

POTENSI MIKROBIOTA *INDIGENOUS* PULP TIGA VARIETAS KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SEBAGAI STARTER DALAM FERMENTASI BIJI KAKAO

(Potential Indigenous Microbiota Pulp of Three Cocoa (*Theobroma cacao*, L.) Varieties as the starters on Cocoa Bean fermentation)

Sri Indrayati¹), Silmi Yusri Rahmadani²*) , Periadnadi²), Nurmiati²)

¹ Universitas Perintis Indonesia, Jl. Adinegoro KM 17, Padang 25473, Indonesia

² Universitas Andalas, Jl. Limau Manis, Pauh Padang 25163, Indonesia

*) e-mail: silmiyusrirahmadani@sci.unand.ac.id

Diterima 16 Desember 2020, Revisi akhir 17 Mei 2021, Disetujui 27 Mei 2021

ABSTRAK. Kakao (*Theobroma cacao*, L.) merupakan salah satu komoditi utama dan andalan ekspor non migas Indonesia. TSH 858, Scavina dan ICS 60 merupakan tiga varietas kakao yang unggul dan sedang diusahakan perkembangannya di Sumatera Barat. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi fermentasi mikrobiota indigenous pulp dari tiga varietas kakao TSH 858, ICS 60 dan Scavina sebagai starter untuk fermentasi biji kakao. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yang dianalisis secara statistik dengan uji Rancangan Acak Lengkap dan nilai organoleptik dianalisis secara statistik dengan Uji Jenjang Bertanda Wilcoxon. Perlakuan yang digunakan adalah (A) tanpa starter (kontrol); (B) penambahan starter varietas TSH 858; (C) penambahan starter varietas Scavina; (D) penambahan starter varietas ICS 60. Setelah 12 hari fermentasi, produk fermentasi menunjukkan hasil bahwa jumlah mikrobiota indigenous perlakuan A ($4,3 \times 10^{10}$ cfu/ml), B ($2,2 \times 10^{14}$ cfu/ml), C ($2,97 \times 10^{14}$ cfu/ml) dan D ($5,1 \times 10^{14}$ cfu/ml). Perubahan nilai pH pulp kakao dari awal sampai akhir fermentasi pada perlakuan A (3,56-4,07), B (3,55-3,90), C (3,64-4,05), dan D (3,56-4,08). Pengurangan kadar gula untuk perlakuan A (5,6%), B (5,7 %), C (6,1%), dan D (5,3%). Intensitas fermentasi terbaik pada perlakuan dengan penambahan starter (B,C,dan D) terjadi pada hari ke-3, sedangkan pada perlakuan tanpa starter (A) terjadi pada hari ke-6. Kadar Alkohol Perlakuan A (2,5%), B (1,3 %), C (2,5%), dan D (1,3%). Nilai rata-rata kesukaan terhadap aroma biji tertinggi (3,2;suka) adalah pada perlakuan D.

Kata kunci: fermentasi, kakao, mikrobiota indigenous, starter

ABSTRACT. Cocoa (*Theobroma cacao*, L) is one of Indonesia's main and essential non-oil commodity export. In West Sumatera, TSH 858, Scavina, and ICS 60 are three superior cocoa varieties that attempt for their cultivation. This study aimed to observe the potential fermentative of indigenous microbiota from pulp three cocoa varieties TSH 858, Scavina and ICS 60 as a starter in cocoa bean fermentation. One way anova used for data analyzed such as pH, alcohol, reducing glucose value, and fermentative intensity. Meanwhile, the Wilcoxon signed test was used for organoleptic analysis. Variable of this study was fermentation without starter (A), Fermentation with starter of TSH 858 variety (B), fermentation with starter of Scavina variety (C), and fermentation with starter of ICS variety (D). After 12 days fermentation, the fermentation product showed which total indigenous microbiota for A were ($4,3 \times 10^{10}$ cfu/ml), B ($2,2 \times 10^{14}$ cfu/ml, C ($2,97 \times 10^{14}$ cfu/ml) and D ($5,1 \times 10^{14}$ cfu/ml). Alteration in pH value for A was (3,56-4,07), B (3,55-3,90), C (3,64-4,05), and D (3,56-4,08). Meanwhile, the reducing glucose value for A was (5,6%), B (5,7 %), C (6,1%), and D (5,3%). The best fermentation intensity comes from treatment with addition starters (A, B, and C) that occurred on the 3rd day, while without starter occurred on the day 6th. Alcohol value from all treatment were A (2,5%), B (1,3 %), C (2,5%), and D (1,3%). The highest averages preference for cocoa bean aroma was D (3,2; likes).

Keywords: cacao, fermentation, indigenous microbiota, starter

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara terbesar ketiga dunia sebagai pengeksport biji kakao pada tahun 2010, dengan produksi biji kering 550.000 ton setelah Pantai Gading sebanyak 1.242.000 ton dan Ghana dengan produksi 662.000 ton (ICCO, 2011; Bantacut, 2016). Dari 1.683.868 ha areal kakao Indonesia, sekitar 98% adalah kakao rakyat. Selain itu, Indonesia terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun dalam mengeksport kakao. Tahun 2017, kakao mampu menyumbang devisa bagi perekonomian nasional sebesar 13,18% dari total ekspor hasil perkebunan nasional dari lima komoditas hasil perkebunan (kelapa, karet, kelapa sawit, kopi dan kakao) (Ditjenbun, 2018).

Sumatera Barat merupakan salah satu daerah sentra produksi kakao (*Theobroma cacao* L.) di kawasan barat Indonesia. Perkembangan luas areal pertanaman kakao di Sumatera Barat cukup pesat. Namun, kondisi usaha tani kakao di Sumatera Barat belum memberikan hasil yang optimal. Hal ini terlihat dari produktivitas kakao dan harga jual yang masih rendah. Varietas kakao di Indonesia sangat banyak, tiga diantaranya adalah varietas TSH 858, Scavina dan ICS 60. Ketiga varietas tersebut merupakan varietas unggul yang sedang diusahakan perkembangannya di Sumatera Barat, yang memiliki keunggulan produktivitas tinggi dan tahan terhadap penyakit busuk buah oleh jamur *Phytophthora palmivora*. Oleh sebab itu, ketiga varietas ini cocok untuk dikembangkan di Sumatera Barat yang memiliki kelembaban yang tinggi.

Rendahnya produktivitas dan mutu kakao Indonesia terutama disebabkan oleh beberapa hal, antara lain karena biji kakao yang diperdagangkan oleh petani pada umumnya tidak difermentasi terlebih dahulu. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa petani kakao rakyat memiliki kecenderungan untuk mengolah dan menjual tanpa fermentasi dan tidak memerhatikan kualitas (Davit, *et al.*, 2013). Untuk menghasilkan biji kakao yang berkualitas dan memiliki nilai ekonomi yang lebih tinggi, tidak hanya tergantung pada varietas dan lingkungan pertumbuhan tanaman kakao saja, tetapi yang terutama adalah bagaimana para petani kakao mengolah biji kakao tersebut untuk menjaga mutu yang lebih baik. Salah satu faktor yang sangat menentukan mutu biji kakao adalah difermentasi atau tidaknya biji kakao tersebut (Manalu, 2018). Fermentasi merupakan kunci penting untuk membentuk cita rasa pada cokelat. Dengan demikian, pengetahuan mengenai pentingnya

fermentasi pada biji kakao perlu disebarluaskan pada masyarakat khususnya petani kakao.

