

Jurnal
**TANAMAN INDUSTRI
 DAN PENYEGAR**
 Journal of Industrial and Beverage Crops
 Volume 6, Nomor 1, Maret 2019

**AKTIVITAS MIKROB DALAM PULP BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
 SELAMA FERMENTASI DENGAN PENAMBAHAN RAGI TAPE**

***MICROBIAL ACTIVITIES IN COCOA (*Theobroma Cacao* L.) PULP DURING FERMENTATION
 WITH RAGI TAPE ADDITION***

* Eko Heri Purwanto¹⁾, Sigit Setyabudi²⁾, dan Supriyanto²⁾

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar¹⁾

Jalan Raya Pakuwon Km 2, Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

* ekohappy01@gmail.com

Departemen Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, UGM²⁾

Jl. Flora No.1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281 Indonesia

(Tanggal diterima: 17 Desember 2018, direvisi: 11 Januari 2019, disetujui terbit: 30 Maret 2019)

ABSTRAK

Aktivitas mikrob pada proses penguraian pulp biji kakao merupakan kunci pada proses fermentasi biji kakao. Ragi tape merupakan sumber mikrob (*starter*) yang banyak digunakan untuk fermentasi, mudah didapat dan disimpan. Tujuan penelitian adalah mempelajari pola perubahan jumlah mikrob, aktivitas degradasi substrat, dan produksi metabolit primer selama fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape. Penelitian dilaksanakan di laboratorium-laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian dan Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta, mulai bulan Maret sampai Oktober 2018. Fermentasi dilakukan skala laboratorium sebanyak 2 kg biji kakao basah dalam kotak plastik per *batch* yang diatur suhunya per hari. Jumlah mikrob dienumerasi menggunakan *total plate count* (TPC), degradasi substrat dan metabolit primer dianalisis menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) dan *gas chromatography* (GC). Suhu, pH pulp dan biji, serta indeks fermentasi diamati selama fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape menghasilkan jumlah *yeast*, bakteri asam laktat (BAL), dan bakteri asam asetat (BAA) maksimal masing-masing $9,03 \pm 0,85$; $9,05 \pm 0,17$; dan $9,15 \pm 0,89$ log cfu/g pulp kakao dengan degradasi substrat berupa sukrosa berkurang 97%, glukosa 98,6%, fruktosa 97%, dan asam sitrat 71% pada hari ketiga. Produksi maksimal metabolit primer etanol $27,84 \pm 21,85$ mg/g pulp kakao, asam laktat $4,18 \pm 3,16$ mg/g pulp kakao, dan asam asetat $3,38 \pm 5,43$ mg/g pulp kakao. Proses fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape dapat mempercepat proses fermentasi menjadi 3 hari dengan nilai indeks fermentasi $1,05 \pm 0,06$ dan pH biji $5,97 \pm 0,20$.

Kata kunci: Fermentasi, metabolit primer, pulp kakao, ragi tape, *yeast*

ABSTRACT

Microbial activities in cocoa pulp decomposition is key in cocoa beans fermentation. Ragi tape is widely used as a source of microbes (starters). The study aimed to investigate the pattern of changes in the number of microbes, substrate degradation activities and primary metabolites production during fermentation with the addition of ragi tape. The study was conducted at the laboratories within the Faculty of Agriculture Technology and Integrated Laboratory of Experiment and Research, UGM from March to October 2018. Fermentation experiment used 2 kg of fresh cacao beans stored in a plastic box per batch, its temperature was set daily. The amount of microbes was enumerated using total plate count (TPC), whereas substrate degradation and primary metabolites were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). Temperature, pulp and seed pH, and fermentation index were observed. The results showed that adding ragi tape for fermentation generated a maximum amount of yeast, lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) of 9.03 ± 0.85 ; 9.05 ± 0.17 ; and 9.15 ± 0.89 log cfu/g of

cocoa pulp respectively, with substrate degradation in the form of sucrose reduced by 97%, glucose 98.6%, fructose 97%, and citric acid 71% on the third day. Maximum production of primary metabolites of ethanol is 27.84 ± 21.85 mg/g of cocoa pulp, lactic acid 4.18 ± 3.16 mg/g of cocoa pulp and acetic acid 3.38 ± 5.43 mg/g of cocoa pulp. Fermentation with the addition of ragi tape accelerates the process to three days with a fermentation index value of 1.05 ± 0.06 and seed pH of 5.97 ± 0.20 .

Keywords: Cocoa pulp, fermentation, primary metabolites, ragi tape, yeast

PENDAHULUAN

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) cocok tumbuh di wilayah sekitar garis equator antara rentang 10° LU dan 10° LS karena iklimnya yang sesuai untuk pertumbuhan tanaman tersebut. Biji kakao merupakan bahan dasar produk cokelat yang diproduksi oleh banyak industri di dunia dan menjadi sumber utama pendapatan jutaan petani di Afrika, Asia, dan Amerika Latin (Motamayor *et al.*, 2008). Indonesia merupakan produsen biji kakao terbesar ketiga di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana, dengan luas area perkebunan kakao pada tahun 2015 mencapai 1.724.092 ha dan total produksi 661.243 ton biji kakao kering (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2016).

Kakao diolah menjadi berbagai produk cokelat melalui beberapa tahapan proses pengolahan, salah satunya adalah fermentasi. Fermentasi ini memiliki peranan dalam menghasilkan prekursor citarasa, aroma, dan warna (Di Mattia, Sacchetti, Mastrocola, & Serafini, 2017). Fermentasi biji kakao pada dasarnya merupakan proses penguraian pulp biji kakao yang dilakukan oleh mikroba. Tiga jenis mikroba utama yang berperan dalam proses fermentasi biji kakao adalah *yeast* yang akan mendegradasi pulp yang kaya gula menjadi etanol serta melepaskan panas, bakteri asam laktat (BAL) berfungsi mengubah gula dan asam sitrat yang merupakan asam organik bebas di dalam pulp kakao segar menjadi asam laktat dan asam asetat, dan bakteri asam asetat (BAA) yang mengoksidasi etanol menjadi asam asetat dan melepaskan panas yang lebih besar (Schwan & Wheals, 2004).

Produk metabolit yang dihasilkan mikroba pada saat fermentasi akan menginduksi terjadinya perubahan biokimia di dalam biji kakao. Pembentukan prekursor citarasa dan warna terjadi pada saat biji kakao mengalami kematian yang dipicu oleh produk metabolit seperti etanol, asam laktat, asam asetat, dan panas yang dilepaskan pada saat proses fermentasi pulp. Ketika biji kakao mengalami kematian, sel-sel vakuola akan pecah dan enzim-enzim akan bertemu substratnya menghasilkan molekul yang lebih sederhana (prekursor citarasa). Senyawa phenol akan dioksidasi oleh enzim polyphenol oksidase menjadi berwarna cokelat dan terdifusi ke seluruh bagian biji kakao (Camu *et al.*, 2008).

