

**PENGARUH PENAMBAHAN INOKULUM CAMPURAN TERHADAP
PERUBAHAN KIMIA DAN MIKROBIOLOGI
SELAMA FERMENTASI COKLAT**

[Effect of the Addition of Mixed Inoculums on the Chemical and
Microbiological Changes During Cocoa Fermentation]

Maria Erna Kustyawati¹⁾ dan Sri Setyani¹⁾

¹⁾ Staf Pengajar Jurusan Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung
Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung, Lampung 35145
Telp. 0721-781823 e-mail: mariaerna@unila.ac.id

ABSTRACT

The effects of the addition of mixed inoculums consisted of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* and *Acetobacter aceti* on the chemical and microbial changes during cacao fermentation were investigated. The fermentation conditions were designed as natural fermentation (without any inoculum addition), fermentation added with mixed inoculums at zero fermentation time, and fermentation added with *S. cerevisiae*, *L. lactis*, and *A. aceti* at the zero, first, and second day of fermentation, respectively. The fermentation was conducted in the sweat box of 5 kg for 5 days and sampling was done at every 12 hours. The result showed that the addition of mixed inoculums at zero time speeded the optimum fermentation time. Microbial inoculums added at the first or second day of fermentation are not recommended.

Keywords: Cacao bean, chemical and microbial changes, fermentation, mixed inoculums

PENDAHULUAN

Fermentasi kakao bertujuan untuk meniadakan daya hidup biji, menjadikan selaput berdaging (pulp) mudah dihilangkan dari kulit biji, dan memberikan kesempatan terjadinya proses yang menuju ke pembentukan warna, rasa dan aroma. Proses fermentasi kakao pada umumnya berlangsung secara alami oleh mikroorganisme yang terdapat dalam atmosfer fermentasi yang berlangsung selama 6 hari dengan pembalikan pada hari ke dua dan pada setiap 24 jam (Schwan *et al.*, 1998; Hii *et al.*, 2006; Hashim *et al.*, 1998; Senanayake *et al.*, 1996). Pulp menyelimuti biji, berwarna putih dan mengandung 14% gula, 1,5% pektin, dan pH 3,5 (Schwan, *et al.*, 1998). Pulp merupakan media yang cocok untuk tumbuhnya mikrobia. Selama fermentasi aktivitas mikrobia dalam pulp akan

memproduksi alkohol, asam, dan membebaskan panas (reaksi eksothermal). Adanya reaksi eksothermal ini menyebabkan difusi zat-zat metabolit tersebut ke dalam biji, akibatnya biji mati dan selanjutnya terjadi reaksi enzimatik pembentukan flavor, aroma dan warna. Sehingga fermentasi menentukan mutu produk akhir.

Pertumbuhan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat di dalam pulp berperan dalam perubahan biokimiawi selama fermentasi kakao (Leerian and Patterson, 1983; Schwan *et al.*, 1998; Ardhana dan Fleet, 2003). Pada awal 24 jam fermentasi yeast (khamir) mendominasi fermentasi, kemudian menurun dan digantikan oleh pertumbuhan bakteri asam laktat. Semula, peranan bakteri asam laktat dalam fermentasi kakao tidak diketahui dengan jelas, sampai ditemukannya

Lactobacillus plantarum yang konsisten berada selama fermentasi (Thompson *et al.*, 2001). Pada saat pulp mulai mencair oksigen mengalir ke dalam kotak fermentasi, akibatnya bakteri asam asetat mendominasi fermentasi dan memproduksi asam asetat. Selama pertumbuhan ini suhu dalam kotak meningkat ke sekitar 50°C, sehingga terjadi difusi asam dan panas ke dalam biji yang mengakibatkan kematian biji, selanjutnya dimulai proses pembentukan warna, aroma, dan flavor yang meliputi gula, asam amino, dan peptida-peptida, secara enzimatik di dalam biji.

Schwan, *et al.* (1998) menemukan lebih dari 40 spesies mikroba yang tumbuh selama fermentasi kakao. Tetapi tidak semua mikroba tersebut mempunyai peran penting dalam fermentasi, sehingga seleksi perlu dilakukan terhadap mikroba yang mempunyai peran utama dalam pembentukan aroma, warna, flavor dan komponen kimiawi kakao biji. *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida tropicalis* merupakan dominan yeast selama fermentasi kakao karena tingkat survival yang tinggi, 10^7 cfu/g selama 36 jam (Ardhana dan Fleet, 2003). Jenis bakteri asam laktat *Lactobacillus cellobiosus* dominan sampai 48jam dan *Acetobacter pasteurianus* merupakan golongan bakteri asam asetat yang paling lama bertahan hidup dibanding *Acetobacter aceti* yang aktif pada 24 jam pertama fermentasi. Penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh penambahan inokulum campuran yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *A. aceti* dan *Lactobacillus lactis* pada proses fermentasi kakao terhadap ekologi pertumbuhan mikroba dan perubahan biokimiawi dalam pulp selama fermentasi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan kakao varietas *Lindak* yang berasal dari Gedong Tataan Kabupaten Pesawaran, Lampung. Penelitian dilakukan di Laboratorium Analisis Pangan dan Laboratorium Biokimia Pangan, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung. Biakan murni *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* diperoleh dari pusat kultur Universitas Gadjah Mada. Media agar dan bahan kimia penunjang lainnya diperoleh dari Laboratorium Kimia Analisis, Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

