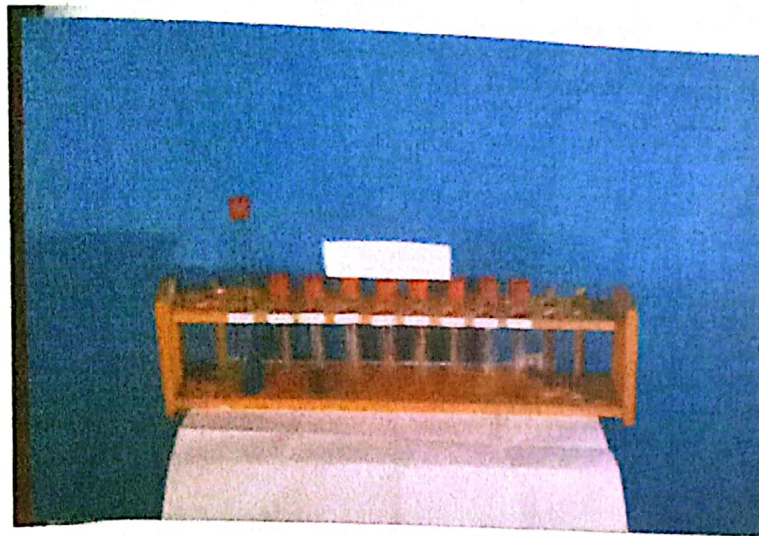
Untuk pengujian sitrat menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadinya perubahan warna pada media dan tidak adanya pertumbuhan mikroba pada permukaan agar miring yang telah digores. Dari uji sitrat ini menandakan bahwa isolat bakteri A tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya di dalam medium Agar *sitrat Simmons*.

Pada uji oksidase menunjukkan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada koloni. Dari uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A tersebut tidak menghasilkan oksidase.

Pada uji hemolisis menunjukkan hasil positif, ditunjukkan dengan adanya warna area pertumbuhan koloni menjadi jernih. Dari uji ini menandakan bahwa pada koloni isolat bakteri A terjadi hemolisis sel-sel darah secara lengkap.

Pada uji MR (*Methyl Red*) menunjukkan hasil positif, ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada biakan MR-VP. Dari uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A merupakan bakteri yang dapat menghasilkan asam.

Jadi dari hasil analisis uji biokimia diatas maka ditetapkan mikroba pada isolat A adalah bakteri *Bacillus coagulans*. Hasil uji biokimia untuk isolat bakteri A dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9. Hasil uji biokimia untuk isolat bakteri A
Setelah diinkubasi 48 jam**

D.2. Hasil uji biokimia isolat bakteri B

Pada isolasi mikroba isolat B hasil pewarnaan Gram yang dilakukan terhadap isolat tersebut memberikan hasil Gram negatif dan bentuk selnya batang pendek.

Pada uji oksidasi etanol, isolat B dapat memproduksi asam dari etanol maka akan mengakibatkan warna media berubah dari biru kehijauan menjadi kuning dan selanjutnya melanjutkan oksidasi tersebut menjadi CO_2 dan H_2O sehingga karena over oksidasi ini warna media akan kembali menjadi hijau.

Hasil uji oksidasi etanol yang dilakukan memperlihatkan adanya perubahan warna setelah 36-42 jam inkubasi dan over oksidasi setelah empat hari inokulasi.

Dari hasil uji terhadap oksidasi laktat, hasil yang didapatkan dari uji tersebut adalah setelah dua hari inokulasi semua inokulum memproduksi endapan putih disekelilingnya. Jadi dari hasil isolasi dan uji biokimia tersebut ditetapkan bahwa isolat B tersebut adalah bakteri *Acetobacter xylinum*.

V. PEMBAHASAN DAN PENDAPAT

A. Total Mikroba Cider Teh

Mikroba yang terdapat dalam cider teh adalah dari kelompok bakteri dan khamir. Ini ditunjukkan dengan tumbuhnya bermacam-macam morfologi koloni dari mikroba yang terisolasi. Kelompok mikroba bakteri yang tumbuh pada media PCA lebih mendominasi dibandingkan kelompok khamir. Setelah dilakukan pengamatan morfologi koloni bakteri terdapat dua morfologi koloni bakteri yang berbeda (Tabel. 4) oleh karena itu dilakukan isolasi dan *purifikasi* terhadap masing-masing koloni bakteri tersebut. Hasil total mikroba dalam cider teh yaitu $2,95 \times 10^7$ sel/ml.