Petani enggan melakukan fermentasi biji kakao karena memerlukan tenaga kerja dan waktu yang lama, yaitu 5–7 hari untuk biji kakao lindak (*Forastero*) dengan fermentasi spontan (Luc De Vuyst, Lefeber, Papalexandratou, & Camu, 2010; Schwan & Wheals, 2004). Penelitian menggunakan mikroba berupa starter murni dan campuran cukup berhasil mempercepat proses dan meningkatkan performa fermentasi. Beberapa kelemahan dalam aplikasi starter ini adalah kesulitan dalam pembuatan dan penyimpanannya. Oleh karena itu, dilakukan percobaan fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape sebagai sumber mikroba (starter) fermentasi kakao (*yeast*, BAL, dan BAA) yang mudah didapatkan, disimpan, dan diaplikasikan.

Keberhasilan fermentasi ditentukan oleh dinamika (suksesi) mikroba dan aktivitasnya yang memengaruhi faktor-faktor lingkungan fermentasi (suhu, pH, dan aerasi) dalam metabolisme substrat yang tersedia dalam pulp kakao (Ardhana & Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007; Schwan & Wheals, 2004). Perlu adanya evaluasi penggunaan ragi tape untuk fermentasi biji kakao dalam hal dinamika populasi mikroba selama fermentasi, degradasi gula, etanol, dan asam organik yang dihasilkan dalam pulp, keasaman biji, serta derajat fermentasi biji kakao yang dihasilkan setelah penambahan ragi tape. Penelitian bertujuan mempelajari dinamika mikroba dan aktivitasnya terhadap degradasi substrat dan produksi metabolit primer di dalam pulp selama proses fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses; Laboratorium Bioteknologi; Laboratorium Kimia, Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta, mulai bulan Maret–Oktober 2018.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah buah kakao jenis lindak (*Forastero*) yang berasal dari kelompok tani Sido Mulyo, Patuk, Gunungkidul,

Yogyakarta dan ragi tape merk NKL produksi Solo. Media enumerasi mikrob *de man ragosa sharpe* (MRS), *yeast glucose calcium carbonate* (YGC), dan *pepton glucose yeast extract* (PGY).

Fermentasi Biji Kakao Skala Laboratorium

Sebanyak ± 50 buah kakao dipecah menggunakan pemukul kayu. Biji kakao basah dimasukkan ke dalam 2 *container* plastik tertutup sebagai kotak fermentasi, masing-masing sebanyak 2 kg. Ragi tape digerus menjadi bubuk dan diinokulasikan sebanyak 4 g atau 0,2% (b/b) ke dalam salah satu kotak fermentasi sebagai perlakuan, sedangkan perlakuan yang lain tanpa penambahan starter (spontan). Kotak fermentasi diletakkan di dalam inkubator selama 6 hari dan diatur suhunya menyerupai perubahan suhu yang terjadi pada proses fermentasi skala besar di lapangan (Lima, Almeida, Rob Nout, & Zwietering, 2011; Schwan & Wheals, 2004; Stoll, 2010). Pengaturan suhu dilakukan karena fermentasi dalam skala kecil tidak bisa mencapai suhu optimal fermentasi. Hari pertama suhu diatur 30°C, kemudian hari kedua 35°C. Pada awal hari ketiga, biji kakao dipindahkan ke dalam kotak plastik berlubang untuk aerasi dan diatur suhunya menjadi 40°C, hari keempat 45°C, hari kelima dan keenam 50°C. Suhu dan pH pulp biji kakao diukur setiap hari dengan memasukkan probe termometer dan elektroda pH meter ke dalam massa fermentasi kakao. Sampel biji kakao ± 100 g diambil setiap hari untuk diuji pulpnya dan biji dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* (50°C; 3 hari).

Enumerasi Populasi Mikrob

Pulp biji kakao (1 g) dipisahkan secara manual menggunakan spatula dari sampel biji kakao kemudian dicampur dengan 9 ml larutan NaCl 0,85%. Satu ml suspensi diencerkan dalam 9 ml larutan NaCl 0,85% untuk 3 seri pengenceran. Enumerasi *yeast* dilakukan pada media agar PGY (pepton 0,75%, ekstrak *yeast* 0,45%, glukosa 2%, 1 ml asam laktat 20%, dan agar 1,5%) dengan inkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Sebanyak 0,1 ml sampel dari tiap seri pengenceran, berturut-turut diinokulasi ke media agar yang berbeda dengan cara *spread plate* sebanyak 2 ulangan. BAL dienumerasi pada media agar MRS yang mengandung MRS broth 5,22% dan agar 1% ditambah natrium azida 100 mg/l yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 hari. BAA dienumerasi dengan media agar YGC (ekstrak *yeast* 1%, glukosa 1%, pepton 0,4%, kalsium karbonat 0,5%, 2 ml etanol 96%, dan agar 1,5%) yang diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari. Enumerasi BAL dan BAA dilakukan dengan cara *pour plate*, sebanyak 1 ml sampel dari tiap seri pengenceran berturut-turut diinokulasi ke media agar yang berbeda

dengan 2 ulangan (Lisdiyanti *et al.*, 2003; Pereira, Miguel, Ramos, & Schwan, 2012).

Analisis Substrat dan Metabolit Primer

Sampel biji kakao (100 g) tiap hari fermentasi dipisahkan pulpnya secara manual menggunakan spatula. Pulp kakao yang diperoleh (3 g) diekstrak menggunakan akuades (30 ml) di dalam *incubator shaker* (120 rpm; suhu ruang; 24 jam). Sampel pulp kemudian dihomogenisasi menggunakan *sonicator* selama 4 menit sebelum disentrifugasi (14.000 rpm; 28°C; 15 menit).

Supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis konsentrasi substrat pulp dan metabolit primer (sukrosa, glukosa, fruktosa, asam sitrat, etanol, asam laktat, dan asam asetat). Analisis *high performance liquid chromatography* (HPLC) dengan fase gerak 5 mM H₂SO₄ laju alir 0,6 ml/min, kolom Aminex HPX-87H suhu 30°C dan *refractive index detector* (RID) digunakan untuk analisis senyawa gula substrat pulp. Detektor *photodiode array* (PDA) panjang gelombang 210 nm pada sistem HPLC yang sama digunakan untuk analisis asam organik (Cempaka, Aliwarga, Purwo, & Kresnowati, 2014; De Sa, De Oliveira, Cammarota, Matos, & Ferreira-Leitao, 2011; Pereira *et al.*, 2012). Kadar etanol dianalisis menggunakan *gas chromatography* (GC) dengan kolom HP-5 dan *flame ionization detector* (FID) secara isokratik (Ho, Zhao, & Fleet, 2015; Lefeber, Gobert, Vrancken, Camu, & De Vuyst, 2011).

Pengukuran pH Biji Kakao Fermentasi

Pengukuran pH biji fermentasi dilakukan menurut AOAC (2006), sampel biji kakao per hari fermentasi yang sudah dihancurkan ditimbang sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambah 45 ml aquades panas $\pm 90^\circ\text{C}$ dan diaduk dengan magnetik stirer. Suspensi disaring untuk mendapatkan filtratnya (*aliquot*), kemudian didinginkan sampai suhu $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ dan ditentukan pH-nya menggunakan pH meter.