Fermentasi biji kakao merupakan fermentasi tradisional yang melibatkan ragi, bakteri asam laktat yang umumnya *Lactobacillus sp.* dan bakteri asam asetat yaitu *Acetobacter sp.* Selain keberadaan mikrobiota *indigenous*, pada pulp kakao juga mengandung nutrisi yang dibutuhkan untuk metabolismenya. Pulp kakao diketahui mengandung 82-87% air, 10-15% gula (60% sukrosa dan 39% campuran dari fruktosa dan glukosa), 2-3% pentosa, 1-3% asam sitrat dan 1-5% pektin. Selain itu, adanya kandungan protein, asam amino, beberapa vitamin dan mineral menjadikan pulp kakao sebagai media yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroba (Puerari *et al.*, 2012).

Untuk itu perlu diketahui sejauh mana kemampuan mikrobiota *indigenous* pulp kakao, sehingga akan memberi jawaban akan pentingnya keberadaan mikroorganisme ini dalam proses fermentasi pulp kakao yang seterusnya juga akan menentukan mutu bagi cokelat yang dihasilkan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui potensi fermentasi mikrobiota *indigenous* pada pulp tiga varietas kakao yaitu TSH 858, ICS 60 dan Scavina sebagai starter untuk fermentasi biji kakao.

2. METODE PENELITIAN

Buah kakao yang dijadikan sebagai starter dari varietas induk (TSH 858, Scavina dan ICS 60) didapatkan dari salah satu perkebunan kakao di Kabupaten Agam, Sumatera Barat. Buah kakao yang digunakan adalah buah yang matang sempurna yang dilihat dari warna kulit buah, sedangkan buah kakao yang dijadikan sebagai sampel media fermentasi merupakan buah kakao dari beberapa perkebunan petani di Sumatera Barat. Medium yang digunakan Glukosa Trypton Agar Kalsium Karbonat (GTA+CaCO₃) penambahan CaCO₃ sebanyak 15 gram/L berguna untuk mengetahui keberadaan mikroba penghasil asam (Balogu & Onyeagba, 2017).

Analisis Pendahuluan Starter Cair Pulp Kakao

Starter didapatkan dari air perasan pulp masing-masing varietas induk (TSH 858, Scavina dan ICS 60) yang diinkubasi selama 3 hari untuk mengaktifkan mikrobiota *indigenous* yang terdapat pada pulp agar cepat beradaptasi pada saat ditambahkan pada media fermentasi. Sebelum digunakan, dilakukan analisis total mikrobiota *indigenous*, nilai pH, dan kadar gula. Pengukuran nilai pH digunakan pH meter digital Corning

Pinnacle 530, dan pengukuran kadar gula dengan refraktrometer. Sedangkan untuk penghitungan total mikrobiota *indigenus* dilakukan dengan metoda plate count (Apriyanto *et al.*, 2016).

Perlakuan Pendahuluan Fermentasi

Sebelum dilakukan fermentasi terlebih dahulu dilakukan perlakuan pendahuluan terhadap total mikrobiota *indigenus*, nilai pH, dan kadar gula pada media fermentasi. Selanjutnya pulp kakao media fermentasi yang sudah diaduk dipersiapkan untuk setiap perlakuan yaitu dibagi menjadi 4 bagian. Lalu ditambahkan 5% starter varietas induk (TSH 858, Scavina dan ICS 60) ke media fermentasi sesuai dengan perlakuan. Sementara itu, disiapkan 4 seri gelas untuk pencuplikan pada 0, 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 hari fermentasi. Kemudian pulp kakao setiap perlakuan tadi dimasukkan ke masing-masing seri gelas tersebut secara aseptik. Kemudian diaduk supaya proses fermentasi berlangsung merata (Putra *et al.*, 2008)

Pemantauan Proses Fermentasi

Pemantauan Proses Fermentasi dilakukan pada 0, 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 hari fermentasi berupa total mikroba *indigenus*, pH, kadar gula dan intensitas fermentasi. Penghitungan total mikrobiota *indigenus*nya dilakukan dengan metoda plate count. Pengukuran nilai pH digunakan pH meter digital Corning Pinnacle 530 yang sebelumnya sudah distandarkan dengan larutan buffer (pH 4 dan pH 7). Pengukuran kadar gula dengan menggunakan refraktrometer. Pengukuran intensitas fermentasi dilakukan dengan pengukuran berat sampel dengan tabung fermentasi secara anaerob setiap 24 jam selama dua belas hari fermentasi. Pengurangan berat sampel menunjukkan CO₂ yang dibebaskan selama fermentasi. Berat jenis alkohol dapat dihitung dengan menggunakan rumus sabagai berikut:

$$BJ = \frac{B_1 - B_0}{B_2 - B_0}$$

Keterangan :

- BJ = Bobot jenis alkohol
- B0 = Bobot picnometer kosong
- B1 = Bobot picnometer berisi destilat
- B2 = Bobot picnometer berisi aquadest

Selanjutnya kadar alkohol dapat diketahui dengan mencocokkan dengan daftar bobot jenis kadar alkohol (etanol) dalam air (Sabahannur, 2018).

Analisis Proses Akhir Fermentasi dan Biji kakao Hasil Fermentasi

Analisis kadar alkohol dilakukan dengan alat piknometer (Sabahannur, 2018). Pengamatan bentuk permukaan dan warna biji dilakukan pada pencuplikan terakhir terhadap produk dari semua perlakuan yang diujikan setelah penjemuran. Penilaian organoleptik aroma dilakukan setelah penjemuran dan pengovenan biji pada suhu 50°C. Penilaian sampel dilakukan pada 15 orang panelis terlatih yang mengetahui aroma khas kakao.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Starter Cair Pulp Kakao

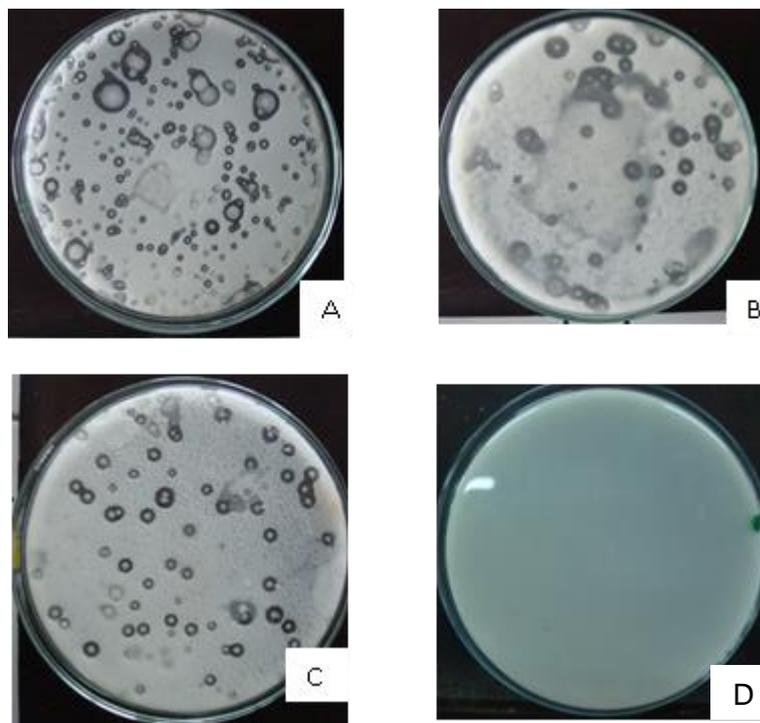
Starter yang digunakan adalah cairan pulp kakao dari varietas TSH 858, Scavina, dan ICS 60 yang telah diinkubasi selama 3 hari. Inkubasi ini bertujuan untuk mengaktifkan mikrobiota *indigenus* yang terdapat pada pulp supaya cepat beradaptasi pada saat ditambahkan pada media fermentasi. Mikrobiota yang berperan di dalam fermentasi biji kakao ini adalah ragi, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Fermentasi biji kakao merupakan tahapan penting dalam menghasilkan cokelat yang berkualitas baik (Sandhya *et al.*, 2016). Mutu bubuk cokelat yang baik harus memenuhi persyaratan Standar Nasional Indonesia (SNI), seperti halnya warna dan citarasa bubuk yang khas. Bentuk dan ukuran partikel yang lembut dan jika diseduh dengan air mendidih hampir semua bagian bubuk berada dalam larutan (Kurnia *et al.*, 2012). Peran dari mikroba berupa ragi, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat yang saling berintegrasi akan berpotensi menghasilkan kualitas cokelat yang baik tersebut. Proses fermentasi kakao terbagi 3 tahapan yaitu: (1) tahap anaerobik mengkonversi gula menjadi alkohol dalam kondisi rendah oksigen dan pH dibawah 4, (2) tahap *Lactobacillus lactis* yang keberadaannya mulai dari awal fermentasi, tetapi hanya menjadi dominan antara 48 dan 96 jam. *Lactobacillus lactis* mengkonversi gula dan sebagian asam organik menjadi asam laktat, (3) tahap bakteri asam asetat, keberadaan bakteri asam asetat juga terjadi selama fermentasi, tetapi peningkatan aerasi. Bakteri asam asetat berperan dalam mengkonversi alkohol menjadi asam asetat (Albertini *et al.*, 2015).

