

ISOLASI MIKROORGANISME HETEROFERMENTATIF PADA BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI SPONTAN

Elazmanawati Lembong, In-In Hanidah, Dwi Indah Puspita Sari

Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang KM. 21, Jatinangor, Sumedang, 40600, Indonesia

Email : dwi14017@mail.unpad.ac.id

ABSTRAK

Kakao merupakan komoditas perkebunan terbesar ketiga setelah kelapa sawit dan karet, produksi nasional dari biji kakao meningkat dari tahun ke tahun. Tetapi tingginya produktivitas kakao Indonesia selama ini kurang didukung dengan upaya peningkatan mutu dari kakao, salah satunya dikarenakan biji kakao tidak difermentasi. Padahal proses fermentasi merupakan proses vital dalam peningkatan mutu dan cita rasa. Dalam proses fermentasi, mikroorganisme memegang peran sangat penting, sehingga perlu dilakukan isolasi mikroorganisme yang terlibat didalamnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh perubahan pertumbuhan dari bakteri asam laktat (BAL), bakteri asam asetat (AAB), khamir dan kapang selama proses fermentasi spontan. Metode penelitian yang digunakan yaitu metode eksperimental yang dianalisis secara deskriptif dengan enam perlakuan dan setiap perlakuan diuji secara duplo. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan optimum BAL pada biji kakao adalah pada lama fermentasi 24 jam, sedangkan AAB dan khamir optimum tumbuh pada lama fermentasi 48 jam. Perubahan pertumbuhan mikroorganisme didominasi oleh bakteri asam laktat dengan total koloni tertinggi yaitu 6,1 log CFU/g dan jumlah terendah 1,3 log CFU/g. Berdasarkan perubahan pertumbuhan mikroorganisme yang terjadi selama fermentasi, waktu optimum untuk proses fermentasi kakao adalah selama kurang dari 5 hari.

ABSTRACT

Cocoa is the third largest plantation commodity after oil palm and rubber, national production of cocoa beans is increasing from year to year. However, the high productivity of Indonesian cocoa has not been supported by efforts to improve the quality of cocoa, one of which is because the cocoa beans are not fermented. Whereas the fermentation process is a vital process in improving the quality and taste. In the fermentation process, microorganisms play a very important role, so it is necessary to isolate the microorganisms involved in it. The purpose of this study was to obtain changes in the growth of lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB), yeast and molds during the spontaneous fermentation process. The research method used is the experimental method which was analyzed descriptively with six treatments and each treatment was tested in duplicate. The results showed that the optimum growth of LAB in cocoa beans was at 24 hours of fermentation, while the optimum growth of AAB and yeast was at 48 hours of fermentation. Changes in the growth of microorganisms were dominated by lactic acid bacteria with the highest total colony of 6.1 log CFU/g and the lowest number 1.3 log CFU/g. Based on changes in the growth of microorganisms that occur during fermentation, the optimum time for the cocoa fermentation process is less than 5 days.

Keywords: *Cocoa, Fermentation, Isolation, Microorganisms*

1. Pendahuluan

Buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terdiri beberapa bagian yakni: kulit buah, plasenta, pulp, kulit biji dan biji, seluruh bagian buah kakao dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan, pakan, pupuk maupun bahan bakar (Djaafar, 2014). Namun, biji kakao merupakan fokus utama dalam produksi kakao yang berperan sebagai bahan baku paling penting dari pembuatan cokelat yang selama ini dikonsumsi dan diperjual belikan.

Kakao merupakan komoditas perkebunan terbesar ketiga setelah kelapa sawit dan karet. Pada

tahun 2019 lahan dari perkebunan kakao menurun dibandingkan tahun tahun sebelumnya, tetapi berbeda dengan luas lahan yang semakin menurun, produksi nasional dari biji kakao meningkat dari tahun sebelumnya (BPS, 2019). Tingginya produktivitas kakao Indonesia selama ini masih kurang didukung dengan upaya peningkatan mutu dari kakao, pengolahan hasil biji kering kakao dan pemasaran (Managanta et al., 2019).

