

Acc dibendel

Penguji, 26 Jul 2021

Sony Suwasono

Acc bendel

25/Juli/2021



**PROFIL BIJI KAKAO RAKYAT DI BANYUWANGI  
TERFEMENTASI STARTER *Saccharomyces cerevisiae* DAN  
*Lactobacillus casei* DALAM FERMENTOR TABUNG KAYU**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Zaat Safira Aviva**  
**171710101031**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2021**



**PROFIL BIJI KAKAO RAKYAT DI BANYUWANGI  
TERFEMENTASI STARTER *Saccharomyces cerevisiae* DAN  
*Lactobacillus casei* DALAM FERMENTOR TABUNG KAYU**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)  
dan mencapai gelas Sarjana Teknologi Pertanian

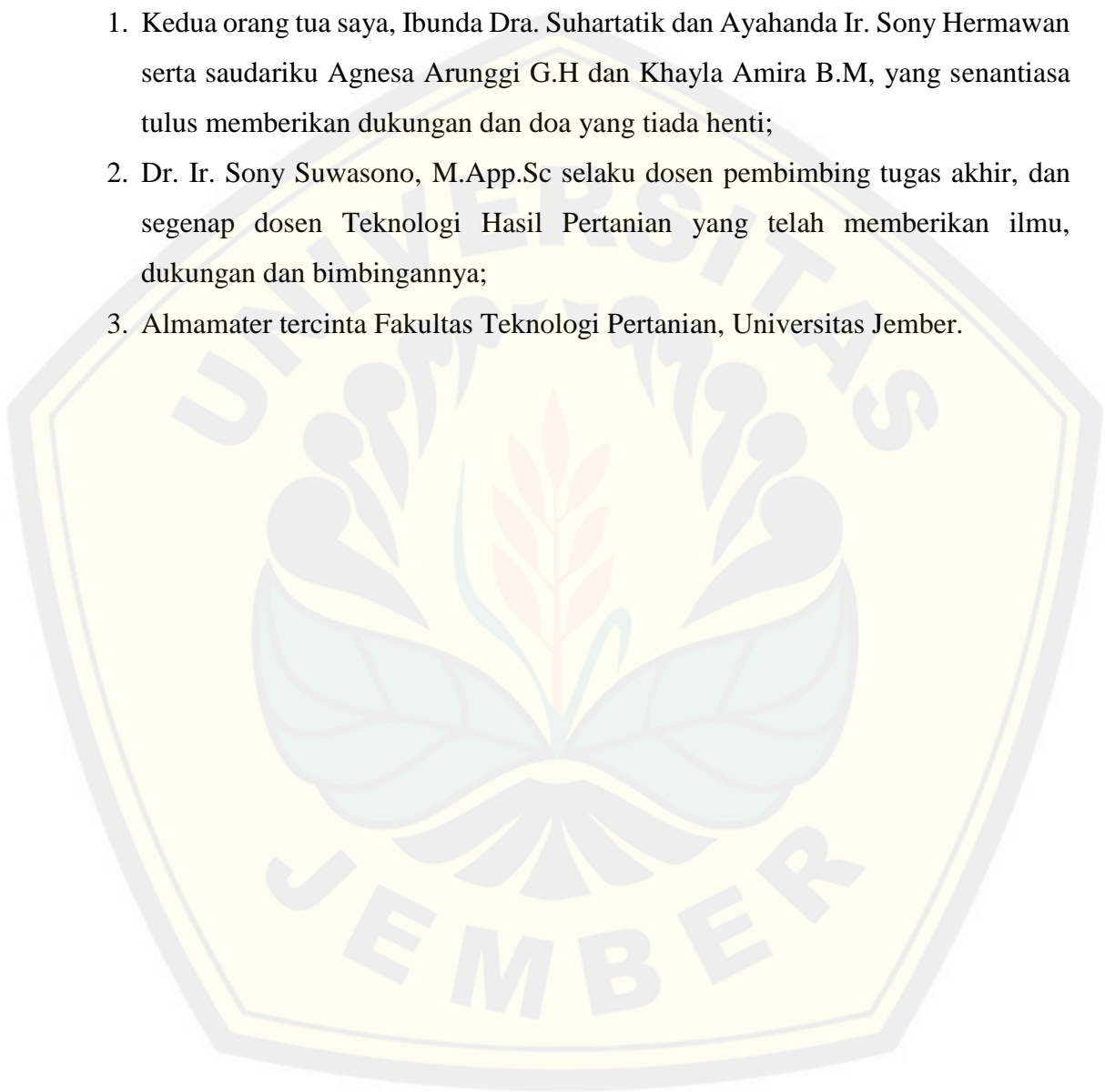
Oleh  
**Zaat Safira Aviva**  
**171710101031**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2021**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan sebagai rasa terima kasih saya yang tidak terkira kepada :

1. Kedua orang tua saya, Ibunda Dra. Suhartatik dan Ayahanda Ir. Sony Hermawan serta saudariku Agnesa Arunggi G.H dan Khayla Amira B.M, yang senantiasa tulus memberikan dukungan dan doa yang tiada henti;
2. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc selaku dosen pembimbing tugas akhir, dan segenap dosen Teknologi Hasil Pertanian yang telah memberikan ilmu, dukungan dan bimbingannya;
3. Almamater tercinta Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.



**MOTTO**

And if somebody else has it much worse, that doesn't really change the fact that you have what you have. Good and bad.

(Stephen Chbosky, *The Perks of Being a Wallflower*\*)



---

\*) Stephen Chbosky. 2010. *The Perks of Being a Wallflower*. Kindle e-book.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zaat Safira Aviva

NIM : 171710101031

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Profil Biji Kakao Rakyat di Banyuwangi Terfermentasi Starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* dalam Fermentor Tabung Kayu” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan kepada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Juli 2021

Yang menyatakan,

Zaat Safira Aviva

NIM 171710101031

**SKRIPSI**

**PROFIL BIJI KAKAO RAKYAT DI BANYUWANGI  
TERFEMENTASI STARTER *Saccharomyces cerevisiae* DAN  
*Lactobacillus casei* DALAM FERMENTOR TABUNG KAYU**

Oleh

Zaat Safira Aviva  
171710101031

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Profil Biji Kakao Rakyat di Banyuwangi Terfermentasi Starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* dalam Fermentor Tabung Kayu” karya Zaat Safira Aviva NIM 171710101031 yang telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Senin, 19 Juli 2021

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember

Pembimbing  
Dosen Pembimbing Utama

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc  
NIP. 196411091989021002

Tim Penguji

Ketua

Anggota

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si  
NIP. 196307011989031004

Ir. Giyarto, M. Sc  
NIP. 196607181993031013

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Ir. Bambang Marhaenanto, M. Eng  
NIP. 196312121990031002



## RINGKASAN

**Profil Biji Kakao Rakyat di Banyuwangi Terfermentasi Starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* dalam Fermentor Tabung Kayu; Zaat Safira Aviva; 171710101031; 101 halaman; Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.**

Kualitas biji kakao rakyat yang rendah dapat disebabkan oleh tidak dilakukannya fermentasi dan kandungan kapang yang tinggi. Kapang pada biji kakao dapat menimbulkan perubahan-perubahan kimiawi di dalamnya, sehingga kakao tidak aman dikonsumsi (beracun). Fermentasi kakao melibatkan bakteri asam laktat (BAL) yang berperan dalam pembentukan senyawa prekursor aroma, warna, rasa, dan bersifat sebagai antikapang. Penggunaan tabung fermentor yaitu tabung fermentor dengan pengaduk pedal *stainless* diharapkan dapat mencegah pertumbuhan kapang. Identifikasi BAL penghasil senyawa antikapang dapat dikembangkan menjadi kultur starter untuk membantu proses fermentasi biji kakao. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan starter *S. cerevisiae* dan *L. casei* komersil terhadap karakteristik mikrobiologis biji kakao terfermentasi menggunakan tabung fermentor serta mengidentifikasi bakteri asam laktat penghasil senyawa antikapang dari fermentasi biji kakao.

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 2 faktor. Faktor pertama adalah jenis starter, dan faktor kedua adalah lama waktu fermentasi. Perlakuan jenis starter terdapat 4 taraf yaitu kontrol (K), 1% *S.cerevisiae* komersil (Sc), 1% *L.casei* komersil (Lc), dan kombinasi penambahan bertahap 0,5% *S.cerevisiae* komersil dan 0,5% *L.casei* komersil (ScLc). Perlakuan lama waktu fermentasi terdiri atas 5 taraf yaitu 0 jam (T<sub>0</sub>), 24 jam (T<sub>1</sub>), 48 jam (T<sub>2</sub>), 72 jam (T<sub>3</sub>), dan 96 jam (T<sub>4</sub>). Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Parameter penelitian ini meliputi pengukuran pH, suhu, *cut test*, indeks fermentasi, perhitungan total mikroba, pengujian antikapang oleh isolat BAL, dan identifikasi BAL secara fenotipik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan starter *S. cerevisiae* dan *L. casei* komersil pada fermentasi biji kakao rakyat menggunakan tabung fermentor berpengaruh terhadap karakteristik mikrobiologisnya. Perlakuan terbaik ada pada kombinasi penambahan bertahap *S. cerevisiae* dan *L. casei* dengan nilai pH pada jam ke-96 mencapai 4,73 dan suhu 39,9°C. Pada uji belah dan indeks fermentasi, perlakuan terbaik ada pada kombinasi penambahan bertahap *S. cerevisiae* dan *L. casei* dengan nilai biji terfermentasi sempurna pada jam ke-96 mencapai 94%. Hal tersebut dapat dibuktikan pula dengan nilai objektif pengujian indeks fermentasi yang mencapai 1,201. Total mikroba fermentasi biji kakao rakyat mengindikasikan bahwa fermentasi berjalan dengan baik dengan nilai total populasi khamir sebesar 7,65 log<sub>10</sub> cfu/g dan total populasi BAL sebesar 9,67 log<sub>10</sub> cfu/g. Bakteri asam laktat yang dominan tumbuh pada fermentasi biji kakao rakyat yang memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antikapang diduga antara lain *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, dan *L. fermentum*. Isolat BAL terduga *L. casei* dan *L. fermentum* dapat menghambat pertumbuhan *A. flavus* dan *A. niger*.



## SUMMARY

**Profile of Smallholder Cocoa Beans in Banyuwangi Fermented *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei* Starter in Wood Tube Fermenter;** Zaat Safira Aviva; 171710101031; 101 pages; Department of Food and Agricultural Technology, University of Jember.

The low quality of smallholder cocoa beans can be caused by non-fermentation and high mold content. Mold on cocoa beans can cause chemical changes in it, so cocoa is not safe for consumption (toxic). Cocoa fermentation involves lactic acid bacteria (LAB) which play a role in the formation of precursor compounds for aroma, color, flavor, and anti-fungal. The use of a fermenter tube, namely a tube fermenter with a stainless pedal stirrer, is expected to prevent mold growth. The identification of LAB that produces anti-fungal compounds can be developed into a starter culture to assist the cocoa bean fermentation process. This study aimed to determine the effect of the addition of commercial *S. cerevisiae* and *L. casei* starter on the microbiological characteristics of fermented cocoa beans using a fermenter tube and to identify lactic acid bacteria that produce anti-fungal compounds from fermented cocoa beans.

The study was conducted with a 4 treatments and 2 factors. The first factor is the type of starter, and the second factor is the length of fermentation time. There were 4 levels of starter treatment, namely control (K), 1% commercial *S. cerevisiae* (Sc), 1% commercial *L. casei* (Lc), and a combination of gradual addition of 0.5% commercial *S. cerevisiae* and 0.5% commercial *L. casei* (ScLc). The fermentation time treatment consisted of 5 levels, namely 0 hours (T<sub>0</sub>), 24 hours (T<sub>1</sub>), 48 hours (T<sub>2</sub>), 72 hours (T<sub>3</sub>), and 96 hours (T<sub>4</sub>). This research was repeated 3 times. The parameters of this study include measurement of pH, temperature, cut test, fermentation index, total microbial count, anti-fungal testing by LAB isolates, and phenotypic identification of LAB.

The results showed that the addition of commercial *S. cerevisiae* and *L. casei* starter in the fermentation of smallholder cocoa beans using a fermenter tube had an effect on its microbiological characteristics. The best treatment was in the combination of the gradual addition of *S. cerevisiae* and *L. casei* with the pH value at 96 hours reached 4.73 and temperature reached 39.9<sup>0</sup>C. In the cut test and fermentation index, the best treatment was in the combination of the gradual addition of *S. cerevisiae* and *L. casei* with the value of completely fermented beans at 96 hours reaching 94%. This can also be proven by the objective value of the fermentation index test which reached 1.201. The total microbial fermentation of smallholder cocoa beans indicated that the fermentation was going well with a total yeast population value of 7.65 log<sub>10</sub> cfu/g and a total LAB population of 9.67 log<sub>10</sub> cfu/g. The dominant lactic acid bacteria that grow in fermented smallholder cocoa beans which has the potential to produce anti-fungal compounds are thought to include *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, and *L. fermentum*. LAB isolates suspected of *L. casei* and *L. fermentum* could inhibit the growth of *A. flavus* and *A. niger*.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Profil Biji Kakao Rakyat Banyuwangi Terfermentasi Starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* dalam Fermentor Tabung Kayu”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Dr. Ir. Bambang Marhaenanto, M. Eng selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Jayus selaku Koordinator Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, dan perhatian serta tulus dan sabar dalam membimbing demi kelancaran studi;
4. Ir. Giyarto, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Penguji Anggota serta Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si selaku Dosen Penguji Utama Skripsi yang telah memberikan saran, evaluasi, dan bimbingan demi perbaikan skripsi;
5. Seluruh dosen Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember, terimakasih atas ilmu dan pengalaman yang diberikan serta bimbingan selama studi;
6. Seluruh staf, karyawan, dan teknisi laboratorium di lingkungan Fakultas Teknologi Pertanian, terimakasih atas bantuan dalam mengurus administrasi dan lainnya;
7. Kedua orang tua saya, Ibunda Dra. Suhartatik dan Ayahanda Ir. Sony Hermawan serta kedua suadari saya, Agnesa Arunggi G.H dan Khayla Amira B.M yang selalu memberikan semangat dan doa setiap waktu;

8. Teman-teman satu tim penelitian Kakao Jambewangi angkatan 2017, Khilmy Aynayya dan Dewi Herlina, terimakasih atas bantuan dan kerjasamanya;
9. Teman-teman asisten laboratorium mikrobiologi, Thalita Zhafirah A., Firarosa A., Siti Nur Aini, Dayintaguna P., Hanim Mufarrihah O., dan Deva Mellenia;
10. Cheryl Brigita V., Rosy Ashariantina R., Salsabila Febrianti., Liuta Mimma M., Eldania Dwi A., dan teman-teman angkatan 2017 terutama untuk THP-B yang memberikan semangat, nasehat, serta motivasi dalam penyusunan skripsi;
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu baik tenaga maupun pikiran dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua.

Jember, 19 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Buah Kakao</b> .....	4
<b>2.2 Kualitas Biji Kakao</b> .....	4
<b>2.3 Fermentasi Kakao</b> .....	5
<b>2.4 Wadah Fermentasi</b> .....	6
<b>2.5 Mikroba yang Berperan dalam Fermentasi Biji Kakao</b> .....	8
2.5.1 Khamir .....	8
2.5.2 Bakteri Asam Laktat .....	9
2.5.3 Bakteri Asam Asetat.....	10



2.5.4 Kapang.....	11
<b>2.6 Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Laktat .....</b>	<b>12</b>
<b>2.7 Metode Identifikasi Bakteri Asam Laktat.....</b>	<b>13</b>
2.7.1 Pewarnaan Gram.....	13
2.7.2 Pengujian Katalase .....	14
2.7.3 Pengujian Produksi Gas CO <sub>2</sub> .....	14
2.7.4 Produksi Dekstran dari Sukrosa .....	14
2.7.5 Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda.....	15
2.7.6 Pertumbuhan pada Konsentrasi NaCl yang Berbeda.....	15
2.7.7 Pertumbuhan pada Karbohidrat yang Berbeda.....	16
2.7.8 Kemampuan Memproduksi Asam.....	16
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>18</b>
3.2.1 Alat Penelitian .....	18
3.2.2 Bahan Penelitian.....	18
<b>3.3 Rancangan Penelitian.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Tahap Penelitian .....</b>	<b>19</b>
3.4.1 Fermentasi Biji Kakao.....	19
3.4.2 Isolasi Mikroba Hasil Fermentasi Biji Kakao .....	21
3.4.3 Pengujian Antikapang oleh Bakteri Asam Laktat .....	22
3.4.4 Pengeringan Biji Kakao.....	24
<b>3.5 Parameter Pengamatan.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Prosedur Analisis.....</b>	<b>25</b>
3.6.1 Pengukuran pH.....	25
3.6.2 Pengukuran Suhu.....	25
3.6.3 Pengujian <i>Cut Test</i> .....	26
3.6.4 Analisis Indeks Fermentasi.....	26
3.6.5 Perhitungan Populasi Mikroba ( <i>Total Plate Count</i> ).....	27
3.6.6 Pengujian Daya Hambat Antikapang .....	27
3.6.7 Identifikasi BAL Secara Fenotipik .....	28

<b>3.7 Analisis Data</b> .....	30
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	31
<b>4.1 Tingkat Keasaman (pH)</b> .....	31
<b>4.2 Suhu Fermentasi</b> .....	33
<b>4.3 Uji Belah (<i>Cut Test</i>)</b> .....	34
<b>4.4 Indeks Fermentasi</b> .....	37
<b>4.5 Populasi Khamir, BAL dan BAA</b> .....	38
<b>4.6 Luas Area Bening BAL Pada Uji Kemampuan Kerja Antikapang</b> .....	42
<b>4.7 Identifikasi BAL Secara Fenotip</b> .....	46
4.7.1 Pewarnaan Gram .....	46
4.7.2 Uji Katalase .....	47
4.7.3 Produksi CO <sub>2</sub> Menggunakan Agar Tusuk .....	48
4.7.4 Produksi Dekstran dari Sukrosa .....	49
4.7.5 Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda .....	50
4.7.6 Penumbuhan pada Konsentrasi Garam Berbeda .....	51
4.7.7 Kemampuan Fermentasi Berbagai Jenis Karbohidrat .....	52
4.7.8 Kemampuan Memproduksi Asam .....	53
<b>BAB 5. PENUTUP</b> .....	57
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	57
<b>5.2 Saran</b> .....	57
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	58
<b>LAMPIRAN</b> .....	63



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2. 1 Syarat umum biji kakao .....	5
2. 2 Syarat khusus biji kakao.....	5
2. 3 Acuan <i>Bergey's manual of systematic bacteriology</i> .....	17
3. 1 Perlakuan konsentrasi dan lama fermentasi .....	19
4. 1 Penghambatan kapang <i>A. flavus</i> dan <i>A. niger</i> oleh isolat BAL .....	45
4. 2 Hasil uji pewarnaan gram pada isolat BAL .....	47
4. 3 Hasil uji katalase pada isolat BAL .....	48
4. 4 Hasil uji produksi CO <sub>2</sub> oleh BAL .....	48
4. 5 Hasil uji produksi dekstran dengan sukrosa pada isolat BAL.....	50
4. 6 Hasil uji pertumbuhan isolat BAL pada suhu yang berbeda.....	51
4. 7 Hasil uji pertumbuhan isolat BAL pada konsentrasi garam berbeda.....	52
4. 8 Hasil uji kemampuan isolat BAL memfermentasi berbagai karbohidrat.....	53
4. 9 Hasil uji produksi asam dan pH isolat BAL.....	53
4. 10 Hasil identifikasi isolat BAL yang diisolasi biji kakao terfermentasi berdasarkan sifat morfologi dan biokimianya .....	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2. 1 Tabung fermentor.....	7
3. 1 Proses fermentasi biji kakao rakyat di Banyuwangi.....	20
3. 2 Isolasi mikroba fermentasi biji kakao rakyat di Banyuwangi.....	22
3. 3 Pengujian kemampuan antikapang oleh BAL.....	23
3. 4 Ilustrasi pengukuran diameter penghambatan kapang oleh isolat BAL.....	24
4. 1 Perubahan pH biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter selama fermentasi.....	31
4. 2 Perubahan suhu biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter selama fermentasi.....	33
4. 3 Persentase <i>cut test</i> biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter selama fermentasi (a) kontrol; (b) + <i>S. cerevisiae</i> ; (c) + <i>L. casei</i> ; dan (d) + <i>S. cerevisiae</i> dan <i>L. casei</i> .....	35
4. 4 Perubahan indeks fermentasi biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter selama fermentasi.....	37
4. 5 Populasi khamir pada fermentasi biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter.....	39
4. 6 Populasi BAL pada fermentasi biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter.....	40
4. 7 Populasi non-BAL pada fermentasi biji kakao rakyat Banyuwangi dengan variasi jenis starter.....	41
4. 8 Isolat BAL dengan zona bening disekitarnya.....	43
4. 9 Penghambatan pertumbuhan kapang oleh isolat BAL.....	43
4. 10 Koloni kapang hasil isolasi fermentasi biji kakao (kiri) dan struktur mikroskopi pada perbesaran mikroskop 400x (kanan) (a) <i>Aspergillus flavus</i> (b) <i>Aspergillus niger</i> .....	44
4. 11 Pengamatan mikroskopik isolat BAL pada perbesaran 1000x.....	47
4. 12 Pengamatan isolat BAL produksi CO <sub>2</sub> ; heterofermentatif penghasil CO <sub>2</sub> (kiri) dan homofermentatif tidak menghasilkan CO <sub>2</sub> (kanan).....	49

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
2.5 Proses Metabolisme Khamir dan BAL .....	64
4.1 Perhitungan pH Fermentasi Biji Kakao .....	67
4.2 Perhitungan Suhu Fermentasi Biji Kakao .....	67
4.3 Perhitungan Uji Belah Fermentasi Biji Kakao .....	69
4.4 Perhitungan Indeks Fermentasi Biji Kakao .....	71
4.5 Perhitungan Total Mikroba Fermentasi Biji Kakao .....	72
4.6 Perhitungan Luas Area Hambatan BAL .....	75
4.7 Dokumentasi Penelitian .....	77
4.7.8 Perhitungan Total Asam Laktat Isolat BAL.....	83

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sebagian besar perkebunan kakao Indonesia dikelola oleh rakyat (87,4%), selebihnya dikelola perkebunan besar negara (6,0%) dan perkebunan besar swasta (6,6%). Salah satu wilayah di Indonesia yang menjadi produsen biji kakao adalah Jawa Timur. Badan Pusat Statistika (2019) menyatakan bahwa produksi biji kakao di Jawa Timur sebesar 26.200 ton per tahun. Biji kakao Jawa Timur didominasi oleh kakao asal Kabupaten Banyuwangi yaitu sebanyak 10.216 ton pada tahun 2019.