Analisis Indeks Fermentasi Biji Kakao

Penentuan indeks fermentasi dilakukan menurut Gourieva & Tserevitinov (1979), dengan menghancurkan sampel nib kakao kering kemudian ditimbang 0,5 g sampel bubuk kakao yang diperoleh dan diekstraksi menggunakan 50 ml larutan campuran dari metanol dan asam klorida dengan perbandingan 97:3 (v/v). Ekstrak didinginkan pada suhu 8°C selama 16–19 jam kemudian disaring dengan kertas saring. Ekstrak jernih diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 460 nm dan 530 nm. Indeks fermentasi diperoleh dari perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 460 nm dan absorbansi pada panjang gelombang 530 nm.

Fermentasi dinilai telah berhasil jika nilai indeks fermentasi sudah mencapai nilai 1 atau lebih.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Suhu dan pH Pulp Selama Fermentasi

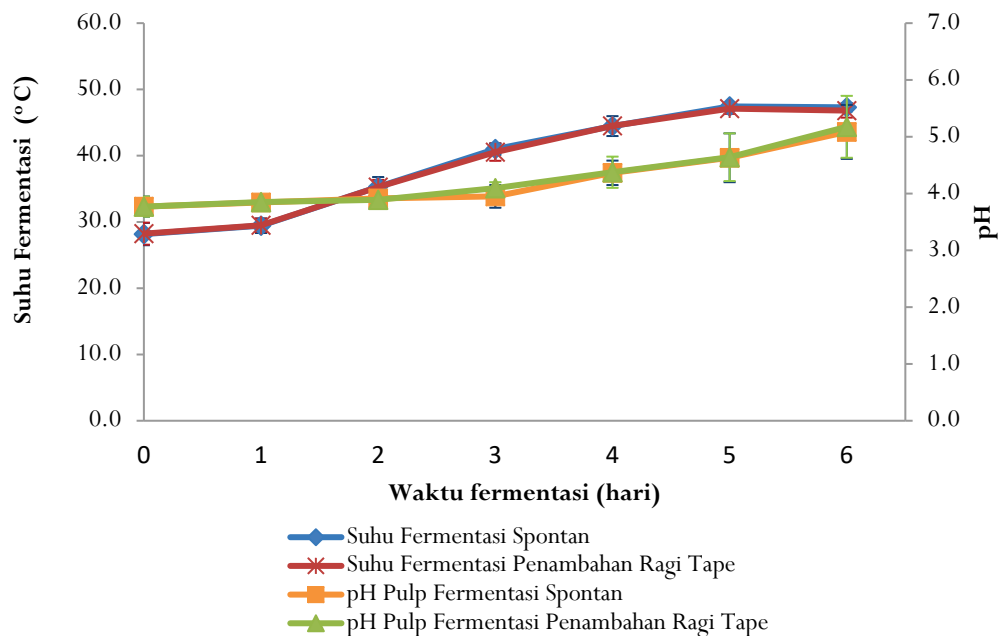
Gambar 1 memperlihatkan suhu pada fermentasi biji kakao spontan dan fermentasi dengan penambahan ragi tape tidak menunjukkan perbedaan yang besar. Suhu massa fermentasi pada hari pertama sampai ketiga terukur sedikit lebih tinggi dari suhu inkubator. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas mikroba di dalam pulp yang menghasilkan panas sehingga dapat mempertahankan suhu lingkungan. Pada hari keempat sampai keenam suhu massa fermentasi terukur sedikit lebih rendah diduga karena aktivitas mikroba sudah jauh berkurang. Pulp sebagai substrat fermentasi untuk sumber energi mikroba sudah hampir habis sehingga tidak bisa menaikkan suhu di dalam masa fermentasi.

pH pulp biji kakao pada awal fermentasi $3,77 \pm 0,18$ naik per hari fermentasi sampai $5,09 \pm 0,48$ pada fermentasi spontan dan $5,18 \pm 0,54$ pada fermentasi dengan penambahan ragi tape (Gambar 1). pH pulp sebelum fermentasi rendah karena kandungan asam sitratnya, kenaikan pH pulp seiring dengan

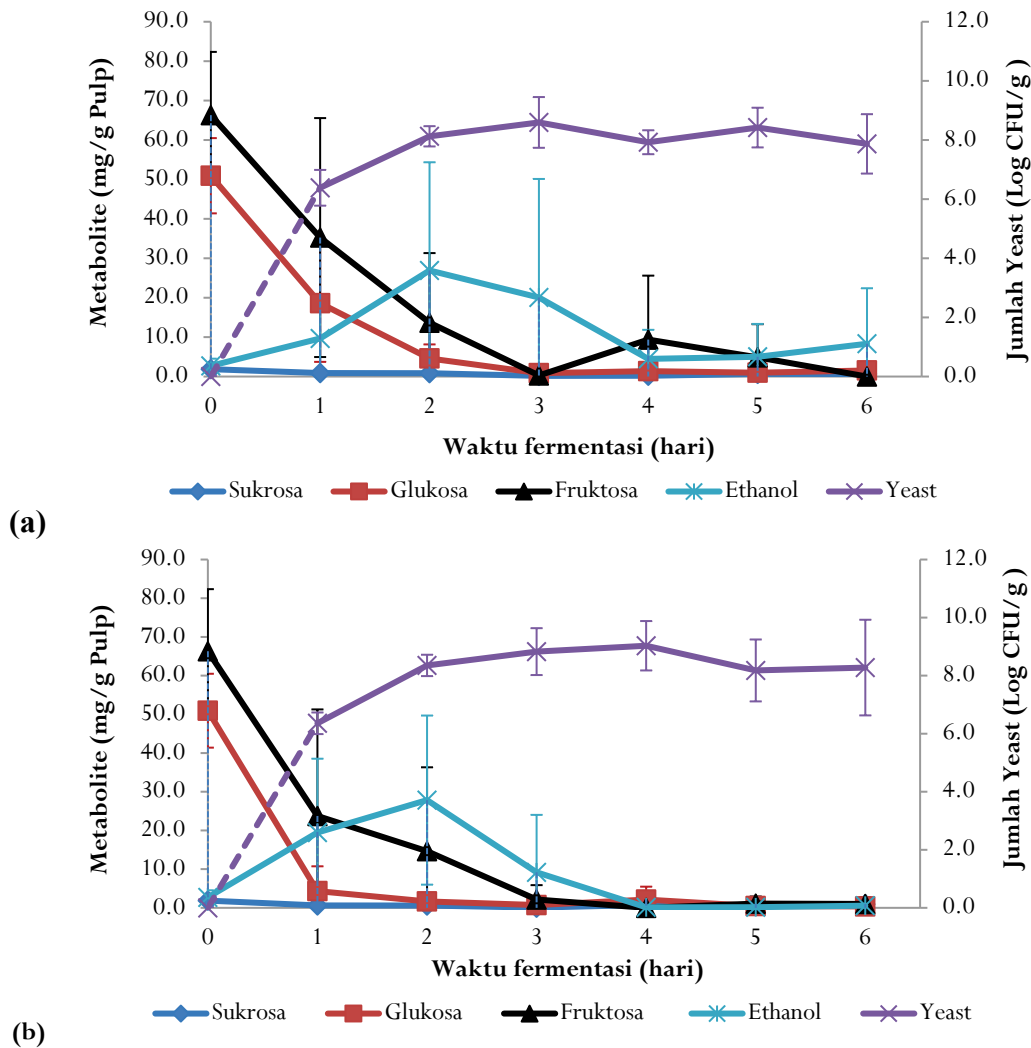
degradasi asam sitrat di dalam pulp selama fermentasi akibat aktivitas mikroba (Luc De Vuyst *et al.*, 2010).