Selama waktu inkubasi, starter cair tersebut memperlihatkan kerja dari mikrobiota yang terkandung pada cairan pulp tersebut yaitu terbentuknya gelembung gas yang bergerak ke atas permukaan starter. Gelembung gas dan aroma tersebut mengindikasikan bahwa ragi yang terdapat pada pulp kakao tersebut sudah mulai aktif dalam

merombak gula yang terdapat pada cairan pulp. Dalam fermentasi kakao ragi bertugas mengubah pulp menjadi etanol dengan mendegradasikan enzim untuk menghancurkan pulp. Dalam proses perombakan tersebut tampak adanya gelembung gas yang merupakan hasil degradasi cairan pulp

dibagian bawah media fermentasi (Crafack *et al.*, 2014).

Berikut adalah gambaran jumlah koloni mikrobiota *indigenus* masing-masing starter cair pulp kakao setelah inkubasi 3 hari dengan tingkat pengenceran 10^{-11} .



Gambar 1. Gambaran jumlah koloni mikrobiota *indigenus* kakao setelah inkubasi 3 hari; A (varietas TSH 858), B (varietas Scavina), C (varietas ICS 60); D (kontrol media GTA+CaCO₃)

Pada gambar di atas, koloni ragi terlihat berwarna putih buram, permukaannya timbul dan tidak membentuk zona bening, sedangkan bakteri pembentuk asam akan terlihat membentuk zona bening pada media GTA+CaCO₃. Secara visual dapat dilihat pada media GTA+CaCO₃ bakteri pembentuk asam pada ketiga starter membentuk daerah halo yang cukup luas. Diameter daerah halo terbesar yang terbentuk pada perlakuan penambahan starter varietas TSH 858, varietas Scavina dan varietas ICS 60 secara berturut-turut adalah 14 mm, 16 mm dan 8 mm. Hal ini mengindikasikan bahwa kemampuan bakteri tersebut cukup besar untuk menghasilkan asam. Rahmadani *et al.*, (2020) menyatakan adanya bakteri *indigenus* pemfermentasi kakao dibuktikan terbentuknya daerah halo (*halo zone*) dalam medium GTA dengan penambahan kalsium karbonat (CaCO₃) sebagai hasil dari hidrolisa bakteri tersebut terhadap asam. Kalsium karbonat

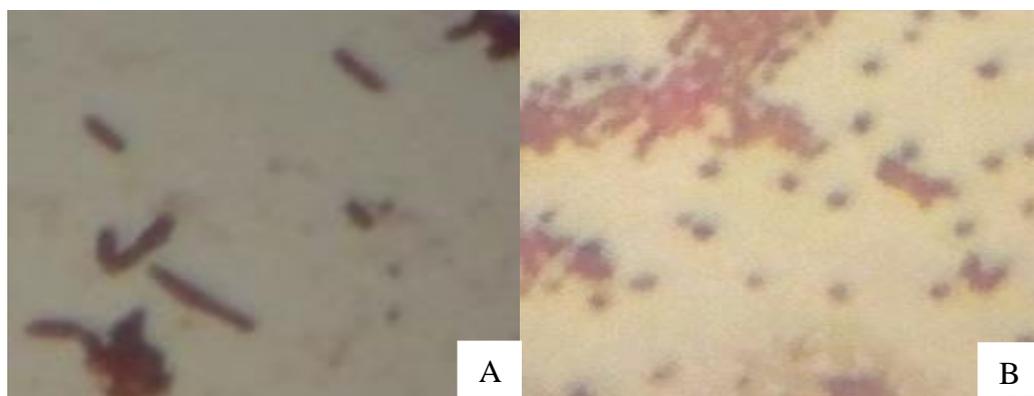
berfungsi dalam menetralsir kapur yang ada pada daerah koloni sehingga terbentuklah daerah halo.

Pada pengamatan makroskopis di atas hanya bisa membedakan antara ragi dan bakteri pembentuk asam. Sedangkan untuk membedakan bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat harus dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis menggunakan metode perwarnaan Gram. Untuk lebih jelasnya membedakan bentuk dan warna sel bakteri tersebut setelah pewarnaan gram dapat dilihat pada Gambar 2.

Pada pengamatan mikroskopis diperoleh bakteri Gram positif mengindikasikan bakteri asam laktat, sedangkan bakteri Gram negatif mengindikasikan bakteri asam asetat. Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif yang memiliki warna sel ungu dengan bentuk sel pada umumnya basil. Camu *et al.* (2007) melaporkan bahwa sebanyak 240 isolat dari 382 isolat bakteri yang diisolasi pada fermentasi kakao spontan merupakan golongan bakteri asam asetat dengan

ciri fenotip bakteri gram negatif dan morfologi sel berbentuk batang atau bulat. Sedangkan 132 isolat dari 170 yang diisolasi termasuk pada golongan

bakteri asam laktat dengan ciri-ciri bakteri gram positif, morfologi sel berbentuk batang atau kokus.



Gambar 2. Mikroskopis mikroflora *indigenus* pada pulp kakao; A (Bakteri asam laktat); B (Bakteri asam asetat)

Tabel 1. Rata-rata jumlah mikrobiota *indigenus*, kadar gula, dan pH starter cair pulp kakao setelah inkubasi 3 hari.

No	Varietas Kakao	Mikrobiota <i>Indigenus</i> (10^{11} Cfu/mL)		Kadar Gula total (%)	pH
		Bakteri Pembentuk Asam	Ragi		
1	TSH 858	159	2	3,3	3,07
2	Scavina	85	36	3,2	3,60
3	ICS 60	147	15	2,8	3,19

Bakteri asam laktat akan merombak gula yang terdapat pada pulp kakao menjadi asam laktat yang nantinya akan berdifusi ke dalam biji kakao sehingga mempengaruhi nilai pH pada pulp dan biji kakao, sedangkan bakteri asam asetat yang merupakan bakteri Gram negatif memiliki warna sel merah dan memiliki bentuk sel pada umumnya kokus. Bakteri asam asetat ini akan merombak gula menjadi asam asetat dan asam organik lain yang juga akan berdifusi ke dalam biji. Selama proses fermentasi kakao, bakteri asam asetat melakukan biokonversi etanol yang diproduksi ragi menjadi asam asetat (Camu *et al.*, 2008). Rata-rata jumlah mikrobiota *indigenus*, kadar gula, dan pH starter cair pulp kakao setelah inkubasi 3 hari dapat dilihat pada Tabel 1. Dasar dilakukan inkubasi 3 hari ini adalah untuk mengoptimalkan jumlah mikrobiota *indigenus* yang terdapat pada starter cair pulp kakao, sehingga cepat beradaptasi saat ditambahkan ke media fermentasi (Schwan & Wheals, 2004).