Perlakuan yang dilakukan yaitu variasi fermentasi yang terdiri dari: (1) fermentasi alami atau tanpa penambahan mikroorganisme; (2) fermentasi terkontrol dengan penambahan mikroorganisme yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* secara bersamaan yang ditambahkan pada awal fermentasi pada hari ke-0; (3) fermentasi dengan penambahan mikroorganisme secara bertahap yaitu *Saccharomyces cerevisiae* pada hari ke-0, *Lactobacillus lactis* pada hari ke-1, dan *Acetobacter aceti* pada hari ke-2. Penambahan mikroorganisme masing-masing sebanyak 10^8 CFU/1kg biji kakao, berdasarkan pada jumlah total mikrobia tersebut pada saat fase logaritmik selama fermentasi alami. Fermentasi dilakukan dalam kotak fermentasi berkapasitas 5 kg kakao segar, pada suhu ruang (33-35°C), selama 5 hari. Analisis yang dilakukan meliputi analisis mikrobiologi, dan analisis kimia terhadap pulp selama fermentasi. Penelitian dilakukan dengan 3 kali ulangan dan data yang diperoleh adalah rerata dari nilai yang diperoleh setiap perlakuan.

Analisis yang dilakukan meliputi: Analisis mikrobial meliputi penghitungan jumlah total masing-masing mikroba dengan metode Cawan Tebar (Spread Plate). Jumlah total yeast dengan media Mold Extract Agar yang dicampur dengan antibiotika untuk membunuh bakteri, bakteri asam asetat dengan media Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate Agar (Ardhana and Fleet, 1999), dan bakteri asam laktat dengan media MRS agar (Oxoid). Analisis kimiawi meliputi pH (AOAC, 1990), total asam (AOAC, 1990), kadar gula reduksi dengan Spektrofotometer (AOAC, 1990) dan Uji Belah (Cut Test) (Senanayake *et al.*, 1996) selama fermentasi. Uji Belah (Cut Test) mengikuti prosedur yang ditentukan oleh the International Organization for Standard (ISO, Senanayake *et al.*, 1996; Hamid dan Lopez, 2000) dengan penyesuaian sebagai berikut: sebanyak 100 sampel biji kakao dibelah memanjang dengan pisau tajam untuk menampakkan seluruh permukaan kotiledon. Warna kedua belahan biji diamati secara visual dalam cahaya matahari (daylight). Warna abu-abu (slaty) bila biji belum terfermentasi, ungu (violet) bila terfermentasi sebagian (belum sempurna), dan warna coklat penuh bila fermentasi sempurna. Nilai warna tersebut adalah slaty = 0, ungu = 1, ungu dominan terhadap coklat = 2, coklat dominan terhadap ungu = 3, dan coklat penuh = 4. Nilai uji belah ditentukan sebagai berikut.

$$NUB = \sum_{i=0}^4 i \times J_i$$

Keterangan ;

NUB = Nilai Uji Belah

i = Nilai warna belahan uji

J_i = Jumlah biji dengan warna belahan bernilai i

Sampling dilakukan setiap 24 jam selama fermentasi. Analisis dilakukan dengan duplikat (duplo).

HASIL DAN PEMBAHASAN

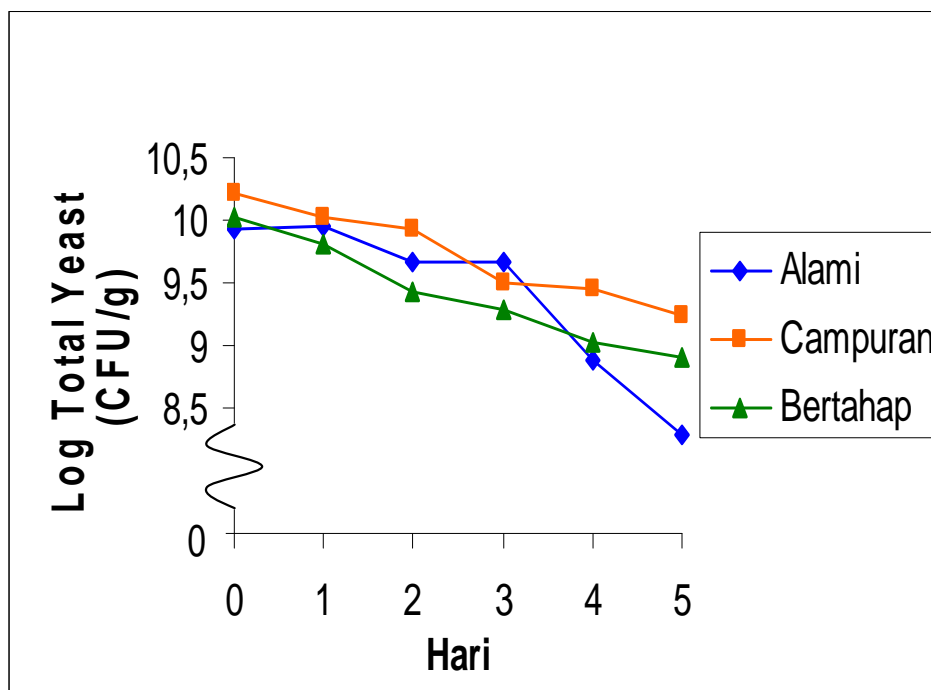
Pertumbuhan Yeast, Bakteri Asam Laktat dan Bakteri Asam Asetat