Populasi *Yeast* serta Degradasi Substrat Gula dan Etanol yang Dihasilkan

Jumlah *yeast* pada pulp biji kakao sebelum fermentasi kurang dari $1 \log \text{ cfu/g}$ pulp (di bawah batas perhitungan). Biji kakao masih steril dari dalam pod kakao, kontaminasi mikroba terjadi setelah beberapa saat pod kakao dibuka dan berasal dari lingkungan sekitar, kulit buah, alat pemecah buah, tangan, atau kotak fermentasi. Dari Gambar 2 terlihat jumlah *yeast* meningkat tajam setelah satu hari fermentasi menjadi $6,38 \pm 0,60 \log \text{ cfu/g}$ pulp untuk fermentasi biji kakao spontan (tanpa penambahan ragi tape) maupun fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape ($6,36 \pm 0,37 \log \text{ cfu/g}$ pulp) dan mencapai puncaknya pada hari ketiga dan keempat sebesar $8,59 \pm 0,86 \log \text{ cfu/g}$ pulp pada fermentasi spontan dan $9,03 \pm 0,85 \log \text{ cfu/g}$ pulp pada fermentasi dengan penambahan ragi tape, setelah itu konstan dan cenderung menurun. Jumlah *yeast* ini sudah cukup untuk proses fermentasi kakao yang optimal. Menurut Luc De Vuyst *et al.* (2010), *yeast* mulai tumbuh pada awal fermentasi dengan jumlah $2-7 \log \text{ cfu/g}$ pulp dan mencapai maksimum sebesar $7-9 \log \text{ cfu/g}$ pulp.



Gambar 1. Perubahan suhu dan pH pulp selama fermentasi biji kakao skala laboratorium
Figure 1. Changes in pulp temperature and pH during lab scale cocoa beans fermentation



Gambar 2. Hubungan antara populasi *yeast*, degradasi gula, dan produksi etanol di dalam pulp kakao (a. Fermentasi spontan, b. Fermentasi dengan penambahan ragi tape)

Figure 2. Relationship between yeast population, sugar degradation and ethanol production in cocoa pulp (a. Spontaneous fermentation, b. Fermentation with the addition of ragi tape)

Yeast terlihat masih bertahan pada fase aerobik dan suhu $>40^{\circ}\text{C}$ sampai akhir fermentasi. Hal ini diduga karena jenis *yeast* yang terkandung di dalam ragi tape NKL yang digunakan adalah *Saccharomyces cerevisiae* (Raharjanti, 2006). Jenis *yeast* dapat bertahan sampai akhir fermentasi karena karakternya yang toleran terhadap asam, etanol, dan panas adalah *Saccharomyces cerevisiae* (Fahrurrozi, 2015).

Produk degradasi pulp berupa cairan 'sweat' pada penelitian ini untuk fermentasi dengan penambahan ragi tape dihasilkan lebih banyak 2 kali lipat pada 3 hari pertama fermentasi biji kakao. Semakin banyak cairan luruhan pulp akan menghasilkan aerasi yang lebih banyak pula pada fermentasi dengan penambahan ragi tape, sehingga bakteri asam asetat sudah menunjukkan aktivitas cukup tinggi di awal

fermentasi. Beberapa jenis *yeast* (seperti *Kluyveromyces marxianus* dan *S. cerevisiae*) memproduksi enzim pektinolitik yang cukup penting pada awal fermentasi biji kakao. Enzim pektinolitik dapat mendegradasi pulp dan meningkatkan aerasi di dalam massa fermentasi kakao sehingga memungkinkan bakteri aerob seperti bakteri asam asetat untuk tumbuh (Schwan & Wheals, 2004).

Sukrosa, glukosa, dan fruktosa sebelum fermentasi masing-masing sebesar $1,87 \pm 1,37$; $50,94 \pm 9,54$; dan $66,31 \pm 16,04$ mg/g pulp, kemudian menurun sampai mendekati nol pada hari ketiga fermentasi biji kakao. Penurunan konsentrasi sukrosa pada fermentasi kakao dengan penambahan ragi tape lebih cepat (berkurang 66% pada hari pertama dan tersisa 3% pada hari ketiga) dibanding fermentasi kakao

spontan (berkurang 53% pada hari pertama dan tersisa 9% pada hari ketiga). Konsentrasi sukrosa pada awal fermentasi tergantung dari tingkat kematangan buah kakao dan berkurang karena konversi oleh enzim inverstase dari *yeast* menjadi glukosa dan fruktosa.

Penurunan konsentrasi glukosa pada fermentasi kakao dengan penambahan ragi tape lebih cepat (berkurang 92% pada hari pertama dan tersisa 1,4% pada hari ketiga) dibanding fermentasi kakao spontan (berkurang 63% pada hari pertama dan tersisa 1,7% pada hari ketiga). Penurunan konsentrasi fruktosa pada fermentasi kakao dengan penambahan ragi tape juga lebih cepat (berkurang 64% pada hari pertama dan tersisa 3,2% pada hari ketiga) dibanding fermentasi kakao spontan (berkurang 47% pada hari pertama dan tersisa 0,4% pada hari ketiga). Konsentrasi glukosa lebih cepat berkurang daripada fruktosa karena glukosa lebih banyak dikonversi menjadi etanol oleh *yeast* pada fase fermentasi anaerob.

Pola penurunan gula sebagai substrat pulp yang cepat dan hampir habis pada hari ketiga juga ditunjukkan oleh penelitian-penelitian sebelumnya (Fahrurrozi, 2015; Febriami & Kresnowati, 2015; Ho et al., 2015; Lefeber, Gobert, et al., 2011; Papalexandratou et al., 2013; Pereira et al., 2012). Pola penurunan sukrosa, glukosa, dan fruktosa ini seiring dengan pertumbuhan jumlah *yeast* dan BAL serta produksi etanol dan asam laktat pada 3 hari pertama fermentasi. *Yeast* mengonversi gula pada pulp kakao menjadi etanol dan karbondioksida (Ardhana & Fleet, 2003).

