

# PENGGUNAAN BEBERAPA ISOLAT KHAMIR PADA FERMENTASI BIJI KAKAO (Utilization of Some Yeast Isolates on Cocoa Beans Fermentation)

Susijahadi<sup>\*)</sup>

## ABSTRACT

Effects of inoculation of eleven Yeast isolates, on the properties of cocoa beans during fermentations was studied. Inoculation of the eleven yeast isolates resulted different chemical properties of the bean comparing with the control. Isolates E, G, H, J, and K increased the temperature of the mass of the beans than that of the control. Especially isolate H and I gave the optimal pH (5,26 and 5,25 respectively), resulting a high concentration of flavour precursors during fermentation. At the end of fermentation isolate H gave the highest concentration of total nitrogen (2,56%) and lipid (48,74%), whereas isolate I gave highest concentration of reduction sugar (2,71%) in cotyledon of the beans. Therefore inoculation of yeasts, especially isolate H and I, could improve the chemical properties of cocoa beans during fermentation.

Key words: isolate, inoculation

## PENDAHULUAN

Produksi kakao di Indonesia pada tahun 1997 sebesar 330.219 ton, dari jumlah tersebut sebesar 263.846 ton atau sekitar 75% merupakan tanaman kakao rakyat (Dirjen Perkebunan, 1998). Penurunan nilai rupiah terhadap dollar Amerika, menyebabkan hasil ekspor biji kakao memberikan devisa yang cukup tinggi bagi Indonesia. Jumlah ekspor biji kakao menduduki urutan pertama untuk produk perkebunan.

Kakao dari Indonesia di pasaran Internasional terutama negara Amerika sebagai negara konsumen terbesar dikategorikan sebagai biji kakao dengan mutu di bawah standar dan *off flavor*. Mutu biji kakao sangat dipengaruhi oleh fermentasi yang dilakukan oleh aktivitas mikroba baik oleh kelompok khamir maupun kelompok bakteri. Selama ini fermentasi biji kakao hanya memanfaatkan aktivitas mikroba sebagai hasil kontaminan secara spontan yang jumlah maupun aktivitasnya sangat bervariasi, sehingga jumlah dan jenis strain yang berperan di dalam proses kurang optimal.

Beberapa jenis khamir yang dijumpai dalam proses fermentasi biji kakao di Jawa yaitu *Sacharomyses anomalus* atau *Indomyses anomalus* dan *Sacharomyses theobroma*. Sedangkan beberapa bakteri yang ditemukan dalam fermentasi biji kakao meliputi *Bacillus xylinoides*, *B. xylinum*, *B. orleanicus* dan *B. Ascenden* (Sulistiyowati, 1986).

Selama fermentasi berlangsung biji kakao mengalami beberapa perubahan yang meliputi kematian biji, perubahan warna, penurunan protein, oksidasi fenol dan

hidrolisa glikosida. Kenaikan suhu, alkohol dan asam asetat selama fermentasi sangat berperan didalam kematian biji (Quesnell, 1965). Produksi asam asetat dan warna pada kotiledon dipengaruhi oleh pembalikan masa biji kakao dan pembalikan tiga kali serta empat kali adalah yang baik. Dalam kondisi ini asam asetat mencapai 29,76% (untuk pembalikan tiga kali) dan 29,52 (untuk pembalikan empat kali). Sedangkan warna coklat yang dicapai adalah 41,1% (untuk pembalikan tiga kali) dan 41,8% (untuk pembalikan empat kali) (Susijahadi and Jinap, 1998). Kenaikan suhu pada biji merupakan akibat terjadinya beberapa reaksi yang bersifat eksotermis, seperti proses hidrolisis gula menjadi alkohol dan oksidasi alkohol menjadi asam asetat. Antosianin sebagai salah satu dari polifenol yang dapat memberikan warna purple pada biji kakao yang belum difermentasikan selama fermentasi dihidrolisa menjadi sianidin dan gula sehingga warna purple hilang dan akan muncul warna coklat (Wood, 1975). Kadar protein pada kotiledon biji kakao oleh adanya kegiatan enzim protease akan dipecah menjadi asam-asam amino, dengan demikian selama fermentasi kandungan protein akan berkurang tetapi sebaliknya jumlah nitrogen terlarut akan meningkat. Kadar asam amino bebas pada biji kakao yang sudah mengalami fermentasi akan meningkat khususnya leusin fenilalanin alanin, valin dan asam glutamat (Zak and Keeney, 1976). Sementara Alamsyah (1991) mengatakan bahwa total asam amino pada biji kakao yang sudah difermentasikan umumnya dihitung sebagai leusin, karena menunjukkan komponen terbesar dari keseluruhan asam amino yang terdapat didalamnya.