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan yeast, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat disajikan pada Gambar 1, 2, dan 3. Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pola pertumbuhan yeast pada ke tiga variasi fermentasi tidak berbeda yaitu menurun secara perlahan. Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa penambahan mikroba campuran mengakibatkan kenaikan jumlah total bakteri asam laktat secara signifikan pada hari ke 1, bila dibandingkan dengan fermentasi alami maupun fermentasi dengan penambahan mikroba secara bertahap. Pada Gambar 3 terlihat bahwa pola pertumbuhan bakteri asam asetat berbeda-beda pada masing-masing variasi fermentasi (secara alami, penambahan mikroba campuran, penambahan mikroba secara bertahap). Penambahan mikroba yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* dalam fermentasi kakao tidak mempengaruhi pertumbuhan dan populasi yeast dalam pulp kakao, tetapi menyebabkan populasi bakteri asam laktat lebih tinggi. Penambahan mikroba secara bertahap memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri asam asetat.

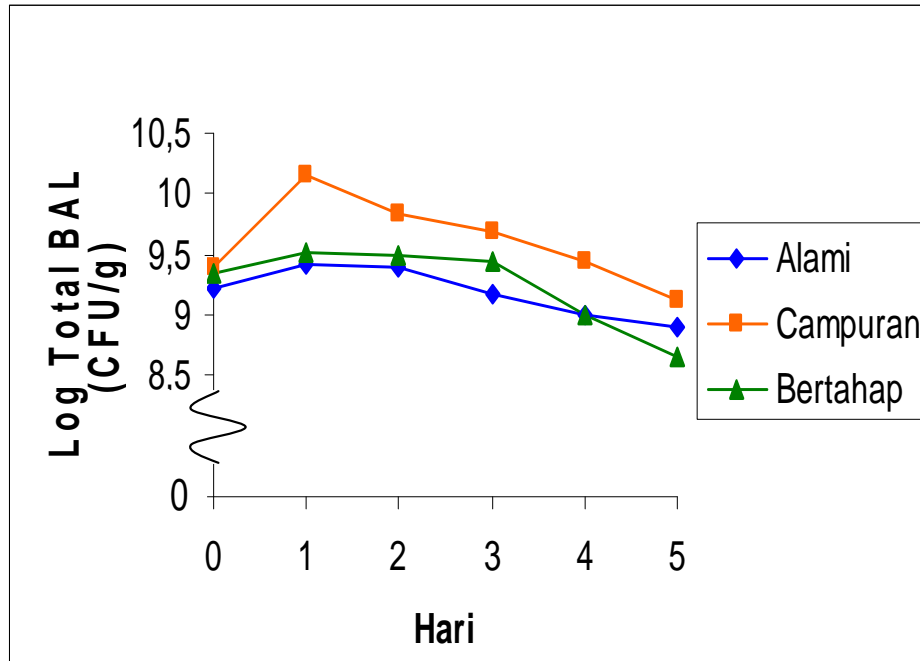
Pada awal (hari ke-0) fermentasi kakao secara alami, populasi yeast sebesar $9,3 \times 10^9$ cfu/g, sedangkan populasi yeast pada fermentasi kakao yang ditambah dengan inokulum campuran sebesar $2,2 \times 10^{10}$ cfu/g dan pada fermentasi yang ditambah inokulum secara bertahap yaitu

sebesar $4,0 \times 10^{10}$ cfu/g. Dari analisis mikroba ini diketahui bahwa yeast merupakan mikroba indigenus yang jumlahnya cukup signifikan, sebagai konsekuensi dari kondisi substrat fermentasi (pulp) yang mengandung gula dan senyawa pektin. Penemuan ini mendukung penelitian yang telah dilakukan oleh Schwan et al., 1998; Ardhana and Fleet., 2003). Jumlah total yeast ini jauh lebih tinggi dibanding total yeast pada awal fermentasi yang dilakukan oleh Ardhana dan Fleet (2003) yaitu hanya 10^4 - 10^5 dan 10^7 - 10^8 cfu/g pada fermentasi 24-36 jam. Yeast mempunyai peran penting dalam fermentasi kakao dalam hal menghasilkan alkohol dalam kondisi oksigen yang terbatas dan kadar gula tinggi, yang selanjutnya alkohol dikonversi menjadi asam asetat. Yeast juga mensekresi pektinase untuk merombak pulp