Dari tabel di atas dapat dilihat jumlah mikrobiota masing-masing starter cair pulp kakao berbeda-beda. Pada starter cair pulp dari varietas TSH 858 terdapat 159×10^{11} cfu/mL. Bakteri pembentuk asam dan 2×10^{11} cfu/mL ragi. Pada starter cair pulp dari varietas Scavina terdapat 85×10^{11} cfu/mL bakteri pembentuk asam dan

36×10^{11} cfu/mL ragi, dan starter cair pulp dari varietas ICS 60 terdapat 147×10^{11} cfu/mL bakteri pembentuk asam dan 15×10^{11} cfu/mL ragi. Perhitungan total mikrobiota *indigenus* pada starter cair pulp tiga varietas kakao diatas bertujuan melihat dominasi mikrobiota tertentu pada starter cair tersebut setelah inkubasi 3 hari. Dari Tabel 1 di atas, dapat diketahui jumlah bakteri pembentuk asam lebih mendominasi dari pada ragi. Hal ini nantinya akan menentukan potensi dari mikrobiota *indigenus* yang terdapat pada varietas kakao yang dijadikan sebagai starter. Hal ini disebabkan oleh jumlah populasi yang besar mengindikasikan kemampuan masing-masing starter untuk berkembang dengan baik di dalam media fermentasi. Tahap awal dari fermentasi kakao akan didominasi oleh mikrobiota aerobik mesofilik seperti ragi dan bakteri asam asetat dengan total $1,5 \times 10^6$ cfu/g dan $9,7 \times 10^5$ cfu/g, kemudian disusul oleh bakteri asam laktat (Galves *et al.*, 2007).

Berdasarkan Tabel 1, varietas TSH 858 memiliki jumlah bakteri pembentuk asam tertinggi diikuti oleh varietas ICS 60 dan Scavina. Disisi lain, TSH 858 memiliki jumlah ragi paling sedikit dibandingkan dua varietas lainnya. Keberadaan mikrobiota *indigenus* tergantung pada keberadaan senyawa organik pada pulp kakao. Beberapa jenis

kakao dari klon nasional memiliki kadar senyawa organik yang bervariasi, varietas TSH 858 mengandung kadar lemak sebesar 56% sedangkan pada varietas scavina mengandung 49,6% (Iswanto *et al.*, 2001). Ragi, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat merupakan mikrobiota utama dalam proses keberhasilan fermentasi biji kakao. Mikrobiota tersebut membutuhkan nutrisi yang berasal dari senyawa organik pulp kakao (Lima *et al.*, 2011).

Karakteristik Media Fermentasi

Media fermentasi yang digunakan dalam fermentasi kakao ini adalah bagian pulp dan biji kakao yang diperoleh dari beberapa perkebunan petani kakao di Kabupaten 50 Kota, Sumatera Barat. Buah kakao yang dipilih adalah buah yang sudah matang, yang siap untuk dilakukan proses pasca panen. Karakteristik media fermentasi yang digunakan ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata jumlah mikrobiota *indigenus*, kadar gula, dan pH media pulp kakao mentah yang digunakan sebagai media fermentasi

No	Karakteristik Media Fermentasi	Hasil Pengukuran
1	Jumlah bakteri pembentuk asam	39×10^9 (cfu/ml)
2	Jumlah ragi	2×10^9 (cfu/ml)
3	Kadar gula total	8,1 %
4	pH	3,56

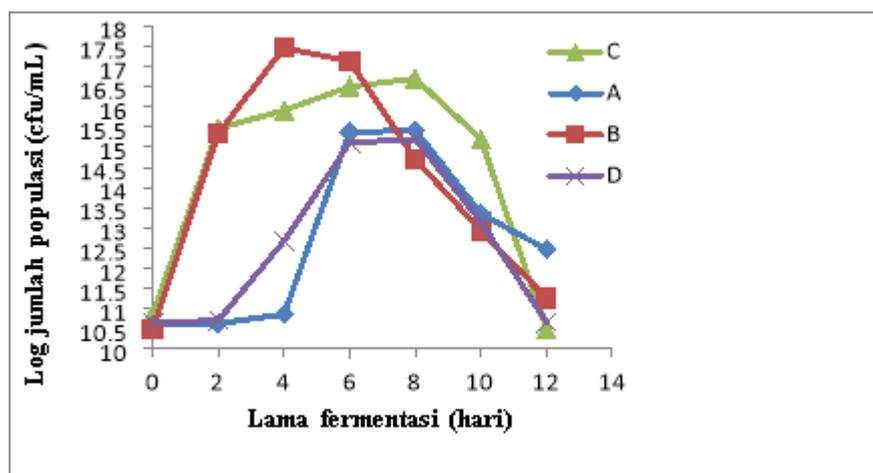
Dengan kadar gula 8,1% dan pH 3,56 pada media fermentasi akan mendukung perkembangan mikrobiota *indigenus* pulp kakao selama proses fermentasi berlangsung. Keasaman awal pulp dengan pH 3,5 - 4,2 mendukung kolonisasi ragi yang mampu memanfaatkan karbohidrat pulp pada kondisi aerobik dan anaerobik (Schwan & Wheals, 2004).

Kadar gula tinggi serta kadar asam yang rendah pada awal fermentasi ditambah adanya oksigen merupakan medium pertumbuhan ragi yang sangat baik. Ragi merupakan perintis untuk merombak beberapa senyawa pada pulp terutama

senyawa gula menjadi etanol dan CO₂ yang berlangsung selama 2 hari pertama. Gula didalam pulp merupakan substrat yang dapat dirombak menjadi etanol, sedangkan inokulasi ragi meningkatkan jumlah mikroba yang bekerja merombak gula menjadi etanol. Peningkatan proses fermentasi terjadi salah satunya akibat inokulasi mikroorganisme (Apriyanto *et al.*, 2016).

Total Mikrobiota *Indigenus* Selama Fermentasi

Perkembangan total mikrobiota *indigenus* selama 12 hari fermentasi dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Profil perkembangan total mikrobiota *indigenus* setelah penambahan masing-masing starter yang berasal dari 3 varietas kakao berbeda; (A) tanpa starter (kontrol); (B) penambahan starter varietas TSH 858; (C) penambahan starter varietas Scavina; (D) penambahan starter varietas ICS 60.

