

Studi Meta-analisis: Pengaruh Penambahan Kultur Starter pada Profil Fermentasi, Mikroorganisme, dan Metabolit Hasil Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

(*Meta-analysis Study: Effect of Addition of Starter Culture on Fermentation Profiles, Microorganisms, and Metabolites of Fermented Cocoa Beans [Theobroma cacao L.]*)

Nafila Chaerunnisa Misbakh, Laras Cempaka*, Wahyudi David, Nurul Asiah

Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Universitas Bakrie, Kawasan Rasuna Epicentrum, Jl. H.R. Rasuna Said Kav. C-22, Kecamatan Setiabudi, Kuningan, Jakarta Selatan, Indonesia
E-mail: laras.cempaka@bakrie.ac.id

ARTICLE INFO

Article history

Submitted: April 24, 2022

Accepted: August 3, 2022

Published: October 1, 2022

Keywords:

cocoa,
fermentation,
meta-analysis,
starter culture

ABSTRACT

Fermentation of cocoa beans can produce flavour precursors and colour changes in chocolate. Generally, this process is carried out for 5-7 days without adding starter culture. Adding a starter culture is considered to improve the quality of cocoa beans and shorten the fermentation time. The purpose of this study was to compare the starter cultures used in the cocoa bean fermentation process through a meta-analysis approach. Twenty-four related articles have been screened from the initial number of 110 articles. There are five starter cultures and six parameters that can be processed by Confidence Interval (CI) analysis. Calculating p and I^2 values using STATA software was performed to see variations between studies and test the significance of their effects during the fermentation process through p values. The variation test between studies showed that the profiles of lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) were heterogeneous. While the yeast profile, levels of lactic acid, acetic acid and pH between studies are homogeneous. The results of the study showed that the addition of starter culture will affect the levels of yeast profile (ES: 0.470; 95% CI: 0.371 to 0.569; $p = 0.0$); LAB profile (ES: 0.747; 95% CI: 0.600 to 0.894; $p = 0,0$); AAB profile (ES: 0.808; 95% CI: 0.663 to 0.953; $p = 0.0$); lactic acid (ES: -0.003; 95% CI: -0.162 to 0.156; $p = 0.039$); acetic acid (ES: 0.189; 95% CI: 0.01 to 0.368; $p = 0.039$) and pH (ES: 0.109; 95% CI: 0.001 to 0.218; $p = 0.049$). Using pure starter cultures can increase the number of microbes of the type added and increase metabolic activity by showing a decrease in acetic acid levels in cocoa beans at the end of the fermentation process. However, no changes were seen in pH or lactic acid levels.



Copyright © 2022 Author(s). This work is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.

PENDAHULUAN

Fermentasi merupakan salah satu teknik pengolahan dalam bidang pangan yang melibatkan mikroorganisme. Salah satu komoditas yang memanfaatkan fermentasi dalam pengolahannya adalah biji kakao. Proses ini dapat memicu tumbuhnya prekursor *flavor* dan perubahan warna cokelat pada biji kakao yang terbentuk selama proses fermentasi (Fang et al., 2020). Fermentasi pada biji kakao

merupakan proses yang dilakukan setelah buah kakao dipanen. Umumnya, biji kakao diambil dari buah kakao dan difermentasikan secara spontan didalam kotak kayu yang ditutup dengan daun pisang selama 5 – 7 hari. Selama proses fermentasi dilakukan, akan terjadi aktivitas mikroorganisme seperti *yeast*, bakteri asam laktat (BAL) dan bakteri asam asetat (BAA) didalam *pulp* yang menyebabkan terdifusinya alkohol dan asam ke dalam biji, sehingga biji mati dan terjadi reaksi enzimatik pembentukan senyawa *flavor*, aroma dan perubahan warna (Sandhya et al., 2016).

