

Peningkatan Mutu Kakao Melalui Percepatan Lama Fermentasi dengan Penggunaan Pektinase *Aspergillus niger* dan Ion Kalsium

*Cocoa Quality Improvement by Fermentation Time Acceleration with The Application of *Aspergillus niger* Pectinase and Calcium Ions*

Novia Anggraini, Christina Mumpuni Erawati*, Sulistyono Emantoko Dwi Putra

Jurusan Bionutrisi dan Inovasi Pangan, Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya

Jalan Raya Kalirungkut Surabaya, 60293, Jawa Timur, Indonesia

*Korespondensi Penulis: christina_erawati@staff.ubaya.ac.id

Submisi: 12 Desember 2023, Revisi: 9 Januari 2024, Diterima (*Accepted*): 27 Mei 2024

ABSTRACT

Indonesia is the third largest producer of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) in the world, but the quality of Indonesian cocoa beans is considered as low. Fermentation is one of the factors that affect the quality of cocoa beans. Fermentation of cocoa beans is a spontaneous fermentation and takes about 5-7 days (for bulk cacao). The objective of this study was to determine the potential of adding pectinase from *Aspergillus niger* and calcium ions in accelerating fermentation time and the quality of cocoa beans produced. The independent variable in this study was the concentration of calcium ions as an enzyme activator. The concentration of calcium ions and pectinase are applied to cocoa fermentation. The observations made were reducing sugar content, total sugar content, protein content, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria levels. Parametric data will be analysed by T-test independent with a confidence level of $\alpha=0.05$. The results showed that added 4.5 units of pectinase and 100 mM calcium ions have significant in reduce the total sugar compared with control due to enzymatic activity. Therefore, the addition of pectinase enzymes from *Aspergillus niger* and calcium ions have a potential to accelerate the fermentation time and the fermented cocoa beans that have been carried out have met the quality standards of SNI 2828:2008 and included in I – B group of forastero cocoa. This potential needs to be tested further with a larger fermentation volume, for example above 40 kg, to achieve the optimal temperature for the formation of flavor precursors.

Keywords: cocoa bean, ion calcium, pectinase, quality

PENDAHULUAN

Pisang merupakan Pemerintah telah menetapkan industri pengolahan kakao sebagai salah satu sektor yang diprioritaskan pengembangannya sesuai Rencana Induk Pembangunan Industri Nasional (RIPIN) tahun 2015–2035

(Ariningsih *et al.*, 2021). Selain merupakan komoditas perkebunan yang memiliki prospek cerah (Ibnu, 2023) juga ada beberapa permasalahan yang harus diatasi karena Indonesia yang semula adalah produsen kakao ketiga di dunia tahun 2015, menjadi keempat pada tahun 2016-2017



Jurnal Agroteknologi is open access article licensed under the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

How to cite: Anggraini, N., Erawati, C.M., & Putra, S.E.D. (2024). Peningkatan mutu kakao melalui percepatan lama fermentasi dengan penggunaan pektinase *Aspergillus niger* dan ion kalsium. *J. Agroteknologi*, 18(01), 14-26. DOI: 10.19184/j-agt.v18i01.41641

dan menjadi ketujuh pada 2019 menurut ICCO (2019). Luas perkebunan rakyat menempati peringkat paling atas yaitu sekitar 99% (BPS, 2022) dari total luas kebun kakao secara nasional yang terdiri dari perkebunan rakyat, perkebunan negara dan perkebunan swasta. Biji kakao yang dihasilkan perkebunan rakyat pada umumnya memiliki mutu yang rendah sehingga belum memenuhi persyaratan standar biji kakao menurut SNI 2323:2008/Amd 1:2010. Simpul kritis yang paling menentukan mutu biji kakao sesuai standar tersebut adalah penanganan pascapanen kakao, khususnya fermentasi. Sebagian besar petani tidak melakukan proses fermentasi, biji kakao dipanen lalu dikeringkan saja menjadi kakao asalan non fermentasi. Menurut Ariningsih *et al.* (2021), petani kakao kurang tergerak melakukan fermentasi jika harga kakao fermentasi tidak berbeda dengan kakao non fermentasi dan proses fermentasi relatif lama sehingga menunda pendapatan hasil panen. Fermentasi biji kakao belum memiliki standar yang baku sehingga kualitas biji kakao fermentasi beragam dan fermentasi berlangsung lama yaitu 5–7 hari (Febrianto & Zhu, 2020).

Peningkatan mutu kakao rakyat mutlak perlu untuk meningkatkan citra kakao Indonesia. Proses fermentasi mampu meningkatkan mutu kakao, baik secara warna coklat (*well fermented*) maupun terbentuknya flavor dan citarasa (Hanifah *et al.*, 2022). Fermentasi biji kakao melibatkan mikroba dan kerja enzim. Mikroba (ragi, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat) memainkan peran penting dalam fermentasi kakao yaitu menghasilkan serangkaian reaksi enzimatik yang stabil untuk menguraikan lendir pulp dan berkontribusi terhadap mutu kakao (Hirko *et al.*, 2023).