Beberapa jenis gula yang terdapat pada biji kakao terutama jenis Trinitario meliputi Sukrosa sebesar 15 - 80 mg/100g biji, pentitol fruktosa (Holden, 1959). Sukrosa didalam fermentasi dihidrolisa menjadi glukosa, manitol dan inositol. Umumnya pada hari ketiga glukosa dan fruktosa meningkat menjadi 26,1% dan 53,0% yang selanjutnya secara perlahan-lahan akan menurun sampai dengan hari ke tujuh (*Reeniccius et al*, 1972). Akan tetapi Alamsyah (1991) mengatakan bahwa gula reduksi maksimal pada biji kakao dapat dicapai pada lama fermentasi 6 (enam) hari dan selanjutnya baru terjadi penurunan.

Tujuan penelitian yaitu untuk mengetahui pengaruh inokulasi isolat khamir yang memiliki daya pektinolitik dan fermentasi alkohol terhadap perubahan sifat fisis dan khemis komponen kimia penyusun biji kakao.

<sup>\*)</sup> Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

## BAHAN DAN METODA

### Bahan

Penelitian menggunakan 11 (sebelas) isolat khamir yaitu A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, dan K yang memiliki daya pektinolitik, dan fermentasi alkohol yang diisolasi pada hari ke dua dan ke empat dari fermentasi biji kakao jenis Forastero di kebun Kota Blater PTP Nusantara XII Jember, sebagai kontrol adalah fermentasi biji kakao tanpa inokulasi. Semua perlakuan dilakukan 5 (lima) kali ulangan. Sebagai bahan penelitian digunakan biji kakao jenis Forastero yang diperoleh dari kebun tersebut.

### Persiapan Penelitian

Kesebelas isolat khamir yang akan dipergunakan didalam penelitian diperbanyak dan diremajakan pada media agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan diinkubasikan selama 24 jam.

### Pembuatan Starter

Untuk perbanyak isolat khamir digunakan media dari pulp biji kakao yang terlebih dahulu dibuat *slurry* dengan air dalam rasio satu dibandingkan dua. Kedalam *slurry* tersebut ditambah gula sukrosa sebanyak 12% dari total bahan, selanjutnya dipanaskan pada suhu 60 - 70°C sampai larutan homogen. Selanjutnya didinginkan dan ditambah dengan (NH<sub>4</sub>) HP0<sub>4</sub> sebanyak 0,25g untuk setiap liter *slurry*. Nilai pH *slurry* disesuaikan menjadi sekitar 4,5 - 5,0. *Slurry* kemudian dimasukkan kedalam erlenmyer steril yang kemudian diinokulasi dengan biakan isolat khamir murni yang telah disediakan pada media PDA dengan ukuran satu tabung biakan khamir untuk setiap 100 ml *slurry*. Erlenmyer yang sudah diinokulasi dengan biakan khamir tersebut setelah ditutup dengan karet yang dilengkapi pipa plastik yang ujungnya dimasukkan ke dalam aquades steril kemudian diinkubasikan selama 24 jam.

### Fermentasi Biji Kakao

Biji kakao segar yang sudah dipisahkan dari buah kakao dimasukkan kedalam kotak fermentasi yang terbuat dari kayu. Selanjutnya pada masing-masing biji kakao yang sudah dipersiapkan dalam kotak fermentasi diinokulasi dengan biakan khamir yang telah ditumbuhkan dalam larutan starter dengan ukuran 20 ml untuk setiap 10 kg biji kakao sampai homogen (Schwan *et al*, 1993). Fermentasi dilaksanakan selama 4 hari pada suhu ruang. Setelah selesai fermentasi biji diturunkan, direndam dan dicuci dengan air, selanjutnya dikeringkan menggunakan panas matahari sampai kadar air mencapai 6 - 7%.