Setelah fermentasi selesai, proses selanjutnya adalah pengeringan biji kakao. Tujuan pengeringan adalah untuk menghentikan proses fermentasi dan menurunkan kadar air. Waktu fermentasi berkisar antara 5—7 hari bergantung pada varietas biji kakao yang digunakan dan pengeringan berlangsung hingga kadar air mencapai 6—7% (Ariyanti, 2017; Aryani et al., 2018). Lalu biji kakao akan memasuki tahap *roasting* yang akan mengubah senyawa prekursor rasa dan aroma yang terbentuk selama proses fermentasi melalui reaksi maillard, karamelisasi, degradasi protein dan sintesis senyawa (Alamilla et al., 2017). Proses fermentasi ini dinilai cukup memakan waktu bagi para petani biji kakao di Indonesia, sehingga banyak dari mereka yang tidak melakukan proses fermentasi. Hal ini berdampak pada rendahnya kualitas akhir biji kakao yang dihasilkan dengan harga jual yang rendah. Salah satu metode untuk mempersingkat waktu fermentasi dapat menggunakan penambahan kultur *starter* (Saunshi et al., 2019)

Kultur *starter* merupakan bahan yang mengandung mikroorganisme terkait dalam jumlah besar, yang dapat ditambahkan untuk mempercepat dan meningkatkan proses fermentasi (Sandhya et al., 2016). Penambahan kultur *starter* pada proses fermentasi diharapkan dapat mempercepat waktu fermentasi dan memperbaiki kualitas akhir biji kakao. Pada penelitian yang dilakukan oleh Misgiyarta et al. (2019), dijelaskan bahwa penambahan kultur *starter* cair yang terdiri dari *yeast*, BAL dan BAA dapat meningkatkan profil pertumbuhan mikroorganisme, asam total dan suhu fermentasi serta penurunan pH.

Penelitian dengan memodifikasi penambahan kultur starter pada proses fermentasi biji kakao telah banyak dilakukan (Ooi et al., 2020; Misgiyarta et al., 2019; Jamili et al., 2016; Kresnowati et al., 2015; Cempaka et al., 2014). Namun, belum ada yang mengkaji secara meta analisis bagaimana pengaruh penambahan kultur starter dalam profil mikroorganisme serta metabolit yang dihasilkan dari seluruh studi yang dilakukan. Hal ini berguna untuk menentukan kesesuaian antara penambahan kultur *starter* dengan efektifitas waktu fermentasi serta peningkatan kualitas biji kakao.

Pemilihan kultur *starter* untuk proses fermentasi biji kakao harus memperhatikan parameter mutu akhir produk yang ingin dicapai serta pengaruhnya terhadap produk selama proses fermentasi berlangsung. Untuk mengetahui pemilihan kultur *starter* yang tepat, perlu adanya pengkajian lebih lanjut tentang perbandingan antar kultur *starter* terhadap profil metabolit selama proses fermentasi dan karakteristik akhir produk biji kakao. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh jenis kultur starter terhadap profil mikroorganisme serta metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi secara meta analisis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode meta-analisis, dimana dilakukan pengkajian melalui jurnal penelitian yang bersifat ilmiah dan spesifik pada satu topik tertentu untuk menghasilkan suatu kesimpulan (Ahn & Kang, 2018). Topik dalam penelitian ini yaitu perbandingan berbagai kultur *starter* dalam fermentasi biji kakao untuk mengetahui pengaruhnya terhadap profil metabolit dan

karakteristik produk biji kakao. Dalam penelitian ini terdapat beberapa topik *search terms* yang digunakan dan masing-masing memiliki terminologi ((*Cocoa bean AND variety*) OR *varieties* OR (*cocoa bean AND hybrid*) OR (*cocoa bean AND country*) OR (biji kakao dan varietas)). ((*Cocoa bean AND starter*) OR (*cocoa bean AND inoculum*) OR (*cocoa bean AND starter AND addition*) OR (*cocoa bean AND starter culture*) OR (*cocoa bean AND yeast*) OR *lactic acid bacteria* OR *acetic acid bacteria* OR (biji kakao dan *starter*) OR (biji kakao dan BAL) OR BAA)) ((*Cocoa bean AND fermentation*) OR OR (*fermentation AND on-farm*) OR (*fermentation AND spontaneous*) OR (*lab scale AND fermentation*)) ((*Cocoa bean AND quality*) OR (*cocoa bean AND characteristics*) OR (*cocoa bean AND profile*) OR (*cocoa bean AND composition*) OR (*cocoa bean AND fermentation index*) OR (*cocoa bean AND pH*) OR (*cocoa bean AND Polyphenol*) OR (*cocoa bean AND Theobromine*) OR (biji kakao AND nilai tambah) OR (biji kakao AND kualitas akhir) OR (biji kakao AND indeks fermentasi) OR (biji kakao AND polifenol).