Beberapa metode dapat dilakukan untuk mempercepat proses fermentasi dengan mutu sesuai standar, salah satunya dengan penambahan kultur starter maupun enzim (Rahardjo *et al.*, 2022). Salah satu enzim yaitu pektinase dapat bekerja memecah senyawa pektin menghasilkan asam galakturonat. Selama fermentasi biji kakao, enzim pektinase menyebabkan depektinasi massa putih pulp berlendir yang mengalir keluar dan mempercepat difusi metabolit mikroba ke dalam biji (Anand *et al.*, 2020). Oleh karena itu, penambahan pektinase memiliki potensi untuk mempercepat fermentasi yaitu bersama-sama pektinase alami dapat segera meluruhkan/mengurangi pulp dan mikroba segera dapat bekerja melakukan degradasi senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana misalnya asam-asam organik. Asam organik akan masuk ke dalam daging biji kakao dan mengakibatkan sel-sel biji kakao yang semula mengandung antosianin (pigmen ungu) dan enzim polifenol oksidase pecah sehingga daging biji berubah warna dari ungu menjadi coklat karena antosianin dioksidasi oleh enzim polifenol oksidase (Rahardjo *et al.*, 2022). Warna coklat (*well fermented*) inilah yang menjadi salah satu indikator mutu kakao dalam SNI.

Produksi pektinase dalam skala besar biasanya menggunakan kapang berfilamen, salah satunya adalah *Aspergillus niger* (Chen *et al.*, 2024; Esawy *et al.*, 2022; Jangra & Srivastava, 2023). Di lain sisi, ion logam dapat berperan sebagai kofaktor enzim dan membantu meningkatkan laju reaksi (Anggraini *et al.*, 2020; Anand *et al.*, 2020). Oleh karena manfaat tersebut, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui potensi penambahan pektinase dan ion kalsium sehingga dapat mempercepat proses fermentasi kakao

dengan mengukur beberapa parameter fermentasi dan mengetahui mutu biji kakao terfermentasi berdasarkan SNI 2323-2008. Melalui penelitian ini, diharapkan proses fermentasi kakao lebih efisien dari segi waktu (tidak terlalu lama) dan memenuhi kualitas sesuai SNI kakao yang berlaku di Indonesia saat ini.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat untuk fermentasi kakao adalah kotak kayu ukuran (15×15×40) cm³. Alat untuk analisis antara lain neraca analitik (Ohaus), peralatan gelas (Pyrex), mikropipet 1 mL (BioRad), *waterbath*, *hotplate*, *stirrer* (Thermo), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 105), *colony counter* (Boeco, China).

Bahan untuk fermentasi kakao diantaranya CaCl₂, enzim pektinase dari *Aspergillus niger* (CDH product), dan buah kakao lindak (dibeli dari petani kakao di daerah Sukomulyo, Kecamatan Gandusari, Kabupaten Blitar). Bahan-bahan untuk analisis adalah asam asetat glasial (Merck), natrium asetat (Merck), aquades, reagen DNS (Merck), buffer asetat pH 4,5; NaCl (Merck), petroleum eter (Merck), reagen ninhidrin (Merck), garam Rochelle (Merck), fenol (Merck), asam sulfat pekat (Merck), *bovine serum albumin*, etanol (Merck), asam oksalat (Merck), NaOH (Merck), media MRSA (Merck), *yeast extract* (Merck), bacto agar 16 (Oxoid), indikator fenoltalein 1%, asam galakturonat, dan glukosa (Merck).

Tahapan Penelitian

Penentuan Jumlah Ion Kalsium yang Digunakan (Mangasi, 1995)

Penentuan jumlah ion kalsium dilakukan menggunakan 1 mL larutan (1%

pektin dalam buffer asetat pH 4,5) yang dimasukkan dalam 5 tabung reaksi dan diberi label sampel P1, P2, P3, kontrol, dan blanko. Pada tabung sampel ditambahkan 1 mL enzim dan 100 µL larutan CaCl₂ [konsentrasi 50 mM (P1), 100 mM (P2), dan 150 mM (P3)], pada tabung kontrol ditambahkan 1 mL enzim, dan pada tabung blanko ditambahkan 1 mL aquades. Kelima tabung tersebut diinkubasi dalam penangas air pada 40°C selama 30 menit. Sejumlah gula pereduksi yang terbentuk diukur aktivitas enzimnya menggunakan metode asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS). Kurva standar dibuat dengan menggunakan asam galakturonat sebagai substrat. Penambahan berapa banyak ion kalsium yang terpilih ditunjukkan dengan kadar gula reduksi tertinggi yang dihasilkan.

Fermentasi Biji Kakao dan Penentuan Lama Fermentasi (Albertini et al., 2015; Schwan & Wheals, 2004)

Biji kakao disortir secara manual (ukuran biji besar, pulp putih, tidak kering-menempel, tidak busuk). Biji kakao dimasukkan ke dalam peti fermentasi kurang lebih 1 kg. Bagian dalam kotak kayu diberi lapisan daun pisang yang telah dibersihkan. Setelah bagian dalam kotak kayu dilapisi daun pisang, biji kakao dimasukkan dan bagian atas tumpukan biji kakao ditutup dengan beberapa lapis daun pisang. Fermentasi dilakukan pada suhu ruangan sekitar 37°C, dilakukan pengadukan, kemudian dicek suhu fermentasi menggunakan termometer setiap 24 jam sekali. Pada akhir fermentasi akan mulai muncul aroma asam asetat khas pada cokelat, daging biji dibelah dan berwarna coklat maka saatnya dilakukan pengeluaran biji kakao dari kotak/peti fermentasi dan dijemur menggunakan sinar matahari sekitar suhu 40–45°C hingga

kering (kadar air 7%) selama 2–3 hari penuh (tergantung terik matahari).