Pada Gambar 3 menunjukkan total mikrobiota dari masing-masing perlakuan

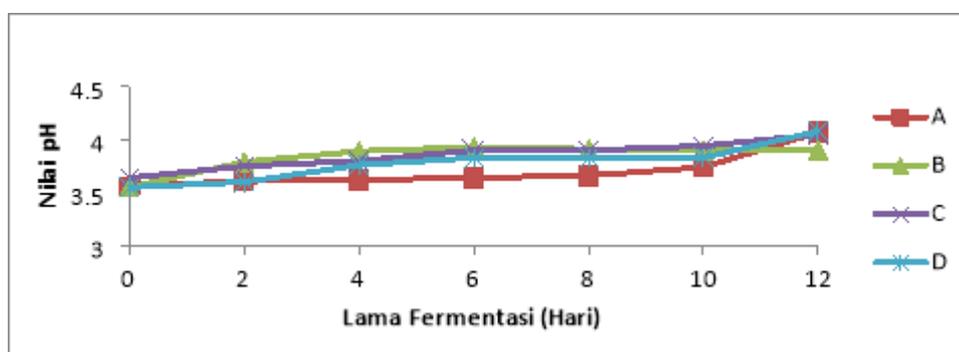
memperlihatkan jumlah yang berbeda. Pada awal fermentasi terlihat peningkatan total mikrobiota

indigenus pada masing-masing perlakuan, setelah mencapai puncak total mikrobiotanya terus mengalami penurunan hingga akhir fermentasi. Jumlah dan jenis mikroorganisme yang terdapat pada fermentasi biji kakao bervariasi, tergantung pada waktu fermentasi. Perubahan jumlah total mikrobiota selama fermentasi kakao menggambarkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas dan kondisi pertumbuhan masing-masing mikroba yang berperan pada setiap perlakuan yang telah diujikan. Permulaan proses fermentasi diawali dengan aktifitas ragi. Tumpukan biji mengandung kadar gula yang tinggi, pH dan oksigen rendah sehingga merupakan media yang cocok bagi pertumbuhan ragi. Ini terbukti pada saat pengamatan awal fermentasi banyak terdapat gelembung gas yang bergerak ke atas permukaan gelas fermentasi. Hal tersebut terjadi akibat tekanan yang dihasilkan oleh CO₂ yang terbentuk karena perombakan gula oleh ragi. Selanjutnya pada hari kedua proses fermentasi terjadi pemecahan alkohol menjadi asam asetat yang dipengaruhi oleh aktivitas bakteri asam asetat. Kresnowati *et al.* (2013) menyatakan mikrobiota yang mendominasi dalam proses fermentasi biji kakao adalah ragi, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat. Ragi dan asam laktat mendominasi 2-3 hari pertama fermentasi, dilanjutkan dengan bakteri asam asetat yang mendominasi pada hari ke 4-5. Konsentrasi ragi meningkat dan mencapai maksimum pada hari ke 3-4 fermentasi (Schwan & Wheals, 2004). Tidak ada perbedaan signifikan yang diamati dalam dinamika populasi ragi antara perlakuan tanpa starter dengan penambahan starter bakteri asam laktat. Dengan kata lain, perlakuan penambahan starter BAL tidak mengubah secara signifikan dinamika konsentrasi ragi diseluruh perlakuan fermentasi (Kresnowati, *et al.*, 2013).

Gula di dalam pulp merupakan substrat yang dapat dirombak menjadi etanol, sedangkan inokulasi ragi meningkatkan jumlah mikrobial yang bekerja merombak gula menjadi etanol. Peningkatan proses fermentasi yang terjadi akibat inokulasi mikroorganisme banyak dilaporkan pada beberapa penelitian. Apriyanto *et al.*, (2017) menyatakan pada penelitiannya penambahan biakan *Saccharomyces cerevisiae* dan beberapa biakan bakteri lain dapat meningkatkan kinerja fermentasi biji kakao. Setelah 24 jam fermentasi populasi ragi mengalami penurunan hal ini disebabkan oleh peningkatan jumlah etanol dan mulai membaiknya aerasi pada tumpukan massa biji, selanjutnya peran ragi dilanjutkan bakteri karena kondisi lingkungan fermentasi mulai ideal untuk pertumbuhan bakteri dan kandungan gula pulp masih tersedia meskipun dalam jumlah kecil.

Nilai pH Pulp Selama Fermentasi

Kisaran pH pada fermentasi pulp kakao selama fermentasi 12 hari adalah 3,55-4,08. Kisaran nilai pH yang didapatkan tersebut merupakan kondisi lingkungan yang optimal untuk proses enzimatik. Keasaman yang tinggi (pH 3,5 – 4,5) diperlukan untuk memberikan kondisi lingkungan yang optimal bagi kelangsungan proses enzimatik pembentukan komponen prekursor cita rasa (Putra, *et al.*, 2008). Di sisi lain, keasaman yang berlebihan akan menimbulkan cita rasa asam yang tidak enak (*acidic off-flavor*). Suhu fermentasi dan pH akan mengaktifkan enzim-enzim yang diperlukan untuk pembentukan karakteristik coklat yaitu *flavour*, aroma dan warna setelah disangrai (Laxiana & Sugiarto, 2010). Perkembangan nilai pH pulp kakao setiap perlakuan selama 12 hari fermentasi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Profil perkembangan nilai pH setelah penambahan masing-masing starter yang berasal dari 3 varietas kakao berbeda; A) tanpa starter (kontrol); B) penambahan starter varietas TSH 858; C) penambahan starter varietas Scavina; D) penambahan starter varietas ICS 60

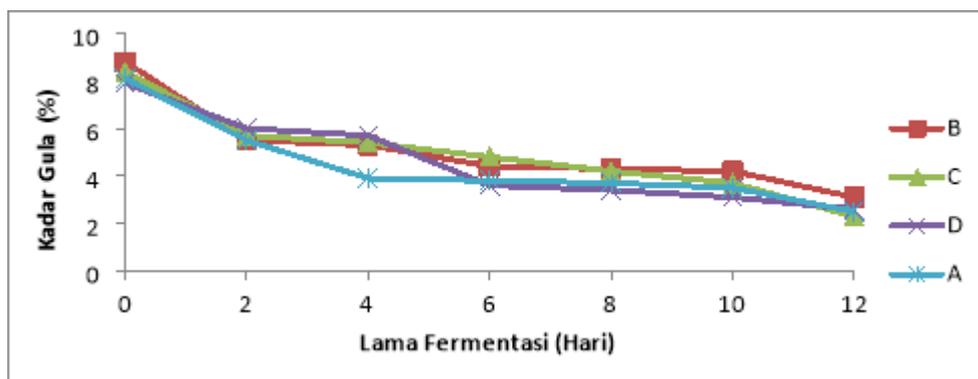
Pada awal fermentasi semua perlakuan menunjukkan nilai pH yang rendah yaitu berkisar antara 3,55 – 3,64. Hal tersebut akan memberi lingkungan yang cocok untuk ragi dalam merombak gula. Selain itu pada Gambar 4 juga dapat dilihat perkembangan nilai pH pulp kakao umumnya mengalami peningkatan sejak awal fermentasi. Peningkatan nilai pH pada fermentasi kakao disebabkan oleh adanya peresapan asam asetat ke dalam biji dari pulp kakao melalui kulit ari biji. Hal ini mengakibatkan keasaman pada biji meningkat, sedangkan pada pulp keasamannya menurun. Semakin banyak asam asetat yang berdifusi ke dalam biji menyebabkan pH pulp terus mengalami peningkatan.

Selama fermentasi terjadi perubahan nilai pH pada pulp kakao secara perlahan-lahan dan akan meningkat hingga fermentasi sempurna. Perubahan nilai pH pulp kakao dari awal sampai akhir fermentasi pada perlakuan A (3,56-4,07), B (3,55-3,90), C (3,64-4,05), dan D (3,56-4,08). Setelah dilakukan uji statistik diperoleh perubahan nilai pH pada masing-masing perlakuan menunjukkan hasil

tidak berbeda nyata dengan nilai $p > 0,05$. Peningkatan nilai pH pada pulp selama fermentasi disebabkan karena alkohol dan asam organik yang telah dihasilkan dari proses degradasi gula pada pulp berdifusi ke dalam biji untuk menghasilkan biji kakao yang berkualitas. Produksi asam dari degradasi pulp sangat penting dalam fermentasi, dengan terdifusinya asam ke dalam biji menjadi awal reaksi biokimia dalam biji, yang akan menghasilkan biji kakao fermentasi yang baik (Apriyanto *et al.*, 2017).