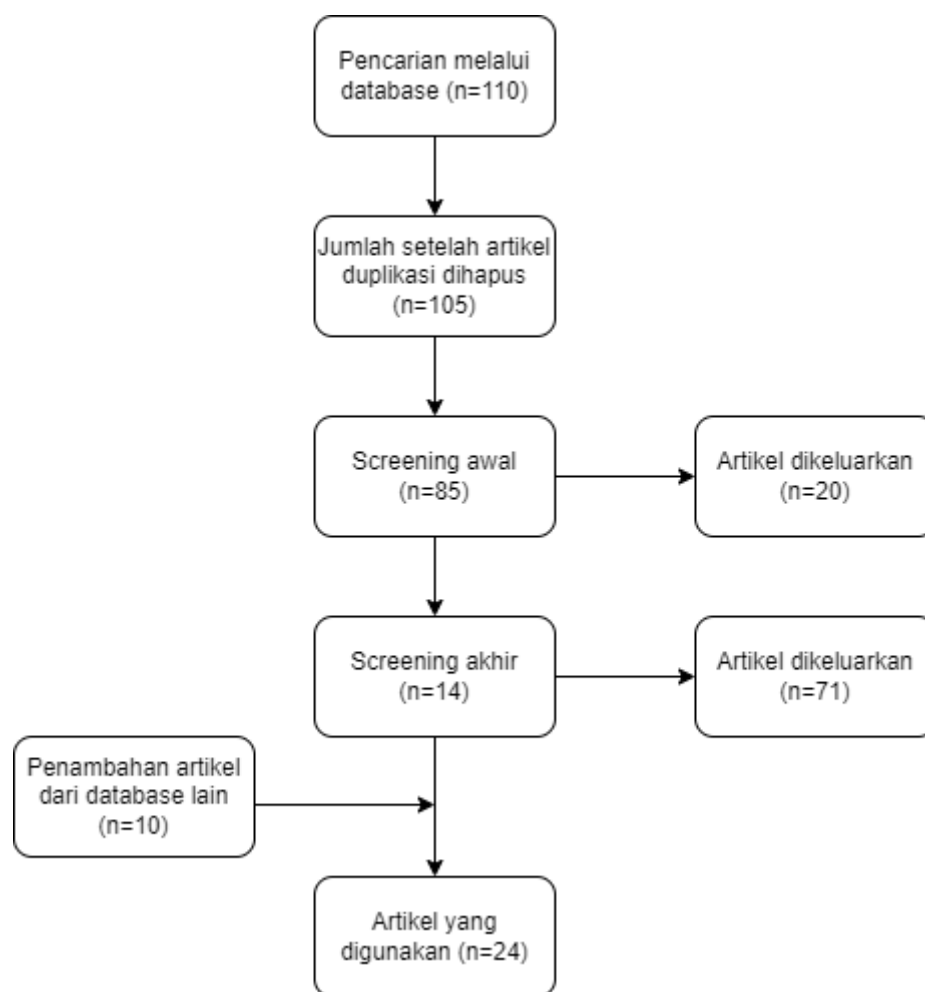
Pemilihan literatur diambil dari *database* elektronik internasional maupun nasional seperti *Science Direct*, DOAJ (*Directory of Open Access Journal*), Google Scholar, dan Garuda. Kriteria inklusi dilakukan untuk menyaring literatur yang dapat digunakan pada penelitian ini. Beberapa kriteria inklusi yang digunakan yaitu: pemilihan berdasarkan tahun publikasi (dari 2010 – 2020) untuk memastikan kebaruan dari penelitian yang dilakukan; penelitian dalam literatur mencakup fermentasi biji kakao menggunakan penambahan kultur *starter*; penelitian mencantumkan nilai *mean* ± standar deviasi/standard error; penelitian menggunakan kontrol sebagai pembanding dan literatur ditulis dalam Bahasa Inggris maupun Bahasa Indonesia. Jika suatu penelitian tidak mencantumkan hal-hal tersebut maka akan dikeluarkan dari tahap penyaringan.

