

SUKSESI MIKROBIA TERHADAP PENURUNAN ETANOL, ASAM LAKTAT DAN ASAM ASETAT SELAMA FERMENTASI BIJI KAKAO

Mulono Apriyanto

Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Islam Indragiri
Jln. Propinsi Parit 1 Tembilahan Hulu, Indragiri Hilir
mulonoapriyanto71@gmail.com

Abstrak

Tujuan penelitian adalah: 1) mengetahui komposisi *pulp* biji kakao asalan sebagai substrat untuk fermentasi; 2) mengevaluasi pengaruh variasi teknik fermentasi biji kakao asalan terhadap populasi mikrobia. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut (1) pengujian komposisi dan kadar air *pulp* biji kakao asalan sebagai substrat fermentasi. (2) Fermentasi biji kakao asalan dengan 3 variasi teknik fermentasi yaitu pertama perlakuan tanpa penambahan inokulum (kontrol), kedua menggunakan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016), masing-masing sekitar 10⁸ cfu/g diberikan serentak diawal fermentasi (IA). (3) pemberian inokulum secara bertahap yeast di awal fermentasi, bakteri asam laktat pada jam ke 24 dan bakteri asam asetat pada jam ke 48 dengan populasi mikrobia sama dengan perlakuan kedua (IB). Fermentasi dilaksanakan selama 120 jam. Suhu diatur selama fermentasi, berturut-turut 35 °C (24 jam pertama), 45 °C (24 jam kedua), 55 °C (24 jam ketiga) dan 35 °C (48 jam terakhir). Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama fermentasi biji kakao asalan menunjukkan seluruh perlakuan terjadi peningkatan kosentrasi etanol sejalan dengan meningkatnya populasi *S. cerevisiae* diawal fermentasi. Selanjutnya *L. lactis* meningkat diikuti asam laktat, diakhir fermentasi *A. aceti* meningkat diikuti asam asetat. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa rehidrasi *pulp* biji kakao asalan dapat memperbaiki komposisi *pulp* sebagai substrat fermentasi. Populasi mikrobia menunjukkan telah terjadi suksepsi mikrobia ditunjukkan pada perlakuan penambahan inokulum secara bertahap.

Kata Kunci : Biji kakao asalan, fermentasi, inokulum, etanol, asam laktat dan asam asetat

PENDAHULUAN

Produksi biji kakao kering dari perkebunan rakyat pada umumnya tidak menggunakan proses fermentasi baik secara alami maupun dengan penambahan inokulum. Pada umumnya petani kakao hanya merendam biji kakao segar dalam air dalam upaya untuk membantu menghilangkan *pulp* dan

menjemur. Biji kakao kering yang tidak diketahui kadar airnya, dijual tanpa memperhatikan kualitas baik dari aspek kadar air maupun kondisi biji kering disebut sebagai biji kakao asalan.

Fermentasi adalah salah satu faktor penting dalam pengolahan biji kakao khususnya dalam pembentukan senyawa prekursor flavor. Fermentasi biji kakao

segar terdiri atas 2 tahap yaitu tahap pertama dimulai dengan pelepasan pulp dari permukaan biji dan kedua reaksi hidrolitik didalam kotiledon biji. Perubahan jenis dan jumlah mikrobia selama berlangsungnya fermentasi biji kakao lebih dikenal dengan istilah suksesi mikrobia. Pada tahap awal fermentasi keberadaan mikrobia didominasi oleh yeast, selanjutnya diikuti oleh bakteri asam laktat dan akhir fermentasi oleh bakteri asam asetat (Aprotosoai et al, 2016; Mulono, 2016). Aktivitas mikrobia tersebut menghasilkan etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi diikuti oleh kenaikan suhu lingkungan fermentasi. Alkohol dan asam asetat didifusi kedalam biji kakao dan diikuti oleh kenaikan suhu yang berdampak pada kematian biji (tidak dapat berkecambah).