Kadar Gula selama Fermentasi

Gula merupakan senyawa yang dirombak oleh mikrobiota selama proses fermentasi kakao untuk menghasilkan senyawa lain seperti etanol dan asam organik untuk meningkatkan kualitas biji kakao. Kadar gula total selama fermentasi perlu diketahui untuk memperkirakan konsentrasi gula reduksi yang dapat terbentuk. Perubahan kandungan gula pada pulp kakao setiap perlakuan selama 12 hari fermentasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Perubahan kandungan gula reduksi pada pulp setelah penambahan masing-masing starter yang berasal dari 3 varietas kakao berbeda; A) tanpa starter (kontrol); B) penambahan starter varietas TSH 858; C) penambahan starter varietas Scavina; D) penambahan starter varietas ICS 60

Berdasarkan Gambar 5 tersebut dapat dilihat kandungan kadar gula reduksi pada pulp selama proses fermentasi pada masing-masing perlakuan. Hal ini disebabkan oleh penguraian gula menjadi alkohol oleh mikrobiota *indigenous* yang terdapat pada pulp, yang terjadi saat fermentasi. Pengurangan kadar gula terbesar terdapat pada perlakuan penambahan starter Scavina yaitu sebanyak 6,1%, kemudian diikuti oleh perlakuan penambahan starter TSH 858 terjadi penurunan kadar gula sebanyak 5,7%. Selanjutnya, diikuti oleh perlakuan tanpa starter yaitu 5,6% dan yang terakhir perlakuan penambahan starter ICS 60 yaitu 5,3%. Setelah dilakukan uji statistik terhadap penurunan

kadar gula reduksi pada pulp selama proses fermentasi pada masing-masing perlakuan menunjukkan hasil tidak berbeda nyata.

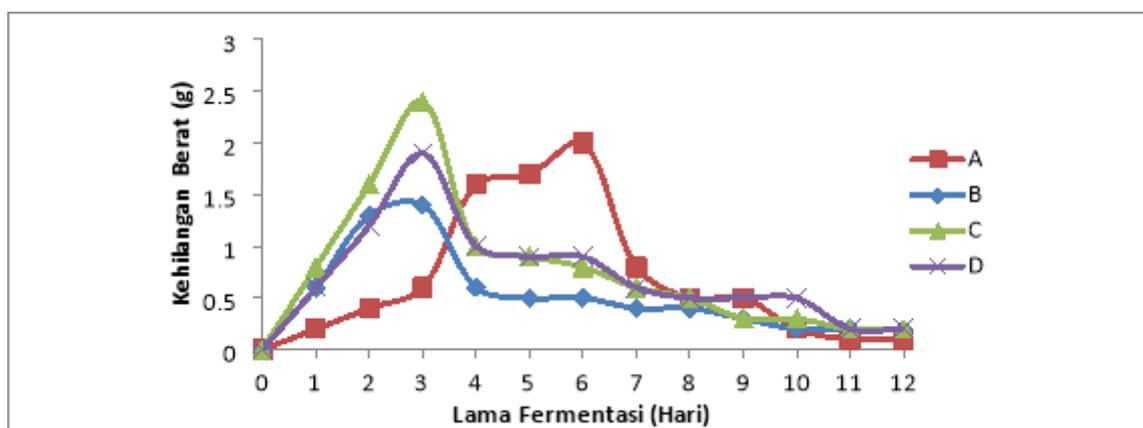
Pulp kakao kaya akan kandungan gula yang berfungsi sebagai substrat untuk mikroba pemfermentasi. Kandungan gula pada pulp terdiri dari glukosa, fruktosa dan sukrosa; dan konsentrasi awalnya (sebelum fermentasi) berturut-turut 20,3 mg glukosa/g, 22,2 mg fruktosa/g, dan 6,1 mg sukrosa/g (Kresnowati *et al.*, 2013). Gula reduksi adalah senyawa karbonil prekursor aroma dalam biji kakao fermentasi, yang terutama dihasilkan dari hidrolisis sukrosa oleh enzim invertase. Gula reduksi merupakan hasil perombakan pektin, pati,

dan sukrosa yang terkandung dalam pulp. Gula reduksi selain berfungsi sebagai bahan mentah pembentukan etanol juga berfungsi sebagai senyawa calon rasa dalam biji kakao (Afoakwa *et al.*, 2013). Gula yang terdapat dalam keping biji kakao sebelum fermentasi sebagian besar berupa sukrosa. Hidrolisis sukrosa akan dimulai pada saat awal fermentasi secara anaerob sampai selesai proses fermentasi. Penurunan konsentrasi gula total selama fermentasi terjadi karena hidrolisis gula sukrosa oleh enzim invertase menjadi glukosa dan fruktosa selama fermentasi. Fruktosa dan glukosa adalah gula pereduksi utama dalam biji kakao (Afoakwa *et al.*, 2013). Kecukupan kandungan gula reduksi dan juga ditambah asam amino dan peptida dalam biji kakao saat akhir fermentasi menjadi prekursor aroma kakao yang saling bereaksi selama proses alkalisasi dan penyangraian (reaksi Maillard)

sehingga menghasilkan aroma biji kakao (Pasau, 2013).

Intensitas Fermentasi

Adanya gelembung gas CO₂ yang bergerak ke permukaan mengindikasikan telah terjadinya proses fermentasi dengan kemampuan mikrobiota *indigenous* yang berbeda-beda pada masing-masing perlakuan. Pengurangan berat tabung fermentasi mengindikasikan banyaknya pelepasan gas CO₂ keluar tabung. Parameter kontrol selama berlangsung proses fermentasi etanol dilakukan dengan cara tidak langsung, yaitu dengan cara mengukur kehilangan berat dalam selang waktu tertentu yang disebabkan oleh pelepasan gas CO₂ (Muin, 2008). Intensitas fermentasi kakao yang telah disajikan dalam bentuk grafik dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Intensitas fermentasi kakao setelah penambahan masing-masing starter yang berasal dari 3 varietas kakao berbeda; A) tanpa starter (kontrol); B) penambahan starter varietas TSH 858; C) penambahan starter varietas Scavina; D) penambahan starter varietas ICS 60

Berdasarkan Gambar 6 dapat dilihat bahwa intensitas fermentasi dengan penambahan starter menunjukkan intensitas fermentasi sudah meningkat pada hari ketiga. Hal ini menunjukkan fermentasi dengan menggunakan starter menunjukkan intensitas fermentasi yang lebih cepat dibandingkan dengan fermentasi tanpa starter. Fenomena ini sesuai dengan Kresnowati *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa fermentasi dengan penambahan starter BAL memiliki indeks fermentasi yang lebih cepat dibandingkan perlakuan standar.

Menurut pemantauan terhadap berat tabung fermentasi pada semua perlakuan, dapat diketahui bahwa setiap perlakuan terjadi kehilangan berat pada setiap harinya. Kehilangan berat pada fermentasi ini disebabkan karena terjadinya penguraian pulp pada kakao oleh mikrobiota

indigenous. Hal ini terlihat bahwa semakin hari pulp yang menyelimuti biji semakin menipis pada setiap perlakuan. Dari hasil penimbangan berat tersebut maka dapat diketahui intensitas fermentasi anaerob setiap hari pada masing-masing perlakuan. Kehilangan berat tersebut menunjukkan besarnya CO₂ yang dibebaskan selama fermentasi berlangsung (Muin, 2008). Laju pertumbuhan bakteri asam asetat akan meningkat setelah tersedianya oksigen dan alkohol hasil perombakan bakteri asam laktat dan ragi. Oleh bakteri asam asetat, alkohol dioksidasi menjadi asam asetat dan asam asetat dioksidasi menjadi CO₂ dan air (Sabahannur, 2018).