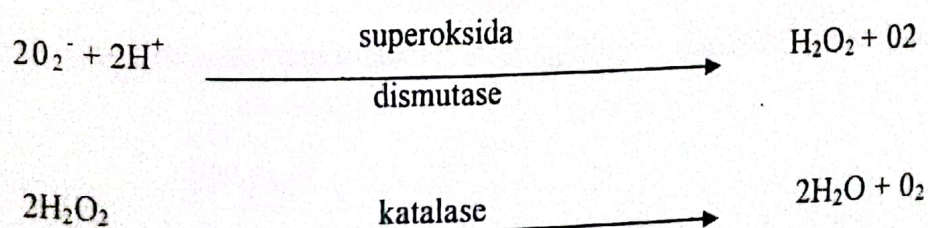
B. Identifikasi Kelompok Bakteri dalam Cider Teh

Dari hasil isolasi pada cider teh didapatkan dua isolat bakteri A dan B. Isolat bakteri A mempunyai morfologi koloni berwarna krem, dengan bentuk tidak beraturan, dengan tepian berlekuk, dan elevasi datar, bersifat Gram positif, berbentuk batang (basil), membentuk spora, dan uji katalase positif. Dari hasil uji identifikasi awal ini, isolat bakteri A termasuk dalam kelompok bakteri Famili *Bacillaceae* (Buchanan dan Gibbons, 1974). Dimana di dalam Famili *Bacillaceae* terdapat kelompok Genus *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, dan *Sporosarcina*. Untuk dapat mengetahui Genus dari isolat bakteri A perlu dilakukan identifikasi biokimia selanjutnya.

Hasil identifikasi isolat bakteri B adalah sebagai berikut : koloni berwarna krem, dengan bentuk bulat, tepian berlekuk, dan elevasi datar, tidak mempunyai endospora, termasuk Gram negatif, berbentuk batang pendek (elips) dan uji katalase positif. Dari hasil uji identifikasi awal ini isolat bakteri B tersebut termasuk kelompok bakteri genus *Acetobacter* (Buchanan dan Gibbons, 1974). Untuk lebih meyakinkan bahwa isolat bakteri B termasuk kelompok bakteri Genus *Acetobacter*, dilakukan identifikasi biokimia selanjutnya.

Hasil uji katalase menyatakan isolat bakteri A mempunyai katalase positif dengan terbentuknya gelembung gas oksigen. Hasil ini membuktikan isolat A bersifat aerob . Sedangkan hasil uji katalase pada isolat bakteri B menyatakan isolat bakteri B mempunyai katalase positif dengan terbentuknya gelembung gas oksigen. Hasil ini membuktikan isolat B bersifat obligat aerob .

Katalase adalah enzim yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Pelczar, 1986). Menurut Fardiaz (1992), bakteri yang bersifat aerobik dan anaerob yang tidak sensitif terhadap oksigen mempunyai enzim-enzim yaitu superoksida dismutase yang memecah radikal bebas tersebut, dan enzim katalase yang memecah H_2O_2 sehingga menghasilkan senyawa akhir yang tidak beracun. Reaksi dapat ditulis sebagai berikut :



C. Identifikasi Genus dan Spesies Mikroba dalam Cider Teh

C.1. Uji biokimia isolat bakteri A

Hasil uji fermentasi karbohidrat yang dilakukan menunjukkan hasil positif pada glukosa, xylosa, arabinosa dan manitol ditandai dengan perubahan warna dari merah menjadi kuning. Perubahan warna ini menandakan adanya produksi asam dari isolat bakteri A yang merubah warna merah pada *phenol red* sebagai indikator menjadi warna kuning.

Untuk pengujian indol menunjukkan hasil negatif dengan tidak terlihatnya cincin yang berwarna merah pada permukaan media setelah ditambahkan *reagen kovac*. Dari hasil uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A yang diuji tidak dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat melalui kerja enzim triptofanase.