Proses fermentasi kakao umumnya berlangsung secara alami dibantu oleh mikrobia dari udara berlangsung selama 6 hari serta dilakukan pembalikan pertama dihari ke 2 dan selanjutnya dilakukan pada setiap 24 jam (Afoakwa et al, 2014). *S. cerevisiae* memiliki beberapa kelebihan seperti pertumbuhannya sangat baik, toleran terhadap etanol, serta aktivitas pektinolitik dan tahan terhadap pH rendah. *Lactobacillus sp* yang dijumpai pada media fermentasi biji kakao segar adalah *L. lactis*, dengan kelebihannya yaitu lebih kompetitif, lebih toleran terhadap asam dan etanol dan tahan dikondisi lingkungan dengan jumlah oksigen lebih banyak. Bakteri asam asetat didominasi *A. aceti* dengan kemampuan tumbuh dikonsentrasi etanol sampai 6,0 %, suhu 45°C dan pada pH 3,5 serta etanol dioksidasi menjadi asam asetat dan dikonversi lanjut asam asetat menjadi CO₂ dan air (Cortes et al, 2012).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suksesi mikrobia dan perubahan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ; buah kakao jenis lindak (*bulk cacao*) diperoleh dari desa Bunder, Patuk, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan karakteristik yang dimiliki yaitu panjang buah ±15 cm, diameter ±8 cm, kulit buah masak optimal berwarna orange, jumlah biji tiap pod ±35 keping biji.

Kemudian nokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Aseton 80%, BSA (bovien serum albumin), buffer pospat, asam asetat, *trichloroacetat acid*, HCl, larutan buffer pH 4, pH 7 dan pH 9, hexan, larutan *Folin-Ciocalteu*, Na₂CO₃.

Pelaksanaan Penelitian

Fermentasi terkendali dengan penambahan inokulum mikrobia dan pengaturan suhu inkubator dengan perlakuan control mengacu Mulono *et al.*, 2016b. Biji kakao kering terhidrasi yang digunakan pada tahap ini adalah yang terpilih. Biji kakao rehidrasi sebanyak 100 gram difermentasi selama 5x24 jam dengan tiga variasi perlakuan: a) tanpa penambahan inokulum disebut kontrol, b) dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) secara serentak pada awal fermentasi dengan populasi masing-masing sebanyak 10⁸ cfu/g, dan c) dengan penambahan inokulum mikrobia secara bertahap sebagai berikut : *S. cerevisiae* (FNCC

3056) pada awal 24 jam pertama, *L. lactis* (FNC 0086) pada awal 24 jam kedua dan *A. aceti* (FNCC 0016) pada awal 24 jam ketiga, masing masing dengan populasi sebanyak 10^8 cfu/g.

Fermentasi dilakukan secara berurutan dengan suhu terkendali: $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam pertama, $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam kedua, $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam ketiga dan $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam keempat hingga jam ke 120. Total waktu fermentasi adalah 120 jam.

Pengujian jumlah *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* menggunakan metode *pour plate count* (Kustyawati dan Setyani, 2008), konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat (metode Kresnowati et al, 2013).

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data seluruhnya dianalisa statistik secara oneway anova pada tingkat signifikansi 95% jika berbeda nyata dilanjutkan dengan uji lanjut LSD (*least Significant different*) menggunakan program SPSS 17.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Populasi Mikrobia awal

Hasil penelitian menunjukkan selama pengeringan biji kakao terjadi penurunan komposisi *pulp* biji kakao kering dan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*, untuk dapat berlansungnya proses fermentasi *pulp* biji kakao kering harus memenuhi syarat sebagai substrat. Penurunan populasi *S. cerevisiae* karena air dalam *pulp* biji kakao menguap sehingga pertumbuhan *S. cerevisiae* terganggu dan menyebabkan kematian sel. *L. lactis* mengalami penurunan diduga karena suhu pengeringan menurunkan kadar air bebas sehingga bakteri tidak dapat tumbuh optimal. Pertumbuhan bakteri membutuhkan air bebas yang lebih banyak dibandingkan yeast. Pada proses pengeringan Aw turun, artinya air bebas yang tersisa tidak mencukupi untuk kebutuhan pertumbuhannya, walaupun *pulp* menyediakan nutrisi yang diperlukan.