Konversi substrat fermentasi berupa gula menjadi produk metabolit adalah proses eksotermis (menghasilkan panas) yang berperan dalam menaikkan suhu fermentasi (Schwan & Wheals, 2004). Panas yang dihasilkan dari proses eksotermis ini akan terdifusi ke dalam biji kakao dan berperan pada kematian biji kakao.

Pola peningkatan jumlah etanol pada fermentasi dengan penambahan ragi tape 2 kali lebih besar dibanding fermentasi kakao spontan pada hari pertama fermentasi tetapi puncaknya sama (meningkat 10 kali) pada hari kedua. Sebelum fermentasi konsentrasi etanol sebesar $2,71 \pm 1,83$ mg/g pulp dan mencapai puncaknya sebesar $26,91 \pm 27,45$ mg/g pulp pada fermentasi spontan dan $27,84 \pm 21,85$ mg/g pulp pada fermentasi dengan penambahan ragi tape. Konsentrasi etanol di dalam pulp meningkat seiring pertumbuhan *yeast* dan degradasi gula (Ho, Zhao, & Fleet, 2014; Pereira et al., 2012). Produksi etanol selama pertumbuhan *yeast* menurunkan kemampuan biji untuk tumbuh dan berhubungan erat dengan kematian

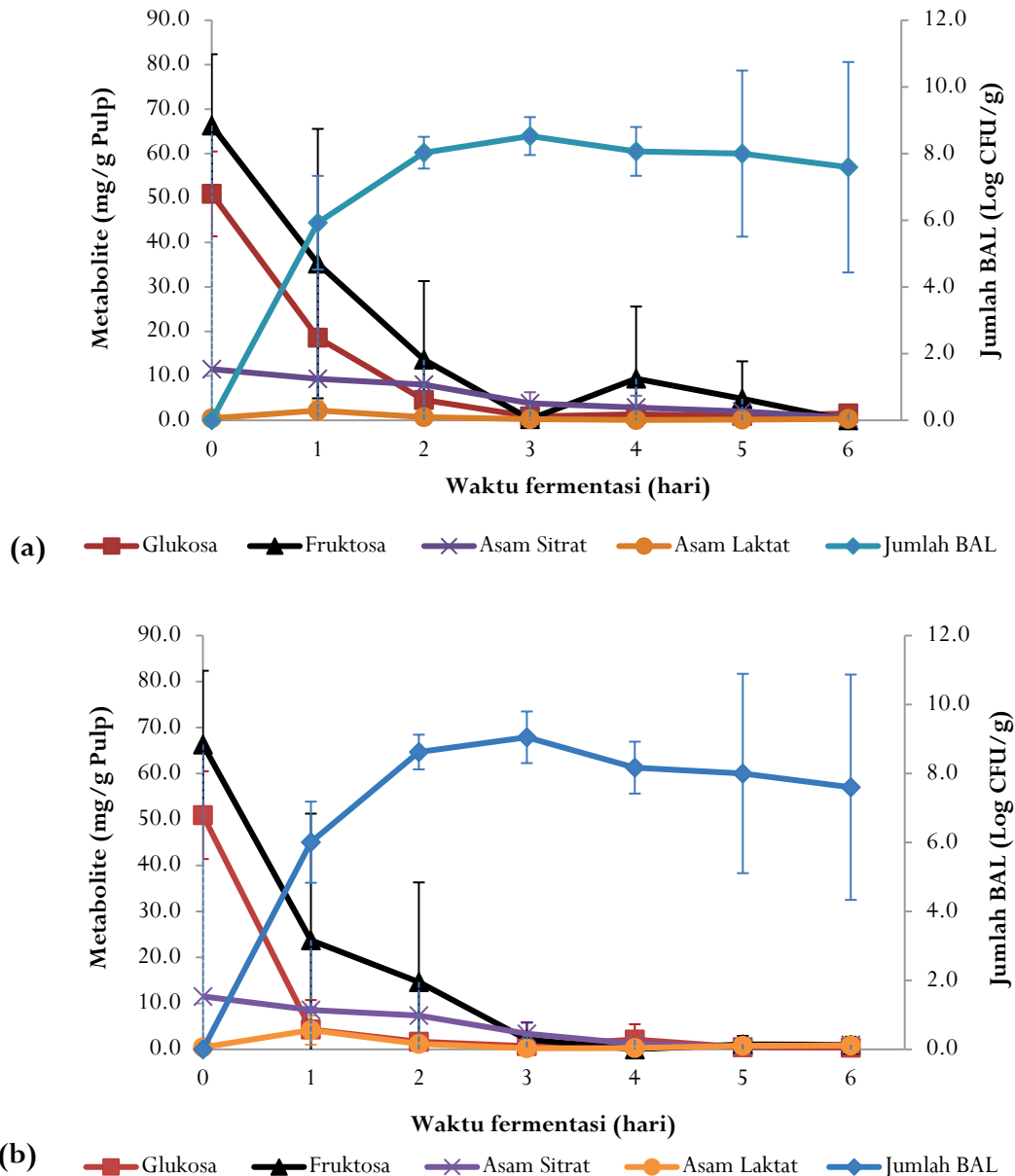
embrio biji yang terjadi sekitar 24 jam setelah konsentrasi etanol maximum tercapai di dalam kotiledon (Thompson, Miller, & Lopez, 2007).

Selain menghasilkan enzim pektinolitik dan alkohol, *yeast* juga berperan dalam menghasilkan senyawa-senyawa aroma volatil selama fermentasi biji kakao yang dapat meningkatkan citarasa produk cokelat. Di antara jenis *yeast* yang mempunyai kemampuan tinggi untuk menghasilkan senyawa aroma volatil dalam jumlah banyak adalah *S. cerevisiae* var. *chevalieri* (Ho et al., 2014; Schwan & Wheals, 2004)

Populasi Bakteri Asam Laktat serta Degradasi Substrat Gula, Asam Sitrat, dan Asam Laktat yang Dihasilkan

BAL mulai tumbuh dengan cepat dari awal fermentasi dan mencapai puncaknya pada hari ke 2–3 fermentasi. Jumlah BAL maksimal $8,53 \pm 0,57$ log cfu/g pulp untuk fermentasi spontan dan $9,05 \pm 0,17$ log cfu/g pulp untuk fermentasi dengan penambahan ragi tape seperti terlihat pada Gambar 3. Pola ini sesuai dengan pernyataan (Luc De Vuyst et al., 2010), bahwa pertumbuhan BAL berada pada fase kedua suksepsi mikrob fermentasi kakao, yaitu 24–72 jam fermentasi dari jumlah awal 3–4 log cfu/g pulp dan mencapai maximum pada 7–9 log cfu/g pulp.