### Pengamatan

Selama fermentasi dilakukan pengamatan suhu fermentasi, pH pulp dan pH biji, kadar gula reduksi, N-total dan lemak pada biji. Pengamatan pertama

dilaksanakan setelah fermentasi berjalan 14 jam dan pengamatan selanjutnya dilakukan setiap 24 jam sekali sampai dengan akhir fermentasi.

Suhu fermentasi diukur dengan menggunakan termometer pada bagian tengah tumpukan massa biji kakao yang sedang difermentasikan. Nilai pH pada pulp diukur dengan menggunakan pH meter orion. Cara pengukuran pH pulp yaitu dengan memasukkan ujung pH meter ke dalam tumpukkan biji kakao. Sedangkan pengukuran pH biji caranya biji ditumbuk sampai halus selanjutnya diambil 10g dan dilarutkan ke dalam aquadest yang telah dididihkan terlebih dahulu sebanyak 90ml. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kapas dan filtratnya diukur pH-nya dengan menggunakan pH meter (Yusianto dan Wahyudi, 1991). Gula Reduksi dilakukan menggunakan metoda Luff Scoorl, N-total menggunakan metode Mikro Kjeldhal dan lemak menggunakan metode Soxlet (Sudarmadji *et al* 1981).

Dan hasil penelitian dianalisa dengan menggunakan analisa Variance dan uji Duncan's, serta penyajian grafik dan tabel.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Suhu Selama Fermentasi

Hasil pengukuran suhu selama fermentasi biji kakao dapat dilihat pada **Gambar 1**. Dari gambar tersebut terlihat bahwa suhu awal fermentasi (0 jam) biji kakao dari berbagai perlakuan bervariasi antara 25,5 - 26,6°C, dan selanjutnya meningkat sejalan dengan lama fermentasi mendekati suhu 50°C. Pada akhir fermentasi (86 jam) suhu pada masa biji kakao bervariasi antara 42° - 47,5°C.

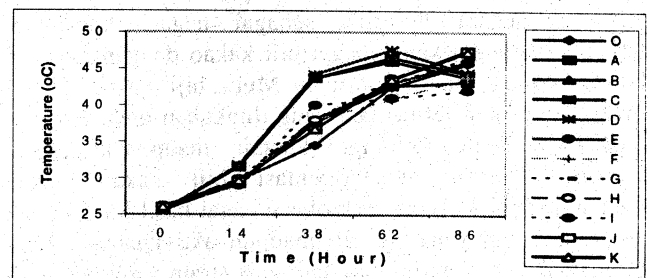


Figure 1. Temperature Changes of Cocoa Beans During Fermentation (°C). See "Bahan dan Metode" for the symbols used

Fermentasi biji kakao yang diinokulasi dengan isolat khamir sampai dengan fermentasi 38 jam dan 62 jam menunjukkan kenaikan suhu yang lebih tinggi dibanding dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa panas yang diproduksi oleh fermentasi biji kakao yang ditambah dengan isolat khamir lebih besar dibanding dengan kontrol. Suhu fermentasi biji kakao mulai terjadi penurunan sesudah fermentasi 62 jam. Adanya kenaikan suhu fermentasi biji kakao dalam fermentasi ini juga seperti yang ditemukan oleh Quesnell, 1968 bahwa adanya

aktivitas mikroba di dalam kotiledon memberikan panas kepada masa biji kakao. Nilai peningkatan suhu seperti juga yang dilaporkan oleh Kenten *et al* (1960) yang mengatakan bahwa kegiatan mikroba dapat menghasilkan panas. Selanjutnya Lopez (1986) mengatakan bahwa suhu di dalam fermentasi biji merupakan hasil adanya aktivitas dari mikroba. Aktivitas metabolisme mikroba di dalam fermentasi biji kakao meliputi oksidasi alkohol menjadi asam asetat, yang selanjutnya dioksidasikan menjadi karbon dioksida dan air. Reaksi-reaksi ini bersifat eksotermis sehingga akan membebaskan panas.