Proses pengeringan menguapkan air dalam *pulp* serta seluruh alkohol hasil perombakan gula oleh *S. cerevisiae* berakibat pada tidak berkembang populasi *A. aceti*. Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* sebesar berturut-turut $3,5 \times 10^5$ cfu/g, $4,7 \times 10^6$ cfu/g dan $4,2 \times 10^4$ cfu/g (cfu= Colony Forming Unit). Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang terdapat pada *pulp* biji kakao segar dan *pulp* biji kakao kering tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada *pulp* biji kakao segar dan *pulp* biji kakao kering

Mikrobia	<i>Pulp</i> biji kakao segar (cfu/g)	<i>Pulp</i> biji kakao kering (cfu/g)
<i>S. cerevisiae</i>	$4,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$
<i>L. lactis</i>	$4,2 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$
<i>A. aceti</i>	$4,6 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$

Hasil penelitian tahap ini menunjukkan bahwa pada biji kakao kering telah memiliki populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*, meskipun populasi tersebut belum memadai untuk berlangsungnya fermentasi biji kakao terutama pada awal fermentasi, sejalan dengan penelitian Kresnowati et al (2013), dan Mulono et al, (2017).

Suksesi Mikrobial

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* di awal fermentasi berturut-turut 5,55, 6,66 dan 4,65 log (cfu/g). Hasil analisis statistik evaluasi hasil fermentasi melalui perubahan kimia dan mikrobiologi dengan perlakuan kontrol, IA dan IB tersaji pada Tabel 2.

Pada perlakuan kontrol diawal fermentasi konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat seluruhnya 0%. Pada 24 jam fermentasi terjadi perubahan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut-turut yaitu 7,24; 6,70 dan 6,71 log (cfu/g). Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut-turut yaitu 4,83, 1,83 dan 1,53%. Pada 48 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* masing-masing yaitu 5,88, 8,66 dan 6,64 log (cfu/g). Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut-turut yaitu 2,63, 3,44 dan 2,35%. Pada 72 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut-turut yaitu 4,23, 8,43 dan 6,11 log (cfu/g). Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut-turut yaitu 1,02, 4,03 dan 3,46%. Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa rata-rata populasi *S. cerevisiae* perlakuan kontrol, IA dan IB berturut-turut yaitu 4,93, 5,86 dan 5,66 log (cfu/g) dan tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$). Hal ini dapat diduga bahwa

pengendalian suhu lingkungan menjadi ideal untuk pertumbuhan *S. cerevisiae*.

Rata-rata populasi *L. lactis* menunjukkan bahwa perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut yaitu 6,90, 8,6 dan 8,55 log(cfu/g) dan perlakuan kontrol menunjukkan berbeda nyata terhadap perlakuan yang lain. Rata-rata populasi *A. aceti* menunjukkan bahwa perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap yaitu 5,57, 7,78 dan 8,74 log (cfu/g).

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan kontrol berbeda nyata ($p \leq 0,05$) terhadap perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap. Perubahan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang dihasilkan perlakuan kontrol sesuai dengan hasil penelitian Kresnowati et al, (2013) dan Afoakwa et al, (2014), yang telah mempelajari pertumbuhan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat selama fermentasi biji kakao segar. Hasil analisis Anova penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata produksi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$) sesuai dengan hasil penelitian Kustyawati dan Setyani, (2008) yang telah mempelajari ekologi mikrobial pada fermentasi biji kakao di Indonesia.

Jika ditinjau konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi pada perlakuan kontrol masih relatif rendah, dapat diduga rendahnya konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat disebabkan oleh populasi dan aktivitas *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* rendah. Rendahnya populasi dan aktivitas *S. cerevisiae* dapat disebabkan karena kondisi suhu dan pH yang tidak ideal, sejalan dengan hasil penelitian Ganda et al, (2008) bahwa kondisi suhu dan pH optimum aktivitas

enzim poligalaturonase (PG) akan terjadi depolimerisasi *pulp* biji kakao.