Kecamatan Sempu menjadi salah satu wilayah produsen biji kakao asal Banyuwangi yang didominasi kakao asal Desa Jambewangi. Menurut Badan Pusat Statistika Banyuwangi tahun 2019, Desa Jambewangi memiliki kebun kakao seluas 246 hektar, namun kualitas biji kakao yang dihasilkan bermutu rendah. Berdasarkan hasil observasi yang dilakukan di Desa Jambewangi, biji kakao rakyat cenderung berwarna abu-abu, berbau apek, dan banyak ditumbuhi kapang. Selain itu, sarana pengolahan dan penerapan teknologi pada seluruh tahapan proses pengolahan biji kakao rakyat tidak berorientasi pada Standar Nasional Indonesia. Proses pengolahan biji kakao di Desa Jambewangi hanya sebatas dikeluarkan dari kulit terluarnya kemudian dikeringkan tanpa dilakukan fermentasi. Salah satu upaya untuk memperbaiki kualitas biji kakao adalah dengan fermentasi.

Teknologi fermentasi telah banyak diaplikasikan pada proses pengolahan biji kakao. Dalam proses fermentasi biji kakao, peran mikroba antara lain khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat sangat penting dalam menentukan produk akhir biji kakao. Mikroba akan mengalami proses hidrolisis dan oksidasi senyawa calon rasa, warna, dan aroma pada kakao. Mikroba mengubah gula sukrosa (*pulp* kakao) menjadi asam-asam organik (Afoakwa *et al.*, 2014). Selain itu bakteri asam laktat (BAL) juga menjadi pencegah pencemaran dan keracunan yang diakibatkan oleh kapang pada kakao. Penelitian Wangge *et al.*, (2012) menunjukkan bahwa BAL dapat berfungsi sebagai *biopreservative* karena kemampuannya untuk menghasilkan substansi antikapang.

Teknologi penambahan starter juga telah dilakukan untuk meningkatkan kualitas kakao saat fermentasi. Kustyawati dan Setyani (2008), telah melakukan penelitian mengenai penambahan starter pada fermentasi kakao dengan hasil mempercepat proses fermentasi *pulp* dan kematian biji. Fermentasi biji kakao membutuhkan waktu sekitar 5 – 6 hari untuk mendapatkan biji dengan kualifikasi sesuai SNI 2323:2008. Penjaminan kepastian mutu harus ditinjau melalui spesifikasi alat dan mesin yang digunakan untuk fermentasi.

Tabung fermentor merupakan alat fermentasi kakao yang terbuat dari kayu berbentuk tabung dengan prinsip biji kakao di fermentasi dalam tabung berpedal *stainless* yang diputar sehingga memudahkan pengadukan. Biji kakao perlu diaduk untuk meratakan proses fermentasi (Alamsyah dan Naibaho, 1991), namun pada implementasinya pengadukan dilakukan secara manual menggunakan pengaduk kayu sehingga tak jarang kontaminasi seperti kapang masuk saat dilakukan pengadukan. Standar mutu biji kakao ditentukan oleh kandungan kapang. Hal ini dikarenakan adanya kapang pada biji kakao menimbulkan perubahan-perubahan kimiawi di dalamnya, sehingga kakao tidak dapat dikonsumsi atau beracun (El Ghaouth *et al.*, 1992).

Beberapa mikroba yang dapat memperbaiki kualitas biji kakao melalui fermentasi antara lain khamir dan bakteri. Namun kedua mikroba tersebut memiliki metabolisme dan kemampuan yang berbeda dalam memproduksi enzim yang berperan dalam proses fermentasi maupun sebagai antikapang. Penelitian ini diharapkan mampu mengoptimalkan proses fermentasi, menghasilkan biji kakao rakyat dengan perbaikan kualitas menggunakan tabung fermentor dengan penambahan starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* komersil, serta menjadi salah satu alternatif usaha untuk mencegah kontaminasi kapang penghasil mikotoksin.

## 1.2 Rumusan Masalah

Kualitas kakao rakyat yang buruk disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya tidak dilakukan fermentasi dan kandungan kapang yang tinggi. Kapang pada kakao akan menimbulkan perubahan-perubahan kimiawi di dalamnya, sehingga kakao tidak dapat dikonsumsi atau beracun. Fermentasi kakao melibatkan



BAL dalam pembentukan senyawa prekursor aroma, warna, rasa, serta menjadi salah satu alternatif pengawet alami sebagai antikapang. Penggunaan tabung fermentor dapat membantu standardisasi sebagai wadah fermentasi yaitu kayu berbentuk tabung dengan pengaduk pedal *stainless* yang diharapkan dapat mencegah pertumbuhan kapang. Identifikasi BAL penghasil senyawa antikapang dapat dikembangkan menjadi kultur starter untuk membantu proses fermentasi biji kakao. Hal ini nantinya akan menjadi salah satu alternatif usaha untuk mencegah kontaminasi oleh kapang penghasil mikotoksin. Penelitian ini menggunakan tabung fermentor yang diaplikasikan dengan penambahan starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* komersil yang diharapkan mampu mempercepat proses fermentasi kakao dengan perbaikan kualitas.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui pengaruh penambahan starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* komersil terhadap karakteristik mikrobiologis biji kakao terfermentasi menggunakan tabung fermentor.
2. Mengidentifikasi bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai antikapang dalam fermentasi biji kakao.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Menghasilkan biji kakao rakyat terfermentasi dengan perbaikan karakteristik mikrobiologis dan sedikit kontaminan kapang.
2. Implementasi fermentor sebagai standardisasi wadah fermentasi biji kakao yang dapat diaplikasikan oleh petani kakao.
3. Mengembangkan senyawa antikapang dari bakteri asam laktat yang diharapkan dapat mencegah kontaminasi kapang.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Buah Kakao

Buah kakao (*Theobroma cacao*) terdiri atas empat bagian utama yaitu kulit, plasenta, *pulp*, dan biji. Kulit terluar kakao pada dasarnya terdapat dua macam yaitu berwarna hijau muda dan hijau agak putih ketika muda, namun saat mulai masak kulit kakao akan berubah sesuai dengan varietasnya. Varietas kakao Menurut Sunanto (1992), terdapat tiga macam yaitu jenis *Criollo*, *Forastero*, dan *Trinitario*. *Criollo* berbentuk agak panjang dan jika masak berwarna jingga, *Forastero* berbentuk agak bulat dan jika masak berwarna kuning, sedangkan *Trinitario* berbentuk panjang dan jika masak berwarna merah gelap.

Bagian terbesar pada buah kakao adalah kulit dengan persentase lebih dari 70% berat buah masak. Buah kakao yang masak memiliki kulit tebal dan berisi sekitar 30 – 40 biji yang diselimuti oleh *pulp* berwarna putih dan berlendir (Nasution *et al.*, 1976). Biji kakao memiliki persentase berkisar 27 – 29% berat buah masak, sedangkan sisanya merupakan plasenta (Mulato *et al.*, 2005). Biji kakao mengandung 35 – 50% lemak, 15% pati, 15% protein, 1 – 4% theobromin, dan 0,07 – 0,36% kafein (Paembong, 2012). Kakao dan produknya merupakan sumber komponen fenolik yaitu sebanyak 12 – 18% yang berpotensi sebagai antioksidan (Othman *et al.*, 2007). Permukaan kulit buah kakao ada yang halus dan ada yang kasar, namun pada dasarnya kulit buah beralur dan letaknya berselang-seling. Buah kakao akan masak setelah berumur 5 – 6 bulan, tergantung pada elevasi tempat penanaman. Pada saat buah masak, ukuran buah yang terbentuk cukup beragam dengan ukuran rata-rata berkisar 10 – 30 cm dan diameter 7 – 15 cm (Wahyudi *et al.*, 2008).

### 2.2 Kualitas Biji Kakao

Kualitas biji kakao yang baik merupakan aspek penting dalam mengembangkan produksi kakao secara berkelanjutan. Standar mutu biji kakao Indonesia diatur dalam Standar Nasional Indonesia Biji Kakao (SNI 2323:2008). Mutu biji kakao yang baik dapat diperoleh melalui tahapan penanganan pasca panen yang tepat yaitu pemanenan, sortasi buah, pemeraman, pemecahan buah,

fermentasi, pengeringan, sortasi biji kering, pengemasan, dan penyimpanan (Mulato *et al.*, 2005). Kualitas biji kakao yang baik ditandai dengan masak penuh, terfermentasi baik (kering, berwarna coklat, berbau asam, tidak terdapat warna ungu atau *slaty* ketika dibelah), ukuran yang seragam, cangkang biji utuh, dan berwarna merah kecoklatan (Litbang Pertanian, 2017). Syarat umum mutu kakao menurut SNI 2323:2008 disajikan pada Tabel 2.1

Tabel 2. 1 Syarat umum biji kakao

No	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
1	Serangga hidup	-	Tidak ada
2	Kadar air	% fraksi massa	Maks. 7,5
3	Biji berbau asap dan/ <i>hammy</i> atau berbau asing	-	Tidak ada
4	Kadar benda asing	-	Tidak ada

Biji kakao kering dengan kualitas baik memiliki kadar air sekitar 7,5% dan tidak kurang dari 5%. Kadar air yang melebihi 7,5% berbahaya karena kapang dapat tumbuh dengan mudah pada kondisi yang lembab, sedangkan bila kadar air < 5% biji sangat rapuh sehingga mudah pecah selama proses penanganan (Afoakwa *et al.*, 2014). Biji kakao kualitas baik memiliki berat sekitar 1 gram, berbentuk padat berisi, dan berwarna coklat tua. Salah satu indikasi bahwa fermentasi tidak sempurna adalah terbentuknya biji *slaty*, yaitu bagian dalam biji yang berwarna ungu (Susanto, 1994). Syarat khusus biji kakao menurut SNI 2323:2008 disajikan pada Tabel 2.2

Tabel 2. 2 Syarat khusus biji kakao

Jenis mutu		Persyaratan (Kadar; % biji/biji)				
Kakao mulia	Kakao lindak	Biji berjamur	Biji <i>slaty</i>	Biji berserangga	Kotoran	Biji berkecambah
I-F	I-B	Maks. 2	Maks. 3	Maks. 1	Maks. 1,5	Maks. 2
II-F	II-B	Maks. 4	Maks. 8	Maks. 2	Maks. 2.0	Maks. 3
III-F	III-B	Maks. 4	Maks. 20	Maks. 2	Maks. 3.0	Maks. 3

### 2.3 Fermentasi Kakao

Fermentasi biji kakao umumnya berlangsung secara alami oleh mikroorganisme dan berlangsung selama 5 – 6 hari dengan pembalikan setiap 24 jam sekali (Senanayake *et al.*, 1996). *Pulp* menyelimuti biji, berwarna putih dan mengandung 14% gula dan 1,5% pektin yang berperan penting dalam pertumbuhan

mikroorganisme. Saat fermentasi gula dan asam sitrat, *pulp* dirombak menjadi asam-asam organik yang dilakukan oleh mikroba pelaku fermentasi. Asam-asam organik tersebut akan menginduksi reaksi enzimatik yang ada di dalam biji sehingga terjadi perubahan biokimia pembentuk aroma, rasa, dan warna pada kakao (Afoakwa *et al.*, 2014). Fermentasi biji kakao terdiri dari pelepasan *pulp* dari permukaan biji dan reaksi hidrolitik di dalam kotiledon biji. Pada tahap awal fermentasi keberadaan mikroba di dominasi oleh khamir, selanjutnya diikuti oleh bakteri asam laktat dan akhir fermentasi oleh bakteri asam asetat (Aprotosoai *et al.*, 2016).

Menurut Ziegleder (2009), proses fermentasi dibagi menjadi tiga tahap dengan tiga mikroorganisme yang berperan. Selama fermentasi, aktivitas mikroba dalam *pulp* akan memproduksi alkohol, asam, dan membebaskan panas (reaksi eksotermal) yang menyebabkan difusi zat-zat metabolit tersebut ke dalam biji. Reaksi eksotermal pada fermentasi kakao mengalami peningkatan suhu mencapai 25 – 45°C (Tarigan *et al.*, 2017). Fase pertama *pulp* mulai terurai akibat adanya khamir yang mengkonversi gula sukrosa menjadi alkohol dan asam laktat. Fase kedua berada dalam kondisi aerob dimana bakteri asam laktat aktif mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat, sehingga menghentikan aktivitas bakteri asam laktat. Terbentuknya asam asetat dan suhu yang tinggi mengakibatkan kematian biji sehingga dinding sel biji terbuka. Fase ketiga terjadi perubahan kimia yang kompleks di dalam biji seperti aktivitas enzim, oksidasi, dan pemecahan protein menjadi asam amino. Hasil degradasi tersebut berupa peptida, asam amino bebas dan gula reduksi yang merupakan senyawa prekursor dari aroma, rasa, dan warna kakao (Kadow *et al.*, 2015).

#### **2.4 Wadah Fermentasi**

Dampak penggunaan material wadah fermentasi sangat berpengaruh terhadap hasil fermentasi kakao. Material untuk wadah fermentasi bermacam-macam antara lain besek bambu, krat plastik, daun pisang, *styrofoam*, dan yang paling umum adalah kayu. Material kayu biasa digunakan dalam fermentasi biji kakao. Kayu di bentuk menjadi kotak dengan lubang aerasi yang cukup sehingga proses

metabolisme mikroorganisme yang membutuhkan udara dapat tercukupi dengan baik (Wahyudi *et al.*, 2008). Menurut Patty (2018), penggunaan bak kayu dengan lubang aerasi dapat mengoptimalkan proses fermentasi pada hari ke 3 dengan ditunjukkan data suhu tertinggi mencapai 42°C.

Wadah krat plastik biasanya berbentuk persegi dan memiliki lubang aerasi yang cukup. Penelitian Rasadi *et al.*, (2014) menunjukkan bahwa penggunaan krat plastik dapat memberikan mutu dan karakteristik fisik dan kimia yang baik untuk industri kakao perkebunan rakyat dengan waktu fermentasi sekitar 5 – 6 hari. Daun pisang juga banyak diaplikasikan pada fermentasi kakao. Prosesnya yaitu dengan menyebar biji kakao di atas daun pisang dengan bentuk piramida kemudian di tutup dan ditindih menggunakan tongkat kayu. Penelitian Wood and Lass, (1989) menjelaskan bagaimana metode fermentasi menggunakan daun pisang dapat mempermudah proses fermentasi dengan alat yang sederhana. Metode ini banyak diaplikasikan oleh perkebunan besar di daerah Afrika Barat, namun fermentasi ini memerlukan daerah yang minim cahaya matahari dan membutuhkan waktu sekitar 6 – 7 hari untuk proses fermentasi. Bentuk tabung fermentor disajikan pada Gambar 2.3



Gambar 2. 1 Tabung fermentor

Tabung fermentor merupakan alat fermentasi kakao yang terbuat dari kayu berbentuk tabung dengan prinsip biji kakao di fermentasi dalam tabung berpedal *stainless* yang di putar sehingga memudahkan pengadukan. Tabung fermentor mempunyai ukuran panjang 49 cm dan diameter 43 cm dengan ketebalan 3 cm berbentuk tabung berbahan kayu. Lubang aerasi terdapat pada bagian kanan dan kiri alat dengan diameter sekitar 1 cm, jarak antar lubang aerasi berkisar 3 – 4 cm, dengan kapasitas 15 kilogram.



Penggunaan *stainless* pada tabung fermentor menciptakan kondisi yang cocok untuk fermentasi biji kakao. Bahan yang lain seperti besi akan mempengaruhi lingkungan terutama pH pada saat proses fermentasi dikarenakan terdapat kandungan Fe di dalamnya. Bagian depan tabung fermentor dilengkapi monitor pengukuran suhu dan generator pengaduk yang bergerak dengan bantuan listrik. Biji kakao perlu diaduk untuk meratakan proses fermentasi (Alamsyah dan Naibaho, 1991) namun, pada implementasinya pengadukan dilakukan secara manual menggunakan pengaduk kayu sehingga tak jarang kontaminasi seperti kapang masuk saat dilakukan pengadukan. Standar mutu biji kakao ditentukan oleh kandungan kapang didalamnya. Hal ini dikarenakan mikotoksin yang dihasilkan kapang menimbulkan perubahan-perubahan kimiawi di dalamnya, sehingga kakao tidak dapat dikonsumsi atau beracun (El Ghaouth *et al.*, 1992).

## 2.5 Mikroba yang Berperan dalam Fermentasi Biji Kakao

Pertumbuhan khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat di dalam *pulp* berperan dalam perubahan biokimiawi selama fermentasi kakao (Tarigan *et al.*, 2017). Sebelum proses fermentasi, kakao yang di pecah dan di keluarkan tak jarang terkontaminasi secara cepat oleh mikroba yang beragam dari udara maupun dari sentuhan pekerja sebab dilakukan pemecahan secara manual. *Pulp* pada kakao mengandung gula dengan kadar air mencapai 41% yang sangat cocok untuk pertumbuhan kapang dan khamir (Tomi, 2020). Pertumbuhan kapang pada biji kakao akan merusak proses fermentasi kakao karena adanya mikotoksin yang dihasilkan pada biji kakao menimbulkan perubahan-perubahan kimiawi di dalamnya (El Ghaout *et al.*, 1992).