Mutu kakao Indonesia rendah dikarenakan antara lain tidak difermentasi, tidak terfermentasi dengan baik, tidak cukup kering, ukuran biji tidak

seragam, kadar kulit tinggi, keasaman tinggi, citarasa sangat beragam dan tidak konsisten (Abriani et al., 2018). Sementara menurut Manalu (2018), rendahnya mutu kakao Indonesia disebabkan oleh 2 beberapa hal misalnya kurangnya kemampuan petani untuk memanfaatkan teknologi maupun kurangnya pengetahuan manajerial.

Apriyanto et al., (2018) mengungkapkan bahwa produksi biji kakao kering terutama dari perkebunan rakyat, umumnya tidak melalui proses fermentasi secara alami maupun dengan penambahan inokulum. Pada umumnya petani kakao hanya merendam biji kakao segar dalam air untuk membantu menghilangkan pulp kemudian menjemur biji kakao tersebut.

Biji kakao kering yang berasal dari perkebunan rakyat biasanya tidak diketahui kadar airnya, dijual tanpa memperhatikan mutu baik dari aspek kadar air maupun kondisi biji kering disebut sebagai biji kakao asalan (Apriyanto et al., 2018).

Mutu biji kakao yang dihasilkan perkebunan rakyat Sumedang serupa dengan biji kakao Indonesia lainnya, hal tersebut dikarenakan biji kakao tidak difermentasi terlebih dahulu. Menurut data statistik Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Barat 2017 perkebunan rakyat kakao di Sumedang memiliki luas total sebesar 58 hektar yang dimiliki oleh 537 kepala keluarga, dengan lahan yang berisi tanaman menghasilkan (TM) hanya seluas 19 hektar dan menghasilkan 7 ton/tahun (ministry of plantation, 2018). Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa lahan dan hasil panen yang dimiliki dan didapatkan oleh masing-masing petani hanya sedikit, hal ini yang menjadi salah satu alasan petani lebih memilih untuk menjual buah kakao secara langsung pada tengkulak atau berupa biji kering tanpa fermentasi.

Fermentasi merupakan tahap yang paling memengaruhi mutu dari biji kakao, karena selama proses fermentasi terjadi penguraian senyawa-senyawa yang akan merubah tekstur, warna, cita rasa, kandungan air, aroma, dan kenampakan biji (Thompson et al., 2007) yang akan meningkatkan mutu serta harga jualnya. Tetapi proses fermentasi ini pun harus dilakukan dengan tepat, menurut (Diansari et al., 2015), fermentasi yang tidak tepat atau biji yang tidak difermentasi akan menghasilkan biji yang berwarna ungu dan keabuan dan bertekstur padat keras (pejal), sedangkan fermentasi biji yang terlalu lama akan menghasilkan biji berjamur dan rapuh sehingga sangat mudah pecah yang dapat menurunkan mutu biji.

Maka, untuk meningkatkan mutu dari biji kakao, perlu diketahui lama fermentasi yang ideal dan perubahan karakteristik fisik, kimia dan mikrobiologis selama fermentasi sehingga dapat ditentukan lama fermentasi yang menghasilkan mutu biji terbaik. Maka akan dilakukan penelitian mengenai perubahan pertumbuhan mikroorganisme heterofermentatif pada biji kakao selama fermentasi spontan.

2. Bahan dan Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Bahan baku utama yang akan digunakan adalah buah kakao matang dengan usia ± 5 bulan yang berasal dari perkebunan warga di Sumedang, Jawa Barat. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah aquades, CaCO_3 1%, daun pisang, larutan BPW 0,1%, NaCl 0,85%, media GYC, MEA, MRSA, dan PDA.