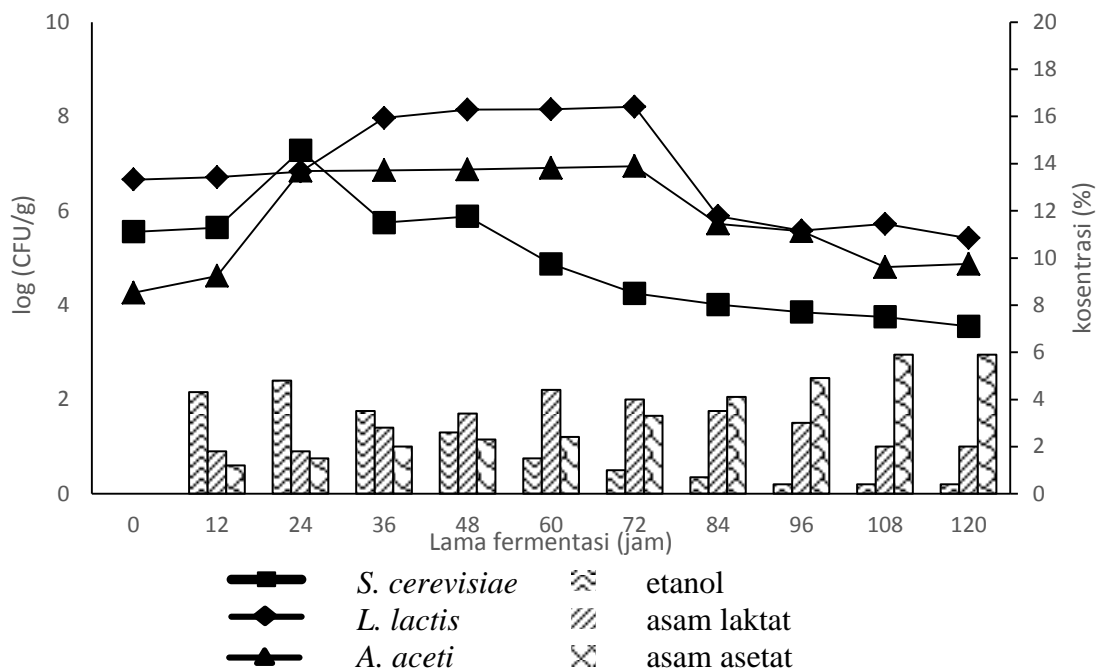
Selanjutnya hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap

konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat biji kakao pada kontrol selama fermentasi tersaji pada Gambar 1.

Tabel 2. Hasil analisis statistik populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*, etanol, asam laktat, asam asetat, total polifenol dan asam amino hidrofobik.

Parameter	Perlakuan		
	Kontrol	IA	IB
<i>S. cerevisiae</i> (log cfu/g)	4,93 ± 0,35a	5,86 ± 0,95a	5,66 ± 0,05a
<i>L. lactis</i> (log cfu/g)	6,90 ± 0,37a	8,6 ± 0,46b	8,55 ± 0,66b
<i>A. aceti</i> (log cfu/g)	5,57 ± 0,27a	7,78 ± 0,48b	4,67 ± 0,81b
Etanol (%)	1,81 ± 0,50a	1,93 ± 0,57a	1,94 ± 0,6a
Asam laktat (%)	2,64 ± 0,37a	2,47 ± 0,39a	2,54 ± 0,40a
Asam asetat (%)	3,09 ± 0,58a	3,25 ± 0,62a	3,43 ± 0,70a

Keterangan : Huruf berbeda dibelakang angka pada baris sama menunjukkan beda nyata $p \leq 0,05$
 Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis



Gambar 1. Hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan kontrol . Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Hasil penelitian ini pada perlakuan penambahan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNCC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) secara serentak diawal fermentasi menunjukkan bahwa populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, dan *A. aceti* diawal fermentasi berturut – turut yaitu 8,28, 8,58 dan 8,57 log (cfu/g).