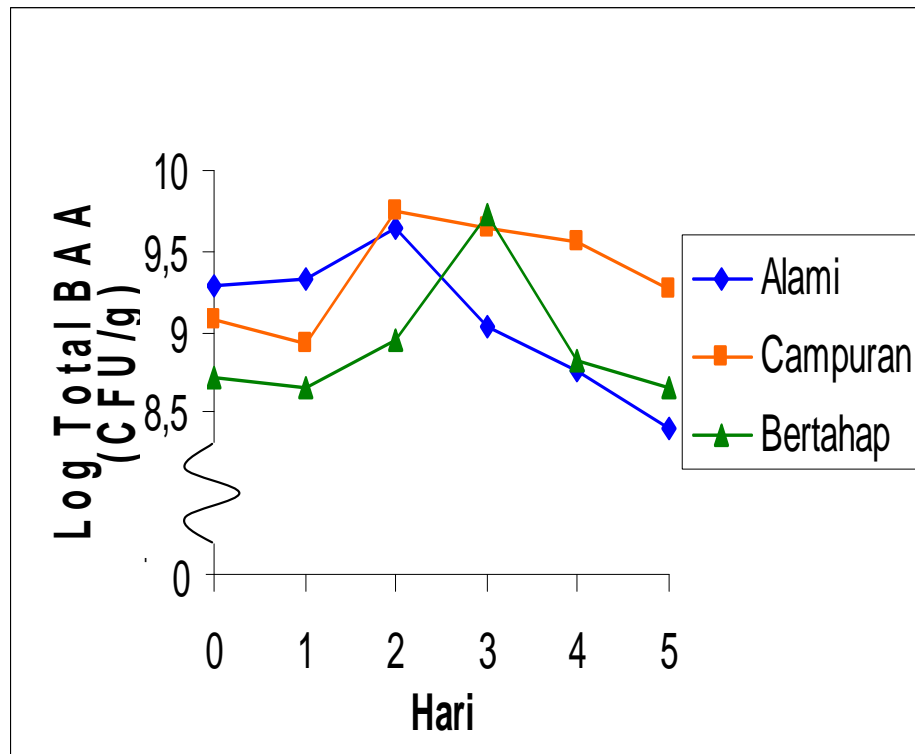
sehingga viskositas pulp menurun dan terjadi aerasi dalam pulp. Pertumbuhan yeast menghasilkan asam-asam terutama asetat, aerasi yang cukup dan keasaman biji karena terjadinya difusi asam asetat. Aerasi akan mendorong pertumbuhan bakteri asam asetat dan selanjutnya pertumbuhan bakteri asam asetat akan menekan laju pertumbuhan yeast sehingga terlihat bahwa pada hari ke 2 dan seterusnya populasi yeast menurun (Gambar 1). Disamping itu, tidak semua jenis yeast dapat bertahan hidup dalam alkohol. Sehingga alkohol dapat merupakan faktor pembatas bagi pertumbuhan yeast. Walaupun jumlah total yeast berbeda, pola pertumbuhan yeast pada penelitian ini serupa dengan penelitian Ardhana dan Fleet (2003) yaitu menurun segera setelah 48 jam fermentasi.



Gambar 1. Total yeast selama fermentasi



Gambar 2. Total bakteri asam laktat selama fermentasi



Gambar 3. Total bakteri asam asetat selama fermentasi

Populasi bakteri asam laktat pada ke tiga variasi fermentasi berawal dengan jumlah 10^9 cfu/g (Gambar 2). Selanjutnya penambahan *Lactobacillus lactis* pada hari ke 2 fermentasi dengan penambahan mikroba campuran menaikkan total jumlah bakteri asam laktat menjadi 10^{10} cfu/g (Gambar 2). Jenis dan populasi bakteri dalam suatu fermentasi berkaitan erat dengan kondisi ekstrinsik dan intrinsik. Dalam hal fermentasi kakao, tempat fermentasi, jenis kakao, dan kondisi geografis tempat tumbuh kakao mempunyai pengaruh terhadap ekologi mikrobial yang terlibat dalam fermentasi. Dengan alasan tersebut, maka jumlah bakteri asam laktat pada penelitian ini lebih tinggi dibanding sejumlah bakteri tersebut (10^8 - 10^9 cfu/g pada 36 jam fermentasi) pada penelitian Ardhana dan Fleet (2003). Bakteri asam laktat pada umumnya merombak glukosa melalui jalur Embden-Meyerhof-Parnas, dan menghasilkan lebih kurang 85% asam laktat. Tetapi beberapa spesies bakteri asam laktat juga merombak glukosa melalui jalur Hexosa-monophosphate-Shunt, yang memproduksi 50% asam laktat ditambah alkohol, asam asetat, glyserol, mannitol dan CO_2 (Schwan *et al.*, 1998). Pertumbuhan bakteri asam laktat akan segera menurun (seperti terlihat pada Gambar 2, pada hari ke-3), karena pertumbuhan golongan bakteri ini akan mendorong pertumbuhan bakteri asam asetat.

Tidak seperti pada pola pertumbuhan yeast dan bakteri asam laktat, pertumbuhan bakteri asam asetat bervariasi dan diawali dengan populasi sebesar 10^8 cfu/g pada ketiga fermentasi. Pola pertumbuhan bakteri asam asetat terlihat menurun tajam setelah 24 jam pada populasi optimum, pola ini serupa dengan bakteri asam asetat pada penelitian Ardhana dan Fleet (2003).

Pertumbuhan bakteri asam asetat optimum pada hari ke-2 (fermentasi alami dan penambahan mikroba campuran) dan hari ke-3 (pada fermentasi penambahan mikroba bertahap).