Kadar Alkohol

Di akhir fermentasi, dilakukan pengukuran kadar alkohol dengan alat piknometer (Sabahannur,

2018). Nilai kadar alkohol dapat diketahui dengan mencocokkan dengan daftar bobot jenis kadar alkohol (etanol) dalam air. Kadar alkohol dari

masing-masing perlakuan selama 12 hari fermentasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kadar alkohol dari masing-masing perlakuan selama 12 hari fermentasi

No	Perlakuan	% Etanol
1	Tanpa Starter	2,5%
2	Penambahan Starter TSH 858	1,3%
3	Penambahan Starter Scavina	2,5%
4	Penambahan Starter ICS 60	1,3 %

Dari hasil penelitian ini juga dapat dilihat bahwa perlakuan tanpa starter juga menunjukkan kadar etanol yang lebih tinggi dengan penambahan starter TSH dan ICS 60. Hal ini disebabkan karena aktifnya mikrobiota *indigenous* pada media perlakuan tanpa starter dalam menghasilkan etanol. Kresnowati *et al.* (2013) menyatakan hasil penelitiannya tanpa meningkatkan populasi ragi selama fermentasi dengan penambahan starter BAL dapat meningkatkan kadar etanol dalam fermentasi. Kadar etanol yang meningkat menyediakan substrat untuk pertumbuhan bakteri asam asetat yang pada gilirannya meningkatkan tingkat asam asetat.

Peningkatan konsentrasi etanol mungkin diproduksi oleh beberapa asam laktat heterofermentatif strain bakteri, yang pertumbuhannya mungkin dipicu dengan penambahan starter BAL.

Permukaan dan Warna Biji Kakao

Permukaan dan warna biji kakao juga menentukan bagi kualitas biji kakao yang dihasilkan pada proses fermentasi kakao. Pengamatan ini dilakukan setelah biji dikeringkan. Hasil pengamatan yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Permukaan dan warna biji kakao yang dihasilkan pada setiap perlakuan setelah 12 hari fermentasi dan pengeringan

No	Perlakuan	Permukaan Biji	Warna
1	Tanpa starter (kontrol)	Agak Kesat	Coklat bata, tidak mengkilat
2	Penambahan starter TSH 858	Licin sekali	Coklat tua, mengkilat
3	Penambahan starter Scavina	Agak Kesat	Coklat bata, mengkilat
4	Penambahan starter ICS 60	Licin	Coklat tua, tidak mengkilat

Tabel 4 menunjukkan permukaan biji dan warna biji yang dihasilkan pada setiap perlakuan berbeda-beda. Permukaan biji yang paling halus dihasilkan pada perlakuan penambahan starter TSH 858. Begitu juga dengan warna yang dihasilkan penambahan starter TSH 858 memiliki warna yang lebih khas yaitu coklat tua dan mengkilat. Perbedaan permukaan biji dan warna biji pada setiap perlakuan disebabkan karena perubahan senyawa kimia yang terdapat dalam pulp dan biji kakao selama fermentasi dari masing-masing perlakuan juga berbeda-beda. Mikrobial akan melakukan perombakan senyawa gula dalam pulp menjadi asam-asam organik selama fermentasi.

Asam akan berdifusi masuk ke dalam biji dan menginduksi reaksi enzimatik untuk membentuk senyawa calon rasa, aroma, dan warna (Afoakwa *et al.*, 2014). Warna kotiledon biji kakao dapat memprediksi potensi rasa dari coklat yang dihasilkan. Kandungan antosianin pada warna biji kakao direfleksikan sebagai penanda yang baik dalam fermentasi biji kakao Perubahan biokimia selama proses fermentasi dari warna ungu sampai coklat tua menandakan kualitas fermentasi yang baik (Sandhya *et al.*, 2016). Perbedaan permukaan dan warna biji kakao dari masing-masing perlakuan yang sudah difermentasi dan dikeringkan dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Bentuk dan warna biji kakao setelah fermentasi 12 hari dan dikeringkan; A (tanpa starter / kontrol), B (penambahan starter varietas TSH 858), C (penambahan starter varietas Scavina), D (penambahan starter varietas ICS 60).

Berbeda halnya dengan biji kakao yang tidak difermentasi, bijinya berkecambah pada saat penjemuran dengan kata lain biji belum mati. Pada biji kakao yang tidak difermentasi ini hanya dilakukan pencucian biji dan kemudian langsung dijemur sehingga tidak dapat menghentikan perkecambahan pada biji. Sebagai perbandingan biji kakao yang tidak difermentasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Bentuk biji kakao yang tidak difermentasi

Pada Gambar 8 dapat dilihat bahwa biji kakao yang tidak difermentasi tumbuh kecambah pada saat penjemuran. Hal tersebut tidak ditemui pada biji kakao yang mengalami fermentasi sempurna. Karena pada saat fermentasi terjadi difusi alkohol, asam asetat, dan asam laktat ke dalam biji sehingga perkecambahan biji berhenti. De Vuyst & Weckx

(2016) menyatakan bahwa etanol, asam asetat dan panas yang dihasilkan selama proses fermentasi biji kakao akan masuk ke dalam biji melalui testa sehingga menyebabkan terbunuhnya embrio biji kakao.

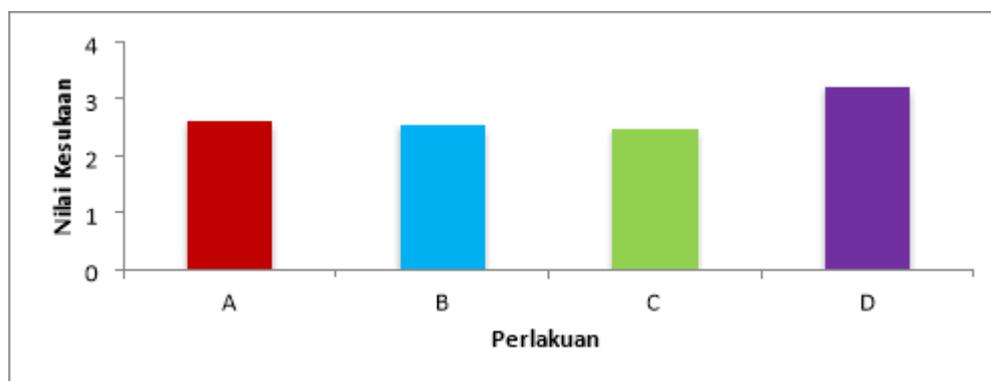
Aroma Biji Kakao

Rata-rata nilai organoleptik terhadap aroma biji kakao setelah pengeringan pada suhu 50 °C dari semua perlakuan berkisar antara 2,46 (agak suka) sampai 3,20 (suka). Aroma biji kakao tertinggi adalah 3,20 (suka) dari perlakuan penambahan starter varietas ICS 60, dan terendah adalah 2,46 (agak suka) dari perlakuan penambahan starter varietas Scavina. Setelah dianalisa secara statistik dengan Uji Jenjang Bertanda Wilcoxon (Wilcoxon's Signed Range Test) menunjukkan hasil tidak berbeda nyata antar setiap perlakuan.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa penambahan starter varietas ICS 60 aromanya lebih disukai dari pada perlakuan lain. Hal ini dipengaruhi oleh proses kimia yang berlangsung pada saat fermentasi *pulp* kakao untuk menghasilkan prekursor aroma. Asam-asam organik yang dihasilkan pada saat fermentasi *pulp* kakao ini akan berdifusi ke dalam biji sebagai prekursor aroma. Prekursor aroma ini akan berkembang menjadi aroma khas coklat setelah proses pengeringan dan

pengovenan pada suhu 50 °C. Berdasarkan aspek kesukaan aroma, perlakuan penambahan starter varietas ICS 60 mengalami fermentasi dan

pengeringan yang lebih baik dibanding perlakuan lain sehingga menghasilkan aroma yang lebih disukai.