Hubungan antara populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak tersaji pada Gambar 2. Pada 24 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti* masing – masing yaitu 12,41, 8,39 dan 8,38 log (cfu/g), terjadi kenaikan populasi *S. cerevisiae* dari awal fermentasi. Pada 48 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti* berturut – turut 5,88, 11,82 dan 8,82 log (cfu/g), populasi *L. lactis* tertinggi terjadi di 48 jam fermentasi. pada 72 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut – turut yaitu 4,23, 9,11 dan 10,72 log (cfu/g), terjadi populasi *A. aceti* tertinggi disini. Selanjutnya populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* menunjukkan penurunan berturut – turut yaitu 2,5, 6,39 dan 5,45 log (cfu/g).

Jika ditinjau konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat menunjukkan berturut – turut diawal fermentasi yaitu 0%. Pada 24 jam fermentasi dihasilkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 5,23, 1,433 dan 1,87%. Pada 48 jam fermentasi dihasilkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 3,02, 3,46 dan 2,05%. Pada jam ke 72 fermentasi menunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 1,35, 3,64 dan 3,54%. Diakhir fermentasi menunjukkan penurunan konsentrasi etanol asam laktat

dan asam asetat berturut – turut yaitu 0,33, 1,82 dan 6,32%.

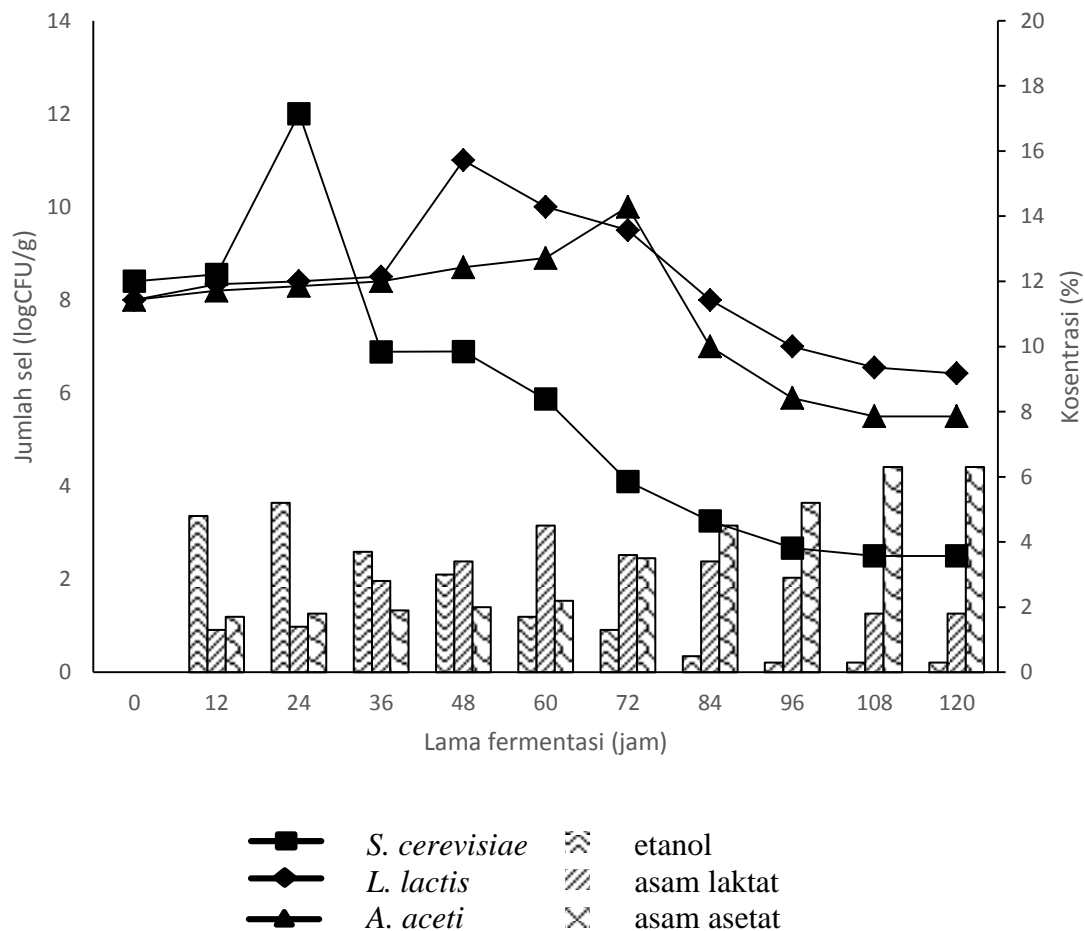
Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat yang dihasilkan lebih tinggi dari perlakuan kontrol dapat diduga bahwa penambahan inokulum meningkatkan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* sebanyak 10^8 cfu/g. Setelah 24 jam fermentasi terjadi kenaikan suhu fermentasi dan pH lingkungan fermentasi berakibat pada kondisi optimum aktivitas enzim PG dan dihasilkan etanol lebih banyak sehingga kondisi tidak sesuai untuk *S. cerevisiae* dan perannya digantikan oleh *L. lactis*. Setelah 48 jam fermentasi substrat gula sudah relatif sedikit, aerasi semakin baik dan konsentrasi etanol yang relatif tinggi, pH *pulp* semakin kecil menjadikan kondisi ideal untuk *A. aceti*.