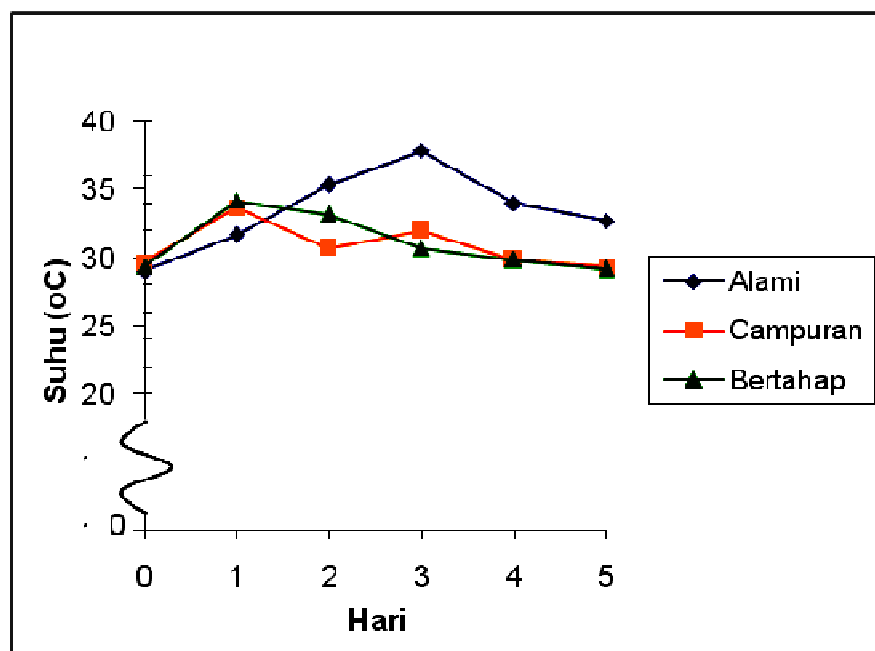
Walaupun pulp mengandung asam organik tetapi bakteri ini tidak beraktivitas pada awal fermentasi karena kondisi ekstrinsik tidak tersedianya oksigen. Laju pertumbuhan bakteri asam asetat akan meningkat setelah tersedianya oksigen dan alkohol hasil perombakan bakteri asam laktat dan yeast. Gambar 3 terlihat peningkatan jumlah total bakteri asam asetat sampai 10^9 cfu/g pada hari ke-2. Oleh bakteri asam asetat, alkohol dioksidasi menjadi asam asetat dan asam asetat dioksidasi menjadi CO_2 dan air (air ini akan keluar dari box fermentasi).

Reaksi oleh bakteri asam asetat berlangsung secara eksotermal sehingga menyebabkan suhu dalam pulp meningkat. Dengan demikian bakteri asam asetat berperan dalam pembentukan keasaman coklat biji, meningkatnya suhu dalam substrat fermentasi, dan difusi asam serta hidrolisis protein dalam kotiledon (Forsyth and Quesnel dalam Schwan, 1998). Dalam penelitian ini, penambahan *Acetobacter aceti* pada hari ke 2 mempengaruhi jumlah total bakteri asam asetat (10^9 cfu/g) dan memperpanjang masa pertumbuhannya, seperti terlihat pada Gambar 3 bahwa pada hari ke 3 fermentasi total jumlah populasinya masih sekitar 10^9 cfu/g. Keadaan ini sangat memungkinkan mempengaruhi proses kematian biji dan reaksi didalam biji. Bakteri asam asetat juga memetabolisme gula dan asam organik menghasilkan berbagai aldehyd, keton dan beberapa produk volatil (Drysdale and Fleet, 1988) yang mempengaruhi sifat organoleptik biji kakao.

Suhu Fermentasi

Hasil pengukuran suhu dari tiga variasi perlakuan fermentasi secara alami, dengan penambahan inokulum campuran, dan penambahan inokulum secara bertahap, disajikan pada Gambar 4. Suhu rerata optimum fermentasi kakao secara alami dicapai pada hari ke tiga yaitu sebesar 38°C. Sedangkan suhu rerata optimum fermentasi dengan penambahan inokulum campuran yaitu 34°C dan fermentasi dengan penambahan inokulum secara bertahap yaitu 35°C dicapai pada hari ke satu. Hasil ini lebih rendah dari suhu optimum yang diperlukan dalam fermentasi kakao yaitu 40°C. Suhu awal fermentasi kakao secara

alami, dengan penambahan inokulum campuran, dan penambahan inokulum secara bertahap yaitu berkisar 29-31°C, dan suhu tertinggi yang diperoleh dari hasil penelitian ini yaitu 34-39°C. Volume fermentasi, proses pembalikan, variasi kandungan komponen dalam substrat dan aerasi mempengaruhi perubahan suhu (Senanayake *et al.*, 1996), tetapi tidak berkaitan dengan suhu maksimum yang dicapai selama fermentasi. Pada penelitian ini suhu maksimum yang diperoleh kurang dari 40°C, kemungkinan karena frekwensi pembalikan dan volume substrat yang tidak sesuai.



Gambar 4. Suhu selama fermentasi

Tidak seperti pada fermentasi alami, fermentasi dengan penambahan inokulum campuran dan fermentasi dengan penambahan inokulum secara bertahap meningkat sampai $\pm 35^{\circ}\text{C}$ pada hari kedua. Temuan ini kurang mendukung penelitian

Schwan *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa suhu tumpukan biji kakao pada hari pertama selama proses fermentasi tidak berbeda antara fermentasi alami dengan penambahan inokulum campuran dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*,