### 2.5.1 Khamir

Khamir merupakan mikroorganisme uniseluler kelompok fungi dengan ukuran diameter umumnya 3 – 4  $\mu\text{m}$  (Walker *et al.*, 2002). Khamir yang paling sering dimanfaatkan pada beberapa bahan pangan adalah *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* dapat mengkonversi gula menjadi alkohol dan karbon dioksida sehingga banyak dimanfaatkan pada produk pangan seperti bir dan roti. Pada fermentasi kakao, khamir berperan dalam perombakan gula menjadi

alkohol dan asam-asam organik. Pertumbuhan khamir biasanya ada pada awal fermentasi karena biji kakao memiliki pH awal netral atau sedikit asam, kadar air  $\pm 40\%$ , dan kandungan gula pada pulp sekitar 14% sehingga sangat cocok untuk pertumbuhan khamir (Tomi, 2020).

Pertumbuhan khamir secara cepat pada awal proses fermentasi kakao. Khamir memecah sukrosa *pulp* kakao dengan bantuan enzim invertase menjadi fruktosa dan glukosa diluar membran. Fruktosa dan glukosa yang telah dipecah kemudian masuk dalam membran sel dan terjadi perubahan fruktosa dan glukosa menjadi fruktosa-6-fosfat dan glukosa-6-fosfat yang selanjutnya menjadi fosfofruktosinase. Pada proses pembentukan tersebut khamir menghasilkan ATP dan ADP. Energi tersebut yang mengakibatkan panas pada proses fermentasi kakao terus naik, dan terbentuk etanol. Metabolisme gula oleh khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* disajikan pada Lampiran 2.5a

#### 2.5.2 Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan asam laktat baik sebagai satu-satunya produk maupun sebagai produk utama disamping produk lain pada metabolisme karbohidrat (Frazier dan Westhoff, 1988). BAL termasuk bakteri gram positif yang menghasilkan katalase negatif, dengan ciri pH rendah, baik berbentuk batang (*Basil*) atau bulat (*Cocci*) dan termasuk bakteri kemoautotrof (Putri *et al.*, 2014). BAL memiliki pH hingga di bawah 4 yang berguna untuk menghambat mikroorganisme lain termasuk mikroba patogen. Hal ini yang menyebabkan pada fermentasi kakao, kapang tidak mudah tumbuh karena bakteri asam laktat dapat memproduksi senyawa antikapang (Putri *et al.*, 2014). Menurut Fitriyana dan Kurniawan (2015), isolat BAL dapat digunakan sebagai kultur starter pada proses fermentasi kakao yang lebih optimal karena dapat menekan kontaminan kapang dan menurunkan kandungan mikotoksin pada biji kakao. *Pulp* kakao yang mengandung gula sukrosa sebelumnya telah dipecah oleh khamir dengan bantuan enzim invertase menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa dirombak menjadi glukosa-6-fosfat melalui jalur heksokinase. Pada proses tersebut, BAL memerlukan energi berupa ATP yang kemudian menghasilkan ADP yaitu panas. Kemudian, glukosa-6-fosfat melalui jalur isomerase fosfoglukosa



diubah menjadi fruktosa-6-fosfat dan fruktosa-1,6-difosfat. Hal yang sama terjadi pada proses tersebut yaitu ATP yang digunakan pada saat perombakan menghasilkan ADP yang kemudian menghasilkan panas. Energi tersebut yang menyebabkan fermentasi pada biji kakao menjadi panas. Jalur metabolisme BAL homofermentatif dan BAL heterofermentatif disajikan pada Lampiran 2.5b dan Lampiran 2.5c

Diantara strain bakteri asam laktat, genus *Lactobacillus* adalah jenis bakteri yang banyak digunakan pada fermentasi biji kakao, antara lain *Lactobacillus fermentum* (Fitriyana dan Kurniawan, 2015), *Lactobacillus plantarum* (Putri *et al.*, 2014), *Lactobacillus curvatus* (Kustyawati dan Setyani, 2008) dan *Lactobacillus casei* (da Veiga Moreira *et al.*, 2013). Menurut Hutkins *et al.*, (2019), ciri-ciri bakteri asam laktat genus *Lactobacillus* adalah berbentuk batang pendek dengan lebar 0,9 – 1,2  $\mu\text{m}$  dan panjang 3 – 8  $\mu\text{m}$  berwarna putih susu sampai abu-abu kekuningan. *Lactobacillus* dapat tumbuh pada suhu 15 – 42°C dengan pH antara 3,0 – 4,6, merupakan bakteri gram positif, katalase negatif, fakultatif anaerob, dan bersifat fermentatif. Berdasarkan sifatnya dapat di klasifikasikan menjadi dua yaitu *Lactobacillus* heterofermentatif dan *Lactobacillus* homofermentatif.

*Lactobacillus* heterofermentatif memetabolisme glukosa melalui alur pentosa fosfat atau fosfoketolase yaitu melalui glukosa-6-fosfat, 6-fosfoglukonat dan ribulosa-5-fosfat. Spesies dari *Lactobacillus* heterofermentatif, diantaranya *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. viridescens* dan *L. buchneri*. Sedangkan *Lactobacillus* homofermentatif dapat membentuk asam laktat  $\pm 90\%$  murni. Penguraian glukosanya melalui alur fruktosa difosfat termasuk aldolase dan memindahkan hidrogen yang terjadi pada dehidrogenasi gliserinaldehid-3-fosfat ke piruvat. Spesies dari *Lactobacillus* homofermentatif, diantaranya *L. casei*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, dan *L. acidophilus* (Hutkins *et al.*, 2019).

### 2.5.3 Bakteri Asam Asetat

Bakteri Asam Asetat (BAA) merupakan kelompok bakteri yang mampu menghasilkan bakteri asam asetat dengan karakteristik umum mempunyai kemampuan mengoksidasi alkohol dan gula (Samah *et al.*, 1990). BAA termasuk

dalam bakteri gram negatif berbentuk kapsul terdiri dari polisakarida dengan unit penyusun berupa glukosa dan selulosa (Madigan dan Martinko, 2005).

BAA memiliki kemampuan mengubah etanol menjadi asam asetat dengan bantuan udara. Hal ini membantu proses fermentasi kakao sehingga menghentikan aktivitas bakteri asam laktat dan memberhentikan perkecambahan biji. pH optimal pertumbuhan BAA sekitar 5,4 – 6,3 dan suhu optimal hidup 25 – 30°C. Selama proses fermentasi biji kakao, BAA merupakan mikroorganisme yang memegang kunci dalam pembentukan aroma dan warna biji kakao. Menurut Afoakwa *et al.*, (2014) BAA mengoksidasi etanol menjadi asetat. Proses tersebut optimal terjadi pada hari ke dua hingga ke tiga fermentasi sehingga suhu bisa mencapai 45<sup>0</sup>C. BAA kotiledon biji akan terbuka dan etanol hasil metabolisme khamir dan BAL dioksidasi menjadi asam asetat (Hutskin *et al.*, 2019). BAA juga mengkonsumsi asam laktat yang dihasilkan oleh BAL dan menghasilkan asetoin. Asam asetat yang dihasilkan meningkatkan hidrolisis protein, terutama asam amino. Asam yang meningkat akan mempengaruhi pH fermentasi biji kakao. Seiring kondisi fermentasi menjadi asam, suhu akan menurun karena nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroorganisme habis. Proses aerasi yang menyebabkan kondisi lingkungan menjadi faktor lain terjadinya penurunan suhu. Diantara strain bakteri asam asetat, genus *Acetobacter* banyak digunakan dalam proses fermentasi biji kakao, antara lain *Acetobacter lovaniensis* (Papalexandratou *et al.*, 2013) dan *Acetobacter xylinum* (Samah *et al.*, 1990).

#### 2.5.4 Kapang

Kapang merupakan anggota fungi yang membentuk hifa dan memiliki filamen (miselium) di bagian selnya. Rahmadi dan Fleet (2008), menyatakan bahwa floral awal yang masuk dalam fermentasi kakao adalah kapang yang dapat menghasilkan toksin. Racun yang dihasilkan kapang sangat berbahaya bagi manusia antara lain okratoksin yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp. (Amaria *et al.*, 2014) dan aflatoksin yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. (Copetti *et al.*, 2012).

Racun yang diproduksi oleh kapang dapat mematikan dan sangat karsinogenik. Serangan racun yang paling ringan adalah terbentuknya iritasi ringan pada kulit

akibat kematian jaringan atau nekrosis. Efek karsinogenik dari racun yang dihasilkan kapang berpotensi merangsang kanker, karsinoma pada hati, dan sirosis (Varga *et al.*, 2003).

Pada fermentasi kakao, keberadaan kapang tidak diinginkan karena dapat merugikan. Racun yang merupakan hasil metabolisme kapang dapat mempengaruhi biji kakao yang telah difermentasi. Salah satu cara untuk mencegah cemaran kapang penghasil toksin yaitu dengan mengisolasi bakteri asam laktat penghasil metabolit sekunder dari *pulp* kakao yang menjadi senyawa antikapang.

## 2.6 Kemampuan Kerja Antikapang dari Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan organisme yang mampu berfungsi sebagai *biopreservative* atau pengawet alami. Selama metabolisme, bakteri asam laktat mampu menghasilkan metabolit sekunder bakteriosin (Kustyawati dan Setyani, 2012). Senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat diantaranya adalah asam organik, peptida, diasetil, CO<sub>2</sub>, asetaldehid, d-isomer, asam lemak, asam-asam amino dan senyawa antikapang (Corsetti *et al.*, 2005).

Mekanisme penghambatan kapang oleh bakteri asam laktat terjadi ketika asam lemak yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat akan mempengaruhi struktur membran sel kapang yaitu meningkatkan permeabilitas membran dan membebaskan elektrolit serta protein intraseluler yang mengakibatkan disintegrasi sitoplasma sel kapang sehingga metabolisme kapang akan terganggu (Isnaini, 2011). Fitriyana dan Kurniawan (2015) menjelaskan bahwa bakteri asam laktat dapat digunakan sebagai kultur starter untuk proses fermentasi yang lebih optimal dan untuk proses fermentasi kembali (*re-fermentation*) biji kakao kering yang tidak difermentasi (*unfermented*). Menurut Hutskin *et al.*, (2019) terdapat kelompok BAL yang hanya menghasilkan metabolit berupa asam laktat saja dan ada yang menghasilkan produk sampingan selain asam laktat. Kelompok BAL yang hanya menghasilkan asam laktat termasuk dalam kelompok BAL homofermentatif, biasanya banyak diaplikasikan sebagai pengawet alami terutama dalam pengawetan makanan. Hal ini dikarena BAL homofermentatif dapat menghasilkan asam laktat dalam jumlah tinggi ( $\pm 90\%$  murni) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan mikroba patogen dalam makanan.

Penelitian mengenai bakteri asam laktat yang menghasilkan senyawa antikapang antara lain Ruggirello *et al.*, (2019), melaporkan bahwa *Lactobacillus fermentum* sebanyak  $10^7$ cfu/ml yang diisolasi dari fermentasi kakao jenis *Forastero* dapat menekan pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* setelah diinkubasi selama 72 jam sebanyak 1 log unit. Penelitian lain mengenai *Lactobacillus fermentum* pada fermentasi biji kakao dilaporkan oleh Romanens *et al.*,(2019) diuji secara *in vivo* dapat menghambat pertumbuhan *Penicillium citrinum* S005 serta *Gibberella moniliformis* S003 yang berpotensi menghasilkan senyawa fumonisin.

## 2.7 Metode Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Identifikasi bakteri asam laktat yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di dasarkan pada karakter fenotip. Acuan yang digunakan adalah ”*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Second Edition; Volume Three-The Firmicutes*” oleh Vos *et al.*, (2009) yang disajikan pada Tabel 2.3

### 2.7.1 Pewarnaan Gram

Visualisasi bakteri asam laktat (BAL) dalam suatu media biasanya seragam, tidak terlihat berbeda, serta transparan atau tidak berwarna. Pada dasarnya BAL termasuk bakteri gram positif yang menghasilkan katalase negatif (Putri *et al.*, 2014). Bakteri gram positif memiliki membran sel dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan gram negatif. Hal ini yang menyebabkan penyerapan warna ungu hasil reaksi antara yodium dan kristal violet lebih maksimal (Cappucino and Welsh, 2017).

Warna ungu yang diserap oleh bakteri gram positif dari reaksi kristal violet dan yodium ditahan oleh lapisan peptidoglikan sehingga saat pencucian dengan alkohol 96% warna ungu tersebut masih tertinggal dan tertahan. Hal inilah yang menyebabkan bakteri gram positif dalam pengamatan menunjukkan warna ungu, sebaliknya pada bakteri gram negatif, lapisan peptidoglikannya tidak mampu mempertahankan warna ungu sehingga warna sel menjadi merah setelah penambahan safranin (Fardiaz, 1992). Genus bakteri asam laktat dapat dibedakan berdasarkan bentuk selnya yang juga dapat teridentifikasi melalui uji pewarnaan gram (Sudarmadji *et al.*, 1989). Genus *Lactobacillus* memiliki sel bervariasi dari



yang panjang dan ramping, batang bengkok hingga pendek dengan formasi rantai umum. Terkadang nampak berkerut saat bereaksi dengan *metylen blue* ketika pewarnaan gram (Hammes and Hertel, 2009). Genus *Pediococcus* selnya berbentuk kokus berpasangan atau tetrad atau bergerombol (Frazier dan Westhof, 1988). Genus *Leuconostoc* selnya berbentuk kokus, tersusun berpasangan atau berbentuk rantai (Ray, 2004). Genus *Streptococcus* biasanya berbentuk bulat atau oval, diameternya kurang dari 2  $\mu\text{m}$ , berbentuk rantai atau berpasangan.

### 2.7.2 Pengujian Katalase

Pada dasarnya BAL merupakan katalase negatif. Penelitian Ibrahim *et al.*, (2015) menunjukkan bahwasanya BAL yang diuji menggunakan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% tidak menghasilkan gelembung yang memberikan indikasi pembentukan gas  $\text{CO}_2$ . Hal tersebut dikarenakan BAL tidak memproduksi enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dan berkaitan dengan kemampuan BAL yang hanya membutuhkan sedikit oksigen untuk hidup (non-oksidatif) atau bakteri anaerob. Sebaliknya, bakteri yang memiliki enzim katalase dapat menguraikan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dan termasuk dalam bakteri aerob. Reaksi penguraian hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dapat menimbulkan gelembung  $\text{CO}_2$  (Cappucino dan Welsh, 2017).

### 2.7.3 Pengujian Produksi Gas $\text{CO}_2$

Berdasarkan sifatnya, BAL dapat di klasifikasikan menjadi dua yaitu heterofermentatif (menghasilkan  $\text{CO}_2$ , asam laktat, asam asetat, dan ethanol) dan homofermentatif (menghasilkan hanya  $\pm 90\%$  asam laktat murni). Spesies dari BAL heterofermentatif, diantaranya *Leuconostoc lactis*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus buchneri*. Spesies dari BAL homofermentatif, diantaranya *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, dan *Lactobacillus acidophilus* (Hutkins *et al.*, 2019).

### 2.7.4 Produksi Dekstran dari Sukrosa

Sebagian besar dekstran merupakan hasil sintesis dari sukrosa oleh enzim dekstransukrase yang disekresikan BAL terutama oleh *Leuconostoc* dan



*Streptococcus* (Naessens *et al.*, 2005). Genus *Leuconostoc* menghasilkan dekstran yang cukup banyak daripada genus BAL yang lain. Suwasono (2005) menyatakan bahwa *Leuconostoc* mampu mendegradasi sukrosa menjadi lendir dekstran, dengan bantuan enzim dekstransukrase. Lendir dekstran yang dihasilkan tidak berperan dalam pertumbuhan sel, tetapi berperan dalam menyesuaikan diri dengan lingkungan hidupnya, seperti kondisi dengan sumber karbon berlebih dalam media pertumbuhannya (>1%). Beberapa contoh genus *Leuconostoc* antara lain *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc lactis* dan *Leuconostoc carnosum* (Llamas *et al.*, 2019).

#### 2.7.5 Pertumbuhan pada Suhu yang Berbeda

Suhu merupakan faktor lingkungan yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan bakteri. Setiap spesies BAL memiliki suhu optimum tumbuh yang berbeda-beda (Budiarti dan Kalsum, 2020). BAL yang hidup optimum pada suhu 15°C antara lain *L. curvatus*, *L. fuchuensis*, *L. graminis*, dan *L. salivarius*. BAL yang hidup optimum pada suhu 37°C antara lain *L. lactis*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, dan *L. fermentum*. BAL yang hidup optimum pada suhu 45°C antara lain *L. acidophilus* dan *L. helveticus*. Vos *et al.*, (2009) menyatakan bahwa BAL dapat hidup pada rentang suhu 2 – 53°C, namun untuk *Lactobacillus* biasanya optimum pada suhu 30 – 40°C, *Leuconostoc* tumbuh optimum pada rentang suhu 10 – 30°C *Pediococcus* tumbuh optimum pada rentang suhu 20 – 30°C, dan *Streptococcus* tumbuh optimum pada rentang suhu 30 – 37°C.

#### 2.7.6 Pertumbuhan pada Konsentrasi NaCl yang Berbeda

Setiap BAL memiliki pertumbuhan optimum pada konsentrasi garam yang berbeda-beda. Hal ini dikarenakan garam atau NaCl merupakan zat yang mampu mempertahankan keseimbangan ion sel sehingga garam menjadi media yang baik untuk menjaga ketahanan hidup isolat BAL. Genus *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* mampu hidup pada konsentrasi garam tinggi hingga 6,5% (b/v). Genus *Lactobacillus* yang tumbuh baik pada konsentrasi 6,5% (b/v) antara lain *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus plantarum*. *Pediococcus* yang tumbuh baik pada konsentrasi garam 6,5 % (b/v), diantaranya *Pediococcus cerevisiae* dan

*Pediococcus halophilus*. *Leuconostoc* yang tumbuh baik pada konsentrasi garam 6,5% (b/v) antara lain adalah *Leuconostoc mesenteroides* dan *Leuconostoc pseudomesenteroides*. BAL yang tidak dapat tumbuh baik pada media dengan konsentrasi garam antara 4 – 6,5% (b/v) adalah genus *Streptococcus* antara lain *Streptococcus lactis* dan *Streptococcus thermophilus* (Vos *et al.*, 2009).

#### 2.7.7 Pertumbuhan pada Karbohidrat yang Berbeda

BAL dapat memfermentasi karbohidrat –monodisakarida maupun disakarida menjadi asam laktat sebagai senyawa yang paling dominan. Beberapa karbohidrat yang dapat dirombak oleh BAL antara lain golongan monosakarida seperti glukosa, fruktosa, dan arabinosa, sedangkan sukrosa dan maltosa termasuk golongan disakarida (Sudarmadji *et al.*, 1989). BAL hanya mampu memfermentasi karbohidrat jenis tertentu saja namun terdapat BAL yang mampu memfermentasi semua karbohidrat antara lain *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, dan *Leuconostoc oenos*.

#### 2.7.8 Kemampuan Memproduksi Asam

Selama proses fermentasi kakao, BAL akan terus merombak semua karbohidrat yang ada pada kakao menjadi asam-asam organik terutama asam laktat. Pertumbuhan BAL akan menghasilkan asam laktat yang akan meningkatkan total asam (Hidayat *et al.*, 2006). Total asam akan menunjukkan banyaknya asam organik yang dihasilkan oleh BAL sehingga mengakibatkan penurunan keasaman atau pH pada media pertumbuhannya. Penurunan pH oleh BAL disebabkan oleh asam laktat yang dihasilkan oleh BAL termasuk asam yang tergolong lemah dan dapat terdisosiasi dengan melepaskan ion hidrogen. Pelepasan ion hidrogen ini akan dapat mengubah keseimbangan larutan sehingga derajat keasaman (pH) pada media pertumbuhannya menjadi rendah (Ray, 2004).