Hasil analisis Anova satu arah menunjukkan bahwa populasi *L. lactis* dan *A. aceti* pada perlakuan penambahan inokulum diawal berbeda nyata ($p \leq 0,05$) terhadap kontrol. Pertumbuhan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang dihasilkan sesuai dengan yang diperoleh Mulono *et al.*, (2016a); yang telah mempelajari penambahan *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNCC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) pada proses fermentasi biji kakao segar varietas lindak. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan hasil yang diperoleh Widiyanto *et al.*, (2013) yang mempelajari perbaikan proses fermentasi dengan penambahan tetes tebu dan penambahan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan secara bertahap populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* diawal fermentasi berturut – turut yaitu 8,66, 6,64 dan 4,67 log (cfu/g). Pada 24 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* naik menjadi berturut – turut 12,55, 8,23 dan

5,53 log (cfu/g). Pada 48 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terjadi perubahan berturut – turut yaitu 6,54, 12,53 dan 8,73 log (cfu/g). Pada 72 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut

– turut yaitu 3,87, 10,64 dan 12,13 log (cfu/g). Selanjutnya diakhir fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* turun menjadi berturut – turut 2,22, 6,23 dan 9,22 log cfu/g.



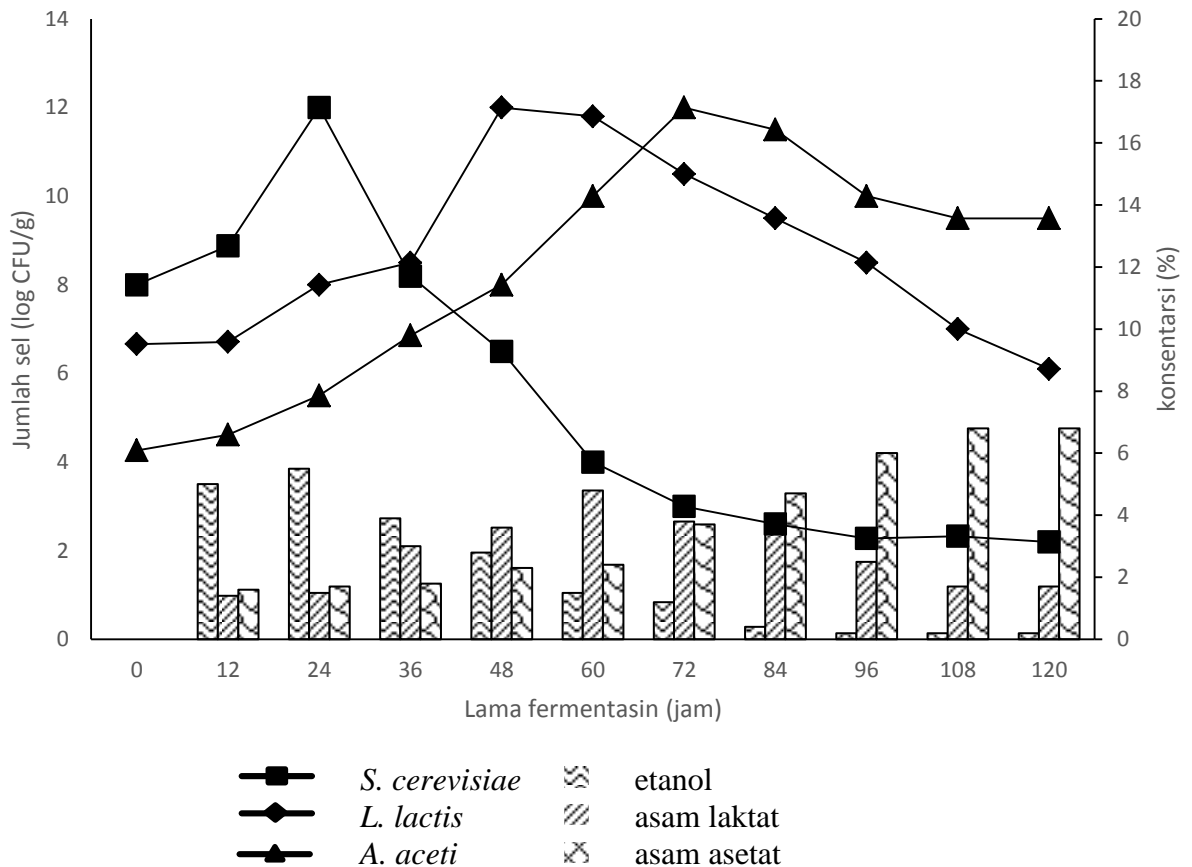