Alat-alat yang digunakan adalah aluminium foil, autoklaf, *beaker glass*, botol schott, *bulb* pipet, cawan aluminium, cawan petri, *colony counter*, *cutter*, desikator, gelas ukur, gunting, *hot plate*, inkubator, kapas, kasa, kotak kayu fermentasi berukuran $p \times l \times t$ 25,5 \times 25,5 \times 30,5 cm, *laminar flow*, mikro pipet, neraca analitik, ose, oven, pengaduk (untuk aerasi), pH meter, pipet ukur, pisau, plastik *wrap*, rak tabung, spatula, tabung reaksi, termometer dan *vortex mixer*.

Metode Penelitian

Penelitian ini didesain dengan metode eksperimental kemudian dianalisis secara deskriptif, pengujian dilakukan dengan enam perlakuan, dua kali 30 pengulangan (duplo) pada setiap ulangannya. Adapun perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: (Apriyanto 2018)

A : Tanpa Fermentasi (standar)

B : Lama Fermentasi jam ke-24

C : Lama Fermentasi jam ke-48

D : Lama Fermentasi jam ke-72

E : Lama Fermentasi jam ke-96

F : Lama Fermentasi jam ke-120

Setelah didapatkan data pengamatan, kemudian dihitung nilai standar deviasi, yaitu ukuran sebaran yang paling banyak digunakan. Berikut merupakan rumus standar deviasi.

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan:

S= standar deviasi/simpangan baku

x_i = nilai x data ke-i

\bar{x} = rata - rata sampel
 n = jumlah data

Parameter Pengamatan

Total Koloni BAL, AAB, Khamir dan Kapang

Sampel diambil setiap interval waktu 24 jam sekali secara aseptik. Penimbangan sampel sebanyak 1g. Dilakukan pengenceran hingga 10^{-6} menggunakan larutan NaCl fis 0,85% untuk BAL, pengenceran hingga 10^{-5} menggunakan larutan BPW untuk AAB dan pengenceran hingga 10^{-4} menggunakan larutan BPW untuk khamir, dengan perbandingan sampel:pelarut adalah 1:9. Pengambilan 1 mL suspensi dari tiga pengenceran terakhir menggunakan mikropipet. Suspensi dituang ke dalam cawan petri steril (cawan petri dilalukan pada Bunsen terlebih dahulu). Media MRSA (untuk pertumbuhan BAL), GYC (untuk pertumbuhan AAB), MEA (untuk pertumbuhan khamir), dan PDA (untuk pertumbuhan kapang) dituang ke dalam cawan petri yang berisi suspensi (mulut botol schott yang berisi media dan cawan petri dilalukan pada Bunsen terlebih dahulu). Cawan petri berisi media dan suspensi digoyangkan searah angka 8. Media ditunggu hingga memadat, kemudian dibungkus dengan plastik wrap dan diinkubasi selama 48 jam dalam suhu 37°C.

Keasaman (pH) Luar Biji Kakao Basah

Pengukuran pH luar biji kakao basah dilakukan setiap 12 jam sekali dengan menggunakan pH meter jenis digital. Pengukuran dilakukan dengan cara pH meter dimasukkan kedalam kotak fermentasi yang berisikan kakao yang sedang difermentasi.

Pengukuran Kadar Air

Analisis kadar air ini menggunakan prinsip penguapan molekul air bebas yang terkandung dalam sampel (BSN, 1992). Cawan yang akan digunakan dioven terlebih dahulu selama 60 menit pada suhu 100-105°C. Setelah itu didinginkan dalam desikator untuk menghilangkan uap air dan ditimbang (A). Sampel ditimbang sebanyak 1-2g dalam cawan yang sudah dikeringkan (B) kemudian dioven pada suhu 105°C selama 3 jam. Sampel didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang (C). Tahap ini diulangi hingga dicapai bobot yang konstan. Penentuan kadar air dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar Air (wb)} = \frac{B - (C - A)}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