Hasil pengujian *VP (Voges Proskauer)* menunjukkan hasil positif karena terjadinya perubahan warna pada medium *VP* setelah ditambahkan *reagen Barritt* menjadi merah. Penambahan *reagen Barritt* dapat dengan mudah mendeteksi adanya asetoin yang merupakan prekursor dari 2-3 butandiol, *reagen Barritt* terdiri dari α -naftol dan KOH. Asetil metil karbinol dengan adanya KOH dan udara akan teroksidasi menjadi diasetil, kemudian diasetil dengan adanya α -naftol dan asam amino yang terdapat di dalam medium akan membentuk warna merah. Hal ini menunjukkan bahwa didalam isolat bakteri A yang diuji terdapat 2,3-butandiol.

Hasil uji pertumbuhan pada Mac Conkey juga menunjukkan hasil yang negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada media hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri A tidak. Dari hasil uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A yang diuji tidak dapat memfermentasikan laktosa.

Untuk pengujian reduksi nitrat menunjukkan hasil negatif dengan tidak adanya perubahan warna medium menjadi merah setelah ditambahkan reagen uji nitrit. Dari pengujian nitrat ini menandakan bahwa isolat bakteri A tidak dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit. Hasil pada uji nitrat ini berhubungan dengan uji katalase yang dapat menunjukkan sifat dari isolat bakteri A yang bersifat aerob. Dalam hal ini penambahan reagen ke dalam biakan tidak menimbulkan perubahan warna.

Pengujian sitrat menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadinya perubahan warna pada medium dan tidak adanya pertumbuhan pada permukaan agar miring yang telah digores. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri A tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya di dalam medium agar *sitrat Simmons*. Medium ini adalah medium sintetik yang mengandung sitrat sebagai sumber karbon satu-satunya, sedangkan sebagai sumber nitrogennya digunakan garam amonium dan bukan asam amino. Agar *sitrat Simmons* juga mengandung indikator biru bromtimol yang dapat berubah warna dari hijau menjadi biru bila keadaan menjadi alkalin (Hadioetomo, 1993).

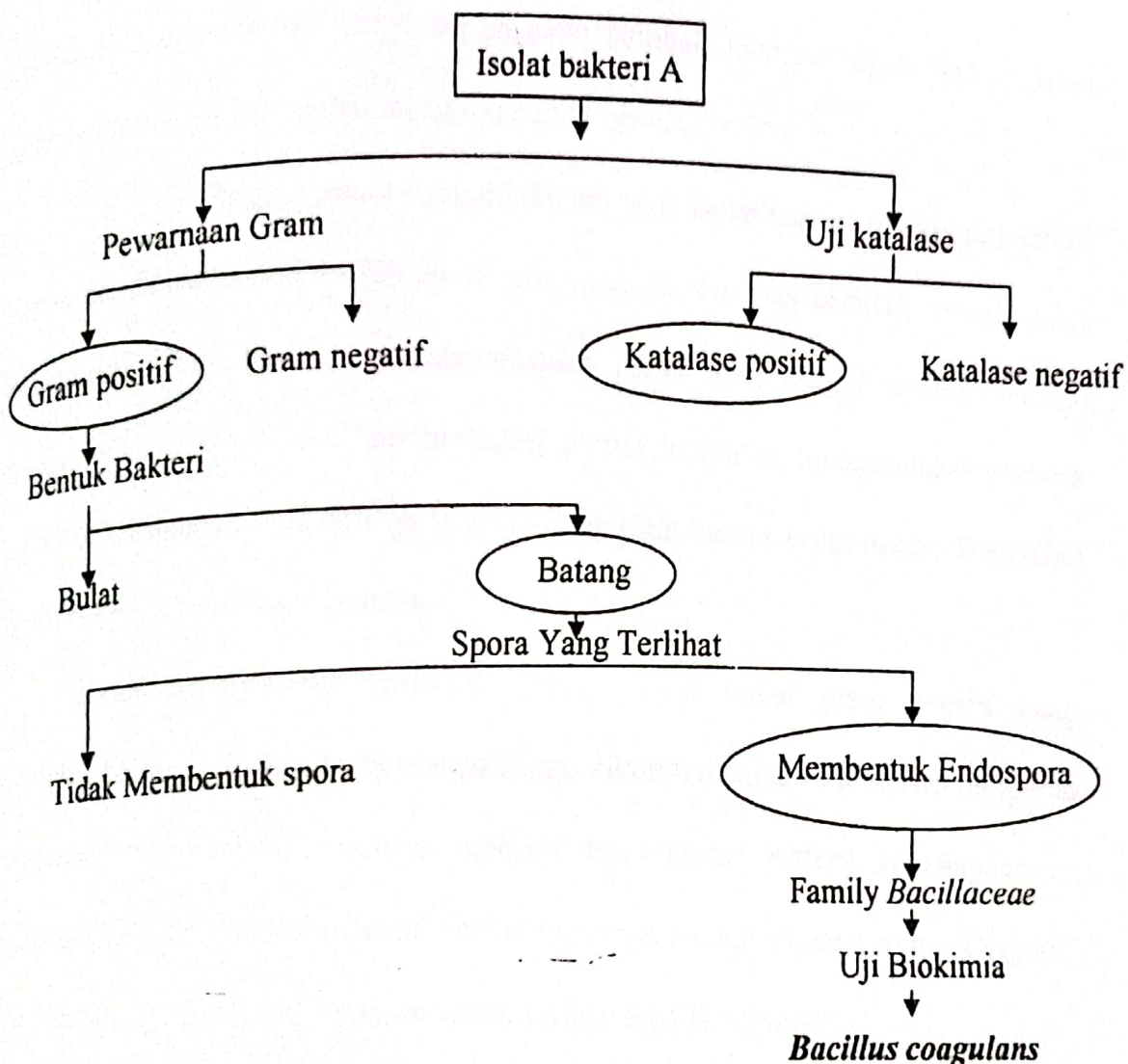
Pada uji oksidase menunjukkan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna pada koloni. Dari uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A tersebut tidak menghasilkan oksidase.