Pengujian pengaruh pektinase dan ion kalsium dilakukan dengan penambahan 4,5 unit pektinase (perlakuan E) pada biji kakao basah sebelum fermentasi dibandingkan dengan perlakuan fermentasi tanpa penambahan pektinase (perlakuan K). Konsentrasi ion kalsium terpilih ditambahkan pada proses fermentasi dengan kriteria kadar gula reduksi tertinggi (berdasarkan **Tabel 1**). Selama proses fermentasi kakao dilakukan uji kimia (gula reduksi, gula total, kadar asam amino, dan total asam tertitrasi), dan uji mikrobiologi jumlah bakteri asam laktat (BAL) dan bakteri asam asetat (BAA) pada biji basah.

Produk yang dihasilkan dari tahap ini adalah biji kakao kering. Produk ini akan diuji mutunya sesuai SNI 2323-2008 meliputi sifat fisik (kadar benda asing, serangga hidup, kadar biji berserangga, kadar biji *slaty*, kadar biji berjamur, kadar biji pecah), dan kimiawi (kadar air).

Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk melihat potensi pektinase mempercepat waktu fermentasi dalam skala laboratorium. Faktor yang digunakan adalah teknik fermentasi, membandingkan antara fermentasi kakao menggunakan pektinase dan ion kalsium (perlakuan E) dengan fermentasi kakao tanpa pektinase dan ion kalsium (perlakuan K). Proses fermentasi dilakukan sebanyak 2 kali ulangan.

Metode Analisis

Uji fisik, kimia, dan persiapan analisis mikrobiologi terkait jumlah bakteri asam laktat (BAL) dan bakteri asam asetat (BAA) sesuai dengan metode SNI 2323 (2008). Preparasi sampel biji kakao untuk

analisis kimia dilakukan dengan menghaluskan ± 3 g biji kakao. Biji kakao yang telah halus dibungkus dengan kertas saring. Sampel diekstraksi dengan metode *Soxhlet* menggunakan pelarut petroleum eter secukupnya. Ekstraksi dilakukan selama 4 jam. Sampel bebas lemak dilarutkan dalam 100 mL aquades dengan pemanasan pada *waterbath* suhu 65°C. Filtrat kemudian disaring dan dilanjutkan dengan uji kimia.

Uji Gula Reduksi Metode DNS

Larutan sampel biji kakao diambil 3 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi. 3 mL reagen DNS ditambahkan ke dalam tabung. Larutan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 1 mL garam *Rochelle* 40% dan didinginkan dalam air dingin selama 20 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 575 nm. Kurva standar dibuat dengan *plotting* konsentrasi larutan glukosa sebagai sumbu X dan absorbansi larutan sebagai sumbu Y sehingga didapatkan persamaan linier $Y = a + bX$.

Uji Gula Total Metode Acid Phenol

1 mL larutan standar atau larutan sampel biji kakao dimasukkan tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL fenol 5%. Larutan yang telah homogen ditambahkan 5 mL H₂SO₄ pekat dan dikocok sampai merata. Larutan campuran didiamkan selama 10 menit lalu dikocok dan dipanaskan dalam *waterbath* suhu 25–30°C selama 10-20 menit. Absorbansi diamati dengan panjang gelombang 488 nm. Kurva standar dibuat dengan *plotting* konsentrasi larutan glukosa sebagai sumbu X dan absorbansi larutan sebagai sumbu Y sehingga didapatkan persamaan linier $Y = a + bX$ dengan nilai $R_2 \geq 0,97$.

Uji Asam Amino Metode Ninhidrin

4 mL larutan standar atau larutan sampel biji kakao dimasukkan tabung reaksi, ditambahkan 1 mL reagen ninhidrin, dan dihomogenkan dengan vortex. Tabung reaksi ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada air mendidih selama 15 menit. Larutan didinginkan dengan merendam tabung reaksi dalam air dingin. Setelah larutan dingin ditambahkan 1 mL etanol dan dihomogenkan. Absorbansi diamati dengan panjang gelombang 570 nm. Kurva standar dibuat dengan *plotting* konsentrasi larutan glukosa sebagai sumbu X dan absorbansi larutan sebagai sumbu Y sehingga didapatkan persamaan linier $Y = a + bX$ dengan nilai $R_2 \geq 0,97$, dan asam tertitrasi metode Sigalingging *et al.*, (2020). 1 gram biji kakao dihaluskan menggunakan mortar atau blender selama kurang lebih 1 menit dan diencerkan dengan 100 mL aquades. Filtrat sampel sebanyak 25 mL dititrasi dengan NaOH 0,1 N dengan menggunakan indikator fenolftalein. Titik akhir titrasi ditandai dengan terbentuknya warna merah muda yang stabil. Kadar asam dapat dihitung menggunakan rumus berikut: $M \text{ asam} = (M \text{ NaOH} \times V \text{ NaOH}) / V \text{ sampel}$ Preparasi sampel biji kakao untuk analisis BAL (bakteri asam laktat) dan BAA (bakteri asam asetat) dilakukan dengan menghaluskan ± 5 g biji kakao dimasukkan dalam kantong plastik steril. 45 mL larutan pengencer (0,9% NaCl) dimasukkan secara aseptis ke dalam plastik. Campuran kemudian di-*stomacher* selama 2 menit. Hasil *stomacher* dimasukkan dalam labu erlenmeyer sebagai pengenceran 10^{-1} . Dilakukan pengenceran hingga 10^{-5} dijadikan sampel dan diuji pada media MRSA dan *Acetobacter agar*.

Biji kakao kering (hasil fermentasi dan pengeringan) diuji mutunya berdasarkan syarat mutu SNI 2323:2008

tentang biji kakao dan telah disesuaikan dengan standard amandemen 2010.