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptis dan *Confidence Interval* (CI). Analisis CI dilakukan untuk mengidentifikasi perbedaan pada studi meta-analisis dengan mengambil level signifikansi sebesar 95% yang berarti data yang digunakan masuk ke dalam selang yang telah dihitung berdasarkan CI (Darius, 2016). Analisis CI dilakukan menggunakan Microsoft Excel dan penyajian data dalam bentuk grafik histogram. Analisis menggunakan STATA ver.16 (StataCorpLLC) untuk melihat heterogenitas antar penelitian (*p value* dan I^2) dan signifikansi. Setelah itu dijelaskan secara deskriptif pada tiap pembahasan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pencarian

Dari terminologi pencarian telah didapatkan jumlah artikel awal sebanyak 110 dari 3 sumber *database* elektronik (Garuda, DOAJ, dan *ScienceDirect*). *Screening* akhir dilakukan berdasarkan kesesuaian dengan topik fermentasi biji kakao dengan penambahan kultur *starter* dan ketersediaan data, jumlah artikel dikeluarkan sebanyak 71 artikel dan menyisakan 14. Lalu dilakukan pencarian kembali melalui *database* lainnya dan didapatkan sebanyak 10 artikel. Sehingga jumlah artikel akhir dari penelitian ini berjumlah 24 yang akan dibahas pada penelitian ini. Karakteristik atau pengelompokkan dari tiap-tiap artikel dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2. Diagram alir pencarian literatur yang sudah disesuaikan dengan diagram PRISMA disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir PRISMA penyaringan literatur

Tabel 1. Karakteristik sumber literatur yang digunakan

No	Penulis	Tahun	Jenis biji kakao	Jenis kultur starter	Metode	
					Wadah	Waktu (hari)
1	Apriyanto et al.	2016	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>A. aceti</i>	Kotak kayu	6
2	Apriyanto & Rujiah	2017	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>A. aceti</i>	Kotak kayu	5
3	Apriyanto et al.	2017	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>A. aceti</i>	Inkubator	5
4	Apriyanto et al.	2018	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. lactis</i> ; <i>A. aceti</i>	Inkubator	5
5	Cempaka et al.	2014	Forastero	<i>S. cerevisiae</i>	Plastik	5
6	Crafack et al.	2014	Forastero	<i>P. kluyveri</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Plastik	5
7	Crafack et al.	2013	Forastero	<i>P. kluyveri</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Tray	5
8	Gutierrez et al.	2018	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>T. delbrueckii</i>	Kotak kayu; daun	5
9	Kresnowati et al.	2013	Forastero	<i>L. plantarum</i>	Fermentor	5
10	Kresnowati et al.	2015	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>A. aceti</i>	Inkubator	5
11	Lefeber et al.	2012	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. fermentum</i> ; <i>A. pasteurianus</i>	Kotak kayu, daun	4
12	Meryandini et al.	2019	Forastero	<i>Lactobacillus sp.</i> ; <i>P. kudriavzevii</i>	Tidak disebutkan	5
13	Miguel et al.	2017	PH16	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. fermentum</i>	Kotak kayu	6
14	Misnawi et al.	2017	Forastero	<i>L. fermentum</i>	Styrofoam	4
15	Munarso et al.	2016	Tidak disebutkan	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>A. aceti</i>	Keranjang bambu	5
16	Ooi et al.	2020	PBM123; BR25; MCBC1; MCBC8	<i>H. thailandica</i> ; <i>P. kudriavzevii</i> ; <i>H. opuntiae</i> ; <i>S. cerevisiae</i> ; <i>Wickerhamomyces sp.</i>	Kotak kayu	5
17	Pereira et al.	2017	Tidak disebutkan	<i>P. kudriavzevii</i>	Inkubator	7
18	Purwanto et al.	2019	Forastero	<i>Ragi tape</i>	Kotak kayu	6
19	Ramos et al.	2014	PH16, PS1030; FA13; PS1319	<i>S. cerevisiae</i>	Kotak kayu	6,5
20	Sabahannur et al.	2018	Forastero	<i>Ragi tape</i> ; <i>Sukrosa</i>	Kotak kayu	5
21	Sandhya et al.	2016	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>A. aceti</i>	Fermentor	7
22	Saunshi et al.	2019	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>L. plantarum</i> ; <i>A. aceti</i>	Kotak kayu	7
23	Visintin et al.	2017	PS1319; SJ02	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>T. delbrueckii</i>	Kotak kayu	7
24	Widianto et al.	2013	Forastero	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>A. aceti</i>	Inkubator	6