Tabel 2. 3 Acuan Bergey's manual of systematic bacteriology

Bakteri Asam Laktat	Gram	Bentuk Sel	Katalase	CO <sub>2</sub>	Dekstran	Suhu °C			NaCl %		Fermentasi Karbohidrat						Asam Dari Litmus Milk	Amonia Dari Arginin	
						15	37	45	4	6,5	Arb	Fruk	Glu	Mal	Man	Mnt			Suk
<i>L. acidophilus</i>	+	batang	-	+	-	-	+	.	.	+	.	+	+	+	.	.	+	-	-
<i>L. brevis</i>	+	batang	-	+	-	+	+	-	.	-	-	+	+	+	.	+	+	-	+
<i>L. bulgaricus</i>	+	batang	-	-	-	+	-	-	.	.	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. casei</i>	+	batang	-	-	-	+	+	-	.	.	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L. curvatus</i>	+	batang	-	-	-	+	+	-	.	.	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>L. fermentum</i>	+	batang	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	d	.	.
<i>L. plantarum</i>	+	batang	-	-	-	+	+	-	-	-	d	+	+	+	.	+	+	+	-
<i>Leu. citreum</i>	+	kokus	-	-	-	-	+	-	.	.	+	+	+	+	-	+	+	.	.
<i>Leu. dextranicum</i>	+	kokus	.	+	+	.	+	.	d	-	-	+	.	+	d	d	.	+	-
<i>Leu. lactis</i>	+	kokus	.	-	-	.	+	.	d	-	-	+	.	+	d	-	+	+	-
<i>Leu. mesenteroides</i>	+	kokus	.	+	+	.	d	.	+	d	+	+	.	+	+	d	.	+	-
<i>P. acidilactici</i>	+	kokus	-	.	.	-	-	+	+	+	d	+	+	+	d	.	.	.	.
<i>P. halophilus</i>	+	kokus	-	.	.	-	+	+	-	+	.	d	.	+	+	.	d	+	+
<i>S. faecium</i>	+	kokus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+
<i>S. thermophilus</i>	+	kokus	-	+	.	-	-	+	-	-	.	+	+	+	d	.	.	.	.

Keterangan :

Tanda : (+) = positif, (d) = >90% positif, (-) = negatif, (.) = tidak diketahui

Singkatan : (Arb) = Arabinosa; (Fruk) = Fruktosa; (Glu) = Glukosa; (Mal) = Maltosa; (Man) = Manosa; (Mnt) = Manitol; (Suk) = Sukrosa (Vos et al., 2009).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Perkebunan Kakao Rakyat di Desa Jambewangi, Kecamatan Sempu, Kabupaten Banyuwangi dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2020 sampai Mei 2021.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan untuk fermentasi dan peralatan untuk analisis. Peralatan yang digunakan dalam fermentasi meliputi tabung fermentor, pisau, timbangan, dan keranjang. Peralatan yang digunakan untuk analisis meliputi, Hand pH meter (Hanna, Italia), termometer, alat-alat gelas dan kaca, neraca analitik (Sartorius BSA224S, Jerman), *cutter*, *hot plate* (Ika c-mag hs 7, Jerman), *laminar air flow* (Crumair 9005FL, Spanyol), autoklaf (Hirayama, Jepang), *colony counter* (Stuart Scientific, Shanghai), mikroskop (Selecta, Turki), jangka sorong, kertas saring, mikropipet, inkubator (Heraeus b6200, Inggris), *vortex*, *bluetip*, *yellowtip*, ose, ependorf, buret, spektrofotometer (Thermo scientific genesys 10 s, China), *micro-centrifuge* (Thermo scientific CL 21R, China) dan oven (Memmert UN 55, Jerman).

#### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi biji kakao jenis lindak (*bulk*) yang diperoleh dari Perkebunan Kakao Rakyat Jambewangi Banyuwangi, *Saccharomyces cerevisiae* komersil (Mauripan, Instant Dry Yeast, AB(Harbin) Food Ingredient Co Ltd, China diimpor oleh PT. Jaya Fermex-Jakarta), *Lactobacillus caseii* komersil dari minuman Yakult (PT. Yakult Indonesia Persada, Mojokerto), aquades, media de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS-A, Merck 110660.0500), de Man Rogosa Sharpe Broth (MRS-B, Merck 110661.0500), Malt Extract Agar (MEA, Merck 105.398), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, NaCl, CaCO<sub>3</sub>, HCl 37%, NaOH,



indikator pp, Pepton Glucose Yeast Broth (PGY-B), methanol, ethanol 96%, kristal violet, safranin, mordan, minyak imersi, dan spiritus.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 2 faktor. Faktor pertama merupakan jenis starter yang digunakan dan faktor kedua merupakan lama waktu fermentasi yang digunakan. Pada masing-masing perlakuan dilakukan pengujian sebanyak 3 kali. Perlakuan jenis starter terdapat 4 taraf yaitu kontrol (K), 1% *S. cerevisiae* komersil (Sc), 1% *L. casei* komersil (Lc), dan masing-masing 0,5% *S. cerevisiae* komersil dan *L. casei* komersil (ScLc), serta perlakuan lama waktu fermentasi terdiri dari 5 taraf yaitu 0(T<sub>0</sub>), 24(T<sub>1</sub>), 48(T<sub>2</sub>), 72(T<sub>3</sub>), dan 96(T<sub>4</sub>) jam. Hasil perlakuan diuji karakteristik mikrobiologisnya. Formulasi fermentasi kakao dapat dijelaskan sebagai berikut.

Faktor A	Faktor B
K : kontrol	T <sub>0</sub> : 0 jam
Sc : 1% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> komersil	T <sub>1</sub> : 24 jam
Lc : 1% <i>Lactobacillus casei</i> komersil	T <sub>2</sub> : 48 jam
ScLc : 0,5% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dan 0,5% <i>Lactobacillus casei</i> komersil	T <sub>3</sub> : 72 jam
	T <sub>4</sub> : 96 jam

Perlakuan dari konsentrasi dan lama fermentasi kakao dengan *S. cerevisiae* dan *L. casei* komersil disajikan pada Tabel 3.1

Tabel 3. 1 Perlakuan konsentrasi dan lama fermentasi

S	T				
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
<b>K</b>	KT <sub>0</sub>	KT <sub>1</sub>	KT <sub>2</sub>	KT <sub>3</sub>	KT <sub>4</sub>
<b>Sc</b>	ScT <sub>0</sub>	ScT <sub>1</sub>	ScT <sub>2</sub>	ScT <sub>3</sub>	ScT <sub>4</sub>
<b>Lc</b>	LcT <sub>0</sub>	LcT <sub>1</sub>	LcT <sub>2</sub>	LcT <sub>3</sub>	LcT <sub>4</sub>
<b>ScLc</b>	ScLcT <sub>0</sub>	ScLcT <sub>1</sub>	ScLcT <sub>2</sub>	ScLcT <sub>3</sub>	ScLcT <sub>4</sub>

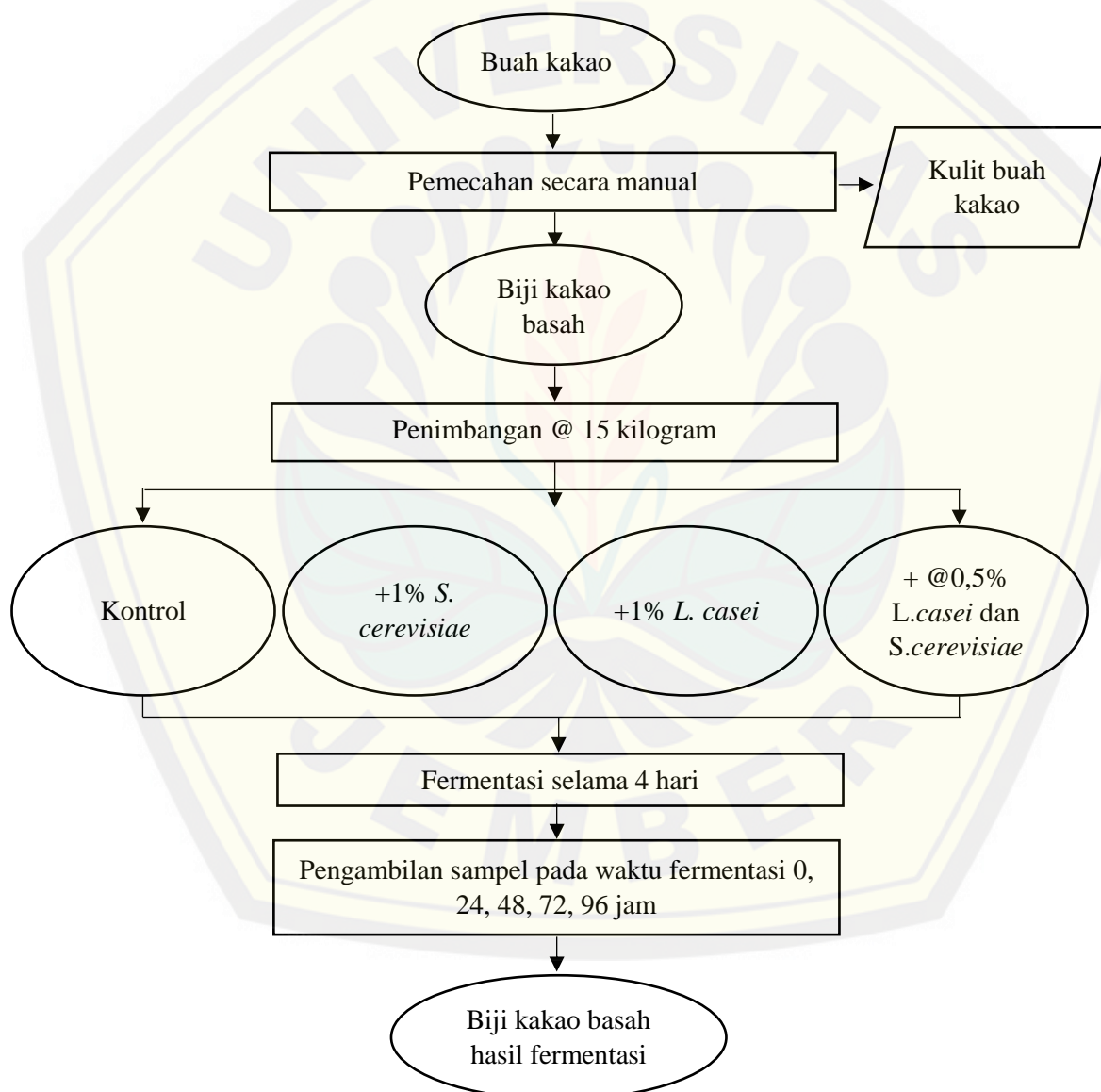
### 3.4 Tahap Penelitian

#### 3.4.1 Fermentasi Biji Kakao

Penelitian diawali dengan melakukan pengambilan sampel kakao rakyat dari perkebunan Jambewangi, Banyuwangi. Kakao yang didapat di pecahkan secara manual untuk mendapatkan biji kakao. Pemecahan biji kakao dilakukan secara



cepat setelah kakao dipanen dari kebun. Pemecahan kakao memerlukan waktu sekitar 1 hingga 2 jam. Biji kakao basah ditimbang 15 kg untuk setiap perlakuan. Terdapat empat taraf yaitu kontrol, penambahan 1% *S. cerevisiae* komersil, 1% *L. casei* komersil, dan penambahan 0,5% *S. cerevisiae* komersil + 0,5% *L. casei* komersil. Pada taraf terakhir dilakukan penambahan *S. cerevisiae* komersil pada jam ke 0, kemudian ditambahkan *L. casei* komersil pada jam ke 24. Penambahan 1% (b/v) starter komersil berdasarkan pada penelitian Putri dan Wartini (2016). Diagram alir proses fermentasi biji kakao disajikan pada Gambar 3.1



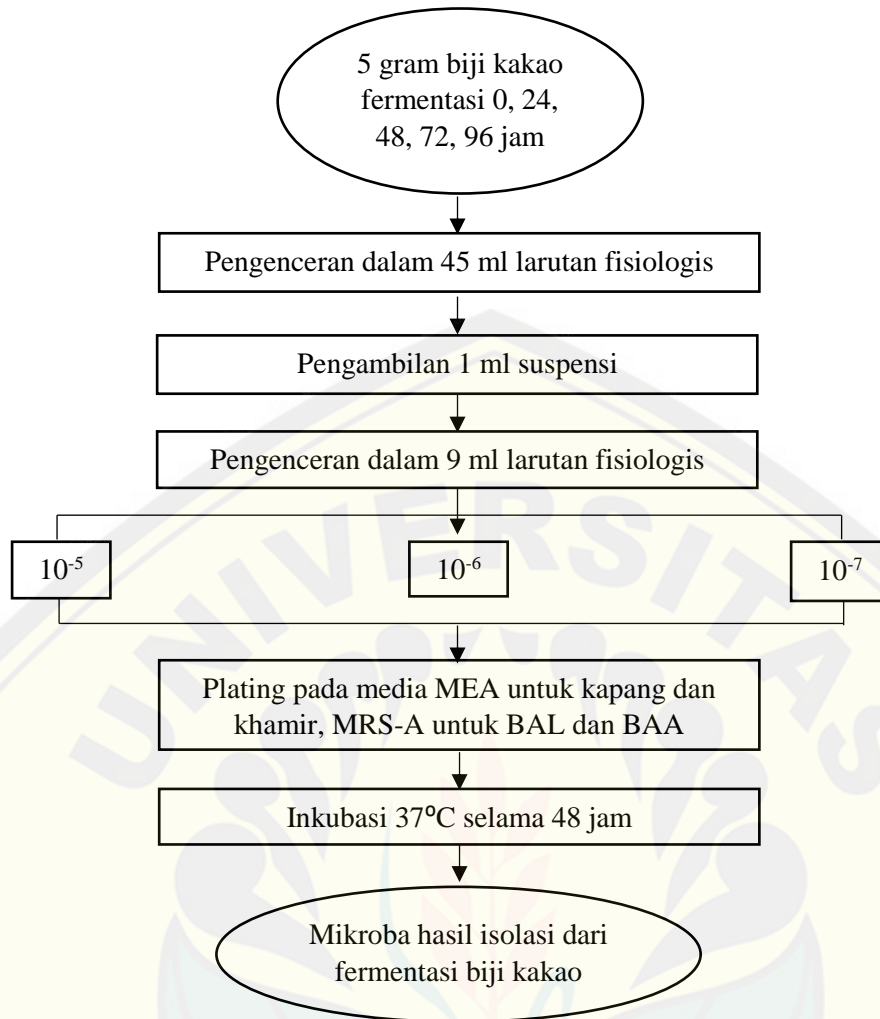
Gambar 3. 1 Proses fermentasi biji kakao rakyat di Banyuwangi

Starter komersil BAL yang digunakan merupakan *L. casei* dari minuman Yakult yang diproduksi oleh PT. Yakult Indonesia Persada. Minuman tersebut mengandung 6,5 milyar sel *L.casei* dalam 65 ml, sehingga *L.casei* yang digunakan adalah sebesar  $\pm 1.500$  milyar sel untuk 150ml starter yang digunakan. Starter komersil khamir menggunakan ragi *S.cerevisiae* yang diproduksi Mauripan, Instant Dry Yeast, AB(Harbin) Food Ingredient Co Ltd, China diimpor oleh PT. Jaya Fermex-Jakarta. Starter tersebut berbentuk bubuk digunakan sebanyak 150 gram yang dilarutkan dalam 150 ml air. 1 gram bubuk ragi mengandung 1,5 milyar sel *S.cerevisiae* sehingga *S.cerevisiae* yang digunakan adalah sebesar  $\pm 225$  milyar sel.

Pada fermentasi digunakan alat tabung fermentor yang mempunyai ukuran panjang 49 cm dan diameter 43 cm dengan ketebalan 3 cm berbentuk tabung berbahan kayu. Lubang aerasi terdapat pada bagian kanan dan kiri alat dengan diameter sekitar 1 cm, jarak antar lubang aerasi berkisar 3 – 4 cm, dengan kapasitas 15 kg per ruang. Fermentasi dilakukan selama masing-masing 4 hari dan dilakukan pengadukan selama 24 jam sekali agar fermentasi merata. Pengambilan sampel dilakukan pada 0, 24, 48, 72, dan 96 jam kemudian dilakukan pengujian biji basah yaitu pH, suhu, dan uji mikrobiologis.

#### 3.4.2 Isolasi Mikroba Hasil Fermentasi Biji Kakao

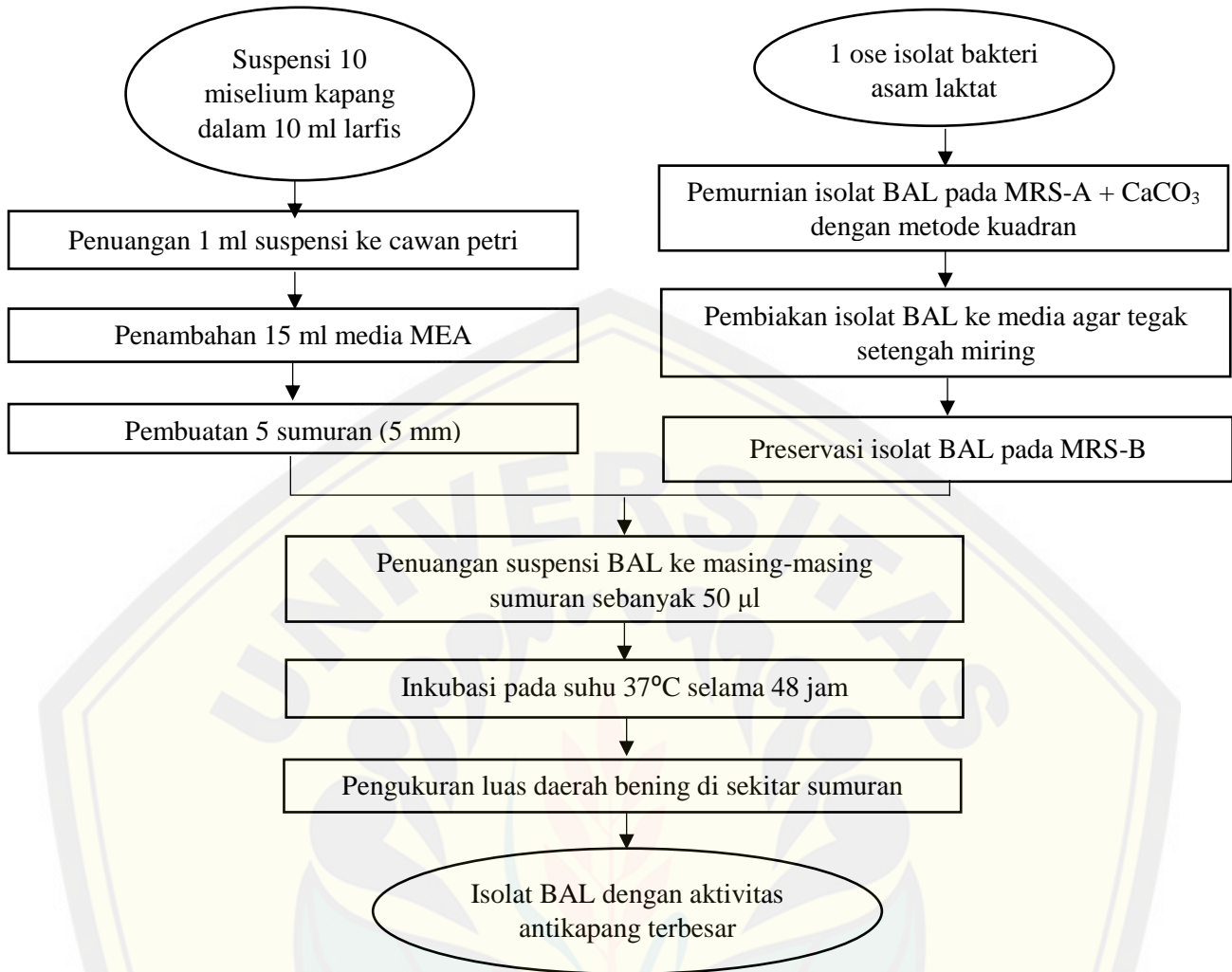
Isolasi mikroba hasil fermentasi biji kakao dilakukan berdasarkan penelitian Ardhana dan Fleet (2003). Diagram alir proses isolasi mikroba fermentasi biji kakao disajikan pada Gambar 3.2. Sebanyak 5 gram biji kakao beserta pulpnya diencerkan dalam 45 ml larutan fisiologis. Sampel yang diambil berdasarkan pada faktor T penelitian yaitu lama waktu fermentasi. Selanjutnya pengenceran dilakukan dengan mengambil 1ml suspensi sampel pada 9 ml larutan fisiologis sampai  $10^{-7}$ . Tiga pengenceran terakhir yaitu  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-7}$  di plating. Metode yang digunakan dalam isolasi mikroba adalah metode pour plate atau metode tuang. Media yang digunakan ada dua macam yaitu MEA untuk pertumbuhan kapang dan khamir, serta MRS-A +  $\text{CaCO}_3$  untuk pertumbuhan bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Media dituang dan dibiarkan memadat. Setelah memadat diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam dalam posisi terbalik. Mikroba hasil fermentasi biji kakao dilakukan perhitungan populasi, pengujian antikapang, dan identifikasi BAL.