BAL dan *yeast* bersama-sama mendegradasi gula pada pulp kakao menghasilkan penurunan konsentrasi glukosa dan fruktosa yang sangat cepat pada awal fermentasi dan hampir habis pada hari ketiga fermentasi. Aktivitas utama BAL adalah mengonversi gula pulp kakao (glukosa dan fruktosa) dan asam organik (asam sitrat) dengan metabolisme homofermentatif dan heterofermentatif. Sebagian besar BAL selama fermentasi kakao mengonversi glukosa melalui jalur metabolisme Embden-Meyerhof dan menghasilkan asam laktat >85%, sedangkan BAL heterofermentatif memanfaatkan glukosa melalui jalur heksosa monophosphate menghasilkan 50% asam laktat, etanol, asam asetat, glycerol, dan CO₂ (Schwan & Wheals, 2004). Dalam konsumsi gula, BAL lebih menyukai glukosa daripada fruktosa. Glukosa digunakan untuk metabolisme BAL sedangkan fruktosa direduksi oleh BAL menjadi mannitol (Lefeber, Janssens, Moens, Gobert, & De Vuyst, 2011). Produk akhir dari aktivitas BAL ini berupa asam laktat, asam asetat, etanol, mannitol, dan karbondioksida yang berpengaruh terhadap keasaman dan kualitas biji kakao (Thompson et al., 2007).



Gambar 3. Hubungan antara populasi BAL, degradasi gula, asam sitrat, dan produksi asam laktat di dalam pulp kakao (a. Fermentasi spontan, b. Fermentasi dengan penambahan ragi tape)

Figure 3. Relationship between LAB population, degradation of sugar, citric acid, and lactic acid production in cocoa pulp (a. Spontaneous fermentation, b. Fermentation with the addition of ragi tape)

Selama fermentasi konsentrasi asam sitrat menurun sebagai hasil dari aktivitas BAL pada fase awal proses fermentasi. Konsentrasi asam sitrat pada pulp kakao sebelum fermentasi sebesar $11,51 \pm 0,14$ mg/g pulp kemudian menurun seiring dengan peningkatan pH pulp kakao. Konsumsi asam sitrat menghasilkan produksi asam organik dengan nilai pKa yang lebih tinggi, meningkatkan pH lingkungan, dan memungkinkan pertumbuhan bakteri yang lebih baik dan kontrol mikrobiologis terhadap lingkungan (Ardhana & Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007; Schwan & Wheals, 2004). BAL menggunakan asam sitrat di dalam pulp untuk memproduksi asam laktat, acetaldehyde,

diacetyl, acetoin, dan 2,3 butanediol (Luc De Vuyst *et al.*, 2010).

Konsentrasi asam laktat mencapai puncak pada hari pertama fermentasi biji kakao sebesar $2,21 \pm 2,13$ mg/g pulp pada fermentasi spontan dan $4,18 \pm 3,16$ mg/g pulp pada fermentasi dengan penambahan ragi tape. Hal ini menunjukkan aktivitas BAL pada fermentasi dengan penambahan ragi tape lebih tinggi 2 kali lipat daripada fermentasi spontan dan aktivitas BAL pada penelitian ini sangat tinggi di awal fermentasi biji kakao. Suksepsi antara *yeast* dan BAL diduga terjadi pada 24 jam pertama fermentasi karena aktivitas pektinolitik dari *yeast* yang tinggi memberikan cukup ruang untuk

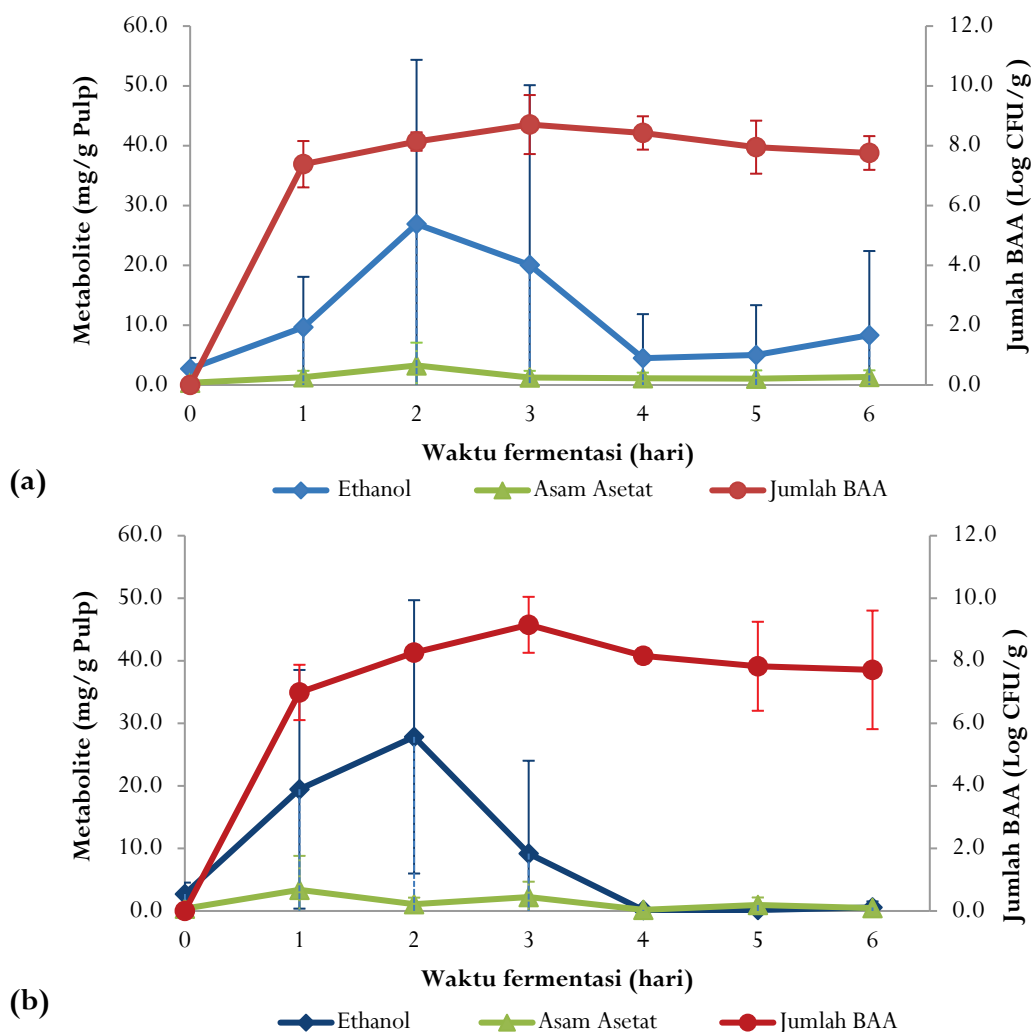
aerasi dan pertumbuhan BAL yang bersifat *mikroaerophilic* dan *aciduric*. Asam laktat dan mannitol yang diproduksi BAL terdifusi ke dalam biji kakao yang dapat memengaruhi pH biji. Selain itu, asam laktat dan mannitol dapat digunakan sebagai sumber energi ekstra bagi BAA sehingga dapat mendorong pertumbuhan BAA dan secara tidak langsung memengaruhi produksi asam asetat dan pH biji kakao (Camu *et al.*, 2007; Luc De Vuyst *et al.*, 2010).