Gambar 9. Histogram nilai kesukaan terhadap biji kakao setelah fermentasi dan pengeringan pada setiap perlakuan; A) tanpa starter; B) penambahan starter varietas TSH 858; C) penambahan starter varietas Scavina; D) penambahan starter varietas ICS 60

Tinggi rendahnya tingkat kesukaan pada aroma biji yang dihasilkan dipengaruhi oleh proses fermentasi dan pengeringan biji. Biji kakao hasil fermentasi dan pengeringan yang baik mengandung cukup banyak senyawa calon pembentuk citarasa dan aroma khas cokelat antara lain asam amino dan gula reduksi. Jika dipanaskan pada suhu dan waktu yang cukup, keduanya akan bereaksi membentuk senyawa Maillard yang merupakan reaksi pembentukan rasa dan aroma (Ramlah, 2016). Kesalahan dalam proses fermentasi dapat menyebabkan biji-biji hasil fermentasi kurang beraroma dan memiliki keasaman yang tinggi (Ariyanti, 2012). Banyak faktor yang mempengaruhi aroma kakao, seperti asal biji kakao, proses pascapanen (fermentasi dan pengeringan), pemanggangan, dan penyimpanan (Liu *et al.*, 2017).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil kesimpulan potensi fermentasi mikrobiota *indigenous* pulp dari tiga varietas kakao TSH 858, ICS 60 dan Scavina sebagai starter dalam menfermentasi biji kakao tidak berbeda nyata. Dari hasil uji organoleptik, warna biji terbaik dihasilkan oleh penambahan starter varietas TSH 858. Intensitas fermentasi terbaik pada perlakuan dengan penambahan starter terjadi pada hari ke-3, sedangkan pada perlakuan tanpa starter terjadi pada hari ke-6. Sedangkan nilai rata-rata kesukaan terhadap aroma biji tertinggi (3,2) dalam kategori suka dihasilkan oleh penambahan starter varietas ICS 60.

DAFTAR PUSTAKA

- Afoakwa, E. O., Kongor, J. E., Takrama, J., & Budu, A. S. (2013). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of *pulp* pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 20(4), 1843–1853.
- Afoakwa, E. O., Ofosu-Ansah, E., Takrama, J. F., Budu, A. S., & Mensah-Brown, H. (2014). Changes in chemical quality of cocoa butter during roasting of *pulp* pre-conditioned and fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 21(6), 2221–2227.
- Albertini, B., Schoubben, A., Guarnaccia, D., Pinelli, F., Della Vecchia, M., Ricci, M., Blasi, P. (2015). Effect of Fermentation and Drying on Cocoa Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(45), 9948–9953. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01062>
- Apriyanto, M., Sutardi, S., Harmayani, E., & Supriyanto, S. (2017). Fermentasi Biji Kakao kering Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, *Acetobacter aceti*. *Agritech*, 37(3), 302–311.
- Apriyanto, M., Sutardi, S., Harmayani, E., & Supriyanto, S. (2016). Perbaikan Proses Fermentasi Biji Kakao Non Fermentasi dengan Penambahan Biakan Murni *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, dan *Acetobacter aceti*. 36(4).
- Ariyanti, M. (2012). Karakteristik mutu biji kakao (*Theobroma cacao L*) dengan perlakuan waktu fermentasi berdasar SNI 2323-2008 *Quality Characteristics Of Cocoa Beans (Theobroma cacao L) With Time Fermentation Treatment*

Based on ISO 2323-2008. 34–42.

- Balogu, T. V., & Onyeagba, A. R. (2017). Polyphenol and microbial profile of on-farm cocoa beans fermented with selected microbial consortia. *Applied Food Biotechnology*. <https://doi.org/10.22037/afb.v4i4.16845>
- Bantacut, T. (2016). *review: potensi dan arah pengembangan agroindustri*. 10(1), 1–11.
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02189-06>
- Camu, N., Winter, T. De, Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & Vuyst, L. De. (2008). *Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate*. 2297(May), 2288–2297. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C. E., Petersen, M. A., Saerens, S., Blennow, A., Nielsen, D. S. (2014). Impact of *starter* cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63, 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Davit, J. M., Yusuf, R. P., & Yudari, D. A. S. (2013). Pengaruh Cara Pengolahan Kakao Fermentasi dan Non Fermentasi Terhadap Kualitas , Harga Jual Produk pada Unit Usaha Produktif (UUP) Tunjung Sari, Kabupaten Tabanan. *E-Jurnal Agribisnis Dan Agrowisata*, 2(4), 191–203.
- 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. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2018). Indonesian Plantation statistics. *Directorate General of Indonesian Plantation*, 1(December 2014), 96.
- Kresnowati, M. T. A. P., Suryani, L., & Affifah, M. (2013). Improvement of Cocoa Beans Fermentation by LAB *Starter* Addition. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(4), 274–278. <https://doi.org/10.12720/jomb.2.4.274-278>
- Kurnia, Meizul Zuki, M. S. (2012). Kajian Suhu Dan Lama Waktu Penyangraian Nibs Terhadap Mutu Bubuk Coklat. *Jurnal Agroindustri*, 2(1), 41–52.
- Laxiana, I., & Sugiarto, R. (2010). *Modifikasidengan variasi lama pemeraman buah*. 3(2), 159–165.
- 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. <https://doi.org/10.1080/10408391003799913>
- Liu, M., Liu, J., He, C., Song, H., Liu, Y., Zhang, Y., Su, X. (2017). Characterization and comparison of key aroma-active compounds of cocoa liquors from five different areas. *International Journal of Food Properties*, 20(10), 2396–2408. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1238929>
- Manalu, R. (2018). *Untuk meningkatkan pendapatan petani (Processing of Smallholder Plantations Cocoa Production to Increase Farmers Income)*. 99–111.
- Muin, R. (2008). Studi Kinetika Teknologi Fermentasi Etanol dengan Pendekatan Minimal Residual Substrat. *Jurnal Teknik Kimia*, 15(1), 15–18. Retrieved from <http://jtk.unsri.ac.id/index.php/jtk/article/view/44>
- Pasau, C. (2013). *Pemeraman biji kakao segar sebagai analog Analog Fermentation : Effectiveness Of Acetic Acid Solution As Soaking Agent On Depulped Fresh Cocoa Beans Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak*. 1(2), 113–120.
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. (2012). New cocoa *pulp*-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, 48(2), 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>
- Putra, G., Sutardi, Bambang kartika (2008). Peranan perubahan komponen prekursor aroma dan cita rasa selama fermentasi terhadap cita rasa bubuk kakao yang dihasilkan. *Jurnal agritech Vol. 13 No. 4 hal 13-17*
- Rahmadani, S. Y., Periadnadi, P., & Nurmiati, N. (2020). isolasi dan karakterisasi isolat bakteri *indigenous* pemfermentasi *pulp* tiga varietas kakao (*Theobroma cacao L.*) (Isolation and Characterizations of *Indigenous* Fermenting Bacteria from *Pulp* of Three Cocoa Varieties (*Theobroma cacao, L.*)). *Biopropal Industri*, 11(1), 49. <https://doi.org/10.36974/jbi.v11i1.5685>
- Ramlah, S. (2016). Karakteristik Mutu Dan Citarasa Cokelat Kaya Polifenol. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, 11(1), 23–32. <https://doi.org/10.33104/jihp.v11i1.3553>
- Sabahannur, A. R. (2018). *Pulp biji kakao dengan penambahan sukrosa dan ragi The Increased Levels of Alcohol , Acid and Polyphenol Waste of Cocoa Bean Pulp Liquid by the Addition of Sucrose and Yeast*. 53–61.

Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaik, J., Rao, L. J., Janardhan, P., & Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the *starter* consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>

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. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>