Gambar 3. 2 Isolasi mikroba fermentasi biji kakao rakyat di Banyuwangi

### 3.4.3 Pengujian Antikapang oleh Bakteri Asam Laktat

Isolat BAL dilakukan dengan memilih 10 koloni yang memiliki area bening terbaik untuk dimurnikan dengan cara menggoreskan kembali isolat BAL tersebut pada media MRS-A + CaCO<sub>3</sub> 1 % dengan goresan kuadran. Isolat BAL yang telah digores kuadran diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat BAL tunggal hasil pemurnian dikembangkan pada media agar tegak setengah miring. Pembiakan isolat pada media agar tegak setengah miring dilakukan dengan menusuk dan menggoreskan 1 ose isolat BAL ke dalam 7 ml media MRS-A yang telah memadat. Isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Isolat dilakukan preservasi dahulu untuk diidentifikasi kemampuan kerja antikapangnya.



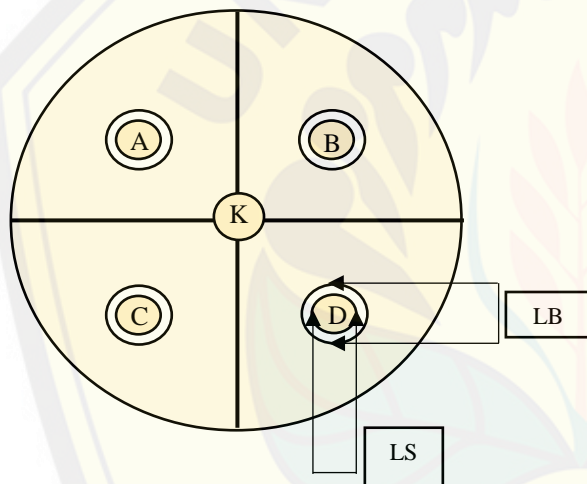
Gambar 3. 3 Pengujian kemampuan antikapang oleh BAL

Metode preservasi BAL berdasarkan pada Suardana et al., (2007). Preservasi isolat dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose kultur koloni tunggal dari media agar tegak setengah miring ke dalam tabung ependorf berisi 2 ml MRS-B, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu inkubator 37<sup>0</sup>C. Preservasi BAL dilakukan agar mengoptimalkan kondisi isolat BAL saat diujikan. BAL yang diujikan sebanyak 10 BAL dominan yang hidup pada cawan petri hasil isolasi.

Kapang yang diujikan adalah kapang yang tumbuh dominan selama fermentasi biji kakao. Pengujian kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur atau well diffusion method (Magnusson, 2003). Caranya dengan menginokulasi 10 ose miselium kapang ke dalam 10 ml aquades steril. Setelah itu dimasukkan ke dalam cawan petri masing-



masing 1 ml, kemudian dituang 15 ml MEA yang sebelumnya sudah dicairkan, digoyang-goyangkan hingga tercampur antara media dan suspensi kapang. Pengujian kemampuan antikapang oleh BAL disajikan pada Gambar 3.3 Sumuran berdiameter 5mm dibuat dengan menggunakan *bluetip* steril yang dipotong ujungnya, sebanyak 5 lubang (empat lubang uji dan satu sumuran sebagai kontrol berisi MRS-B saja) yang mengelilingi cawan petri. Selanjutnya sebanyak 50  $\mu$ l suspensi kultur BAL dituangkan ke dalam masing-masing sumur dan dibiarkan terdifusi ke dalam agar selama 3 – 4 jam pada suhu ruang. Setelah itu diinkubasi secara aerobik pada suhu 37°C selama 48 jam, tanpa dibalik. Pengamatan kemampuan kerja antikapang diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05mm. Ilustrasi pengukuran diameter penghambatan pertumbuhan kapang oleh isolat BAL disajikan pada Gambar 3.4



Keterangan :

LB : Luas area bening

LS : Luas area sumuran

K : Kontrol (lubang sumuran berisi MRS-B)

A, B, C, dan D : Luas area bening oleh isolat BAL

Gambar 3. 4 Ilustrasi pengukuran diameter penghambatan pertumbuhan kapang oleh isolat BAL

#### 3.4.4 Pengeringan Biji Kakao

Pengeringan biji kakao berdasarkan pada penelitian Apriyanto *et al.*, (2017) dengan beberapa modifikasi. Biji kakao basah yang diambil setiap jam perlakuan dikeringkan selama 5 hari untuk mendapatkan biji kakao kering. Pengeringan dilakukan menggunakan sinar matahari langsung dengan keranjang plastik berlubang. Biji kakao diaduk dan dibalik agar kering merata. Penjemuran diakhiri ketika diduga tidak ada kandungan air lagi dan biji kakao terlihat berwarna coklat



atau cokelat merah. Setiap sampel kering ditimbang sebanyak 100 gram untuk pengujian *cut test* dan indeks fermentasi.

### 3.5 Parameter Pengamatan

Parameter pada penelitian ini meliputi pengukuran pH (SNI 2323:2008), pengukuran suhu (Mulato *et al.*, 2005), pengujian *cut test* (Mulato *et al.*, 2005), analisis indeks fermentasi (Gourieva dan Tserevitinov, 1979), pengujian populasi total mikroba (Biological Analytical Method, 2001), perhitungan luas area bening pada uji kemampuan kerja antikapang oleh isolat bakteri asam laktat (Magnusson, 2003), dan Identifikasi BAL secara fenotip (Cappucino dan Welsh, 2017; dan Cahyaningsih, 2006).

### 3.6 Prosedur Analisis

#### 3.6.1 Pengukuran pH

Pengukuran nilai pH sampel biji kakao basah menggunakan pH meter. Sebelum melakukan pengukuran, pH meter dikalibrasi dengan larutan buffer pH 7, demikian pula elektroda dibilas dengan aquades 50 ml dalam gelas beaker. Selanjutnya aquades ditambahkan hingga volumenya mencapai 100 ml dan diaduk hingga rata. Larutan diukur pHnya menggunakan pH meter yang sudah distandarisasi sebelumnya menggunakan larutan buffer pH 4 kemudian buffer pH 7. Elektroda dibilas dengan aquades, dimasukkan ke dalam larutan sampel. Sampel yang digunakan berupa biji kakao basah sebanyak 5 gram yang dilarutkan dengan 100 ml aquades. Angka yang ditunjukkan oleh pH meter dicatat, elektroda dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan tisu. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali.

#### 3.6.2 Pengukuran Suhu

Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer. Prinsip kerja termometer didasarkan pada naik atau turunnya cairan pengisi air raksa berwarna merah didalam kaca dan panjang garis merah menunjukkan skala suhu. Sebelum melakukan pengukuran termometer dipastikan bersih dan dimasukkan dalam sampel yaitu pada 9 titik lokasi tumpukan kakao yang berbeda dan ditunggu hingga

garis merah berhenti sempurna. Angka yang ditunjukkan oleh termometer dicatat, termometer dibersihkan menggunakan tisu. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali.

### 3.6.3 Pengujian *Cut Test*

Pengujian *cut test* dilakukan dengan cara mengamati secara subjektif perubahan warna biji kakao kering menggunakan indra penglihatan. Sampel yang digunakan merupakan biji kakao kering utuh sebanyak 100 biji. Biji kakao dibelah menggunakan *cutter* membujur tepat dibagian tengah sama besar. Biji yang sudah dibelah diamati satu persatu keping untuk dibedakan berdasarkan klasifikasinya. Terdapat tiga klasifikasi yaitu biji *non-fermented*, *under fermented*, dan *fermented*. Biji *non-fermented* ditandai dengan biji berwarna abu-abu keunguan, biji *under-fermented* ditandai dengan biji *slaty* berwarna ungu kecoklatan, dan biji *fermented* ditandai dengan biji berwarna coklat dominan. Hasil dari pengujian dihitung persentasenya berdasarkan rumus berikut. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

$$\% \text{ Biji } \textit{non-fermented} = \sum \frac{\text{biji berwarna abu-abu}}{\text{belahan total biji kakao}}$$

$$\% \text{ Biji } \textit{under fermented} = \sum \frac{\text{biji berwarna ungu}}{\text{belahan total biji kakao}}$$

$$\% \text{ Biji } \textit{fermented} = \sum \frac{\text{biji berwarna coklat}}{\text{belahan total biji kakao}}$$

### 3.6.4 Analisis Indeks Fermentasi

Penetapan indeks fermentasi dilakukan dengan pengukuran absorbansi larutan. Keping biji kakao kering dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Bubuk kakao ditimbang sebanyak 0,5 gram untuk dilarutkan dengan campuran metanol dan HCl 37% dengan perbandingan 97 : 3 sebanyak 50 ml. Larutan biji kakao dihomogenisasi selama 5 menit. Larutan disimpan pada suhu 4°C selama 20 jam. Setelah 20 jam larutan disaring menggunakan kertas saring dan hasilnya diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 460nm dan 530nm. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali. Perhitungan indeks fermentasi ditetapkan sebagai berikut.

$$\text{Indeks fermentasi} = \frac{\lambda 460}{\lambda 530}$$

### 3.6.5 Perhitungan Populasi Mikroba (*Total Plate Count*)

Aktivitas mikrobiologis dapat diamati dari perubahan yang berlangsung pada hasil fermentasi biji kakao basah yaitu jumlah kuantitatif total khamir, total bakteri asam laktat, total bakteri asam asetat dan total kapang,. Pengujian aktivitas mikrobiologis sampel dilakukan dengan mengencerkan sampel terlebih dahulu. Biji kakao basah ditimbang sebanyak 5 gram dilarutkan ke dalam 45 ml larutan fisiologis dan di homogenkan selama 2 menit. Larutan ini merupakan larutan dengan pengenceran  $10^{-1}$ . Sebanyak 1 ml suspensi diambil menggunakan mikropipet dan *bluetip* dilarutkan dalam larutan 9 ml NaCl 0,85%. Pengenceran dilakukan hingga mencapai pengenceran  $10^{-7}$  dengan cara yang sama. Tiga pengenceran terakhir yaitu  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ , dan  $10^{-7}$  di plating. Suspensi diambil 1 ml dituangkan pada media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba yang dianalisis dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

Total bakteri asam laktat (BAL) dan bakteri asam asetat (BAA) ditumbuhkan menggunakan media *de Man Rogosa Agar* (MRS-A), sedangkan untuk kapang dan khamir menggunakan media *Malt Extract Agar* (MEA). Setelah 48 jam diamati pertumbuhan mikroba. Total mikroba dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut.

$$N = \frac{\Sigma c}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times (d)]}$$

Keterangan :

N = jumlah koloni per ml atau g sampel

$\Sigma c$  = jumlah koloni tiap cawan

$n_1$  = jumlah cawan pada pengenceran seri pertama

$n_2$  = jumlah cawan pada pengenceran seri kedua

d = tingkat pengenceran seri pertama

### 3.6.6 Pengujian Daya Hambat Antikapang

Kemampuan kerja antikapang oleh isolat BAL dapat diamati dengan cara mengukur luas area penghambatannya terhadap kapang menggunakan jangka sorong ketelitian 0,05mm. 10 isolat BAL yang dipilih merupakan isolat dengan zona bening berdiameter antara 2 – 3cm. Pengukuran luas area penghambatan

kapang oleh isolat bakteri asam laktat (L) adalah sama dengan luas area bening (LB) dikurangi luas sumuran yaitu 5 mm (LS). Hasil pengukuran terluas diambil 3 terbesar untuk diuji identifikasi fenotipnya. Secara matematis luas area penghambatan kapang oleh isolat BAL (L) dapat dihitung sebagai berikut:

$$\text{Luas area penghambatan (L)} = \text{Luas area bening (LB)} - \text{Luas sumuran (LS)}$$

### 3.6.7 Identifikasi BAL Secara Fenotipik

#### a. Pewarnaan gram (Cappucino dan Welsh, 2017)

Isolat segar diambil menggunakan jarum ose secara aseptik. Isolat tersebut dicampurkan dengan 2 tetes aquades steril di atas kaca preparat dan dilakukan fiksasi. Pewarnaan bakteri asam laktat dilakukan dengan cara meneteskan larutan kristal violet sebanyak 2-3 tetes ke isolat yang sudah menempel di kaca preparat dan didiamkan selama 1 menit. Pembilasan dilakukan menggunakan air dan ditetesi yodium sebanyak 2-3 tetes didiamkan selama 3 menit. Isolat ditetesi dengan alkohol 96% dan didiamkan 1 menit lalu ditetesi 2-3 tetes safranin dan dibiarkan hingga warnanya menyerap. Ketika warna telah menyerap dibilas, dikering anginkan, dan diberi minyak imersi. Kaca preparat diberi kaca d-glass untuk mempermudah pengamatan di mikroskop. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x guna mengamati sel dan bentuk bakteri. Warna isolat merah termasuk dalam bakteri gram negatif, sedangkan warna ungu termasuk dalam bakteri gram positif yang merupakan ciri umum dari BAL.

#### b. Uji katalase (Cappucino dan Welsh, 2017)

Satu ose isolat BAL berumur 48 jam dioleskan pada objek glass, di atasnya ditetesi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % dan didiamkan selama kira-kira 1 menit. Jika terjadi gelembung, maka isolat tersebut termasuk dalam bakteri katalase positif (aerob), sedangkan jika tidak terjadi gelembung maka isolat BAL tersebut termasuk bakteri katalase negatif (anaerob) yang merupakan ciri umum dari BAL.

#### c. Uji produksi CO<sub>2</sub> menggunakan agar tusuk (Cappucino dan Welsh, 2017)

Satu isolat BAL diinokulasikan pada media MRS-A dalam tabung reaksi dengan ukuran yang seragam. Isolat tersebut ditusukkan ke media agar tegak setengah



miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Dilakukan pengamatan ada tidaknya gas CO<sub>2</sub> yang dihasilkan oleh isolat tersebut. Kultur BAL yang memproduksi gas dapat dilihat dari tingginya media agar tegak yang terdorong gas CO<sub>2</sub> yang merupakan ciri dari kelompok BAL heterofermentatif, apabila tidak memproduksi gas maka termasuk ke dalam kelompok BAL homofermentatif.

d. Uji produksi dekstran dari sukrosa (Cappucino dan Welsh, 2017)

Satu ose isolat BAL diinokulasi dalam tabung ependorf berisi 1-1,5 ml MRS-B diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diambil 0,1 ml kultur BAL dan diinokulasikan ke dalam cawan petri steril, lalu dituangkan 10 ml sukrosa agar dan diratakan. Inkubasi isolat BAL dengan posisi cawan terbalik pada suhu 37°C selama 5 hari. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya produksi lendir dekstran dari sukrosa pada cawan yang berarti isolat tersebut genus *Leuconostoc*. Jika tidak memproduksi dekstran maka bakteri asam laktat tersebut tidak termasuk jenis *Leuconostoc* meskipun ada sebagian dari spesies *Leuconostoc* tidak mampu memproduksi dekstran dari sukrosa, antara lain *Leu. paramesenteroides*, *Leu. oenos*, *Leu. Lactis* dan *Leu. cremoris*.

e. Uji pertumbuhan pada suhu yang berbeda (Cappucino dan Welsh, 2017)

Satu ose isolat BAL diinokulasikan pada media MRS-B sebanyak 2 ml diinkubasi selama 48 jam pada suhu yang berbeda 15°C (lemari es), 37°C dan 45°C. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas.

f. Uji penumbuhan pada konsentrasi garam berbeda (Cappucino dan Welsh, 2017)

Konsentrasi garam (NaCl) yang digunakan terdiri dari NaCl 4 %, NaCl 6,5 % dan kontrol (tanpa penambahan garam). Masing-masing konsentrasi garam tersebut ditambah 30 ml MRS-B dan disterilisasi. Selanjutnya media tersebut dimasukkan ke dalam tabung ependorf steril sebanyak 2 ml dan diinokulasi dengan 50 µl isolat. Inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pertumbuhan isolat ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas.



g. Uji kemampuan fermentasi berbagai jenis karbohidrat (Cahyaningsih, 2006)

Satu ose isolat BAL diinokulasi ke dalam 2 ml media PGY-B yang dimodifikasi. Glukosa yang digunakan kedalam PGY-B diganti dengan karbohidrat yang diujikan terdiri dari arabinosa, fruktosa, glukosa, maltosa, manitol, manosa, dan sukrosa. Isolat diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C sampai menimbulkan reaksi positif ditandai dengan adanya kekeruhan, endapan dan gas.

h. Uji produksi asam (Cahyaningsih, 2006)

Satu ose isolat BAL diinokulasi ke dalam tabung ependorf berisi 2 ml MRS-B diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Analisis produksi asam dilakukan dengan mengambil sejumlah media MRS-B yang telah ditumbuhi oleh isolat secara aseptis, kemudian diukur tingkat keasaman (pH) menggunakan pH meter. Setelah dilakukan pengukuran menggunakan pH meter dilanjutkan dengan menggunakan metode titrasi asam-basa sebagai data pembanding. Media MRS-B yang telah ditumbuhi oleh isolat tersebut disentrifuse selama 10 menit, yang bertujuan untuk memisahkan sel isolat dari hasil metabolit (padatan tidak terlarut). Sebanyak 1 ml supernatan hasil sentrifuse diencerkan dalam 9 ml aquades, lalu ditambah 2-3 tetes indikator fenolftalin 1 % dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,01 N sampai titik akhir titrasi tercapai, yaitu terbentuk warna merah muda dan tidak memudar lagi (tetap). Jumlah ml NaOH yang digunakan setara dengan jumlah total asam laktat yang dihasilkan oleh isolat. Total asam dihitung sebagai persen asam laktat dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 0,09 \times \text{pengenceran}}{\text{ml sample}} \times 100\%$$

### 3.7 Analisis Data

Data yang didapat diolah menggunakan program *Microsoft Excel 2013*. Penyajian data disusun dalam bentuk tabel dan dimuat dalam bentuk diagram histogram yang menunjukkan hubungan antara waktu dan variabel yang diamati. Data identifikasi BAL secara fenotip diolah menggunakan metode deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel sehingga mempermudah analisa.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* komersil pada fermentasi biji kakao rakyat menggunakan tabung fermentor berpengaruh terhadap karakteristik mikrobiologisnya. Perlakuan terbaik ada pada kombinasi penambahan bertahap *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* dengan nilai pH pada jam ke-96 mencapai 4,73 dan suhu 39,9°C. Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan tersebut dapat mempercepat proses fermentasi dengan minimal pH <5,0 dan suhu optimum mencapai ≤40°C.