Tabel 2. Karakteristik profil mikroorganisme dan metabolit dari sumber literatur yang digunakan

No	Penulis	Tahun	Parameter										
			Y	BAL	BAA	E	AL	AA	TPC	GR	pH	IF	
1	Apriyanto et al.	2016				√					√	√	
2	Apriyanto et al.	2017a	√	√	√	√	√	√				√	√
3	Apriyanto et al.	2017b							√	√			
4	Apriyanto et al.	2018	√	√	√	√	√	√					
5	Cempaka et al.	2014	√			√	√	√	√			√	√
6	Crafack et al.	2014					√	√				√	
7	Crafack et al.	2013	√			√	√	√				√	
8	Gutierrez et al.	2018	√	√	√							√	
9	Kresnowati et al.	2013	√	√	√	√	√	√					
10	Kresnowati et al.	2015	√	√	√	√	√	√				√	√
11	Lefeber et al.	2012				√	√	√					
12	Meryandini et al.	2019	√	√		√				√		√	
13	Miguel et al.	2017	√	√	√								
14	Misnawi et al.	2017											√
15	Munarso et al.	2016				√						√	
16	Ooi et al.	2020							√				√
17	Pereira et al.	2017	√			√				√			√
18	Purwanto, et al.	2019	√	√	√	√	√	√				√	√
19	Ramos et al.	2014					√	√				√	
20	Sabahannur et al.	2018								√		√	
21	Sandhya et al.	2015	√	√	√		√	√				√	
22	Saunshi et al.	2019	√	√	√				√			√	
23	Visintin et al.	2017	√		√							√	
24	Widianto et al.	2013	√		√	√				√		√	

Keterangan: Y = yeast, BAL = bakteri asam laktat, BAA = bakteri asam asetat, E = Etanol, AL = asam laktat, AA = asam asetat, TPC = total polyphenolic contents, GR = gula reduksi, IF = indeks fermentasi

Jenis Biji Kakao

Jenis biji kakao secara umum dibagi menjadi 3, yaitu *Criollo*, *Forastero* dan *Tinitario*. Dari 24 literatur yang digunakan pada penelitian ini, terdapat 18 sumber yang menggunakan jenis biji kakao *Forastero*, sedangkan 4 lainnya menggunakan jenis biji kakao lain dan 2 tidak disebutkan.

Forastero merupakan jenis biji kakao yang paling banyak ditanam di dunia, jumlahnya hampir 90-95% dari total produksi kakao di dunia (Wahyuni et al., 2021). *Forastero* merupakan jenis kakao yang menghasilkan biji coklat yang bermutu sedang (*bulk cocoa*) dan sering disebut sebagai jenis lindak di Indonesia. Jenis biji kakao ini memiliki ciri yaitu buahnya berwarna hijau, kulit buahnya tebal, biji buahnya tipis dengan kotiledon berwarna ungu pada waktu basah (Schwan & Fleet, 2015). Warna ungu pada biji diakibatkan adanya kandungan antosianin (Kongor et al., 2016).

Penggunaan jenis biji kakao yang berbeda pada proses fermentasi akan memberi hasil akhir produk yang berbeda dari segi *flavour* maupun parameter lainnya. Dikutip dari Kongor (2016), perbedaan ini diakibatkan oleh komposisi biji, asal dan lokasi pertumbuhan serta kondisi lingkungan. Vuyst & Weckx (2016) juga menyebutkan bahwa jenis biji kakao akan menentukan hasil panen dan

ketahanan terhadap hama serta berkontribusi pada komposisi, *flavour* dan kualitas dari biji kakao yang telah difermentasi.