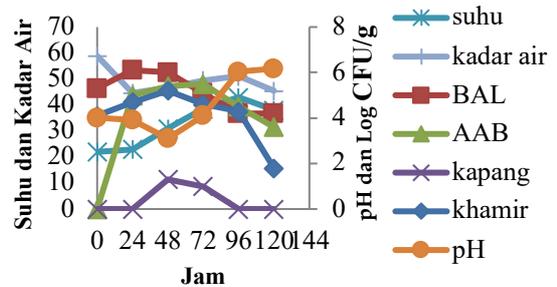
A: berat cawan kosong (g)

B: berat sampel awal (g)

C: berat cawan + sampel kering (g)

3. Hasil dan Pembahasan

Aktivitas mikroorganisme, perubahan suhu, pH dan kadar air saling berkaitan selama proses fermentasi berlangsung. Seperti yang disajikan dalam diagram berikut ini.



Gambar 1. Grafik Rata-rata Total BAL, AAB, Khamir dan Kapang, Perubahan Suhu, Kadar Air dan pH

Total Koloni BAL, AAB, Khamir dan Kapang

Pertumbuhan mikroorganisme terjadi secara bertahap, khamir tumbuh dominan pada awal fermentasi, digantikan oleh bakteri asam laktat selama 48 jam berikutnya, dan akhirnya digantikan oleh bakteri asam asetat (Haliza et al., 2020). Berdasarkan Gambar 1, dapat terlihat bahwa khamir dan bakteri asam laktat sudah tumbuh sejak fermentasi belum berlangsung. Khamir merupakan perintis didalam fermentasi kakao dengan spesies antara lain *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida rugosa* dan *Kluyveromyces marxianus* (Schwan, 1998).

Khamir mengalami fase adaptasi pada waktu inkubasi jam ke-0, kemudian khamir memasuki fase logaritmik dari jam ke-0 hingga jam ke-48, pada jam ke-48 pertumbuhan khamir mencapai titik optimum karena pada jam ke-48 suhu fermentasi mencapai suhu 30°C yang termasuk dalam rentang suhu optimum untuk pertumbuhan khamir. Kisaran suhu optimal pertumbuhan khamir dituturkan dalam penelitian Hardianto, Muhibuddin, dan Sektiono (2018) bahwa suhu optimum pada perkembangan khamir umumnya yaitu 28-30°C. Setelah pertumbuhan optimumnya khamir mengalami penurunan karena memasuki fase kematian, hal ini disebabkan karena adanya faktor pembatas bagi pertumbuhan khamir yaitu alkohol yang dihasilkan khamir yang semakin meningkat, kemudian menjadi bersifat desinfektan bagi khamir itu sendiri (Muzaifa et al., 2017).

Jam ke-0 merupakan fase adaptasi dari bakteri asam laktat (BAL), fase logaritmik dari BAL adalah pada rentang waktu inkubasi ke-0 hingga

ke-24 dan BAL tumbuh optimum pada waktu inkubasi jam ke-24, kemudian BAL memasuki fase kematian hingga waktu inkubasi ke-96 jam, dan diakhiri dengan fase *long term stationary* yaitu fase dimana populasi bakteri telah mati 90% dari keseluruhan bakteri dan bakteri yang tersisa memanfaatkan sisa metabolisme dari bakteri yang sudah mati dan dari sisa nutrisi pada media yang tersisa (Setiawati, et al. 2014).

Fase adaptasi AAB berada pada waktu inkubasi jam ke-0, jam ke-0 hingga jam ke-24 bakteri asam asetat berada pada fase logaritmik, dengan kenaikan total koloni dari 0 log CFU/g menjadi 5 log CFU/g. Kemudian tumbuh optimum pada waktu inkubasi jam ke-72. Bakteri asam asetat memasuki fase stasioner pada rentang waktu fermentasi jam ke-24 hingga jam ke-72. Meningkatnya jumlah bakteri asam asetat dikarenakan oleh adanya proses aerasi pada proses fermentasi, saat proses fermentasi sudah mulai teraerasi, kondisi ini cocok untuk perkembangan bakteri asam asetat (Schwan dan Wheals, 2004).