Pada uji hemolisis menunjukkan hasil positif, ditunjukkan dengan adanya warna area pertumbuhan koloni menjadi jernih. Dari uji ini menandakan bahwa pada koloni isolat bakteri A terjadi hemolisis sel-sel darah secara lengkap.

Pada uji MR (*Methy Red*) menunjukkan hasil positif, ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada media MR-VP. Dari uji ini menandakan bahwa isolat bakteri A merupakan bakteri yang dapat menghasilkan campuran asam.

Dari hasil pengamatan morfologi dan uji biokimia dapat ditetapkan bahwa isolat A adalah *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans termasuk bakteri termofilik, dapat menghasilkan asam laktat dalam jumlah sedikit dan bersifat aerob serta dapat tumbuh pada makanan asam seperti pada jus tomat kaleng (Buchanan dan Gibbons, 1974). Diagram Alir Identifikasi *Bacillus coagulans* dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Diagram Alir Identifikasi *Bacillus coagulans*

C.2. Uji biokimia isolat bakteri B

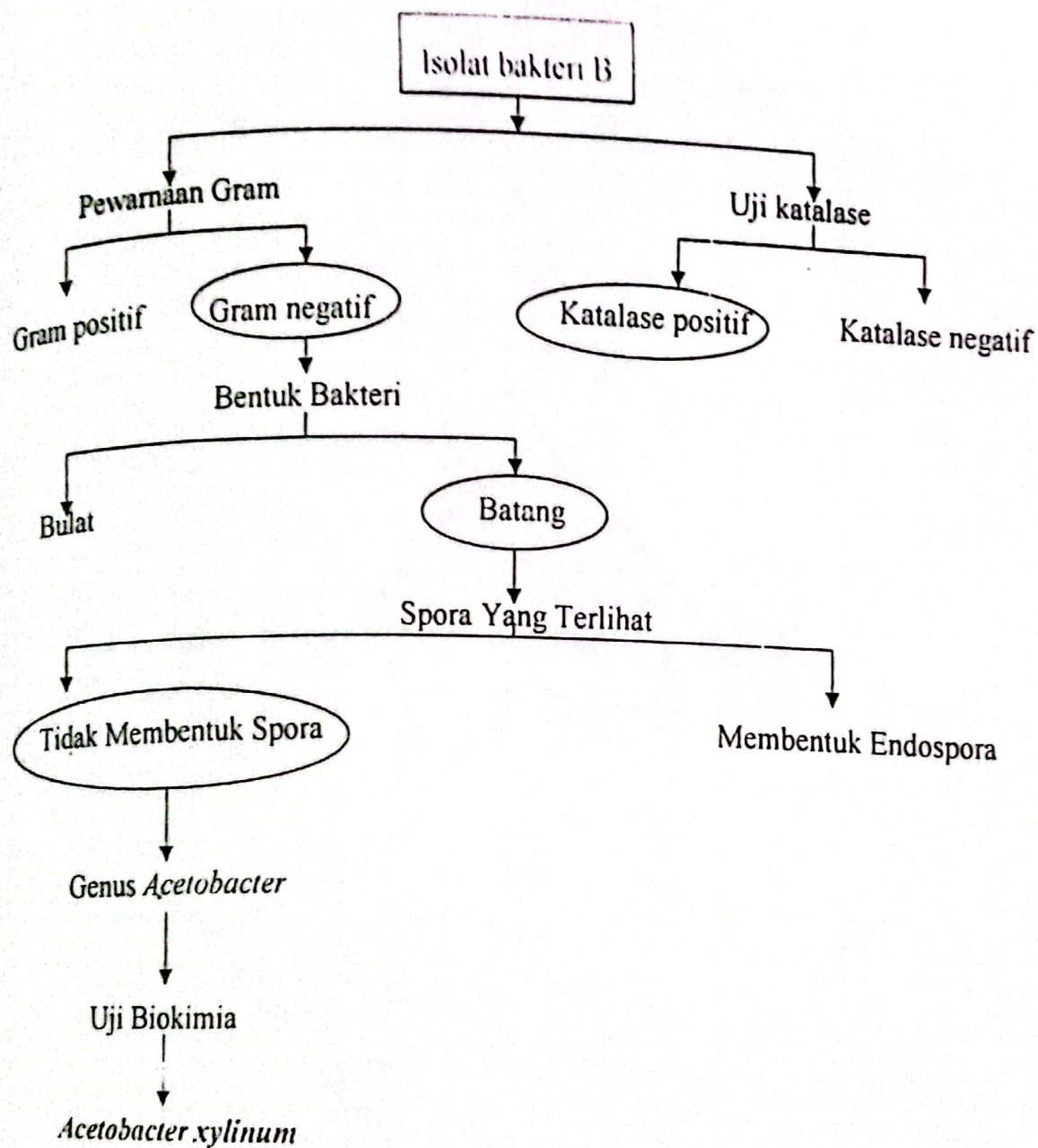
Dari ciri-ciri morfologi diduga isolat bakteri B termasuk dalam Genus *Acetobacter* (Buchanan dan Gibbons, 1974). Maka untuk menentukannya diperlukan uji biokimia dengan melakukan uji oksidasi etanol.

Pada uji oksidasi etanol isolat bakteri B dapat memproduksi asam dari etanol maka akan mengakibatkan warna media berubah dari biru kehijauan menjadi kuning dan selanjutnya melanjutkan oksidasi tersebut menjadi CO_2 dan H_2O sehingga