Beberapa penelitian terkait perbedaan jenis biji kakao dalam mempengaruhi kualitas akhir biji lebih berfokus pada senyawa volatil untuk membedakan aroma yang dihasilkan dari tiap jenis biji kakao yang berbeda. Salah satunya yaitu dari Qin et al. (2015) yang mengemukakan bahwa pada varietas Forastero memiliki nilai senyawa volatil yang lebih rendah daripada jenis lainnya.

Metode Fermentasi

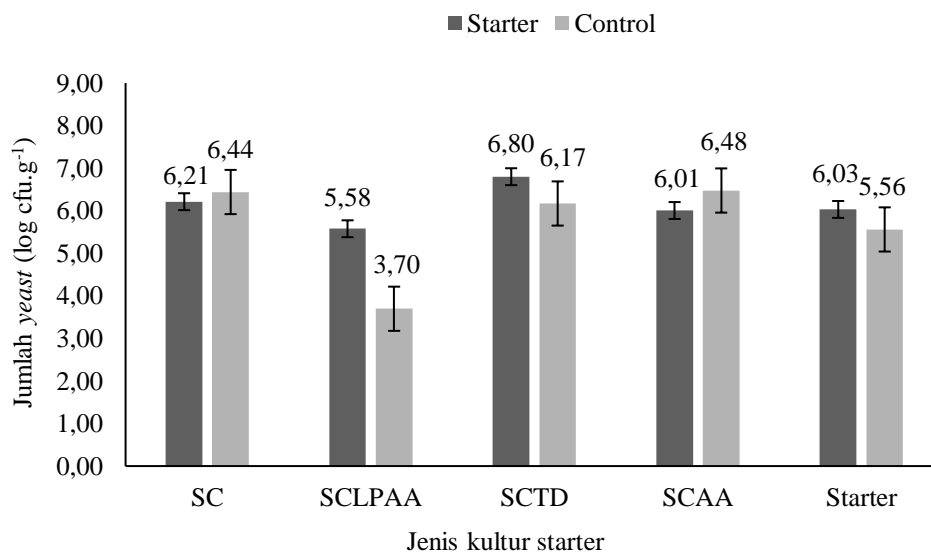
Proses fermentasi biji kakao dapat dilakukan dengan berbagai macam metode, baik konvensional secara langsung maupun metode yang sudah dimodifikasi. Fermentasi biji kakao konvensional umumnya dilakukan secara spontan menggunakan kotak kayu yang dilapisi dengan daun pisang selama 5—7 hari. Dari 24 literatur yang digunakan pada penelitian ini, terdapat beberapa metode yang digunakan yang dibedakan berdasarkan wadah dan waktu fermentasi. Sebagian besar penelitian menggunakan metode yang serupa dengan metode konvensional, yaitu menggunakan kotak kayu. Perbedaan metode fermentasi biji kakao akan mengakibatkan perbedaan pada hasil akhir biji seperti pH dan indeks fermentasi karena perbedaan kondisi lingkungan. Vuyst & Weckx (2016) menyatakan bahwa perbedaan metode fermentasi berdampak pada profil pertumbuhan mikroorganisme dan senyawa metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi.

Pada nilai profil yeast, penggunaan media inkubator memiliki nilai yang paling tinggi. Penggunaan kotak kayu meningkatkan kadar etanol dibanding kontrol, sedangkan penggunaan plastik memiliki nilai kadar etanol yang rendah. Untuk nilai asam laktat, penggunaan media plastik dan daun memiliki nilai yang tidak berbeda jauh dengan kontrol, dan penggunaan media lainnya memiliki nilai kadar asam laktat diatas fermentasi secara alami. Untuk parameter akhir seperti pH, media daun pisang dan wadah kotak kayu menunjukkan nilai pH yang sesuai dengan standar kualitas biji kakao yang baik. Menurut Calvo et al. (2021), kualitas biji kakao yang baik memiliki kisaran pH sebesar 4,75—5,19. Pada nilai indeks fermentasi, penggunaan media kotak kayu dan inkubator berada pada standar kualitas yang baik yaitu diatas angka 1.