Pertumbuhan optimum bakteri asam asetat berada pada rentang suhu 30-38,5°C, kemudian setelah melalui fase optimum bakteri asam asetat mulai memasuki fase kematian sehingga terus mengalami penurunan hingga akhir fermentasi berlangsung. Penurunan jumlah bakteri asam asetat setelah jam ke-72 diakibatkan karena penghambatan pertumbuhan oleh suhu yang terus meningkat (Schwan dan Wheals, 2004). Kenaikan pH diakhir fermentasi disebabkan oleh adanya degradasi asam sitrat di dalam pulp yang terjadi selama sisa waktu fermentasi akibat aktivitas mikroorganisme (Vuyst et al., 2010).

Pertumbuhan kapang saat proses fermentasi berlangsung cukup rendah dibandingkan dengan bakteri dan khamir yang berperan dalam proses fermentasi dan tidak ada keberadaannya pada awal dan akhir proses fermentasi. Fase logaritmik dari kapang ada pada jam ke-24 hingga jam ke-48, fase stasioner tidak tergambar karena waktu pengambilan sampel yang cukup jauh, lalu fase kematian dimulai dari jam ke-72 hingga 96 hingga kapang tidak ada lagi keberadaannya pada proses fermentasi. Kapang tidak dianggap sebagai mikroorganisme penting pada biji kakao, bahkan keberadaannya tidak dikehendaki karena menyebabkan beberapa efek negatif pada biji kakao yang dihasilkan, salah satunya akan menyebabkan rasa biji

Suhu

Berdasarkan Gambar 1, pertumbuhan mikroorganisme pada proses fermentasi biji kakao

tumbuh optimum pada kisaran suhu 23 – 30°C, yang menandakan sebagian besar mikroorganisme yang tumbuh bersifat mesofilik. Peningkatan suhu yang terjadi secara terus-menerus setelah fermentasi berlangsung selama 72 jam mengakibatkan pertumbuhan dari bakteri asam asetat mengalami penurunan (Schwan dan Wheals, 2004). Selama fermentasi berlangsung, perubahan suhu sangat memengaruhi pertumbuhan dari mikroorganisme selama fermentasi, selain itu mikroorganisme yang tumbuh pun memengaruhi perubahan suhu yang terjadi di dalam proses fermentasi.

Perubahan suhu terjadi kenaikan signifikan dimulai dari waktu fermentasi jam ke-24 hingga jam ke-96. Kenaikan suhu ini mulanya disebabkan oleh khamir yang berperan merombak gula menjadi alkohol secara eksotermis sehingga mengakibatkan suhu meningkat (Shindy et al., 2014). Kemudian kenaikan suhu diakibatkan oleh isolat bakteri yang diduga tumbuh didalamnya yaitu *Leuconostoc mesenteroides* yang mampu memproduksi CO₂ dalam jumlah yang banyak dan mengakibatkan peningkatan suhu (Shindy et al., 2014).

Kenaikan suhu juga disebabkan oleh bakteri asam asetat bertanggung jawab atas oksidasi etanol menjadi asam asetat dan oksidasi selanjutnya menjadi CO₂ dan air, yang mengakibatkan meningkatnya suhu dan kadar air (Papalexandratou et al., 2011). Suhu mulai mengalami penurunan sebesar 11,6% dari waktu fermentasi jam ke-96 hingga jam ke-120, hal ini disebabkan karena aktivitas mikrobiologis yaitu BAL, AAB, dan khamir yang sudah menurun (Aryani et al., 2018).

pH Luar Biji Kakao

Pertumbuhan dari mikroorganisme dan perubahan pH yang terjadi selama proses fermentasi saling terkait dan memengaruhi satu sama lainnya. Mikroorganisme memiliki rentang pH minimum, optimum dan maksimum untuk keberlangsungan hidupnya, kemudian perubahan pertumbuhan dari mikroorganisme selama proses fermentasi mengakibatkan perubahan pH pada proses fermentasi karena adanya proses yang menghasilkan asam dan mengoksidasi asam.