Gambar 2. Hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C

Perlakuan penambahan inokulum secara bertahap mempunyai konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat diawal fermentasi seluruhnya 0%. Pada 24 jam fermentasi ditunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat naik berturut – turut yaitu 5,54, 1,55 dan

1,70%. Pada 48 jam fermentasi menunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 2,84, 3,67 dan 2,37%. Pada 72 jam fermentasi ditunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 1,23, 3,83 dan 3,32% sejalan

dengan penelitian Campos *et al.*, (2012), bahwa lama fermentasi akan menunjukkan peningkatan senyawa asam organik yang menghasilkan senyawa aroma. Hubungan antara populasi *S.*

cerevisiae, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat pada perlakuan penambahan inokulum secara bertahap tersaji pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C

Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat tertinggi terjadi berturut – turut di 24, 60, dan 108 jam fermentasi hal ini dapat diduga inokulum yang ditambahkan mengalami adaptasi dan kompetisi dengan mikrobia endogenus yang ada. Hasil analisis ANOVA satu arah menunjukkan bahwa populasi *S. cerevisiae*, *L.* pada perlakuan inokulum

secara bertahap tidak berbeda nyata terhadap perlakuan kontrol dan perlakuan penambahan inokulum secara serentak, sedangkan populasi *L. lactis*, populasi *A. aceti* berbeda nyata terhadap kontrol.