### Nilai pH - Pulp

Hasil pengukuran pH-pulp dapat dilihat pada **Gambar 2**. Dari gambar tersebut terlihat bahwa pH awal fermentasi (0 jam) pulp biji kakao berkisar antara 3,52 - 3,76, yang selanjutnya terlihat semakin meningkat, sehingga pH-pulp pada akhir fermentasi (86 jam) berkisar antara 4,23 - 4,93. Fermentasi biji kakao yang diinokulasi dengan isolat khamir A, D, H, I, dan K menunjukkan adanya kenaikan pH pulp yang lebih cepat dibanding kontrol, dengan pH pada fermentasi 86 jam masing-masing sebesar 4,80; 4,64; 4,65; dan 4,59 dibanding dengan 4,58. Terjadinya kenaikan pH pulp dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Forsyth dan Quesnell (1963) bahwa kenaikan pH pulp selama fermentasi disebabkan oleh terjadinya desimilasi asam asetat oleh khamir dan bakteri asam laktat.

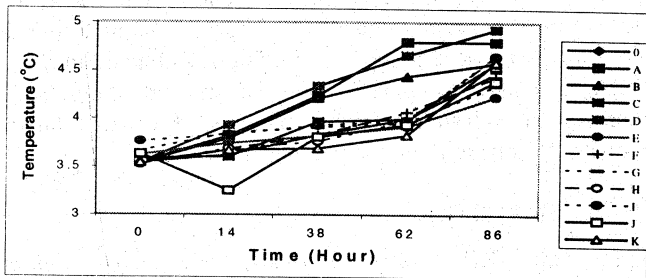


Figure 2. Changes of pH of Cocoa Beans Pulp During Fermentation. See "Bahan dan Metode" for the symbols used

### Nilai pH - Kotiledon

Dari hasil pengukuran pH kotiledon dapat dilihat pada **Gambar 3**. Dari gambar tersebut juga terlihat bahwa pH kotiledon pada awal fermentasi berkisar antara 6,74 - 6,75, yang kemudian secara perlahan-lahan akan menurun sehingga pH pada akhir fermentasi (86 jam) berkisar antara 5,00 - 5,25.

Nilai pH kotiledon berpengaruh terhadap kegiatan enzim yang ada pada kotiledon tersebut untuk merubah komponen kimia seperti protein, karbohidrat, dan lemak. Mulai fermentasi 62 jam pH kotiledon biji kakao yang diinokulasi lebih tinggi dibanding dengan kontrol. Nilai pH fermentasi kotiledon pada fermentasi 86 jam bervariasi

mulai dari 5,15 sampai dengan 5,26 (inokulasi) dibanding dengan 5,00 (kontrol). Isolat khamir H dan I menghasilkan pH kotiledon yang optimal untuk berlangsungnya fermentasi dalam kotiledon, masing-masing yaitu 5,26 dan 5,25 pada fermentasi 86 jam.

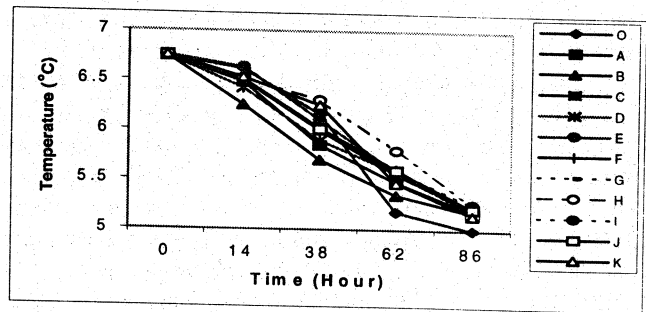


Figure 3. Changes of pH of Cocoa Cotyledon During Fermentation. See "Bahan dan Metode" for the symbols used

### Kadar Gula Reduksi (%)

Hasil analisa kadar gula reduksi yang masih tersisa pada kotiledon biji kakao setelah fermentasi (86 jam) dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Contents of reduction sugar, total nitrogen and lipid in the cotyledon of cocoa beans at the end of fermentation (See "Bahan dan Metode" for symbols used)

Sample	Reduction Sugar (%)	Total-N (%)	Lipid (%)
Control (0)	2,27 ± 0,20 b	1,85 ± 0,79 a	43,91 ± 2,60 b
A	2,52 ± 0,28 cd	1,83 ± 1,67 a	45,64 ± 2,13 b
B	2,24 ± 0,21 c	1,86 ± 0,72 a	45,37 ± 3,13 b
C	2,10 ± 0,35 a	1,98 ± 0,07 a	33,26 ± 1,08 a
D	2,63 ± 0,42 a	1,99 ± 1,10 a	48,49 ± 4,13 b
E	2,09 ± 0,08 a	2,15 ± 0,02 a	31,76 ± 1,23 a
F	2,49 ± 0,15 cd	2,70 ± 0,13 a	32,36 ± 1,44 a
G	2,63 ± 0,07 d	2,11 ± 0,04 a	32,36 ± 3,37 a
H	2,70 ± 0,18 d	2,56 ± 0,28 a	48,73 ± 3,82 b
I	2,71 ± 0,05 d	2,00 ± 0,24 a	32,18 ± 0,41 a
J	2,68 ± 0,16 d	2,12 ± 0,09 a	33,78 ± 3,20 a
K	2,29 ± 0,30 ab	1,69 ± 0,02 a	41,30 ± 2,33 ab