Penggunaan media inkubator memiliki beberapa nilai parameter yang mendekati standar. Hal ini dapat dikarenakan inkubator merupakan media yang dapat dikontrol suhu dan waktunya, sehingga dapat mengoptimalkan proses fermentasi. Sedangkan penggunaan kotak kayu merupakan media yang paling sering dijumpai karena teknisnya yang mudah. Namun penggunaan media ini perlu dilakukan *turning* atau pembalikan selama proses fermentasi. Hal ini perlu dilakukan untuk memastikan bahwa proses fermentasi berjalan secara homogen (Ganeswari et al., 2015). Jika tidak dilakukan proses *turning*, maka dapat meningkatkan nilai asam organik seperti asam laktat sehingga mempengaruhi tingkat keasaman biji.

Profil Yeast

Gambar 2 menunjukkan profil pertumbuhan *yeast* pada 4 kultur *starter* yang berbeda. Nilai optimal pertumbuhan *yeast* yaitu $7 - 9 \log \text{cfu.g}^{-1}$ pada waktu ke-24 jam fermentasi (Vuyst et al., 2010).



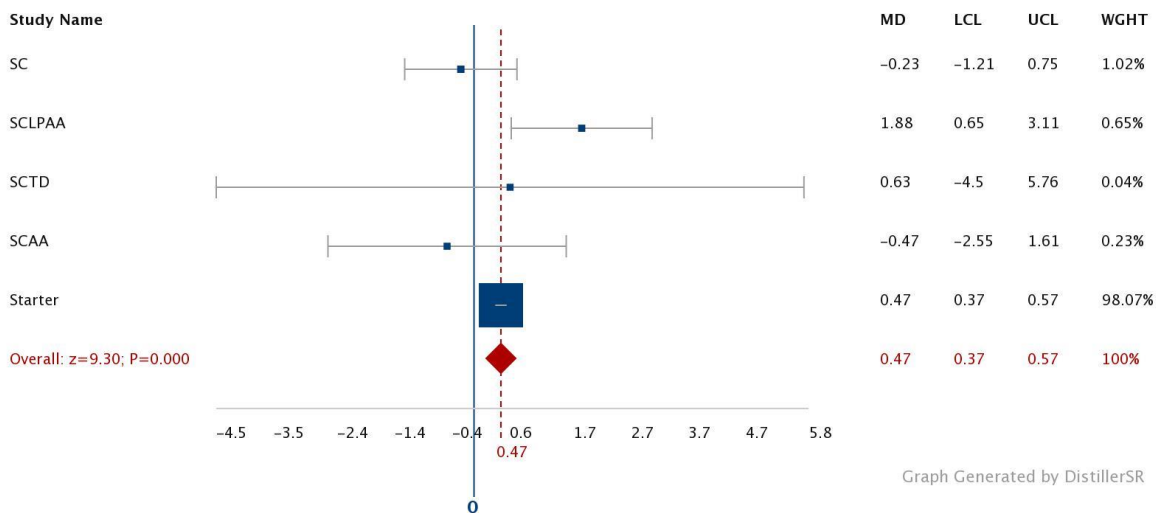
*Keterangan

SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCTD (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*); SCAA (*S. cerevisiae*, *A. aceti*)

Gambar 2. Rerata gabungan profil pertumbuhan yeast

Gambar 2 menunjukkan proses fermentasi menggunakan penambahan kultur *starter* memiliki nilai profil *yeast* yang jumlahnya masih belum optimum pada jam ke-24 fermentasi. Diantara penambahan kultur *starter*, jenis SCTD memiliki nilai jumlah sel *yeast* tertinggi. Pada semua perlakuan penambahan kultur *starter*, profil *yeast* keseluruhan masih berada dibawah standar. Nilai profil paling tinggi terdapat pada perlakuan penambahan SCTD, dimana *Saccharomyces cerevisiae* dan *Torulaspora delbrueckii* merupakan genus *yeast*. Penggunaan *S. cerevisiae* sebagai kultur *starter* memiliki karakteristik seperti tingkat toleransi terhadap etanol yang tinggi (Lefeber et al., 2012) dan menghasilkan enzim invertase (Satryo et al., 2015). Sedangkan *T. delbrueckii* memiliki enzim proteolitik, sehingga akan berkontribusi pada reaksi proteolisis dan meningkatkan konsentrasi asam amino (Santos et al., 2020). Pada dasarnya, penambahan kultur *starter* akan menyebabkan perbedaan konsentrasi metabolit yang dihasilkan, hal tersebut bergantung pada metabolisme mikroorganisme selama fermentasi berlangsung. Hal ini dapat meningkatkan nilai profil *yeast* awal pada proses fermentasi.