Pada uji belah dan indeks fermentasi, perlakuan terbaik ada pada kombinasi penambahan bertahap *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* dengan nilai biji terfermentasi sempurna pada jam ke-96 mencapai 94%. Hal tersebut dapat dibuktikan pula dengan nilai objektif pengujian indeks fermentasi yang mencapai 1,201. Total mikroba fermentasi biji kakao rakyat mengindikasikan bahwa fermentasi berjalan dengan baik dengan nilai total populasi khamir sebesar 7,65 log<sub>10</sub> cfu/g dan total populasi BAL sebesar 9,67 log<sub>10</sub> cfu/g.

Bakteri asam laktat yang dominan tumbuh pada fermentasi biji kakao rakyat Desa Jambewangi, Kecamatan Sempu, Kabupaten Banyuwangi yang memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antikapang diduga antara lain *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, dan *L. fermentum*. Isolat BAL terduga *L. casei* dan *L. fermentum* dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus niger*.

### 5.2 Saran

Biji kakao rakyat Desa Jambewangi, Kecamatan Sempu, Kabupaten Banyuwangi terfermentasi starter *Saccharomyces cerevisiae* dan *Lactobacillus casei* komersil menggunakan tabung fermentor perlu dilakukan identifikasi lanjutan untuk mengetahui karakteristik kimianya sehingga didapatkan kepastian mutu yang baik. Isolat BAL terduga *L. casei* dan *L. fermentum* perlu dilakukan identifikasi lanjutan sehingga dugaan lebih diperjelas keabsahannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afoakwa, E. O., Budu, A. S., Mensah-Brown, H., Takrama, J. F., dan Akomanyi, E. 2014. Changes In Biochemical And Physico-Chemical Qualities During Drying Of Pulp Preconditioned And Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *Journal of Nutritional Health and Food Science*, 2(1); 1-8.
- Akhiriani, S., Susijahadi, S., Djumarti, D., & Wahyudi, T. 2018. The effect of the addition of yeast isolates on the colour differentiation in cocoa beans during the fermentation. *UNEJ e-Proceeding*, 196-205.
- Akinfala, T. O., Houbraken, J., Sulyok, M., Adedeji, A. R., Odebode, A. C., Krska, R., & Ezekiel, C. N. 2020. Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria. *International journal of food microbiology*, 316, 108490.
- Alamsyah, T. S., dan Naibaho, P. 1991. Pengaruh Pengempaan Sebelum Fermentasi, Pengadukan Dan Waktu Fermentasi Terhadap Mutu Biji Kakao Kering. *Prosiding Konperensi Nasional Kakao III*, 3(1); 109-117.
- Amaria, W., Iflah, T., dan Harni, R. 2014. Dampak Kerusakan Oleh Jamur Kontaminan Pada Biji Kakao Serta Teknologi Pengendaliannya. *Jurnal Balai Penelitian Tanaman Industri Dan Penyegar*.
- Apriyanto, M., Sutardi, S., Supriyanto, S., & Harmayani, E. 2017. Fermentasi Biji Kakao Kering Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae*, *Lactobacillus Lactis*, Dan *Acetobacter Aceti*. *Agritech*, 37(3); 302-311.
- 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(1); 73-91.
- Ardhana, M. M., dan Fleet, G. H. 2003. The Microbial Ecology Of Cocoa Bean Fermentations In Indonesia. *International journal of food microbiology*, 86(1-2); 87-99.
- Badan Pusat Statistika (BPS). 2019. *Kecamatan Sempu Dalam Angka 2019*. Jawa Timur: Badan Pusat Statistika Banyuwangi. [Diakses online 7 Oktober 2020].
- Badan Pusat Statistika (BPS). 2019. *Produksi Kakao Menurut Provinsi 2016-2019*. Jakarta: Badan Pusat Statistika. [Diakses online 7 Oktober 2020].
- Badan Standardisasi Nasional. 2008. Standar Nasional Indonesia (SNI). *SNI 2323:2008 Biji Kakao*. Jakarta: Dewan Standardisasi Indonesia.
- Budiarti, E., Ali, U., dan Kalsum, U. 2020. Pengaruh Suhu dan Lama Pengovenan pada Enkapsulasi *Lactobacillus salivarius* terhadap Kadar Bahan Kering dan Jumlah Bakteri Asam Laktat. *Dinamika Rekasatwa*, 3; 1-2.

- Cahyaningsih, H. 2006. Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Nira Lontar serta Aplikasinya dalam Mereduksi *Salmonella thypimurium* dan *Aspergillus flavus* pada Biji Kakao. *Journal Agriculture*. 48; 3806-3816.
- Cappuccino, J. G., dan Welsh, C. T. 2017. *Microbiology: A laboratory manual*. Pearson Education.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Lemes, D. P., Nakano, F., dan Taniwaki, M. H. 2012. Co-occurrence of ochratoxin A and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*, 26(1); 36-41.
- Corsetti, A., Settanni, L., Van Sinderen, D., Felis, G. E., Dellaglio, F., dan Gobbetti, M. 2005. *Lactobacillus rossii* isolated from wheat sourdough. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1); 35-40.
- da Veiga Moreira, I. M., Miguel, M. G. D. C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., dan Schwan, R. F. 2013. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54(1); 9-17.
- El Ghaouth, A., J. Arul., J. Grenier., dan A. Asselin. 1992. Antifungal Activity of Chitosan on Two Postharvest Pathogens of Strawberry Fruits. *Journal American Phytopathological Society*, 82(4); 398-402.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Fitriyana, F., dan Kurniawan, F. 2015. Polyaniline-invertase-gold nanoparticles modified gold electrode for sucrose detection. *Indonesian Journal of Chemistry*, 15(3); 226-233.
- Frazier, W.C. dan Westhof, D.C. 1988. *Food Microbiology*. Singapore: Mc Graw Hill Book Company.
- Gourieva, K. B., dan Tserevitinov, O. B. 1979. *Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans*. United State of America; USSR patent.
- Hammes, W. P., dan Hertel, C. 2009. *Genus I. Lactobacillus Beijerinck 1901*, 212AL. Bergey's manual of systematic bacteriology, 3; 465-90.
- Hatiningsih, S. 2015. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Senyawa Antikapang Dari Fermentasi Kakao Varietas Forastero di PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Hidayat, N., Padaga, M.C. dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: C.V. Andi Offset.
- Hutkins, R. W. 2019. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. University of Nebraska, USA; IFT Press.
- Ibrahim, A., Fridayanti, A., dan Delvia, F. 2017. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat (BAL) dari buah mangga (*Mangifera indica* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1(2); 159-163.



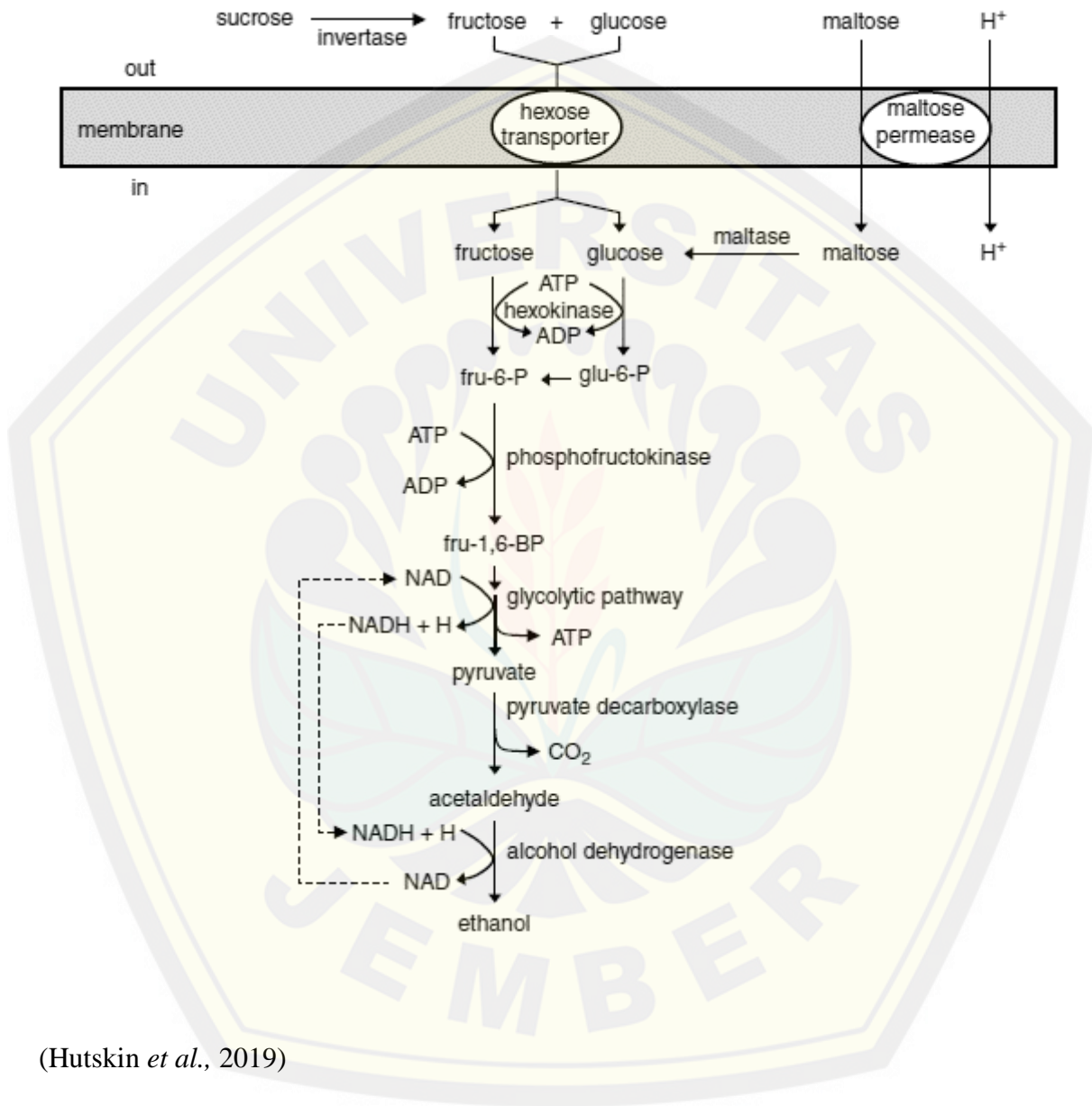
- Isnaini, N.F. 2011. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenous dengan Potensi Antikapang dari Fermentasi Kakao di PTPN XII Kebun Banjarsari, Jember. *Tesis*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Jackson, G. J., R. I. Merker, R. Bandler. 2001. *Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A*. Office of Special Research Skills, CSFSAN: FDA.
- Kadow, D., Niemenak, N., Rohn, S., dan Lieberei, R. 2015. Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.)—Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1); 357-361.
- Kustyawati, M. E., dan Setyani, S. 2012. Pengaruh Penambahan Inokulum Campuran Terhadap Perubahan Kimia Dan Mikrobiologi Selama Fermentasi Coklat. *Jurnal Teknologi & Industri Hasil Pertanian*, 13(2); 73-84.
- Litbang, Pusat Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2017. *Prospek Dan Arah Pengembangan. Agribisnis Kakao. Edisi Kedua*. Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian. Jakarta: Departemen Pertanian.
- Llamas-Arriba, M. G., Puertas, A. I., Prieto, Cobos, M., Miranda, J. I., dan Dueñas, M. T. 2019. Characterization of dextrans produced by *Lactobacillus mali* and *Leuconostoc carnosum*. *Food Hydrocolloids*, 89; 613-622.
- Madigan, M. T., dan Martinko, J. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn. New York; Pearson.
- Magnusson, J. 2003. Antifungal Activity of Lactid Acid Bacteria. *Disertasi*. Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Mulato, S., Widyotomo, S., dan Misnawi, E. S. 2005. Pengolahan produk primer dan sekunder kakao. *Pusat penelitian kopi dan kakao Indonesia*, Jember: Puslit Koka Indonesia.
- Naessens, M., Cerdobbel, A. N., Soetaert, W., dan Vandamme, E. J. 2005. *Leuconostoc dextransucrase* and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8); 845-860.
- Nasution, M. Z., Ciptadi, W., dan Laksmi, B. S. 1976. *Manual for cocoa processing*. Indonesia: Agroindustri Press.
- Othman, A., Mukhtar, N. J., Ismail, N. S., dan Chang, S. K. 2014. Phenolics, flavonoids content and antioxidant activities of 4 Malaysian herbal plants. *International Food Research Journal*, 21(2); 759.
- Paembong, A. 2012. Mempelajari Perubahan Kandungan Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) dari Hasil Fermentasi yang Diberi Perlakuan Larutan Kapur. *Disertasi*. Makassar: Program Pasca Sarjana Universitas Hasanuddin.

- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., dan De Vuyst, L. 2013. *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations. *Food Microbiology*, 35(2); 73-85.
- Patty, A. 2019. Analisis Sifat Fisik Biji Kakao Pada Berbagai Metode Fermentasi Dan Konsentrasi Fermipan. *Jurnal Hutan Pulau-Pulau Kecil*, 3(1); 13-24.
- Putra, G. G., dan Wartini, N. M. 2016. Pengaruh Penambahan Ragi Tape Selama Fermentasi Terhadap Karakteristik Cairan Pulpa Hasil Samping Fermentasi Kakao untuk Produksi Cuka Makan. *Jurnal Ilmiah Teknologi Pertanian Agrotechno*, 1(1); 46-50.
- Putri B.S.P., Suwasono, S., dan Choiron, M. 2014. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Sebagai Anti Kapang Dari Fermentasi Kakao Di Gunung Kidul Yogyakarta. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1); 2-3
- Rahmadi, A., dan Fleet, G. H. 2008. The occurrence of mycotoxigenic moulds in cocoa beans from Indonesia and Queensland, Australia. *In Proceeding of International Seminar on Food Science* 1; 1-18.
- Rasadi, Y. 2015. Karakteristik Fisik dan Kimia Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Hasil Fermentasi Variasi Wadah Kotak Kayu, Krat Plastik dan Daun Pisang di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. *Skripsi*. Universitas Jember.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. Florida: CRC Press LLC.
- Romanens, E., Leischtfeld, S. F., Volland, A., Stevens, M. J., Krähenmann, U., Isele, D., dan Schwenninger, S. M. 2019. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International journal of food microbiology*, 290; 262-272.
- Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., dan Dolci, P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115; 519-525.
- Samah, O. A., Putih, F., dan Selamat, J. 1990. Comparative studies on small scale fermentation of cocoa using *Acetobacter xylinum* and *Saccharomyces cerevisiae* (wild strain). In 15. Malaysian Biochemical Society Conference, Kuala Lumpur (Malaysia), 3-4 Sep 1990. *Persatuan Biokimia Malaysia*.
- Senanayake, M., Jansz, E. R., dan Buckle, K. A. 1997. Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(1); 42-48.
- Suardana, I. W., Suarsana, I. N., Sujaya, I. N., dan Wiryawan, K. G. 2007. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari cairan rumen sapi bali sebagai kandidat biopreservatif. *Jurnal veteriner*, 8(4); 155-159.

- Sudarmadji, S., Kasmidjo, R., Sardjono, Wibowo, D., Margino, S. dan Rahayu, E.S. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.
- Sunanto, H. 1992. *Kakao, Budidaya dan Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonomi*. Jakarta: Kanasius.
- Suwasono, S. 2005. *Bioteknologi Produksi Agen Antikapang Pada Fermentasi Kakao*. Jember: Universitas Jember.
- Tarigan, L., Sitepu, F. E., dan Lahay, R. R. 2014. Respon Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap Pemberian Pupuk Kandang Ayam dan Pupuk Organik Cair. *Jurnal Agroekoteknologi Universitas Sumatera Utara*, 2(4); 102-176.
- Tomi, H. 2020. Pengerinan Kakao Menggunakan Alat Pengerin Photovoltaic Thermal (PV/T). *Disertasi*. Padang, Sumatra Barat: Universitas Andalas.
- Varga, J., Rigó, K., Kocsubé, S., Farkas, B., dan Pál, K. 2003. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. *Research in Microbiology*, 154(8); 593-600.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., dan Whitman, W. B. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science and Business Media.
- Wahyudi, T., Pangabean, T. R., dan Pujiyanto, P. 2008. *Panduan Lengkap Kakao Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Walker, R. 2002. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *In Mycotoxins and food safety*. Boston; Springer. 1; 249-255.
- Wangge, E. S. A., Suprpta, D. N., dan Wirya, G. N. A. S. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Jamur Penghasil Mikotoksin Pada Biji Kakao Kering Yang Dihasilkan Di Flores. *Journal of Agricultural Science and Biotechnology*.
- Wood, G. A. R., dan Lass, R. A. 1989. *Cocoa: Tropical Agricultural series* (eds.) John Wiley and Sons. Inc. New York, 265-383.
- Ziegleder, G. 2009. Flavour development in cocoa and chocolate. *Industrial Chocolate Manufacture And Use*, 4; 169-191.