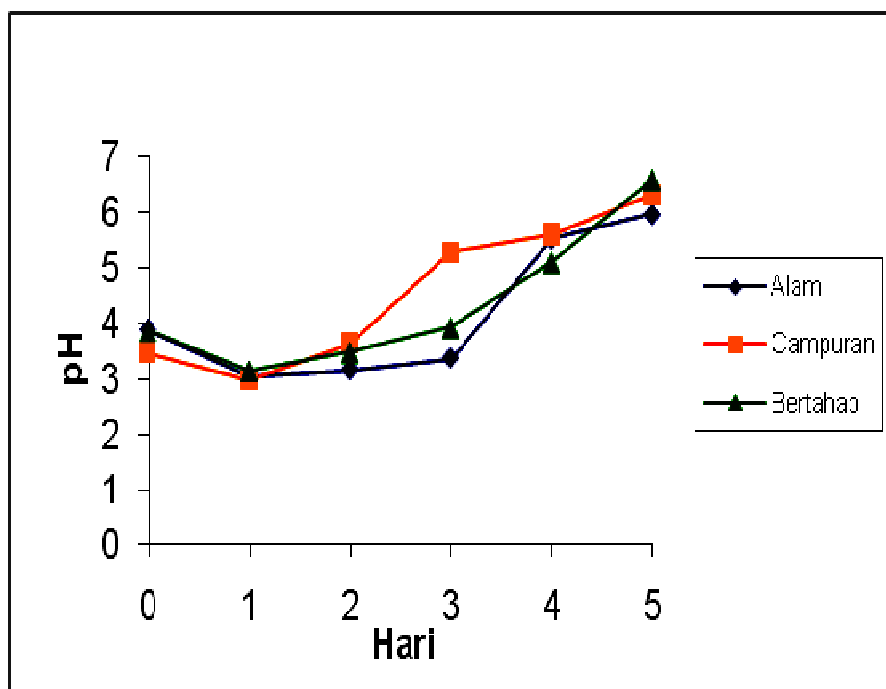
Lactobacillus lactis, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter aceti*, dan *Gluconobacter oxydans*.

Suhu tinggi pada saat fermentasi disebabkan oleh reaksi eksotermis yang terjadi pada saat perubahan gula pulp menjadi etanol oleh aktivitas yeast. Akibatnya pulp meleleh, tetesan air dan oksigen akan mengalir ke dalam tumpukan biji. Aerasi ini menyebabkan kenaikan suhu yang tajam dan mengakibatkan kematian biji. Pada saat biji mati maka akan dimulailah reaksi kimiawi di dalam kotiledon. Reaksi ini berperan dalam pembentukan flavor biji kakao. Terdapat dua fase penting selama fermentasi kakao yaitu: pertama, aktivitas yeast yang mengubah gula pulp menjadi alkohol selama fermentasi anaerobik di awal fermentasi dan kedua, aktivitas bakteri asam asetat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat dan selanjutnya menjadi CO₂ dan H₂O (Passos *et al.*, 1984). Tetapi suhu pada

fermentasi kakao dengan penambahan inokulum secara bertahap mengalami penurunan suhu setelah hari pertama. Hal ini dapat disebabkan oleh perlakuan penambahan inokulum dan pengadukan di hari ke dua fermentasi yang dapat mengganggu proses aerasi. Akibatnya terjadi kehilangan panas dari tumpukan biji kakao ke luar lingkungan. Oleh karena itu penambahan inokulum pada fermentasi kakao menyebabkan suhu maksimum dicapai pada waktu yang relatif awal dan perlakuan penambahan inokulum secara bertahap dapat mengganggu proses aerasi dan perubahan suhu.

Nilai pH

Hasil pengukuran terhadap nilai pH dan total asam pada fermentasi kakao secara alami, dengan penambahan inokulum campuran, dan penambahan inokulum secara bertahap disajikan pada Gambar 5 dan 6.

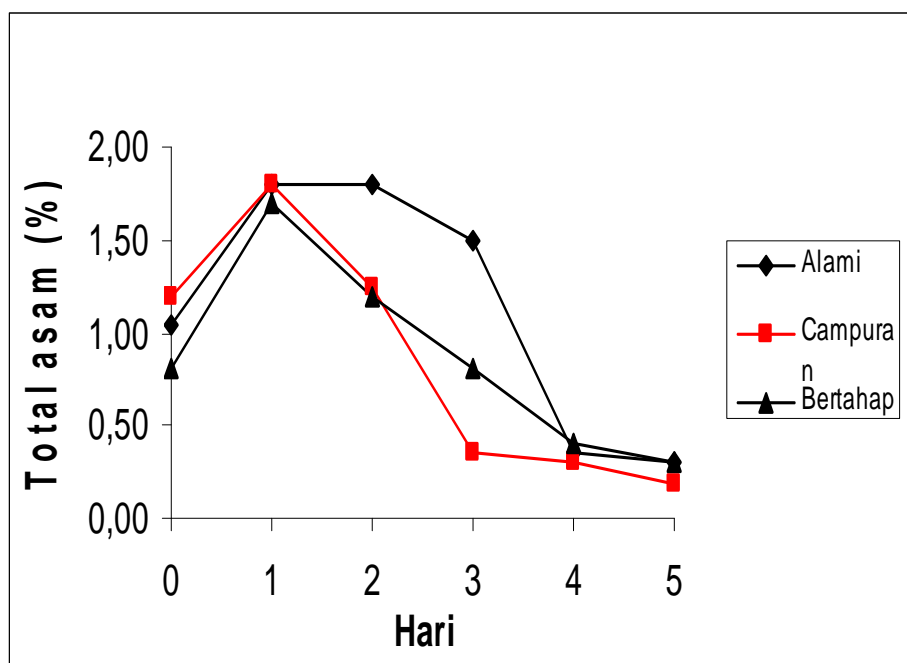


Gambar 5. pH selama fermentasi

Nilai pH pada ketiga variasi fermentasi mempunyai pola kenaikan yang serupa dimulai pada hari ke 1. Tetapi pada Gambar 5 terlihat bahwa penambahan mikroba campuran menyebabkan menurunnya pH pada hari ke 1. Nilai pH ditentukan oleh besarnya konsentrasi H^+ yang disumbangkan oleh asam-asam lemah di dalam substrat, dalam hal ini adalah asam sitrat, asam laktat dan asam asetat yang merupakan hasil perombakan gula oleh yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat.