Analisis Data

Data pengamatan kimia selama fermentasi meliputi kadar gula total, gula reduksi, asam amino, total asam titrasi, jumlah bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat diuji normalitasnya. Data parametrik akan diolah dengan uji *T-independent*) dengan tingkat kepercayaan $\alpha=0,05$; sementara untuk data non-parametrik bisa menggunakan *Man Whitney*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Ion Kalsium sebagai Aktivator Pektinase Selama Fermentasi Kakao

Penambahan ion kalsium sejumlah 50 mM hingga 150 mM yang merujuk pada penelitian Mangasi (1995) berperan sebagai aktivator pektinase. Aktivitas pektinase dapat diukur dengan melihat kadar gula reduksi karena pektinase mengubah pektin menjadi gula reduksi. Pektinase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis pektin, sebuah polisakarida yang terdiri dari unit gula galakturonat. Dalam proses ini, pektinase mengkonversi pektin menjadi gula reduksi, seperti gula galakturonat, yang dapat diukur menggunakan metode kolorimetri dengan menggunakan asam galakturonat sebagai standar (Lestari, 2019). Aktivitas enzim pektinase yang distimulasi oleh penambahan ion kalsium terdeteksi berdasarkan kadar gula reduksi yang terbentuk sebagaimana tersaji pada **Tabel 1**.

Penambahan 100 mM ion kalsium menghasilkan kadar gula reduksi paling tinggi yaitu 77,68%. Menurut Anand *et al.* (2020), ion kalsium dapat bekerja sebagai stimulator aktivitas pektinase yang dapat meningkatkan hingga 50% aktivitas enzim.

Akan tetapi jika konsentrasi aktivator yang berlebihan dapat menjadi inhibitor atau tidak dapat meningkatkan laju reaksi karena ion kalsium tidak lagi menarik pasangan elektron bebas pada reaksi enzimatis antara enzim pektinase dan substrat pektin, tetapi mengikat sisi aktif pektinase sehingga menghalangi pektin berikatan dengan enzim dan terjadi penurunan aktivitas pektinase (Rehman *et al.*, 2021). Penurunan aktivitas pektinase terjadi pada P3 (penambahan enzim dan 150 mM ion kalsium) sehingga penambahan ion kalsium dilakukan seperti perlakuan P2 karena menunjukkan aktivitas pektinase tertinggi.

Tabel 1. Kadar gula reduksi pada substrat pektin dengan buffer asetat pH 4,5

Perlakuan	Kadar gula reduksi (%)
• Kontrol (enzim)	45,32±0,42 ^a
• Enzim dan 50 mM ion kalsium (P1)	67,93±0,47 ^b
• Enzim dan 100 mM ion kalsium (P2)	77,68±0,20 ^c
• Enzim dan 150 mM ion kalsium (P3)	65,30±0,12 ^d

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Sifat Kimia Selama Fermentasi dengan Penambahan Pektinase dan Ion Kalsium dan Mutu Biji Kakao

Suhu Tumpukan Biji Kakao Terfermentasi

Suhu tumpukan biji kakao selama proses fermentasi perlakuan tanpa dan dengan penambahan pektinase cenderung mengalami kenaikan (**Tabel 2**). Perubahan suhu tersebut terjadi secara signifikan setelah 24 jam fermentasi. Perlakuan dengan enzim pada kedua fermentasi cenderung memiliki suhu yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hal ini terjadi karena

adanya aktivitas mikroba menyebabkan peningkatan suhu. Reaksi perubahan gula menjadi alkohol bersifat eksoterm sehingga dihasilkan panas dan menyebabkan kenaikan suhu pada fermentasi biji kakao (Hart, 2019). Adanya penambahan enzim menyebabkan suhu tumpukan biji kakao selama proses fermentasi akan lebih tinggi karena proses degradasi pektin sebagai sumber makanan mikroba yang berperan dalam fermentasi lebih cepat terjadi. Namun demikian suhu tertinggi adalah 43°C yang dicapai pada fermentasi dengan penambahan enzim (E), hal ini dirasa masih belum mencapai suhu optimal pembentukan flavor yaitu 45–50°C (Araque *et al.*, 2020) kemungkinan karena volume fermentasi yang perlu ditambah.

Tabel 2. Suhu fermentasi biji kakao pada tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Suhu fermentasi (°C)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	30,55±5,26	30,73±4,59
1	40,68±0,13 ^a	40,98±0,90 ^a
2	41,33±1,12 ^a	41,33±1,74 ^a
3	41,98±0,60 ^a	41,50±0,36 ^a
4	42,98±0,81 ^a	42,58±0,49 ^a
5	43,60±0,62 ^a	42,63±0,91 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Kadar Gula Reduksi Biji Kakao

Kadar gula reduksi biji kakao mengalami fluktuasi namun cenderung menurun selama fermentasi (**Tabel 3**). Kenaikan kadar gula reduksi dapat disebabkan adanya proses degradasi pektin, pati, sukrosa yang terkandung pada pulp dan biji kakao oleh aktivitas enzimatis. Selama fermentasi terjadi reaksi enzimatis oleh beberapa enzim invertase dan

penambahan enzim pektinase dapat menaikkan kadar gula reduksi karena enzim pektinase akan memecah pektin yang ada pada pulp. Penurunan kadar gula reduksi dikarenakan gula digunakan sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan mikroba yang berperan selama proses fermentasi (Araque *et al.*, 2020). Menarik untuk dicermati adalah penurunan kadar gula reduksi pada hari ke 1 menuju hari ke 2 yang menurun cukup tajam, hal ini dapat dihubungkan dengan data gula total pada **Tabel 4** berikutnya dimana gula total juga mengalami penurunan sehingga menyebabkan gula reduksi yang dihasilkan juga menurun. Pada fermentasi biji kakao, gula reduksi berperan sangat penting sebagai prekursor aroma dan agen pendegradasi asam amino dalam reaksi non-enzimatis, Maillard, sehingga kecepatan pembentukan gula reduksi akan berpengaruh pada kualitas biji kakao (Muñoz, 2019).