**Lampiran 2.5 Proses Metabolisme Khamir dan BAL**

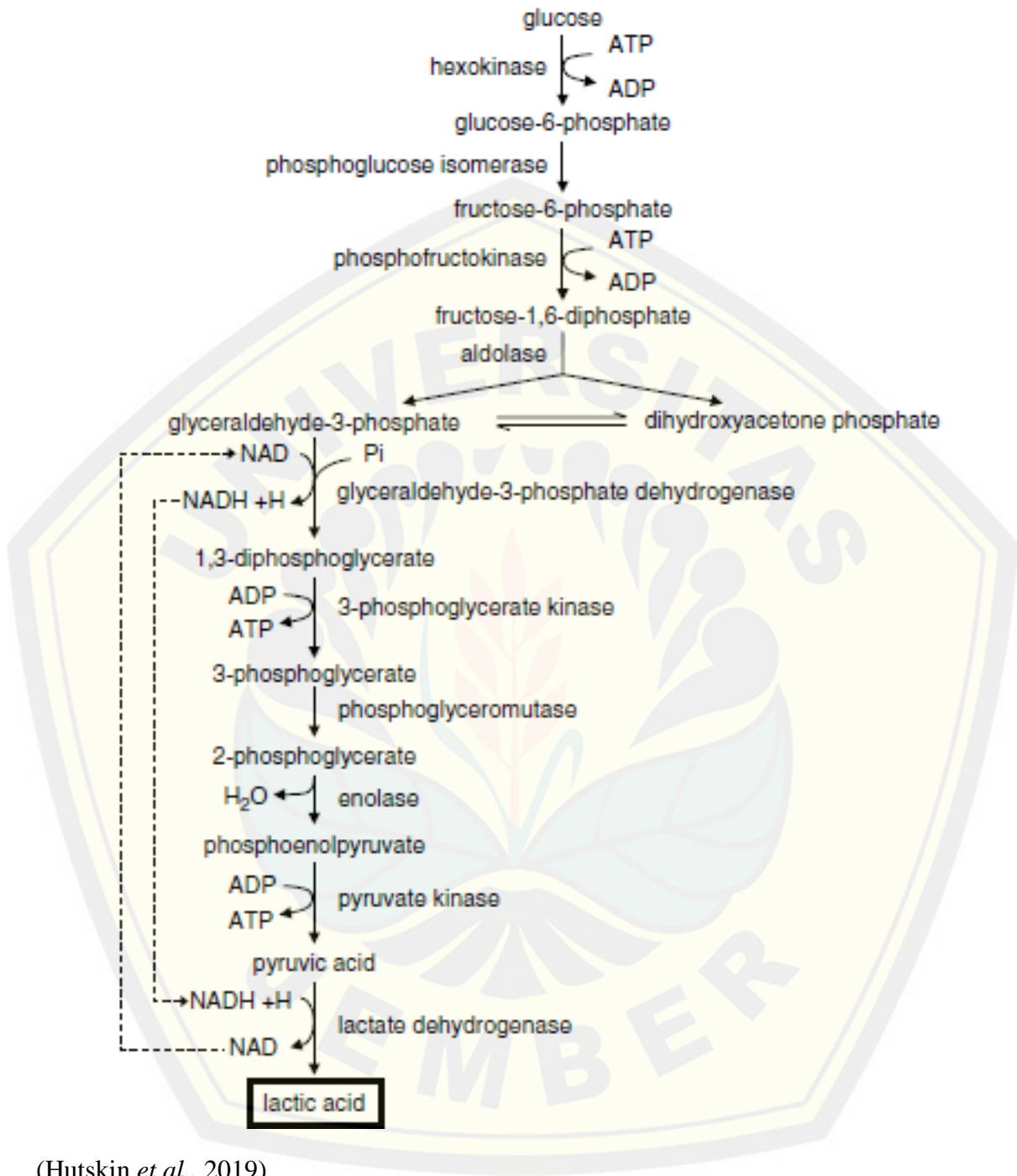
2.5a Jalur metabolisme khamir *Saccharomyces cerevisiae* dalam memetabolisme gula *pulp* kakao



(Hutskin *et al.*, 2019)

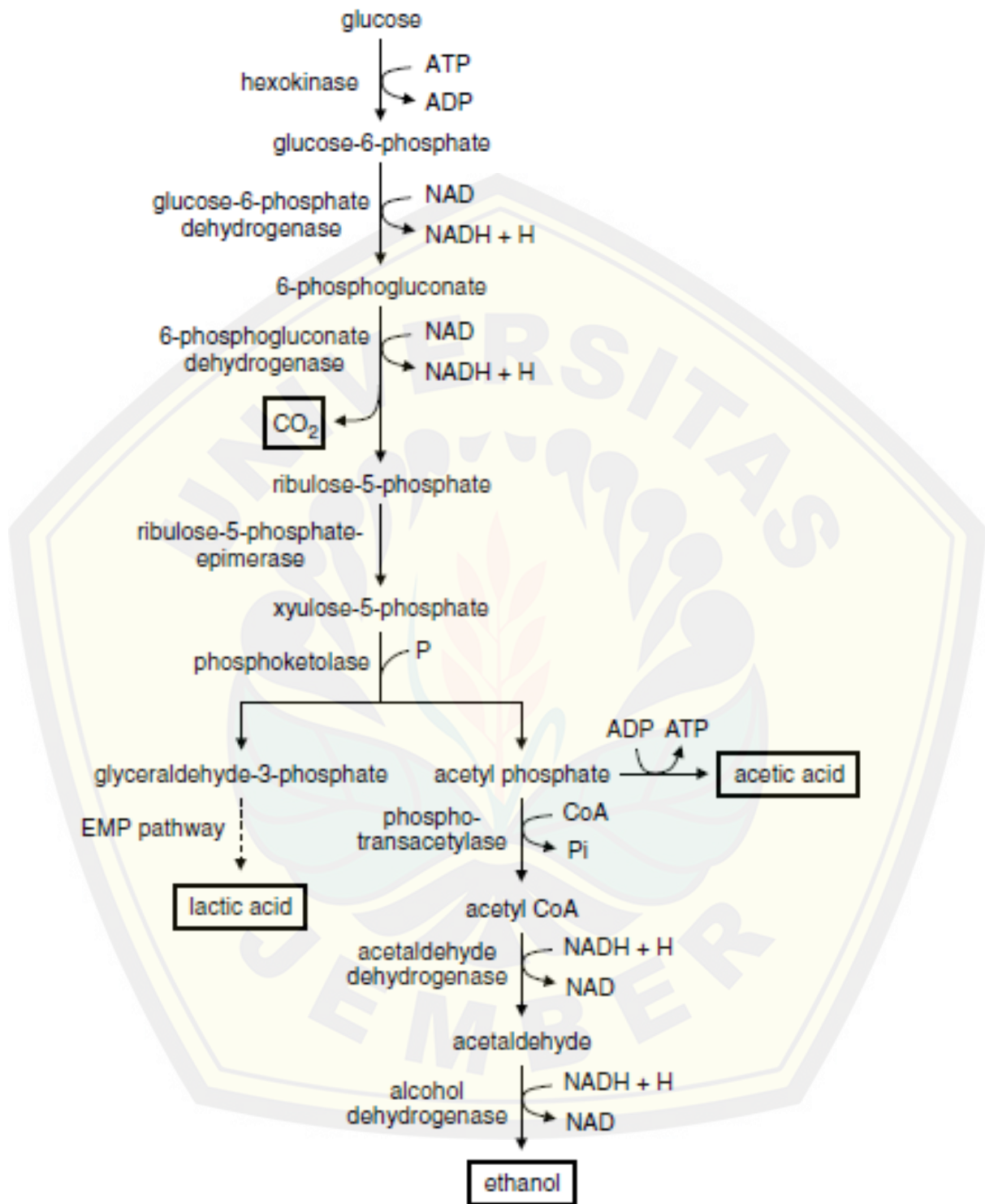


2.5b Jalur metabolisme BAL homofermentatif pembentukan asam laktat



(Hutskin *et al.*, 2019)

2.5c Jalur metabolisme BAL heterofermentatif pembentukan asam laktat



(Hutskin *et al.*, 2019)

## Lampiran 4.1 Perhitungan pH Fermentasi Biji Kakao

Jam ke-	Sampel											
	Kontrol			Sc			Lc			Sc+Lc		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3
0	6,1	6,1	6,2	6,1	6,1	6,1	6,1	6,0	6,0	6,1	6,3	6,0
24	6,0	6,0	5,9	5,7	5,7	5,9	5,7	5,7	5,7	5,8	5,7	5,7
48	5,7	5,6	5,7	5,4	5,5	5,6	5,5	5,5	5,6	5,4	5,4	5,5
72	5,1	5,2	5,1	5,0	5,0	5,0	4,9	4,9	5,0	4,9	4,9	5,0
96	4,8	4,9	4,9	4,8	4,8	4,9	4,8	4,7	4,7	4,7	4,7	4,8
Jam ke-	Rata-rata											
0	6,1			6,1			6,0			6,1		
24	6,0			5,8			5,7			5,7		
48	5,7			5,5			5,5			5,4		
72	5,1			5,0			4,9			4,9		
96	4,9			4,8			4,7			4,7		

## Lampiran 4.2 Perhitungan Suhu Fermentasi Biji Kakao

## 4.2a Perhitungan suhu fermentasi biji kakao (bersambung)

Titik	Jam ke 0 (°C) 12.30				Jam ke 24 (°C) 12.00			
	Kontrol	Sc	Lc	Sc+Lc	Kontrol	Sc F	Lc F	Sc+Lc
1	28,0	27,0	28,0	29,0	32,0	33,5	33,0	34,0
2	28,0	29,0	29,0	28,0	31,0	33,5	32,0	35,0
3	28,5	29,0	29,0	28,0	32,0	34,0	35,0	33,0
4	28,5	29,0	29,0	28,0	30,0	34,0	38,0	35,5
5	28,0	29,0	29,0	27,5	32,0	35,0	34,0	35,0
6	27,5	27,0	28,0	28,0	33,0	34,0	35,5	35,5
7	28,0	29,0	29,0	28,0	32,0	34,0	33,5	35,5
8	28,0	29,0	29,0	27,5	33,0	33,0	34,0	34,0
9	27,5	28,0	29,0	28,0	31,0	33,5	33,0	35,5
<b>Rata-rata</b>	<b>28,0</b>	<b>28,4</b>	<b>28,8</b>	<b>28,0</b>	<b>31,8</b>	<b>33,8</b>	<b>34,2</b>	<b>34,8</b>

## 4.2b Perhitungan rata-rata suhu fermentasi biji kakao (sambungan 1)

Jam ke 48 (°C) 12.30				Jam ke 72 (°C) 12.22				Jam ke 96 (°C) 12.30			
Kontrol	Sc	Lc	Sc+Lc	Kontrol	Sc	Lc	Sc+Lc	Kontrol	Sc	Lc	Sc+Lc
39,0	39,0	36,0	39,0	38,5	40,0	38,0	39	35,0	38,0	38,0	38,0
40,0	38,0	42,5	38,0	39,0	38,0	37,0	38	37,0	37,0	41,5	37,0
40,0	42,0	38,0	39,0	38,0	30,0	37,0	38	35,0	39,0	41,0	39,0
38,0	38,0	41,0	38,5	38,5	38,0	38,0	39	35,5	38,0	36,0	36,5
38,0	38,0	39,0	38,0	37,0	38,0	38,0	40,5	37,0	37,0	38,0	38,0
37,0	40,0	41,0	41,0	38,0	38,0	39,0	38	36,0	38,0	41,0	37,0
38,0	38,0	43,0	40,0	37,0	38,0	39,0	39	34,4	36,0	33,0	39,0
39,0	38,0	39,0	39,5	37,0	40,0	39,0	38,5	36,0	38,0	41,0	37,5
40,0	38,0	40,0	38,0	37,0	39,0	38,0	40	36,0	36,0	37,0	38,0
<b>38,8</b>	<b>38,8</b>	<b>39,9</b>	<b>39,0</b>	<b>37,8</b>	<b>37,7</b>	<b>38,1</b>	<b>38,9</b>	<b>35,8</b>	<b>37,4</b>	<b>38,5</b>	<b>37,8</b>



## Lampiran 4.3 Perhitungan Uji Belah Fermentasi Biji Kakao

## 4.3a Perhitungan uji belah fermentasi biji kakao per 100 biji (bersambung)

Jam ke-	Ulangan	Sampel / 100 biji											
		Kontrol			Sc			Lc			Sc + Lc		
		NF	UF	F	NF	UF	F	NF	UF	F	NF	UF	F
0	U1	100	0	0	92	8	0	90	10	0	94	6	0
	U2	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	U3	100	0	0	94	8	2	94	6	0	98	2	0
24	U1	32	60	8	8	76	16	8	56	36	68	28	4
	U2	44	48	8	16	76	8	20	44	36	78	22	4
	U3	54	36	10	24	56	20	18	54	28	70	30	0
48	U1	12	76	16	8	56	36	8	40	52	8	48	44
	U2	8	60	36	8	64	28	8	48	44	6	40	54
	U3	4	60	36	12	48	40	12	58	30	8	40	52
72	U1	8	52	48	8	56	36	12	20	68	0	12	88
	U2	4	44	52	0	36	64	4	36	60	4	24	72
	U3	6	48	46	4	40	56	8	56	36	2	22	76
96	U1	8	32	60	4	40	56	4	20	76	0	6	94
	U2	0	20	80	0	28	72	4	20	76	0	10	90
	U3	6	34	60	2	22	76	0	18	82	0	2	98

## 4.3b Perhitungan persentase uji belah fermentasi biji kakao (sambungan 1)

Jam ke-	Ulangan	Persentase											
		Kontrol			Sc			Lc			Sc + Lc		
		NF	UF	F	NF	UF	F	NF	UF	F	NF	UF	F
0	U1	100%	0%	0%	92%	8%	0%	90%	10%	0%	94%	6%	0%
	U2	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
	U3	100%	0%	0%	94%	8%	2%	94%	6%	0%	98%	2%	0%
24	U1	32%	60%	8%	8%	76%	16%	8%	56%	36%	68%	28%	4%
	U2	44%	48%	8%	16%	76%	8%	20%	44%	36%	78%	22%	4%
	U3	54%	36%	10%	24%	56%	20%	18%	54%	28%	70%	30%	0%
48	U1	12%	76%	16%	8%	56%	36%	8%	40%	52%	8%	48%	44%
	U2	8%	60%	36%	8%	64%	28%	8%	48%	44%	6%	40%	54%
	U3	4%	60%	36%	12%	48%	40%	12%	58%	30%	8%	40%	52%
72	U1	8%	52%	48%	8%	56%	36%	12%	20%	68%	0%	12%	88%
	U2	4%	44%	52%	0%	36%	64%	4%	36%	60%	4%	24%	72%
	U3	6%	48%	46%	4%	40%	56%	8%	56%	36%	2%	22%	76%
96	U1	8%	32%	60%	4%	40%	56%	4%	20%	76%	0%	6%	94%
	U2	0%	20%	80%	0%	28%	72%	4%	20%	76%	0%	10%	90%
	U3	6%	34%	60%	2%	22%	76%	0%	18%	82%	0%	2%	98%

## 4.3c Perhitungan rata-rata uji belah fermentasi biji kakao (sambungan 2)

Jam ke-	Rata-rata Kontrol			Rata-rata Sc			Rata-rata Lc			Rata-rata Sc + Lc		
	KNF	KUF	KF	ScNF	ScUF	ScF	LcNF	LcUF	LcF	ScLcNF	ScLcUF	ScLcF
0	100%	0%	0%	95%	5%	1%	95%	5%	0%	97%	3%	0%
24	43%	48%	9%	16%	69%	15%	15%	51%	33%	72%	27%	3%
48	8%	65%	29%	9%	56%	35%	9%	49%	42%	7%	43%	50%
72	6%	48%	49%	4%	44%	52%	8%	37%	55%	2%	19%	79%
96	5%	29%	67%	2%	30%	68%	3%	19%	78%	0%	6%	94%

## Lampiran 4.4 Perhitungan Indeks Fermentasi Biji Kakao

Sampel	Jam ke-	$\lambda_{460}$			$\lambda_{530}$			IF			Rata-rata
		1	2	3	1	2	3	U1	U2	U3	
Kontrol	0	0,349	0,351	0,593	0,984	0,995	1,420	0,355	0,353	0,418	<b>0,375</b>
	24	0,573	0,566	0,508	1,230	1,244	1,085	0,466	0,455	0,468	<b>0,463</b>
	48	0,606	0,604	0,450	0,931	0,951	0,759	0,651	0,635	0,593	<b>0,626</b>
	72	0,462	0,406	0,441	0,571	0,531	0,471	0,809	0,765	0,936	<b>0,837</b>
	96	0,446	0,472	0,506	0,470	0,494	0,551	0,949	0,955	0,918	<b>0,941</b>
Sc	0	0,635	0,639	0,665	1,683	1,681	1,643	0,377	0,380	0,405	<b>0,387</b>
	24	0,791	0,790	0,785	1,397	1,399	1,408	0,566	0,565	0,558	<b>0,563</b>
	48	0,618	0,615	0,612	0,953	0,961	0,965	0,648	0,640	0,634	<b>0,641</b>
	72	0,570	0,569	0,543	0,671	0,680	0,563	0,849	0,837	0,964	<b>0,884</b>
	96	0,687	0,690	0,656	0,642	0,640	0,634	1,070	1,078	1,035	<b>1,061</b>
Lc	0	0,705	0,709	0,708	1,708	1,835	1,829	0,413	0,386	0,387	<b>0,395</b>
	24	0,497	0,498	0,487	0,841	0,846	0,876	0,591	0,589	0,556	<b>0,579</b>
	48	0,563	0,545	0,605	0,830	0,801	0,983	0,678	0,680	0,615	<b>0,658</b>
	72	0,577	0,579	0,560	0,644	0,640	0,631	0,896	0,905	0,887	<b>0,896</b>
	96	0,528	0,525	0,532	0,481	0,487	0,461	1,098	1,078	1,154	<b>1,110</b>
Sc+Lc	0	0,791	0,799	0,797	1,855	1,858	1,809	0,426	0,430	0,441	<b>0,432</b>
	24	0,474	0,481	0,478	0,478	0,986	0,998	0,992	0,488	0,479	<b>0,653</b>
	48	0,578	0,588	0,591	0,591	0,900	0,919	0,978	0,653	0,643	<b>0,758</b>
	72	0,495	0,486	0,485	0,585	0,528	0,512	0,846	0,920	0,947	<b>0,905</b>
	96	0,539	0,529	0,586	0,486	0,451	0,444	1,109	1,173	1,320	<b>1,201</b>

Lampiran 4.5 Perhitungan Total Mikroba Fermentasi Biji Kakao

Sampel	MSRA 1			MRSA 2			MEA 1			MEA 2		
	peng. $10^{-5}$	peng. $10^{-6}$	peng. $10^{-7}$	peng. $10^{-5}$	peng. $10^{-6}$	peng. $10^{-7}$	peng. $10^{-5}$	peng. $10^{-6}$	peng. $10^{-7}$	peng. $10^{-5}$	peng. $10^{-6}$	peng. $10^{-7}$
<b>K</b>	0	20	10	3	17	8	6	0	0	0	0	0
		6	4	1	8	5	1	5	4	1	7	4
	24	52	25	2	53	40	36	0	0	0	0	0
		17	12	3	16	11	4	20	10	7	27	18
	48	67	45	16	65	40	8	0	0	0	0	0
		37	29	13	35	30	12	39	23	7	35	26
	72	120	110	84	154	103	95	0	0	0	0	0
		72	35	14	58	29	14	104	90	42	85	45
96	156	90	40	180	115	29	5	3	0	1	1	
	65	40	20	69	50	23	134	115	93	170	89	
<b>Sc</b>	0	48	27	5	42	29	6	1	1	1	0	0
		5	5	2	5	3	1	26	18	9	36	19
	24	139	80	16	117	98	22	0	0	0	0	0
		18	10	3	19	12	5	137	67	20	150	75
	48	207	135	37	196	156	44	0	0	0	0	0
		45	25	12	51	30	8	161	123	32	197	137
	72	312	145	16	261	135	20	0	0	0	0	0
		76	37	17	84	46	14	319	145	59	232	125
96	356	189	14	348	90	15	2	1	1	0	0	
	78	39	17	76	38	24	348	257	128	388	267	
<b>Lc</b>	0	49	28	5	66	25	9	0	0	0	1	0
		3	3	0	4	2	2	4	1	0	8	4
	24	142	98	24	192	95	21	1	1	1	0	0
		14	5	2	13	7	0	24	12	0	20	10
	48	270	165	39	290	163	31	0	0	0	0	0
		26	10	6	15	13	3	33	24	12	69	67
	72	322	196	43	325	191	46	0	0	0	0	0
		17	16	10	18	15	8	171	90	16	169	87
96	368	236	60	328	235	60	1	1	0	4	2	
	18	10	8	17	15	13	220	175	144	120	115	
<b>Sc+Lc</b>	0	49	27	6	50	25	8	1	0	0	0	0
		2	2	1	3	2	1	15	9	3	17	8
	24	156	99	29	187	109	30	1	1	0	0	1
	9	5	2	9	5	1	75	45	23	78	50	



48	280	176	42	273	167	40	0	0	0	1	0	0
	11	8	6	17	11	4	123	99	25	130	101	30
72	331	201	45	295	208	48	1	0	0	1	1	0
	18	14	8	15	9	7	199	165	45	213	178	48
96	365	246	73	322	234	64	1	0	0	1	1	0
	14	8	6	20	8	4	328	285	145	376	290	123

#### 4.5a Perhitungan populasi khamir fermentasi biji kakao

KHAMIR cfu/g				
Jam	K	Sc	Lc	ScLc
0	9,00E+06	4,46E+07	7,65E+06	2,21E+07
24	3,38E+07	1,93E+08	2,97E+07	1,12E+08
48	5,54E+07	2,78E+08	8,69E+07	2,04E+08
72	1,46E+08	3,69E+08	2,33E+08	3,40E+08
96	2,29E+08	5,67E+08	2,84E+08	5,76E+08

KHAMIR (log cfu/g)				
Jam	K	Sc	Lc	ScLc
0	6,95E+00	7,65E+00	6,88E+00	7,34E+00
24	7,53E+00	8,29E+00	7,47E+00	8,05E+00
48	7,74E+00	8,44E+00	7,94E+00	8,31E+00
72	8,16E+00	8,57E+00	8,37E+00	8,53E+00
96	8,36E+00	8,75E+00	8,45E+00	8,76E+00

#### 4.5b Perhitungan populasi BAL fermentasi biji kakao

BAL cfu/g				
Jam	K	Sc	Lc	Sc Lc
0	2,48E+07	6,57E+07	7,56E+07	6,80E+07
24	7,65E+07	1,95E+08	1,07E+09	2,48E+09
48	9,77E+07	3,12E+08	2,25E+09	4,03E+09
72	2,19E+08	3,84E+08	2,14E+09	4,66E+09
96	2,43E+08	4,42E+08	2,66E+09	4,20E+09