Dengan penambahan inokulum campuran, perombakan asam sitrat dan sumbangan H^+ dalam pulp lebih besar, akibatnya akan menurunkan pH dari ± 4.0 menjadi 3.1 seperti terjadi pada hari pertama fermentasi. Nilai pH awal ini tidak berbeda

jauh dengan penelitian Ardhana dan Fleet (2003); Senanayake *et al.* (1996), yang melakukan fermentasi coklat asal Indonesia secara alami diketahui bahwa pH pulp sebelum fermentasi 3,7-3,9 dan meningkat menjadi 4,8-4,9 di akhir fermentasi (selama 5 hari). Keadaan ini menyebabkan terjadinya difusi asam dan hidrolisis protein di dalam kotiledon setelah biji mati. Oleh karena itu, bakteri asam asetat mempunyai peran dalam pembentukan flavor biji kakao (Forsyd and Quesnel, 1963). Sehingga penambahan inokulum campuran yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, dan *Acetobacter aceti* pada awal fermentasi mempengaruhi proses perubahan pH dan kemungkinan berperan dalam pembentukan flavor biji kakao.



Gambar 6. Total asam selama fermentasi

Total Asam

Pada Gambar 6 menunjukkan bahwa pada ke tiga variasi fermentasi persen total

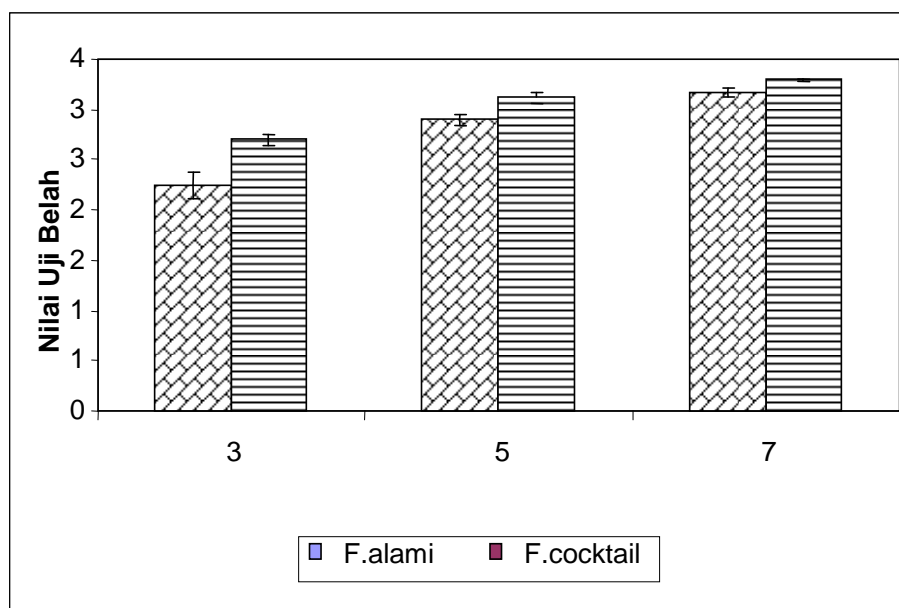
asam meningkat pada hari ke 1. Total asam dalam pulp adalah hasil perombakan gula menjadi alcohol oleh *S.cerevisiae*, gula

glukosa menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat yang didominasi oleh *L. lactis*, dan alcohol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat yang didominasi oleh *A. aceti* (Senanayake *et al.*, 1997). Menurut Schwan *et al.* (1998); Leerian and Patterson, (1983), pada awal 24 jam fermentasi yeast (khamir) mendominasi fermentasi yang akan merombak komponen gula di dalam pulp, sehingga pada penelitian ini penambahan inokulum yang mengandung *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* juga menunjukkan bahwa total asam meningkat pada hari ke 1 fermentasi. Keadaan ini juga diikuti oleh nilai pH yang rendah pada hari ke 1. Tetapi pada hari berikutnya total asam menurun signifikan pada fermentasi dengan penambahan inokulum baik inokulum campuran yang ditambahkan pada awal fermentasi maupun inokulum yang ditambahkan secara bertahap. Dengan hasil ini menunjukkan bahwa penambahan

inokulum menyebabkan meningkatnya total asam. Pada proses fermentasi kakao, nilai pH dan total asam sangat berkaitan dengan proses kematian biji yang diikuti oleh difusi asam ke dalam biji dan reaksi kimia yang mempengaruhi kualitas biji kakao.

Uji Belah (cut test)

Uji belah (cut test) digunakan sebagai standar untuk mengetahui apakah biji kakao sudah cukup terfermentasi dengan sempurna atau disebut sebagai derajat fermentasi. Pengaruh penambahan inokulum terhadap derajat fermentasi disajikan pada Gambar 7, yang menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka warna coklat biji kakao makin dominan terhadap ungu yang berarti proses fermentasi makin sempurna. Pada hari ketiga pada fermentasi alami, nilai rerata uji belah yaitu 2,25 yang berarti ungu dominan terhadap coklat.