Tabel 3. Kadar gula reduksi biji kakao tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Kadar gula reduksi (%)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	0,83±0,15 ^b	0,44±0,02 ^a
1	0,78±0,26 ^a	0,49±0,12 ^a
2	0,45±0,16 ^a	0,36±0,09 ^a
3	0,47±0,11 ^a	0,43±0,12 ^a
4	0,46±0,14 ^a	0,43±0,13 ^a
5	0,41±0,10 ^a	0,47±0,21 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Kadar Gula Total Biji Kakao

Gula total selama fermentasi terjadi penurunan, baik pada perlakuan dengan pektinase (E) dan tanpa pektinase (K). Pada

Tabel 4, kadar gula total dengan perlakuan (E) mengalami penurunan yang signifikan selama proses fermentasi berlangsung. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan enzim dapat mempercepat proses pelepasan pulp dengan memecah pektin menjadi monomernya sehingga kadar gula total pada perlakuan enzim cenderung mengalami penurunan yang lebih cepat dibandingkan dengan kontrol. Hasil pemecahan pektin menjadi monomernya bisa menjadi gula reduksi, salah satunya, dan bisa jadi jatuh terbuang bersama pulp yang meluruh sebagai tetesan di bawah kotak fermentasi. Menurut Rottiers *et al.* (2019), penurunan kadar gula total menandakan bahwa gula dalam bentuk kompleks telah dipecah menjadi gula sederhana dan gula sederhana dimetabolisme oleh mikroba yang berperan dalam proses fermentasi.

Tabel 4. Kadar gula total biji kakao tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Kadar gula total (%)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	1316,09±133,79 ^a	1338,69±198,72 ^a
1	1032,53±252,43 ^b	1247,26±175,87 ^a
2	760,25±150,76 ^b	1165,58±201,92 ^b
3	593,84±196,32 ^b	1052,06±141,62 ^b
4	443,84±92,69 ^b	923,63±150,89 ^b
5	300,51±70,25 ^b	830,14±129,05 ^b

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Dengan demikian, **Tabel 4** menjadi indikator kuat bahwa kinerja pektinase yang ditambahkan selama fermentasi dapat mempercepat proses perubahan pektin menjadi monomernya maupun dalam hal meluruhkan pulp kakao sehingga memiliki potensi mempercepat proses fermentasi karena perlakuan E (penambahan

pektinase) signifikan berbeda dengan perlakuan K (tanpa penambahan pektinase). Hal ini memiliki kesamaan dengan penelitian Muñoz *et al.*, 2019, penurunan kadar gula total juga diduga karena sebagian hasil pemecahan gula berdifusi keluar dari keping biji. Penurunan konsentrasi gula total juga akan semakin cepat dengan semakin rendahnya volume pulp, karena volume pulp yang rendah dapat mempercepat kematian biji dimana kecepatan perombakan senyawa gula dalam keping biji kakao akan semakin cepat terjadi (Muñoz *et al.*, 2019). Penelitian ini juga belum dapat memberikan hasil dalam berapa hari pektinase ini mampu mempercepat proses fermentasi karena tidak ada pengujian kualitas hasil fermentasi dari tiap hari fermentasi, sehingga tanpa pengujian kualitas fermentasi pada tiap hari tidak dapat disimpulkan bahwa proses fermentasi telah selesai.

Kadar Asam Amino Biji Kakao

Tabel 5 menunjukkan kadar asam amino perlakuan dengan pektinase (E) selama proses fermentasi mengalami kenaikan dan memiliki kadar asam amino yang lebih tinggi dibanding kontrol (K) namun secara statistik tidak berbeda nyata. Tingginya kadar asam amino pada perlakuan enzim menunjukkan bahwa dengan penambahan enzim dapat mempengaruhi kandungan asam amino biji kakao selama proses fermentasi dengan cara mempercepat proses degradasi protein menjadi asam amino. Peningkatan kadar asam amino dikarenakan adanya aktivitas mikrobial dan enzim *endogenous* dari keping biji kakao yang mendegradasi protein menjadi asam amino. Asam amino akan naik sejalan dengan lamanya proses fermentasi (D'Souza *et al.*, 2018).

Sementara itu, penurunan asam amino terjadi karena adanya reaksi *browning* non-enzimatis Maillard dengan gula pereduksi (Tamimi, 2023).