BAL (log cfu/g)				
Jam	K	Sc	Lc	ScLc
0	7,39E+00	7,82E+00	7,88E+00	7,83E+00
24	7,88E+00	8,29E+00	9,03E+00	9,39E+00
48	7,99E+00	8,49E+00	9,35E+00	9,61E+00
72	8,34E+00	8,58E+00	9,33E+00	9,67E+00
96	8,39E+00	8,65E+00	9,42E+00	9,62E+00

## 4.5c Perhitungan populasi non-BAL fermentasi biji kakao

NON BAL cfu/g				
Jam	K	ScF	LcF	ScLc
0	1,04E+07	8,10E+06	5,40E+06	4,05E+06
24	2,52E+07	2,66E+07	1,76E+07	1,26E+07
48	5,90E+07	6,80E+07	2,88E+07	2,12E+07
72	8,73E+07	1,09E+08	2,97E+07	2,52E+07
96	1,01E+08	1,04E+08	2,70E+07	2,25E+07

NON BAL (log cfu/g)				
Jam	K	Sc	Lc	ScLc
0	7,01E+00	6,91E+00	6,73E+00	6,61E+00
24	7,40E+00	7,42E+00	7,24E+00	7,10E+00
48	7,77E+00	7,83E+00	7,46E+00	7,33E+00
72	7,94E+00	8,04E+00	7,47E+00	7,40E+00
96	8,00E+00	8,02E+00	7,43E+00	7,35E+00

## Lampiran 4.6 Perhitungan Luas Area Hambatan BAL

4.6a Perhitungan luas area hambatan BAL menggunakan *Aspergillus flavus*

No	Kode Isolat	<i>Aspergillus flavus</i>											Lb-Ls mm <sup>2</sup>	Lb-Ls cm <sup>2</sup>
		D(Lb) mm				D(Lb) Rata-rata mm	D (Ls) mm	r mm		L mm				
		a	b	c	d			Lb	Ls	Lb	Ls			
1	Kontrol F1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	11,00	9,55	10,05	7,15	9,44	5,00	4,72	2,50	69,92	19,63	50,29	0,50	
2	Kontrol F2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	7,30	8,05	11,60	8,65	8,90	5,00	4,45	2,50	62,18	19,63	42,55	0,43	
3	Sc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	9,50	7,00	7,05	7,75	7,83	5,00	3,91	2,50	48,07	19,63	28,44	0,28	
4	Sc F 2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	9,40	9,65	9,45	8,50	9,25	5,00	4,63	2,50	67,17	19,63	47,54	0,48	
5	Lc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	7,25	9,05	7,40	9,55	8,31	5,00	4,16	2,50	54,24	19,63	34,62	0,35	
6	Lc F 2 72 jam 10 <sup>-7</sup>	11,00	10,90	9,00	10,65	10,39	5,00	5,19	2,50	84,70	19,63	65,08	<b>0,65</b>	
7	Lc F 3 72 jam 10 <sup>-7</sup>	11,00	12,20	8,20	11,10	10,63	5,00	5,31	2,50	88,62	19,63	68,99	<b>0,69</b>	
8	Sc+Lc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	8,25	7,00	7,40	7,60	7,56	5,00	3,78	2,50	44,90	19,63	25,27	0,25	
9	Sc+Lc F 2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	9,55	10,25	9,40	9,40	9,65	5,00	4,83	2,50	73,10	19,63	53,48	<b>0,53</b>	
10	Sc+Lc F 3 72 jam 10 <sup>-7</sup>	9,05	8,35	9,80	10,90	9,53	5,00	4,76	2,50	71,22	19,63	51,59	0,52	

4.6b Perhitungan luas area hambatan BAL menggunakan *Aspergillus niger*

No	Kode Isolat	<i>Aspergillus niger</i>											
		D(Lb) mm				D(Lb) Rata-rata mm	D (Ls) mm	r mm		L mm		Lb-Ls mm <sup>2</sup>	Lb-Ls cm <sup>2</sup>
		a	b	c	d			Lb	Ls	Lb	Ls		
1	Kontrol F1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	11,50	9,95	7,00	9,80	9,56	5,00	4,78	2,50	71,78	19,63	52,16	0,52
2	Kontrol F2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	10,60	11,20	8,40	10,10	10,08	5,00	5,04	2,50	79,68	19,63	60,06	0,60
3	Sc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	13,60	14,85	17,15	13,80	14,85	5,00	7,43	2,50	173,11	19,63	153,49	1,53
4	Sc F 2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	14,70	13,90	13,00	12,20	13,45	5,00	6,73	2,50	142,01	19,63	122,38	1,22
5	Lc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	11,55	10,80	10,10	11,10	10,89	5,00	5,44	2,50	93,05	19,63	73,43	0,73
6	Lc F 2 72 jam 10 <sup>-7</sup>	11,20	9,35	11,10	11,00	10,66	5,00	5,33	2,50	89,25	19,63	69,62	0,70
7	Lc F 3 72 jam 10 <sup>-7</sup>	12,45	13,45	13,00	12,60	12,88	5,00	6,44	2,50	130,13	19,63	110,50	1,11
8	Sc+Lc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	12,30	17,05	15,30	12,45	14,28	5,00	7,14	2,50	159,96	19,63	140,34	1,40
9	Sc+Lc F 2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	11,15	10,60	8,40	12,30	10,61	5,00	5,31	2,50	88,41	19,63	68,79	0,69
10	Sc+Lc F 3 72 jam 10 <sup>-7</sup>	10,55	12,40	12,05	11,00	11,50	5,00	5,75	2,50	103,82	19,63	84,19	0,84



Lampiran 4.7 Dokumentasi Penelitian



Starter *Saccharomyces cerevisiae* komersil



Starter *Lactobacillus casei* komersil



Pemanenan buah kakao



Persiapan tabung fermentor



Pemisahan kulit dan biji kakao



Proses fermentasi



Proses pengadukan



Pengeringan biji kakao

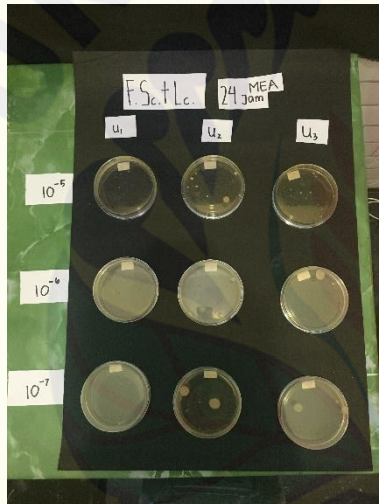
4.7b Pengamatan total Populasi mikroba (perlakuan terbaik)



Sc+Lc MEA 0 jam



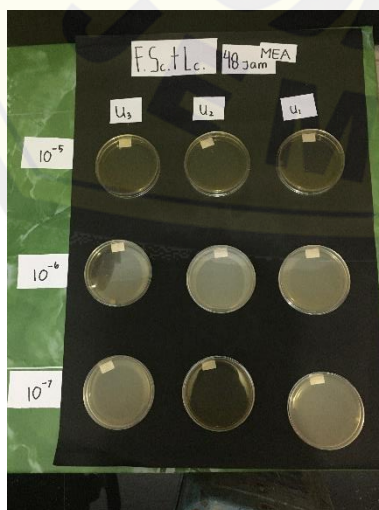
Sc+Lc MRS-A 0 jam



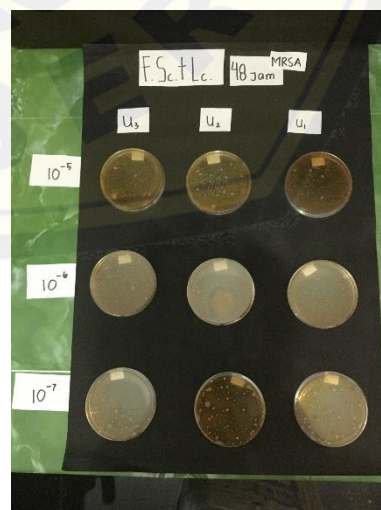
Sc+Lc MEA 24 jam



Sc+Lc MRS-A 24 jam

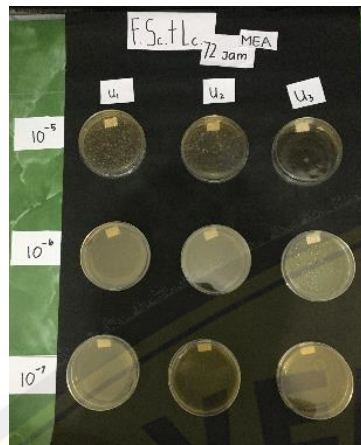


Sc+Lc MEA 48 jam

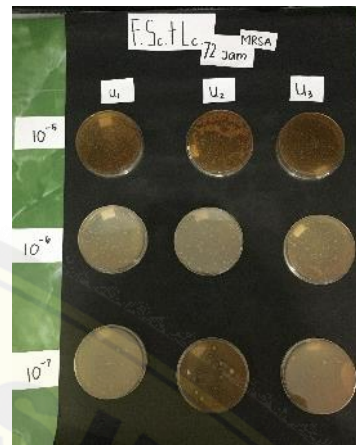


Sc+Lc MRS-A 48 jam





Sc+Lc MEA 72 jam



Sc+Lc MRS-A 72 jam



Sc+Lc MEA 96 jam



Sc+Lc MRS-A 96 jam

4.7c Zona penghambatan kapang oleh isolat BAL

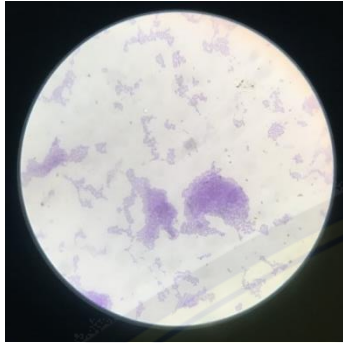
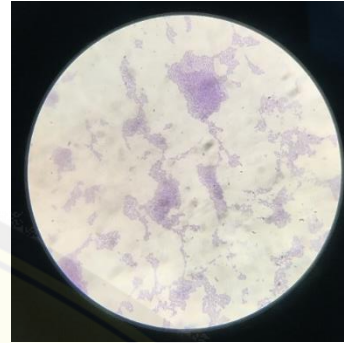
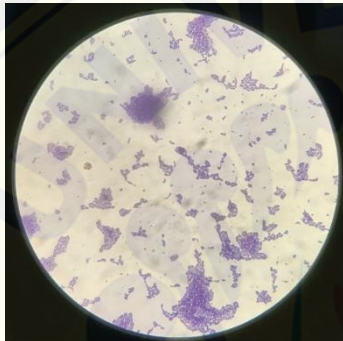
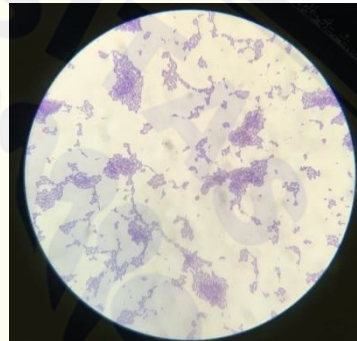
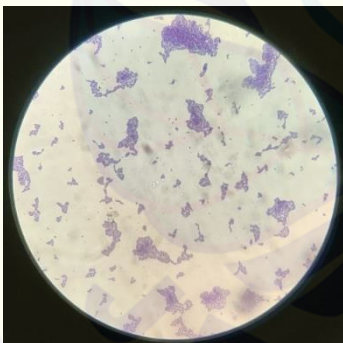
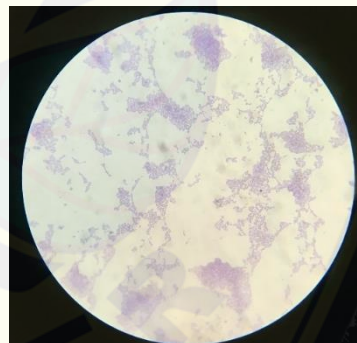


Pengamatan area hambatan BAL 48 jam oleh *Aspergillus niger*



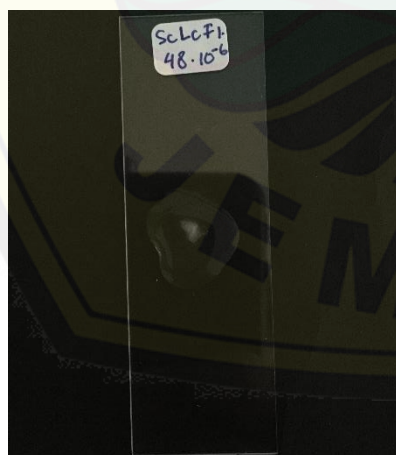
Pengamatan area hambatan BAL 48 jam oleh *Aspergillus flavus*

## 4.7d Gambar isolat BAL dibawah mikroskop

Sc F 1 48 jam  $10^{-6}$ Sc F 2 48 jam  $10^{-7}$ Lc F 2 72 jam  $10^{-7}$ Lc F 3 72 jam  $10^{-7}$ Sc+Lc F 1 48 jam  $10^{-6}$ Sc+Lc F 2 48 jam  $10^{-7}$



## 4.7e Hasil uji Katalase

Sc F 1 48 jam  $10^{-6}$ Sc F 2 48 jam  $10^{-7}$ Lc F 2 72 jam  $10^{-7}$ Lc F 3 72 jam  $10^{-7}$ Sc+Lc F 1 48 jam  $10^{-6}$ Sc+Lc F 2 48 jam  $10^{-7}$

4.7f Hasil uji produksi CO<sub>2</sub>



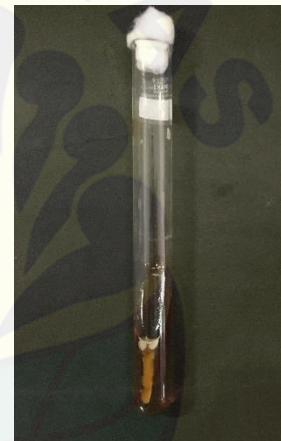
Sc F 1 48 jam 10<sup>-6</sup>



Sc F 2 48 jam 10<sup>-7</sup>



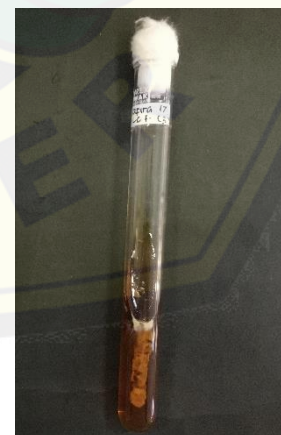
Lc F 2 72 jam 10<sup>-7</sup>



Lc F 3 72 jam 10<sup>-7</sup>

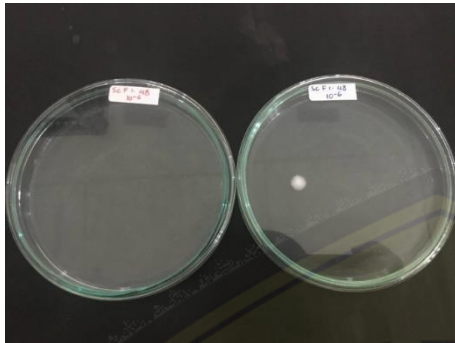


Sc+Lc F 1 48 jam 10<sup>-6</sup>

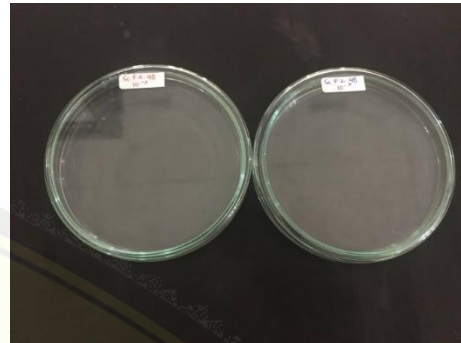


Sc+Lc F 2 48 jam 10<sup>-7</sup>

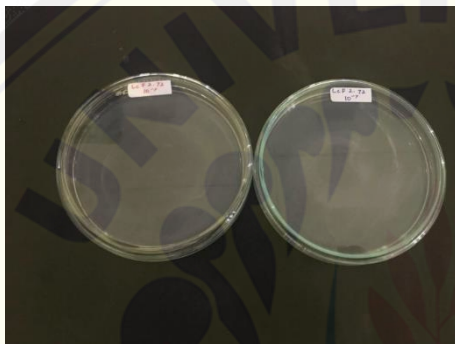
4.7g Hasil uji produksi dekstran



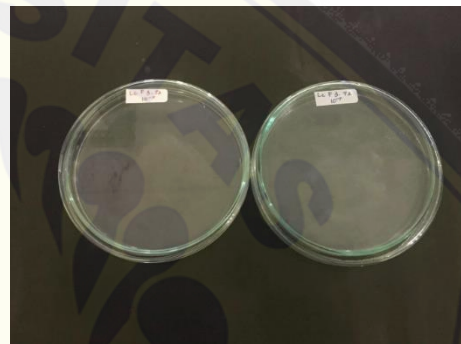
Sc F 1 48 jam  $10^{-6}$



Sc F 2 48 jam  $10^{-7}$



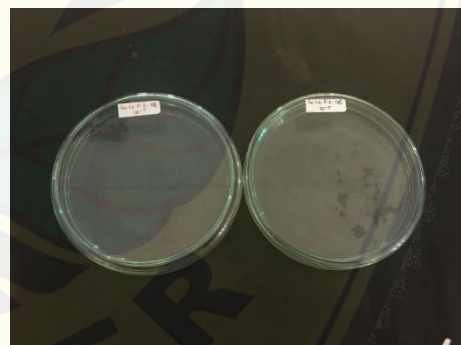
Lc F 2 72 jam  $10^{-7}$



Lc F 3 72 jam  $10^{-7}$



Sc+Lc F 1 48 jam  $10^{-6}$

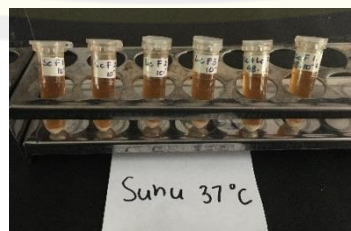


Sc+Lc F 2 48 jam  $10^{-7}$

4.7h Hasil uji pertumbuhan suhu berbeda



Penumbuhan pada suhu  
15°C



Penumbuhan pada suhu  
37°C



Penumbuhan pada suhu  
45°C



4.7i Hasil uji pertumbuhan garam berbeda



Penumbuhan pada NaCl 0%



Penumbuhan pada NaCl 4%



Penumbuhan pada NaCl 6,5%

4.7j Hasil uji pertumbuhan pada fermentasi karbohidrat berbeda



Penumbuhan pada arabinosa



Penumbuhan pada fruktosa



Penumbuhan pada glukosa



Penumbuhan pada maltosa



Penumbuhan pada manosa



Penumbuhan pada manitol



Penumbuhan pada sukrosa



## Lampiran 4.7.8 Perhitungan Total Asam Laktat Isolat BAL

No	Kode Sampel	% Asam laktat						Rata-rata total asam %
		mL NaOH			Total Asam %			
		U1	U2	U3	U1	U2	U3	
1	Sc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	22,3	23,6	22,1	2,01	2,12	1,99	2,04
2	Sc F 2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	23,0	22,8	21,8	2,07	2,05	1,96	2,03
3	Lc F 2 72 jam 10 <sup>-7</sup>	24,5	23,2	24,3	2,21	2,09	2,19	2,16
4	Lc F 3 72 jam 10 <sup>-7</sup>	23,9	24,2	23,6	2,15	2,18	2,12	2,15
5	Sc+Lc F 1 48 jam 10 <sup>-6</sup>	24,4	24,8	24,9	2,20	2,23	2,24	2,22
6	Sc+Lc F 2 48 jam 10 <sup>-7</sup>	24,8	24,0	23,7	2,23	2,16	2,13	2,18