karena over oksidasi ini warna media akan kembali menjadi hijau. Namun strain isolat bakteri B sangat lambat melakukan over oksidasi.

Hasil uji oksidasi etanol yang dilakukan pada isolat bakteri B memperlihatkan adanya perubahan warna setelah 36-42 jam inokulasi dan over oksidasi setelah empat hari inokulasi. Dari hasil uji terhadap oksidasi laktat, hasil yang didapatkan dari uji tersebut adalah setelah dua hari inokulasi semua inokulum memproduksi endapan putih disekelilingnya. Jadi dari uji tersebut ditetapkan bahwa isolat bakteri B tersebut adalah bakteri *Acetobacter xylinum*.

Acetobacter xylinum termasuk bakteri asam asetat gram negatif yang berbentuk batang, sehingga tidak mengoksidasi alkohol menjadi CO_2 secara sempurna melainkan alkohol akan dioksidasi menjadi asam asetat. Karena kemampuannya memproduksi asam, maka isolat ini relatif toleran terhadap suasana asam. Diagram Alir Identifikasi *Acetobacter xylinum* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Diagram alir identifikasi *Acetobacter xylinum*

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi dan identifikasi bakteri dalam cider teh pada penelitian ini, diperoleh 2 spesies bakteri yaitu *Bacillus coagulans* dan *Acetobacter xylinum*.

B. Saran

Dalam pembuatan cider teh perlu dilakukan pasteurisasi agar mikroba yang kurang menguntungkan atau bahkan patogen tidak dapat tumbuh dan berkembang, disamping itu perlu standardisasi minuman cider teh.