Tabel 5. Kadar asam amino biji kakao tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Kadar asam amino (%)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	0,89±0,02 ^a	0,93±0,03 ^a
1	0,96±0,07 ^a	0,95±0,04 ^a
2	1,16±0,13 ^a	1,01±0,08 ^a
3	1,29±0,32 ^a	1,06±0,19 ^a
4	1,40±0,49 ^a	1,18±0,28 ^a
5	1,48±0,48 ^a	1,38±0,39 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Kadar Asam Tertitrasi Biji Kakao

Pada **Tabel 6** menunjukkan kadar asam tertitrasi pada fermentasi biji kakao cenderung mengalami peningkatan baik pada perlakuan dengan pektinase (E) maupun tanpa pektinase (K) tapi tidak berbeda nyata. Kenaikan kadar asam selama fermentasi menunjukkan bahwa masih ada aktivitas mikroba yang menghasilkan senyawa asam sehingga proses fermentasi masih berlangsung. Peningkatan kadar asam selama proses fermentasi mengindikasikan konversi gula menjadi asam laktat oleh bakteri asam laktat (BAL) dan konversi etanol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat (BAA). Pada akhir fermentasi (hari ke-5) akan terjadi penurunan kadar asam dikarenakan penurunan aktivitas BAL dan BAA karena substrat yang mulai habis, serta terjadinya penguapan asam asetat seiring kenaikan suhu fermentasi (Lopez & Dimick, 1995).

Tabel 6. Kadar asam tertitrasi biji kakao tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Kadar asam tertitrasi (%)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	1,03±0,24 ^a	0,99±0,18 ^a
1	1,65±0,18 ^a	1,27±0,09 ^a
2	1,79±0,19 ^a	1,41±0,11 ^a
3	2,02±0,24 ^a	1,79±0,24 ^a
4	2,21±0,094 ^a	1,65±0,42 ^a
5	2,12±0,18 ^a	2,12±0,32 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Jumlah Bakteri Asam Laktat dan Asam Asetat Selama Fermentasi Biji Kakao

Jumlah BAL pada kedua percobaan fermentasi mengalami kenaikan di awal fermentasi dan penurunan di akhir fermentasi (**Tabel 7**), sedangkan pada jumlah BAA (**Tabel 8**) cenderung mengalami kenaikan hingga akhir fermentasi. Berdasarkan Apriyanto (2018) dan Sarbu & Csutak (2019), mikroba yang berperan aktif pada hari pertama fermentasi adalah *yeast* yang menghasilkan etanol. Pada hari kedua fermentasi jumlah BAL mulai meningkat karena kondisi lingkungan yang mulai ideal untuk pertumbuhannya, dimana suhu dan pH lingkungan mulai meningkat. Hal ini karena adanya aktivitas pektinolitik yang memberikan cukup ruang untuk aerasi dan pertumbuhan BAL yang bersifat mikroaerofilik dan *aciduric*. BAL dan *yeast* akan mendegradasi gula pada pulp hingga kadar gula habis, kurang lebih pada hari ketiga fermentasi, sehingga aktivitas dari BAL akan mulai menurun dan didominasi oleh aktivitas BAA. BAL akan mengkonversi gula dan asam organik dan menghasilkan produk asam laktat, asam asetat, etanol, mannitol, dan CO₂ yang

berpengaruh pada keasaman dan kualitas biji kakao. Jumlah etanol yang semakin meningkat, adanya aerasi, serta kenaikan suhu akan meningkatkan aktivitas dari BAA, dimana etanol berperan sebagai substrat pada pembentukan asam asetat.

Tabel 7. Jumlah bakteri asam laktat biji kakao tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Jumlah bakteri asam laktat (log ₁₀ CFU/mL)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	4,50±0,58 ^a	4,50±0,58 ^a
1	7,08±0,05 ^b	4,50±0,58 ^a
2	7,53±0,48 ^b	5,86±0,49 ^a
3	7,40±0,32 ^b	5,93±0,69 ^a
4	7,20±0,36 ^a	6,66±0,33 ^a
5	6,79±0,02 ^a	6,78±0,25 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Tabel 8. Jumlah bakteri asam asetat biji kakao tahap fermentasi dengan dan tanpa penambahan pektinase

Hari ke-	Jumlah bakteri asam asetat (log ₁₀ CFU/mL)	
	Penambahan pektinasi (E)	Tanpa pektinase (K)
0	4,50±0,58 ^a	4,50±0,58 ^a
1	4,50±0,58 ^a	4,50±0,58 ^a
2	5,86±0,49 ^a	5,41±0,47 ^a
3	5,93±0,69 ^a	5,88±0,32 ^a
4	6,66±0,33 ^a	6,48±0,06 ^a
5	6,78±0,25 ^a	6,60±0,30 ^a

Keterangan: *Superscript* yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($\alpha < 0,05$)

Mutu Biji Kakao Terfermentasi

Biji kakao hasil fermentasi diuji berdasarkan parameter uji syarat mutu SNI 2323:2008 tentang biji kakao. Langkah pengujian dilakukan berdasarkan cara uji

yang tercantum dalam SNI 2323:2008 dan amandemen 2010. Berdasarkan hasil uji terkait syarat khusus, biji kakao hasil fermentasi perlakuan penambahan pektinase dan 100 mM ion kalsium (E) maupun tanpa penambahan pektinase (K) termasuk dalam golongan jenis mutu I–B biji kakao lindak. Biji *slaty* atau biji yang belum terfermentasi sempurna (biasa

berwarna abu-abu atau putih) sebesar 0% artinya hasil fermentasi dengan pektinase dan kontrol telah terfermentasi dengan baik selama 5 hari. Hal ini menunjukkan bahwa jika proses fermentasi dilakukan dengan baik (adanya kontrol suhu, pembalikan biji dalam tumpukan, kondisi-kondisi lingkungan terkait kebersihan, dan lain

Tabel 9. Penggolongan mutu biji kakao terfermentasi tanpa penambahan dan dengan enzim pektinase dan ion logam berdasarkan SNI 2323:2008