Perlakuan secara bertahap menunjukkan rata – rata populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut

– turut yaitu 5,66, 8,55 dan 4,47 log (cfu/g). Jika ditinjau dari perlakuan variasi teknik fermentasi menunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat naik, diduga suhu lingkungan yang dihasilkan penambahan inokulum yaitu 39-51°C merupakan suhu optimum untuk aktivitas enzim pektinolitik seperti enzim Poli Galaktoranase (PG) dan menaikkan kemampuan depolimerisasi *pulp* biji kakao sejalan dengan hasil penelitian Ganda *et al*, (2008) yang melakukan optimasi kondisi depolimerisasi *pulp* biji kakao oleh enzim bahwa kondisi optimum untuk aktivitas enzim PG pada suhu 42,5°C dan pH 4,6. Jika ditinjau dari konsentrasi asam asetat yang dihasilkan maka dapat diartikan perlakuan secara bertahap adalah yang terbaik. Asam asetat merupakan asam organik yang terdifusi kedalam keping biji sehingga mengakibatkan aktifnya enzim polifenol oksidase yang mengoksidasi polifenol (Supriyanto *et al*, 2007).

KESIMPULAN

Rehidrasi *pulp* dapat meningkatkan kadar air *pulp* biji kakao kering sehingga dapat digunakan sebagai substrat fermentasi. Mutu biji kakao hasil fermentasi dapat ditingkatkan melalui proses fermentasi terkendali. Perlakuan penambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi dapat menaikkan suhu fermentasi (51°C), indeks fermentasi (1,03), kadar gula reduksi (10,79%), persentase jumlah warna coklat keping biji (97,01%), konsentrasi asam asetat (6,83%), populasi *S. Cerevisiae* (10^{12} cfu/g), *L. lactis* (10^{12} cfu/g) dan *A. aceti* (10^{12} cfu/g), meskipun pH biji kakao (4,22) masih rendah dibandingkan perlakuan kontrol dan penambahan inokulum secara serentak fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afoakwa, E.O., Kongor, J. E., Takrama, J. dan Budu, A. S., 2014. Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Internasional Food Research Journal* 20(4): 1843-1853
- Aprotosoai A. C., Luca S.V., dan Miron A., 2016. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: 73-91
- Cortes, T.R.; Olvera, V.R., Jimenes, G.R., dan Lepe .M. R., 2012. Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*. 6:339-347
- Campo, R. J., Escalona-Buendía, H. B., Ramos.E.H.B., Avila, C.S.M., Flores, O.I. J.E., dan Cervantes, L.E., 2012. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1):277–288.
- Ganda Putra, G.P., Harjiono, Susanto, T., Kumalaningsih, S., dan Aulanni'am, 2008. Optimasi kondisi depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim poligalakturonase endojinus. *Jurnal Teknik Industri*. 9(1): 124-34.
- Kresnowati P, M. T. A, Suryani, L dan Affifah, M., 2013. Improvement of Cocoa Beans Fermentation by LAB Starter Addition, *Journal of Medical and Bioengineering*. 2: 274-278.
- Kustyawati M.E., dan Setyani S., 2008. Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama

- fermentasi coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 8: 73 - 84
- Mulono Apriyanto, 2016. Changes in Chemical Properties of Dried Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans during Fermentation,. *Intl. J. Food. Ferment*. 5(1): 11-16, June 2016
- Mulono Apriyanto., Sutardi., Harmayani, E., dan Supriyanto ., 2016a. Perbaikan proses fermentasi biji kakao non fermentasi dengan penambahan biakan murni *saccharomyces cerevisiae* , *lactobacillus lactis* , dan *acetobacter aceti*. *Agritech* 36, 410– 415. doi: .10.22146.
- Mulono Apriyanto., Sutardi., E Harmayani., Supriyanto, 2016b. Study on Effect of Fermentation to The quality parameter cocoa beans in Indonesia, *Asian J. Dairy & Food Res.*, 35 (2) 2016 : 160-163.
- Supriyanto, Haryadi, Rahardjo. B., dan Warseno. D.W., 2007. Perubahan suhu, kadar air, warna, kadar polifenol, dan aktivitas oksidatif kakao selama penyangraian dengan energi gelombang mikro. *AGRITECH*. 27(1):176-182
- Widiyanto, D., Pramita, A. D., dan Wedhastri, S., 2013. Perbaikan proses fermentasi biji kakao kering dengan penambahan tetes tebu, khamir, dan bakteri asam, *Jurnal Tekno sains*. 3(1):1-80