BAL merupakan komponen penting dari kultur starter dalam mengontrol proses fermentasi biji kakao untuk memperoleh biji kakao kering terfermentasi sempurna dan mengembangkan rasa produk-produk coklat (Lefeber, Janssens, *et al.*, 2011). BAL sangat penting untuk keberhasilan suksesi mikrob selama fermentasi biji kakao. BAL membentuk hubungan antara fermentasi *yeast* yang menghasilkan etanol serta

flavor dan fermentasi BAA yang menghasilkan asam asetat (Luc De Vuyst *et al.*, 2010; Lefeber, Janssens, Camu, & De Vuyst, 2010).

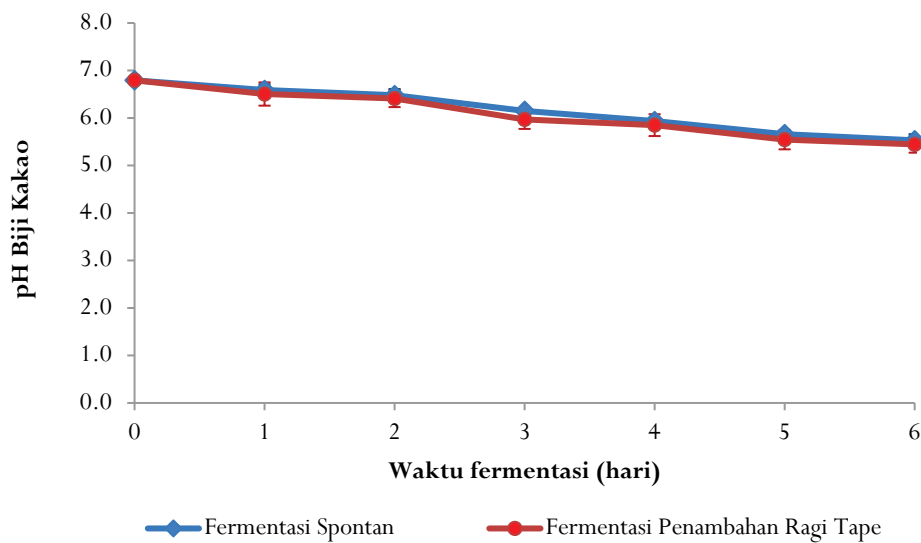
Populasi Bakteri Asam Asetat serta Konsentrasi Etanol dan Asam Asetat

Pertumbuhan BAA di dalam pulp biji kakao sudah terlihat pada awal fermentasi sebesar $7,38 \pm 0,77$ log cfu/g pulp untuk fermentasi spontan dan meningkat maximum pada hari ketiga fermentasi menjadi $8,71 \pm 0,99$ log cfu/g pulp. Jumlah BAA untuk fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape sebesar $6,99 \pm 0,88$ log cfu/g pulp pada hari pertama fermentasi dan mencapai maximum pada hari ketiga fermentasi sebesar $9,15 \pm 0,89$ log cfu/g pulp (Gambar 4).



Gambar 4. Hubungan antara populasi BAA, etanol dan produksi asam asetat di dalam pulp kakao (a. Fermentasi spontan, b. Fermentasi dengan penambahan ragi tape).

Figure 4. Relationship between AAB population, ethanol and acetic acid production in cocoa pulp (a. Spontaneous fermentation, b. Fermentation with the addition of ragi tape).



Gambar 5. pH biji kakao selama fermentasi
Figure 5. pH of cocoa beans during fermentation

Konsentrasi asam asetat meningkat seiring pertumbuhan BAA dan peningkatan etanol. Pada fermentasi spontan tanpa penambahan ragi tape, asam asetat sudah terdeteksi pada hari pertama fermentasi dan konsentrasinya meningkat sampai maksimum pada hari kedua yaitu $3,27 \pm 3,81$ mg/g pulp, kemudian menurun pada hari selanjutnya. Pola produksi asam asetat pada fermentasi dengan penambahan ragi tape sedikit berbeda, konsentrasi asam asetat maksimum diperoleh lebih cepat, pada hari pertama fermentasi $3,38 \pm 5,43$ mg/g pulp kemudian menurun dan naik lagi pada hari ketiga sampai $2,23 \pm 2,45$ mg/g pulp dan menurun lagi pada hari berikutnya. Kematian biji kakao biasanya terjadi pada hari kedua fermentasi dan penyebab utamanya adalah peningkatan konsentrasi asam asetat di dalam biji kakao (Camu *et al.*, 2007). Produksi asam asetat pada fermentasi biji kakao sebagian besar berasal dari aktivitas bakteri asam asetat mengoksidasi etanol yang dihasilkan oleh *yeast* (Luc De Vuyst *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2011; Schwan & Wheals, 2004).

Selama fermentasi, sebagian asam asetat menguap (volatil) dan sebagian yang lain masuk ke dalam kotiledon biji. Etanol dan asam asetat yang masuk ke dalam biji serta panas yang dihasilkan berperan terhadap perubahan-perubahan di dalam struktur subseluler biji, yaitu kematian biji dan penurunan pH. Perubahan ini merupakan faktor yang dibutuhkan pada berbagai reaksi biokimia endogenous untuk menghasilkan prekursor-prekursor citarasa dan warna coklat yang khas (L. De Vuyst & Weckx, 2016; Thompson *et al.*, 2007).

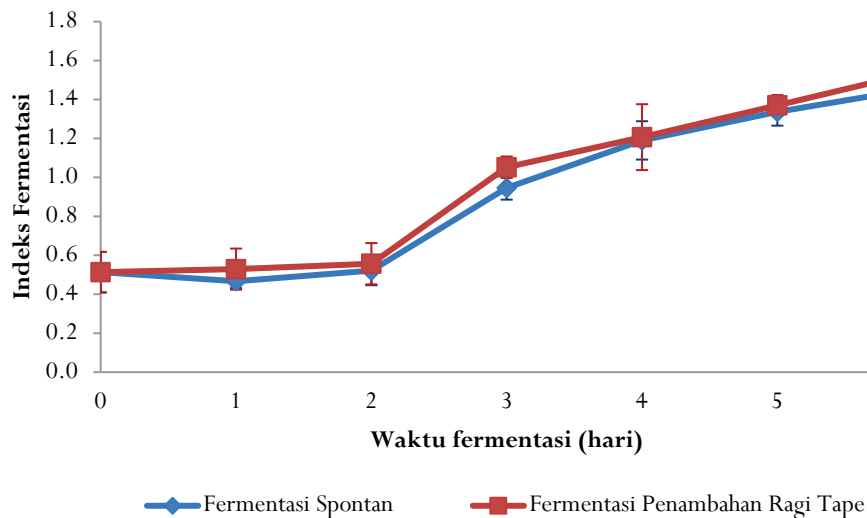
Dari Gambar 4 terlihat bahwa etanol dan asam asetat konsentrasinya menurun setelah hari ketiga dan habis pada hari keempat. Ketika semua etanol dioksidasi menjadi asam asetat lalu menjadi karbon dioksida dan air, fermentasi berhenti karena sumber energi untuk pertumbuhan mikrob tidak lagi tersedia, dan suhu fermentasi mulai menurun (dibanding suhu inkubator/lingkungan).

pH Biji Kakao

Derajat keasaman (pH) biji kakao menurun selama fermentasi dari pH biji sebelum fermentasi $6,79 \pm 0,08$ menjadi 5,5 pada hari keenam fermentasi biji kakao (Gambar 5). Hal ini menunjukkan adanya peningkatan asam yang disebabkan difusi asam laktat dan asam asetat dari pulp ke dalam biji kakao. Penurunan pH biji kakao disertai dengan peningkatan suhu dan kerusakan struktur biji-bijian akan memfasilitasi pengembangan prekursor citarasa dan degradasi pigmen oleh enzim endogen, seperti invertase, glikosidase, protease, dan polifenol oksidase (Camu *et al.*, 2008).