\* value followed by the same letter within the column do not differ significantly of the 5% level using Duncan's multiple test

Dari tabel tersebut terlihat bahwa hasil fermentasi biji yang diinokulasi dengan isolat khamir lebih tinggi dibanding dengan kontrol, kecuali yang diinokulasi dengan isolat khamir B, C, dan E. Kadar gula reduksi terendah dicapai pada biji yang diinokulasi dengan isolat C yaitu sebesar 2,10%. Keadaan ini menunjukkan bahwa hampir semua isolat khamir dapat meningkatkan hidrolisa senyawa gula di dalam biji menjadi gula reduksi (Holden, 1959).

Pada biji kakao yang diinokulasi dengan isolat A, D, F, G, H, I, J dan K mengandung kadar gula reduksi yang lebih besar dibanding dengan kontrol. Kadar gula reduksi tertinggi diperoleh pada biji yang diinokulasi dengan isolat khamir I, kemudian diikuti H masing-masing sebesar 2,71% dan 2,70%. Adanya perbedaan kadar gula reduksi pada kotiledon ini disebabkan oleh perbedaan genus atau strain khamir yang diinokulasikan ke dalam biji kakao yang difermentasikan. Hal ini seperti yang ditemukan oleh Schwan *et al* 1995 bahwa macam genus dan strain khamir yang aktif di dalam fermentasi biji kakao akan mempengaruhi produk fermentasi tersebut. Terjadinya perbedaan kadar gula reduksi pada kotiledon juga dapat disebabkan oleh terjadinya perbedaan pH selama fermentasi.

#### Kadar N-total (%)

Hasil pengukuran kadar N-total (%) pada kotiledon biji kakao setelah fermentasi (86 jam) dapat dilihat pada **Tabel 1**. Dari tabel tersebut terlihat bahwa N-total setelah fermentasi (86 jam) hampir pada semua perlakuan inokulasi biakan isolat khamir lebih tinggi dibanding dengan kontrol kecuali yang diinokulasi dengan isolat khamir K. Kadar N-total tertinggi didapatkan pada biji kakao yang diinokulasi dengan isolat khamir tipe F yaitu sebesar 2,70% kemudian diikuti oleh tipe H yaitu sebesar 2,56%. Fermentasi biji kakao yang diinokulasi dengan isolat khamir tipe F suhu fermentasinya mencapai 43,8°C, sedangkan pH pada kotiledon mencapai 5,19. Pada kondisi suhu dan pH ini sangat menunjang aktivitas enzim pada kotiledon untuk membentuk prekursor flavor (Said, 1980).

#### Kadar Lemak (%)

Hasil pengukuran kadar lemak (%) pada kotiledon kakao setelah fermentasi dapat dilihat pada tabel 1. Dari tabel tersebut terlihat biji kakao yang diinokulasi dengan isolat murni C, E, F, G, I, dan K kandungan lemak setelah fermentasi 86 jam lebih rendah dari pada kontrol masing-masing bervariasi dari 32,18% sampai 41,30%, dibanding 43,91%, sedangkan yang diinokulasi dengan lima jenis isolat khamir yang lain kadar lemaknya lebih tinggi. Kadar lemak tertinggi didapat pada biji kakao yang diinokulasi dengan isolat khamir tipe H yaitu sebesar 48,73% yang kemudian diikuti dengan isolat tipe D yaitu sebesar 48,49%.