Daftar Pustaka

- Amerine, M.A., H. W. Bergl, R. E. Kunkee, C. S. Ough, V. I. Singleton. 1982. *Technology of Wine Making*. The AVI. Publ. Co. Westport, Connecticut.
- Anderson, C. C. 1948. *An Introduction to Bakteriological Chemistry*. E. S. Livingstone, Ltd., Edinburg.
- Ansori, R., Suliantari, dan C.C Nurwitri. 1986 . *Teknologi Fermentasi, Penuntun Praktikum*. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, IPB
- Black, Jacquiline G. 1993. *Microbiology : Principles And Applications*. Second Edition. Prentice – Hill Inc. Englewood Cliffs.
- Buchanan, R. E. dan N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. Eight Edition. The Wiliams And Wilkins Company. Baltimore
- Eden, T. 1958. *Tea*. Longmans, Green and Co., New York.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pengolahan Pangan*. PAU JPB. Bogor.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. P.T. Raja Grafindo Persada. Jakarta
- Frank, Gunther W. 1995. *Kombucha-Beverage and Natural Remedy from The Far East*. Schwarzwald, Germany.
- Gadd, C. H. 1933. *Tea Cider*. The Tea Quarterly Vol. IV, The Research Institut of Ceylom., New York.
- Gupta, S. 1990 . *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Ketiga. Binapura Aksara, Jakarta.
- Hadioetomo, Ratna Siri. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. PT Gramedia, Jakarta.
- Harler, R. 1964. *The Culture and Marketing of Tea*. Oxford Universiti Press, New York, Toronto.
- Heath, H. B. 1978. *Tea*. B. Pharm (London). AVI Publ., Co., Inc., Westport, Coneticut.

- Hesseltine, C. W. 1965. *Myologia*. Vol VII No. 2 ; x-y-z. Coneticut.
- Jawetz, Ernest, J.L. Melnick dan E. A. Adelberg. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kedokteran*. EGC — Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Koolhaas, D. R. dan K. B. Boedijn. 1932. *De "Theeschimmel"*. Nederlandsh-Indie. Bergcultures.
- Mashudi. 1993. *Mempelajari Pengaruh Penambahan Amonium Sulfat dan Waktu Penundaan Bahan Baku Air Kelapa Terhadap Laju Pertumbuhan Dan Struktur Gel Nata De Coco*. Skripsi S1. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi Fateta. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pelczar, Michael J. Jr. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Diterjemahkan oleh Markham M. Sr. UI-Press, Jakarta.
- Prescott, S. C. dan C. G. Dunn. 1959. *Industrial Mikrobiologi*. Mc-Graw Hill Book Co., Inc., New York.
- Setiowati, J.G. 1990. *Mempelajari Peranan Mikroba Dalam Pembuatan " Tea Cider"*. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB, Bogor.
- Soetejo, R. 1970. *Buku Pelajaran Ilmu Bercocok Tanam Tanaman Keras : Teh*. PT. Sueroeanan, Jakarta.
- Sugianto, S. 1972. *Tea Cider dan Cara Pembuatannya*. Menara Perkebunan. Tahun ke 40 No. 4. Balai Penelitian Perkebunan Bogor, Bogor.
- Thayib, S., A. Amar., S. Sukotjo., D. Nurani. 1997. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Umum*. Laboratorium Mikrobiologi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Teknologi Indonesia, Serpong.
- Wood .C.F. 1961 Neuberg's third edition form fermentation