Jenis Uji	Ulangan (bak fermentasi)	Perlakuan sampel	Persyaratan SNI 2323:2008	Hasil pengamatan	Keterangan
Serangga Hidup	Fermentasi 1	E1	Tidak ada	Tidak ada	Sesuai
		K1		Tidak ada	Sesuai
	Fermentasi 2	E2		Tidak ada	Sesuai
		K2		Tidak ada	Sesuai
Kadar Air	Fermentasi 1	E1	Maks. 7,5%	2,15 ± 0,21%	Sesuai
		K1		1,95 ± 0,92%	Sesuai
	Fermentasi 2	E2		1,52 ± 0,12%	Sesuai
		K2		1,51 ± 0,29%	Sesuai
Biji bau asap abnormal atau bau asing	Fermentasi 1	E1	Tidak ada	Tidak ada	Sesuai
		K1		Tidak ada	Sesuai
	Fermentasi 2	E2		Tidak ada	Sesuai
		K2		Tidak ada	Sesuai
Kadar benda asing	Fermentasi 1	E1	Tidak ada	0%	Sesuai
		K1		0%	Sesuai
	Fermentasi 2	E2		0%	Sesuai
		K2		0%	Sesuai
Kadar biji pecah	Fermentasi 1	E1	–	4,75 ± 1,06%	–
		K1		3,00 ± 2,26%	–
	Fermentasi 2	E2		2,05 ± 2,89%	–
		K2		2,75 ± 0,49%	–
Kadar biji berjamur	Fermentasi 1	E1	Maks. 2 (I – B)	0%	I – B
		K1		0%	I – B
	Fermentasi 2	E2	Maks. 4 (II – B)	0%	I – B
		K2		Maks. 4 (III – B)	0%
Kadar biji <i>slaty</i>	Fermentasi 1	E1	Maks. 3 (I – B)		0%
		K1		0%	I – B
	Fermentasi 2	E2	Maks. 8 (II – B)	0%	I – B
		K2		Maks. 20 (III – B)	0%
Kadar Biji berserangga	Fermentasi 1	E1	Maks. 1 (I – B)		0%
		K1		0%	I – B
	Fermentasi 2	E2	Maks. 2 (II – B)	0%	I – B
		K2		Maks. 2 (III – B)	0%

Keterangan: E: kelompok biji kakao yang difermentasi dengan perlakuan penambahan enzim pektinase
K: kelompok biji kakao yang difermentasi dengan perlakuan tanpa penambahan enzim

lain) maka fermentasi alami juga sudah memberikan hasil yang baik.

Parameter fermentasi skala laboratorium telah menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kadar gula total (**Tabel 4**) antara perlakuan penambahan pektinase (E) dan tanpa (K), namun pada kadar gula reduksi, kadar asam amino, kadar asam tertitrisasi maupun jumlah bakteri (**Tabel 5, 6, 7, 8**) tidak berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan pektinase (E) mampu mempercepat pengubahan pektin menjadi monomernya dan peluruhan pulp kakao namun tidak cukup meningkatkan produksi hasil fermentasi berupa gula reduksi maupun asam amino yang diperlukan untuk pembentukan flavor berikutnya meskipun secara kualitas fermentasi menunjukkan kualitas produk yang memenuhi standar SNI 2323 tahun 2008. Perlakuan dengan penambahan pektinase yang diaktivasi ion kalsium berpotensi untuk menyelesaikan proses fermentasi kurang dari 5 hari, namun hal ini perlu diujicobakan lebih lanjut dengan volume fermentasi skala perkebunan (minimal 40 kg). **Tabel 9** merupakan mutu biji kakao terfermentasi berdasarkan syarat mutu SNI 2323:2008.

KESIMPULAN

Tepung pisang lokal penambahan 4,5 unit enzim pektinase dari *Aspergillus niger* dan 100 mM ion Kalsium pada fermentasi biji kakao (E) berpotensi mempercepat proses fermentasi berdasarkan adanya pengaruh signifikan terhadap kadar gula total selama fermentasi dibanding kontrol/K (tanpa penambahan enzim). Hasil fermentasi pada perlakuan dengan pektinase maupun kontrol memenuhi syarat umum SNI 2323:2008 dan amandemen 2010 tentang biji kakao seperti kadar air sesuai standar, tidak ada biji *slaty*, tidak ada

benda asing maupun bau aneh dan termasuk dalam biji kakao terfermentasi golongan I – B. Penambahan pektinase dari *Aspergillus niger* perlu dilakukan pengujian lebih lanjut pada volume fermentasi yang lebih besar, sesuai praktek fermentasi di tingkat petani, misal di atas 40 kg.

DAFTAR PUSTAKA

- Albertini, B., Schouben, A., Guarnaccia, D., Pinneli, F., Della Vecchia, M., Ricci, M., Di Renzo, G.C., & Blasi, P. (2015). Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenol. *Journal Agriculture Food Chemistry* 63(45), 9948–9953. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01062>
- Anand, G., Yadav, S., Gupta, R., & Yadav, D. (2020). Pectinases: From microbes to industries. *Microorganism for sustainable environment and health*, pp: 287–313. DOI: 10.1016/b978-0-12-819001-2.00014-0
- Anggraini, D.P., Sulistiana, D., Agustina, D.K., & Ulimaz, A. (2020). Determination of kinetic parameters and the effect of ion Mg^{2+} inhibition into pectinase activities. *Jurnal Penelitian dan Pengkajian Ilmu Pendidikan e-Saintika*, 4(2), 112. <https://doi.org/10.36312/esaintika.v4i2.170>
- Apriyanto, M. (2018). Sukses mikroba terhadap penurunan etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 7(2), 30–39. <https://doi.org/10.32520/jtp.v7i2.300>
- Araque, R.H.O., Vera, E.F., Villegas, J.C.U., & Jaramillo, C.F.C. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: Systematic review. *J. Foods and Raw Materials*, 8(1) 155–162. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-155-162>
- Ariningsih, E., Helena, J., Purba, Julia, F., Sinuraya, Septanti, K.S., & Suharyono,