Indeks Fermentasi Biji Kakao

Keberhasilan fermentasi biji kakao dapat diukur menggunakan indeks fermentasi. Pada penelitian ini indeks fermentasi dianalisis perhari untuk mengetahui kemajuan proses fermentasi. Gambar 6 menunjukkan indeks fermentasi untuk kedua perlakuan fermentasi. Indeks fermentasi meningkat dari $0,51 \pm 0,10$ saat biji belum difermentasi menjadi $1,45 \pm 0,07$ pada hari keenam untuk fermentasi spontan dan $1,54 \pm 0,01$ pada hari keenam untuk fermentasi dengan penambahan ragi tape.



Gambar 6. Indeks fermentasi biji kakao

Figure 6. Cocoa beans fermentation index

Proses fermentasi dengan penambahan ragi tape lebih cepat dibandingkan fermentasi spontan. Pada hari ketiga indeks fermentasi dengan penambahan ragi tape sudah lebih dari 1 ($1,05 \pm 0,06$), sedangkan fermentasi spontan masih di bawah 1 ($0,95 \pm 0,06$). Hal ini menunjukkan fermentasi dengan penambahan ragi tape lebih baik dari fermentasi spontan. (Voigt, Voigt, Heinrichs, Wrann, & Biehl, 1994) mengemukakan bahwa biji kakao fermentasi dengan nilai indeks fermentasi di bawah 1 menunjukkan fermentasi belum sempurna, sedangkan biji kakao fermentasi dengan indeks fermentasi ≥ 1 dapat dikatakan sudah terfermentasi sempurna.

KESIMPULAN

Pola pertumbuhan jumlah mikroba fermentasi dengan penambahan ragi tape menunjukkan jumlah *yeast*, BAL, dan BAA yang optimal pada awal proses fermentasi dengan suksepsi mikroba fermentasi yang berlangsung lebih cepat, degradasi substrat pulp kakao habis pada hari ketiga dan produk metabolit primer lebih banyak daripada fermentasi spontan. Uji indeks fermentasi menunjukkan fermentasi dengan penambahan ragi tape sudah sempurna pada hari ketiga fermentasi dengan nilai indeks fermentasi $1,05 \pm 0,06$ dengan pH biji $5,97 \pm 0,20$ sehingga proses fermentasi biji kakao dengan penambahan ragi tape dapat mempercepat proses fermentasi.

Pada penelitian ini fermentasi biji kakao sudah selesai pada hari ketiga, tetapi belum dilakukan pengujian kualitas dari fermentasi yang dihasilkan. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dilakukan konfirmasi kualitas biji kakao yang dihasilkan berupa

metabolit primer yang terdifusi, prekursor citarasa yang dihasilkan dan aktivitas enzim di dalam biji kakao selama fermentasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang telah memberikan bantuan biaya untuk kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. (2006). *Official methods of analysis* (18th ed). Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 87-99. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008). Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2288-2297.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., ... De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1809-1824. <http://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>

- Cempaka, L., Aliwarga, L., Purwo, S., & Kresnowati, M. T. A. P. (2014). Dynamics of cocoa bean pulp degradation during cocoa bean fermentation: Effects of yeast starter culture addition. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 46(1), 14–25. <http://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2014.46.1.2>
- De Sa, L. R. V., De Oliveira, M. A. L., Cammarota, M. C., Matos, A., & Ferreira-Leitao, V. S. (2011). Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.08.056>
- De Vuyst, L., Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). The Functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. In F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications* (pp. 301–325). Blackwell Publishing. <http://doi.org/10.1002/9780813820866.ch17>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: From ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17. <http://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., & Serafini, M. (2017). From cocoa to chocolate: The impact of processing on in vitro antioxidant activity and the effects of chocolate on antioxidant markers in vivo. *Frontiers in Immunology*, 8(SEP), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01207>
- Fahrurrozi. (2015). *Microbiological and biochemical investigations of cocoa bean fermentation*. University of Hamburg.
- Febriami, H., & Kresnowati, M. T. A. P. (2015). Mapping the effects of starter culture addition on cocoa bean fermentation. *ASEAN Engineering Journal*, 5(1), 25–37.
- Gourieva, K., & Tserevitinov, O. (1979). Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa bean. USSR. Patent.
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72–87. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Lefeber, T., Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N., & De Vuyst, L. (2011). Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiology*, 28(3), 457–464. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.010>
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716. <http://doi.org/10.1128/AEM.01206-10>
- Lefeber, T., Janssens, M., Moens, F., Gobert, W., & De Vuyst, L. (2011). Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6694–6698. <http://doi.org/10.1128/AEM.00594-11>
- Lima, Lí. J. R., Almeida, M. H., Rob Nout, M. J., & Zwietering, M. H. (2011). *Theobroma cacao L.*, “the food of the gods”: Quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(8), 731–761. <http://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2003). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiol. Cult. Coll.*, 19(2), 91–99.
- Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao L.*). *PLoS ONE*, 3(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. *Food Microbiology*, 35(2), 73–85. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2013.02.015>
- Pereira, G. V. de M., Miguel, M. G. da C. P., Ramos, Cí. L., & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395–5405. <http://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. (2016). *Statistik pertanian 2016*. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Raharjanti, D. S. (2006). *Penghambatan pertumbuhan Aspergillus parasiticus dan reduksi aflatoksin oleh kapang dan khamir ragi tape*. Institut Pertanian Bogor.
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <http://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Stoll, L. (2010). *Biochemische indikatoren für keimung und fermentation in samen von kakao (Theobroma cacao L.)*. Universität Hamburg.
- Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2007). Cocoa and coffee. In M. Doyle & L. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers, 3rd edition* (pp. 837–850). Whashington DC. <http://doi.org/10.1128/9781555815912.ch39>
- Voigt, J., Voigt, G., Heinrichs, H., Wrann, D., & Biehl, B. (1994). In vitro studies on the proteolytic formation of the characteristic aroma precursors of fermented cocoa seeds: The significance of endoprotease specificity. *Food Chemistry*, 51, 7–14.