Awal waktu fermentasi pH tidak mengalami penurunan yang signifikan karena pertumbuhan BAL dan AAB belum mencapai tingkat optimum, tetapi penurunan pH ini disebabkan oleh pertumbuhan dari *Leuconostoc mesenteroides* yang menghasilkan asam laktat juga asam asetat (Zubaidah et al., 2020). Lama fermentasi jam ke-24,

pertumbuhan BAL menunjukkan fase stasioner, pada fase ini pH mulai menurun 21% hingga jam ke-48 dikarenakan BAL sudah tumbuh optimal dan menghasilkan asam laktat yang melimpah.

Bakteri asam asetat pada waktu fermentasi jam ke-24 sudah mulai tumbuh karena memasuki fase logaritmik sehingga jumlahnya semakin meningkat dan asam asetat yang dihasilkan pun semakin melimpah, hal ini mengakibatkan suasana pulp menjadi asam (Aryani et al., 2018). Selain disebabkan oleh bakteri penghasil asam, khamir juga memiliki peran dalam penurunan pH ini karena selain memetabolisme gula untuk menghasilkan etanol, khamir juga menghasilkan metabolit sekunder berupa asam sitrat dan asam asetat menyebabkan pH menurun (Thompson, Miller, and Lopez 2007; Yuliasni and Zakaria 2013).

Kenaikan pH pada waktu fermentasi jam ke-48 hingga jam ke-96 diakibatkan karena total BAL terus menurun sebesar 30%, yang menunjukkan bahwa BAL telah memasuki fase kematian, yang mengakibatkan asam laktat yang diproduksi menurun pula. pH mengalami peningkatan yang tidak signifikan pada akhir fermentasi, kenaikan pH diakhir fermentasi terjadi disebabkan oleh adanya degradasi asam sitrat di dalam pulp, asam tersebut akan mengalir (berdifusi) kedalam biji kakao yang terjadi selama sisa waktu fermentasi akibat aktivitas mikroorganisme (Vuyst et al. 2010; Sigalingging, et al. 2020). Nilai pH biji kakao yang baik adalah mendekati netral (pH>6) agar senyawa-senyawa khas coklat dapat terbentuk secara intensif dan standar pH kakao berkisar antara 6 - 7 (Aryani, et al. 2018).

Kadar Air

Kadar air biji kakao setelah dipanen mengandung kadar air yang tinggi yaitu sekitar 51%-60% (Ardhana and Fleet, 2003). Kadar air biji kakao basah selama fermentasi mengalami kenaikan seiring dengan lamanya fermentasi berlangsung, kadar air semakin meningkat karena menurut Mulato et al. (2005) dan Paper (2012) waktu fermentasi merupakan salah satu faktor penting penyebab meningkatnya kadar air sehingga apabila waktu fermentasi meningkat maka kadar air dalam biji kakao akan meningkat pula. Selain itu, peningkatan kadar air pada proses fermentasi disebabkan oleh aktivitas mikroorganisme.

Sejak 24 jam pertama fermentasi berlangsung, kadar air sudah mengalami perubahan, kadar air menurun sebesar 24,2% karena cairan pulp yang terurai mulai keluar melalui celah kotak fermentasi

dan belum terjadi aerasi karena fermentasi masih bersifat anaerob fakultatif sehingga belum ada perubahan asam laktat menjadi H₂O (Afrida & Gram, 2016). Kadar air mengalami peningkatan setelah 24 jam fermentasi berlangsung karena setelah 24 jam fermentasi, dilakukan pembalikan dan pengadukan biji kakao yang berfungsi untuk meningkatkan aerasi dan menjadikan proses fermentasi menjadi aerob, sehingga pada tahap ini asam laktat dan asam asetat akan diuraikan lagi hingga menghasilkan H₂O dan CO₂ (Afrida and Gram 2016; Papalexandratou et al. 2011).