- S. (2021). Problems and strategies in enhancing production and quality of Indonesian cocoa. *Analisis Kebijakan Pertanian*, 19(1), 89–108. <http://dx.doi.org/10.21082/akp.v19n1.2021.89-108>
- Chen, H., Wan, M., Liu, Y., Yang, G., & Cai, Z. (2024). Solid-state fermentation of hyperactive pectinase by the novel strain *Aspergillus* sp. CM96. *Processes*, 12(3), 615. <https://doi.org/10.3390/pr12030615>
- D'Souza, R.N., Grimbsa, A., Grimbsa, S., Behrendsa, B., Cornob, M., Matthias, S., Ullricha, & Kuhnerta, N. (2018). Degradation of cocoa proteins into oligopeptides during spontaneous fermentation of cocoa beans. *Food Research International*, 109, 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.068>
- Esawy, M.A., Gamal, A.A., & Kamel, Z. (2022). Optimalization of *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase using citrus peel pectin purification, and thermodynamic characterization of the free and modified enzyme, *Waste and Biomass Valorization*, 13(2), 1–15. DOI: 10.1007/s12649-022-01838-2
- Febrianto, N.A., & Zhu, F. (2020). Changes in the composition of methylxanthines, polyphenols, and volatiles and sensory profiles of cocoa beans from the Sul 1 genotype affected by fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 68, 8658–8675, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02909>
- Hanifah, A., Firmanto, H., Putri, S.P., & Fukusak. (2022). Unique metabolite profiles of Indonesian cocoa beans from different origins and their correlation with temperature. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.05.001>
- Hart, C.K. (2019). “The Effects of Fermentation and Drying Methods of Theobroma Cacao on Quality and Flavor Characteristics”. Thesis. Tropical Plants and Soil Science, University of Hawai’i.
- Hirko, B., Mitiku¹, H., & Getu, A. (2023). Role of fermentation and microbes in cacao fermentation and their impact on cacao quality: Review. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 3, 509–520. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00160-9>
- Ibnu, M. (2023). Strategi prioritas untuk keberlanjutan subsektor perkebunan Indonesia. *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, 40(2), 135–150. <http://dx.doi.org/10.21082/fae.v40n2.2022.135-150>
- Jangra, S., & Srivastava, S. (2023). Microbial enzymes in food industries: Enhancing quality and sustainability, in book *Food Microbial Sustainability*: 193-221, Springer Nature Singapore. DOI: 10.1007/978-981-99-4784-3_10
- Lestari, M.D. (2019). ”Skринing Bakteri Pektinolitik pada Sistem Pencernaan (*Crocidolomia pavonana* F.) dan Purifikasi Enzim yang Dihasilkan”. Tesis. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, Jember.
- Lopez, A.S., & Dimick, P.S.(1995). *Cocoa fermentation in: Emzymes, biomass, food and feed*, second edition Biotechnology Vol. 9. Weinheim: Reed G. and Nagodawithana TW.
- Mangasi, D. (1995). “Produksi Pektinase Oleh *Aspergillus* sp. Melalui Fermentasi Media Padat Kulit Buah Kakao dan Studi Awal Aplikasinya Pada Proses Fermentasi Biji Kakao”. Skripsi. Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Muñoz, M.S., Cortina, J.R., Vaillant, F.E. & Parra, S.E. (2019). An overview of the physical and biochemical transformation of cocoa seeds to beans and to chocolate:

- Flavor formation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1593–1613.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1581726>
- Rahardjo, Y.P., Rahardja, S., Samsudin, Dalapati, S.S., Amalia, A.F., Purwaningsih, H., & Syamsu1, K. (2022). A literature review on cocoa fermentation techniques to shorten fermentation time. *Earth and Enviromental Science* 974, 012111. DOI: 10.1088/1755-1315/974/1/012111
- Rehman, H.U., Baloch, A.H., & Nawaz, M.A. (2021). Pectinase: Immobilization and applications. A review. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, 6(24), 1–16.
<https://doi.org/10.22037/tpps.v6i.33871>
- Rottiers, H., Sosa, T., de Winne, A., Ruales, J., de Clippeleer, J., de Leersnyder, I., de Wever, J., Everaert, H., Messens, K., & Dewettinck, K. (2019). Dynamics of volatile compounds and flavor precursors during spontaneous fermentation of fine flavor Trinitario cocoa beans. *European Food Research and Technology*, 245(9), 1917–1937.
<https://doi.org/10.1007/s00217-019-03307-ys>
- Sarbu, I., & Csutak, O. (2019). The microbiology of cocoa fermentation, caffeinated and cocoa based beverages. *The Science of Beverages*, 8, 423–446.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00013-1>
- Schwan, R.F., & Wheals, A.E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44, 205–221.
<https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Tamimi, K.A., Hidayat C., Utami, T., & Witasari LD. (2023). Flavor precursor formation of non-fermented forastero cocoa beans after flavourzyme® and glucose treatment. *J. Food Science and Technology*, 184, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114910>