Gambar 7. Grafik standard deviasi dan nilai uji belah (cut test) selama fermentasi pada biji kakao yang difermentasi dengan penambahan inokulum dan biji kakao dengan fermentasi alami

Pada fermentasi dengan penambahan inokulum campuran nilai rerata uji belah 2,7 yang berarti cokelat dominan terhadap ungu. Sedangkan hari kelima dan ketujuh pada masing-masing perlakuan, nilai rata-rata uji belahnya antara 2,9 sampai 3,29, yang berarti keping biji kakao rata-rata berwarna cokelat keunguan (cokelat dominan terhadap ungu). Nilai uji belah yang baik adalah sekitar 3,00, yaitu biji rata-rata berwarna cokelat keunguan dengan warna cokelat lebih dominan dan biji kakao dikatakan baik jika lebih dari 50 % terfermentasi sempurna yaitu warna cokelat dominan-cokelat penuh (Senanayake *et al.*, 1995).

Berdasarkan nilai rata-rata pada perlakuan tersebut, menunjukkan bahwa fermentasi dengan penambahan inokulum berpengaruh terhadap waktu fermentasi. Semakin meningkatnya aktivitas mikroba maka aerasi akan lebih baik dan suhu maksimum segera dicapai. Pada saat biji sudah mati, warna kotiledon kakao secara bertahap akan berubah dari ungu menjadi coklat. Selama fermentasi berlangsung terjadi perubahan senyawa kimia dalam pulp dan kotiledon. Asam asetat yang terbentuk dari oksidasi alcohol oleh mikrobia dan suhu tinggi mengakibatkan kematian embrio biji. Proses ini merupakan prasyarat untuk inisiasi reaksi biokimia dalam biji yang akan membentuk flavor, terutama reaksi yang melibatkan komponen polifenol. Selain itu antosianin sebagai hasil hidrolisis polifenol dapat mengubah warna biji menjadi ungu sedangkan jika terjadi oksidasi senyawa tanin oleh enzim polifenol oksidase mengakibatkan terbentuknya warna coklat pada biji. Munculnya warna cokelat pada biji menandakan bahwa fermentasi sempurna dan dapat diakhiri. Fermentasi sempurna dicapai pada hari ke

tiga oleh fermentasi dengan penambahan inokulum, sedangkan pada hari kelima oleh fermentasi alami. Oleh karena itu nilai uji belah atau derajat fermentasi pada penelitian ini dipengaruhi oleh penambahan inokulum.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan inokulum yang terdiri dari *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti* mempengaruhi perubahan kimiawi substrat selama fermentasi karena perubahan ekologi mikroflora di dalamnya. Penambahan dengan inokulum campuran pada awal fermentasi mempercepat proses fermentasi pulp dan kematian biji. Penambahan inokulum secara bertahap menyebabkan kenaikan suhu dini dan mengakibatkan fermentasi kurang sempurna.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analytical Chemist. Washington, DC.
- Ardhana dan Fleet. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Inter. J. of Food Microbiol.* 86: 87-99.
- Drysdale, G.S. and G.H.Fleet. 1988. Acetic acid bacteria in wine making: a review. *Am. J.Enol.Vitic.* 39: 143-154.
- Forsyth, W.G.C. and V.C. Quesnel. 1963. Mechanisms of cocoa curing. *Adv. Enzymol.* 25: 457-492.
- Hashim, P., J. Selamat, S.K.S. Muhammad, and A. Ali. 1998. Effect of mass and turning time on free amino acids, Peptide-N, sugar, and Pyrazine

- concentration during cocoa fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 78: 543-550.
- Hii, C.L., R.A. Rahman, S. Jinap, and Y.B.C. Man. 2006. Quality of cocoa beans dried using a direct solar dryer t different loadings. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1237-1243.
- Lehrian, D.W and G.R. Patterson. 1983. Cocoa fermentation, p. 529-575. In G. Reed (ed), *Biotechnology, a comprehensive treatise*, vol 5.verlag Chemie, Basel, Switzerland.
- Passos, F.M.L., A.S. Lopez, and D.O. Silva. 1984. Aeration and its influence on the mikrobial sequence in cacao fermentation in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. *J. of Food Sci.* 49: 1470-1476.
- Quesnel, V.C. 1965. Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 16: 441-447.
- Schwan, R.F. 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *J. Microbiol.* 14: 1477-1483.
- Senanayake, M., E.R. Jansz, and K.A. Buckle. 1995. Effect of variety and location on optimum fermentation requirements of cocoa beans: An aid to fementation on a cottage scale. *J. Sci. Food Agric.* 69: 461-465.
- Senanayake, M., R.J. Errol, and K.A. Buckle. 1996. Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans. *J. Sci. Food Agric.* 74: 42-48.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi. 1984. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Edisi Ketiga. Penerbit Liberty: Yogyakarta.
- Thompson, S.S., K.B.Miller., A.S.Lopez. 2001. Cocoa and coffee. In: Doyle, M.P.,
- L.R. Beuchat, T.J. Montville. (Eds). *Food Microbiology Fundamentals and Frontier*. ASM Press, Washington, D.C, pp 721-736.