Lampiran.1 . Perbedaan Karakteristik Spesies-Spesies dari Genus *Bacillus*

Spesies	Spora			Pembentukan		
	Bentuk	Pembengkakan	Posisi	Asam	Gas	Accoin
1. <i>B. subtilis</i>	E	-	C	+	-	+
2. <i>B. pumilus</i>	E	-	C	+	-	+
3. <i>B. liecheniformis</i>	E	-	C	+	-	+
4. <i>B. cereus</i>	E	-	C	+	W atau -	+
5. <i>B. anthracis</i>	E	-	C	+	-	+
6. <i>B. thuringiensis</i>	E	-	C	+	-	+
7. <i>B. megaterium</i>	E	-	C	+	-	+
8. <i>B. polymyxa</i>	E	+	CT	+	+	+
9. <i>B. macerans</i>	E	+	T	+	+	-
10. <i>B. circulans</i>	E	+	CT	+	-	-
11. <i>B. stearothermophilus</i>	E	+ atau -	T	+	-	-
12. <i>B. coagulans</i>	E	+ atau -	CT	+	-	+
13. <i>B. alvei</i>	E	+	CT	+	-	+
14. <i>B. firmus</i>	E	-	C	W	-	-
15. <i>B. laterosporus</i>	E	+	C	+	-	-
16. <i>B. brevis</i>	S	+	CT	+ atau -	-	-
17. <i>B. sphaericus</i>	S	+	T	-	-	-
18. <i>B. pasteurii</i>	E	+	T	-	-	-
19. <i>B. fastidiosus</i>	E	-	C	-	-	-
20. <i>B. larvae</i>	E	+	CT	+	-	-
21. <i>B. popilliae</i>	E	+	C	+	-	-
22. <i>B. lentimorbus</i>	E	+	C	+	-	-

Sumber : Buchanan dan Gibbons, 1974

Keterangan : E = Elips
 C = Tengah
 CT = Tengah ke ujung
 T = Ujung
 W = Sedikit positif
 S = Silinder

Lampiran 2. Perbedaan Karakteristik Spesies-Spesies dari Genus *Acetobacter*

	1. <i>A. aceti</i>				2. <i>A. pasteurianus</i>				3. <i>A. peroxidans</i>
	1 a subsp. <i>aceti</i>	1 b subsp. <i>orientalis</i>	1 c subsp. <i>xylinum</i>	1 d subsp. <i>liquefaciens</i>	2 a subsp. <i>pasteurianus</i>	2 b subsp. <i>lorenzianus</i>	2 c subsp. <i>esthensis</i>	2 d subsp. <i>aceticus</i>	2 e subsp. <i>paradoxus</i>
Katalase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-
Perembukan dalam etanol	÷	-	(-)	+	(-)	+	+	-	-

Sumber : Buchanan dan Gibbons, 1974

Keterangan :

(+) = Katalase-katalase

Lampiran.3 . Data Pengamatan Uji Biokimia Genus *Bacillus coagulans*

	a	b	c	d
COLONI MORPHOLOGI				
GRAM STAIN	Gram + btg	Gram + btg	Gram + btg	
PERTUMBUHAN PADA 37°C	+	+	+	
PERTUMBUHAN PADA °C	+	+	+	
CATALASE	+	+	+	
OXIDASE	+	+	+	
GLUKOSE				
O/F				
PERTUMB. PADA MAC CONKEY	-	-	-	
MOTILITY	+	+	+	
HEMOLYSIS	+	+	+	
CITRATE	+	+	+	
MR TEST	+	+	+	
VP TEST	+	+	+	
INDOLE	-	-	-	
GELATIN				
H ₂ S PADA TsiA				
LYSINE DECARBOXYLASE				
ORNITHINE DECARBOXYLASE				
UREASE				
NITRATE	+	+	+	
AESCULIN HYDROLYSIS				
PERTUMB. PADA NA/BROTH	+	+	+	
GLUKOSE				
ADONITOL	d	d	d	
ARABINOSE				
DULCITOL				
GLYCEROL				
INOSITOL				
LACTOSE				
MALTOSE		+	+	
MANNITOL	d			
RAFFINOSE				
RHAMNOSE				
SALICIN				
SORBITOL				
SUCROSE				
TREHALOSE				
XYLOSE	d	d	+	
HASIL IDENTIFIKASI				
a. <i>Bacillus coagulans</i>				
b. <i>Bacillus coagulans</i>				
c. <i>Bacillus coagulans</i>				
d.				

BA₁ = *Bacillus coagulans*

M.L.



Lampiran 4. Data perhitungan total mikroba

<div>Pengenceran</div> <div>perlakuan</div>	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	TBUD	293	41
2	TBUD	140	32

Perhitungan :

$$\frac{2,9 \times 10^7 + 1,4 \times 10^7}{2} = 2,2 \times 10^7$$

$$\frac{4,1 \times 10^7 + 3,2 \times 10^7}{2} = 3,7 \times 10^7$$

$$\frac{3,7 \times 10^7}{2,2 \times 10^7} = < 2, \dots \text{ Maka hasil perhitungan dijumlah dan dirata-rata}$$

$$\text{Hasil total mikroba : } \frac{5,9 \times 10^7}{2} = 2,95 \times 10^7$$