## KESIMPULAN

Inokulasi dengan khamir pada biji kakao dapat meningkatkan suhu fermentasi, pH-pulp dan kotiledon, kadar gula reduksi, N-total, dan lemak pada kotiledon. Isolat khamir G, H, J, dan K dapat meningkatkan suhu fermentasi yang lebih tinggi dibanding kontrol, masing-masing sebesar 26,0 °C pada fermentasi 0 jam menjadi 46,5°C sampai 47,5°C pada fermentasi 86 jam, dan 25,5°C pada fermentasi 0 jam menjadi 45,7°C pada fermentasi 86 jam. Isolat khamir H dan I dapat meningkatkan pH kotiledon sehingga berada pada kisaran pH optimal untuk pembentukan prekursor flavor, masing-masing sebesar 5,26 dan 5,25. Inokulasi isolat khamir H dapat menghasilkan gula reduksi sebesar 2,70%, N-total 2,56%, dan lemak 48,73%, sedangkan isolat khamir I dapat menghasilkan kadar gula reduksi sebesar 2,07%, N-total 2%, dan lemak 3,18%.

## SARAN

Untuk meningkatkan mutu maupun flavor biji kakao hasil fermentasi disarankan untuk dilakukan fermentasi menggunakan isolat yang dominan baik dalam hidrolisa pektin, maupun fermentasi alkohol.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian maupun penulisan karya ilmiah ini dapat dilaksanakan berkat bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih terutama kepada Prof. Dr. Ir. Kapti Rahayu, Ir. Sony Swasono, M.App. Sc., Ph.D., Ir. Achmad Subagio, M.Agr., Ph.D., dan Ari Wahyu Sulistyowati yang telah banyak memberikan saran maupun bantuan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan naskah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah, T.S., 1991. *Peranan Fermentasi dalam Pengolahan Biji Kakao*. Berita Penelitian Perkebunan I (2) = 97-103.
- Forsyth W.G.C and V.C. Quesnell, 1963. *Mecanism of Cocoa Curing*. Advances in Enzymology. 25 : 457-492.
- Holden E.M, 1959. Processing of Raw Cocoa III *Enzymic Aspect of Cocoa Fermentation*. J. Sci. Food Agric. 10 (12).
- Jinap, S., I. Amin, and B. Jamilah. 1998. *Proteolytic Activity (Aspartic Endoprotease and Carboxypeptidase) of Cocoa Beans During Fermentation*. J. Sci. Food Agric. 76 : 123 - 128.
- Knapp, A.W., 1932. *Cocoa Fermentation. A Critical Survey of Its Scientific Aspect*. John Bale, Sons and Curnov Ltd. London P. 171.
- Reeniccius, G.A., G. Keency, and W. Werisberger, 1972. *Factors Affecting of Pyrazine in Cocoa Beans*. J. Agric. Food Chem. 20 (2) : 202-206.

- Rohan A.T., 1963. *Precursor of Chochalate Aroma*. J. Sci. Food Agric. 14 : 799-805.
- Sulistyowati, 1986. *Beberapa Faktor Mutu Biji Kakao*. Warta Balai Penelitian Perkebunan Jember. 5-22.
- Samah, O.A., M.F. Puteh, S. Jinap, H. Alisan, 1993. *Fermentation Products in Cocoa Beans Inoculated with Acetobacter*. ASEAN Food Journal 82 (1).
- Susijahadi, Wahyudi T, Unus, A. Santoso and S. Jinap, 1998. *Effect of Frequency Turning on Acetic Acid Concentration and Colour, During Cocoa Beans Fermentation*. Procc. Malaysian International Cocoa Conference, Kuala Lumpur 1998, Malaysia.
- Susijahadi and S. Jinap, 1998. *Isolation of Yeast Having Potential in Alcohol Fermentation from Fermented Cocoa Beans*. Procc. Malaysian Science and Technology Congres 1998, Kuala Terengganu Malaysia.
- Sudarmadji, S., B. Haryono, dan Suhardi, 1981. *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Ed. 2. Penerbit Liberty Yogyakarta.
- Wood, G.A.R (1975). *Cocoa*. 3 rd. ed. Longman, London.
- Yusianto, T. Wahyudi, dan Sumartono, 1995. *Analisa Mutu Pada Kakao Lindak. (Theobroma Cacao L.) Pada Beberapa Perlakuan Fermentasi*, Pelita Perkebunan.
- Zak, D.L., and G. Keeney, 1976. *Implication of Bacillus subtilis in The Sythesis of Tetramethyl Pyrazine During Fermentation of Cacao Beans*. J. Sci. Food Agric. 10 (12).