Peningkatan kadar air terjadi pada waktu fermentasi ke-24 jam hingga ke-96 jam. Setelah 96 jam fermentasi berlangsung, kadar air kembali mengalami penurunan dikarenakan biji kakao yang telah mencapai akhir fermentasi mengalami pengeringan disebabkan pulp telah hampir habis diuraikan oleh mikroorganisme dan aktivitas mikroorganisme pun menurun pada akhir waktu fermentasi karena ketersediaan substrat yang sudah menurun (Aryani et al. 2018)

4. Kesimpulan

Pertumbuhan bakteri asam laktat optimum pada waktu fermentasi 24 jam dengan total koloni 6,1 log CFU/g. Pertumbuhan bakteri asam asetat dan khamir optimum pada waktu fermentasi 72 jam, dan kapang adalah mikroorganisme dengan pertumbuhan yang paling rendah dengan total koloni 1,3 log CFU/g dan optimum pada waktu fermentasi 48 jam. Fermentasi spontan pada biji kakao dapat berjalan optimal pada fase logaritmik dengan waktu fermentasi kurang dari 5 hari.

5. Daftar Pustaka

1. Abriani, C. R., Noor, A., & Dali, S. (2018). Identifikasi Mikroba pada Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Klon Sulawesi 1. *Bioma*, 9(2), 1–8.
2. Afrida, I. R., & Gram, P. (2016). *Deteksi Keberadaan Bakteri Asam pada Proses Pengolahan Kakao Detection of Acid Bacteria in the Process of Cocoa Production Tempat dan Waktu Penelitian Pengamatan Pola Pertumbuhan Bakteri Asam pada Medium Ekstrak Pulp*. 13(1), 822–826.
3. Apriyanto, M., Sutardi, S., Supriyanto, S., & Harmayani, E. (2018). Fermentasi Biji Kakao Kering Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, dan *Acetobacter aceti*. *Agrotech*, 37(3), 302. <https://doi.org/10.22146/agrotech.17113>

4. Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 87–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
5. Aryani, N. L. P. N. A., Yulianti, N. L., & Arda, G. (2018). Karakteristik Biji Kakao Hasil Fermentasi Kapasitas Kecil dengan Jenis Wadah dan Lama Fermentasi yang Berbeda Characteristics of Cocoa Beans on Small Capacity Fermentation Results Based on Different Types of Containers and Different Fermentation Lengths A. *Jurnal Beta (Biosistem Dan Teknik Pertanian)*, 6(1), 17–24.
6. BPS.2019, I. C. S. (2005). *STATISTIK KAKAO INDONESIA 2019 Indonesian Cocoa Statistics 2019* (D. S. T. Perkebunan (ed.)). Badan Pusat Statistik.
7. BSN. (1992). Cara Uji Makanan dan Minuman SNI 01-2891-1992. In *Sni* (p. Jakarta (ID): BSN).
8. Diansari, A. Z., Suwasono, S., & Yuwanti, S. (20015). Karakteristik fisik, kimia, dan mikrobiologis biji kakao kering produksi ptpn xii kebun kalikempit, banyuwangi. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(1), xx–xx.
9. Haliza, W., Purwani, E. Y., Fardiaz, D., & Suhartono, M. T. (2020). KAKAO FERMENTASI: PELEPASAN PEPTIDA BIOAKTIF DAN MANFAATNYA BAGI KESEHATAN Fermented Cocoa: The Release of Bioactive Peptides and Their Health Benefits. *Perspektif*, 18(2), 104. <https://doi.org/10.21082/psp.v18n2.2019.104-119>
10. Hardianto, Muhibuddin, A., & Sektiono, A. W. (2018). Optimalisasi Fosfat untuk Meningkatkan Pertumbuhan Kerapatan Populasi dan Kemampuan Antagonis *Saccharomyces cerevisiae* terhadap *Fusarium* sp. *Saintekbu*, 10(2), 27–41. <https://doi.org/10.32764/saintekbu.v10i2.206>
11. Managanta, A. A., Sumardjo, Sadono, D., & Tjitropranoto, P. (2019). Faktor-Faktor yang Berpengaruh terhadap Kompetensi Petani Kakao di Provinsi Sulawesi Tengah. *Jurnal Peyuluan*, 15(1), 120–133.
12. Manalu. (2018). Pengolahan biji kakao produksi perkebunan rakyat untuk meningkatkan pendapat petani. *J Ekonomi & Kebijakan Publik*, 9(2), 99–111.
13. ministry of plantation. (2018). Indonesian Plantation statistics. *Directorate General of Indonesian Plantation*, 1(December 2014), 96.
14. Mulato, S., Widyotomo, S., & Misnawi, E. S. (2005). Pengolahan produk primer dan sekunder kakao. *Pusat Penelitian Kopi Dan Kakao Indonesia*
15. Muzaiifa, M., Abubakar, Y., & Haris, F. (2017). Profil Pertumbuhan Mikroorganisme pada Fermentasi Biji Kakao Aceh. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia*, 9(2), 50–54. <https://doi.org/10.17969/jtipi.v9i1.5975>
16. Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
17. Paper, T. (2012). Kajian Fermentasi dan Suhu Pengeringan pada Mutu Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Journal Keteknikan Pertanian*, 26(2), 129–136. <https://doi.org/10.19028/jtep.26.2.129-136>
18. Schwan, Rosane F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
19. Schwan, Rosane Freitas. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(4), 1477–1483. <https://doi.org/10.1128/aem.64.4.1477-1483.1998>
20. Setiawati, Ernie Maduratna; Prahāsanti, Chiquita, W, P. A. (Ed.). (2014). Identifikasi Warna Koloni Bakteri Anaerob Pada Saliva Pasien Dengan Penyakit Periodontal. In *Ikatan Periodonsia Indonesia*. Airlangga University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1s5nzzw>
21. Shindy, B., Putri, P., Suwasono, S., & Choiron, M. (2014). IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI ANTI KAPANG DARI FERMENTASI KAKAO DI GUNUNG KIDUL YOGYAKARTA *Identification of Lactic Acid Bacteria as Antifungal Agent Isolated from Cocoa Fermentation at Gunung Kidul Yogyakarta*. x(1), 1–5.
22. Sigalingging, H. A., Putri, S. H., & Iflah, T. (2020). Perubahan Fisik Dan Kimia Biji Kakao Selama Fermentasi. *J. Industri Pertanian*, 2(2), 158–165.
23. Thompson, S. S., Miller, K. B., & Lopez, A. S. (2007). *Cocoa and Coffee* 39.
24. Titiek F. Djaafar, R. U. H. (2014). *Pemanfaatan Buah Kakao Sabagai Bahan Baku Bioindustri Di*

Indonesia.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21082/jp3.v33n2.2014.p69-78>

25. Vuyst, L. De, Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). *Chapter 17 Bean Fermentation*. 301–325.
26. Yuliasni, & Zakaria. (2013). Kajian Penambahan Khamir *Kluyveromyces lactis*, *Candida curiosa*, dan *Brettanomyces custersii* Asal Dadih Terhadap Konsentrasi Asam-Asam Amino, Lemak, Organik dan Karbohidrat Susu Kerbau Fermentasi (Dadiah). *Bionatura-Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 15(2), 54–59.
27. Zubaidah, E., Susanti, I., Yuwono, S. S., Rahayu, A. P., Srianta, I., & Blanc, P. J. (2020). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures in lower salt concentration fermentation on the sauerkraut quality. *Food Research*, 4(4), 1038–1044. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(4\).029](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(4).029)