Penambahan Starter terhadap Yeast



***Keterangan**

SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCTD (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*); SCAA (*S. cerevisiae*, *A. aceti*)

Gambar 3. Grafik forest plot pengaruh penambahan starter terhadap profil yeast

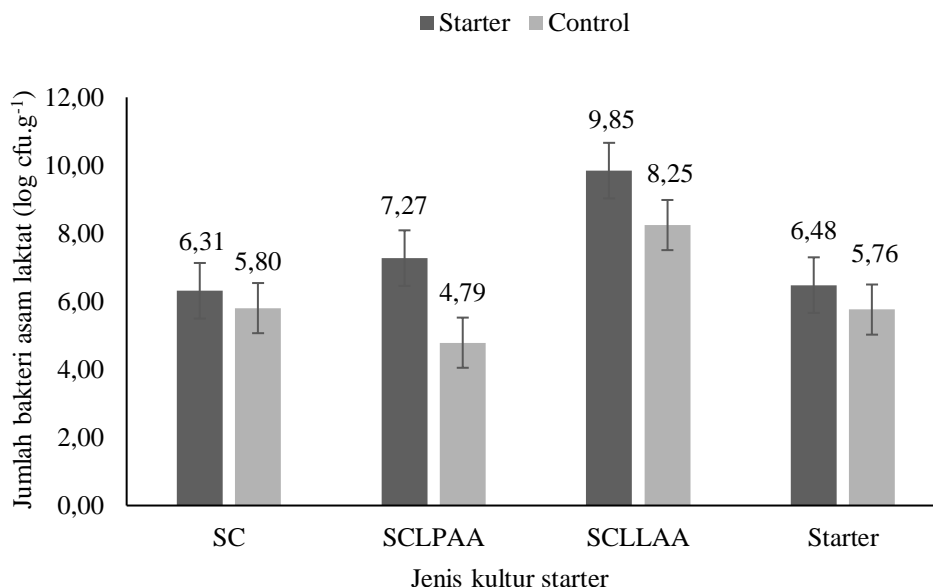
Dari perhitungan nilai p dan I² untuk menentukan heterogenitas antarpelelitian, didapatkan hasil nilai p sebesar 0,099 dan I² sebesar 48,7%. Hal ini menunjukkan bahwa antarpelelitian bersifat homogen atau sama, sehingga dapat dikatakan bahwa dari setiap penelitian didapatkan hasil yang seragam. Sedangkan dari nilai p untuk melihat signifikansi, didapatkan hasil p = 0,000, dengan nilai ES (*effect size*) 0,470 dan 95% CI dari 0,371 hingga 0,569. Hal ini menandakan bahwa penambahan kultur *starter* akan berpengaruh terhadap perubahan nilai profil *yeast* selama fermentasi berlangsung. Berdasarkan Gambar 3, kultur SCAA dan SC dapat meningkatkan jumlah profil yeast secara signifikan.

Fase pertama dari fermentasi yaitu fase *aerobic yeast* atau pertumbuhan yeast. Pada fase ini pertumbuhan *yeast* terjadi secara dominan pada 24 – 48 jam fermentasi awal. *Yeast* akan mengubah gula (sukrosa, glukosa atau fruktosa) menjadi alkohol (etanol) dalam keadaan tinggi karbohidrat, *anaerob* (tidak ada oksigen karena metode fermentasi yang digunakan) dan asam (pH rendah akibat kadungan asam sitrat yang tinggi) (Vuyst & Weckx, 2016; Vuyst et al., 2010). Pada fase ini juga terjadi aktivitas depektinasi atau pencairan *pulp* akibat sekresi enzim pektinolitik sehingga dinding sel dalam *pulp* pecah dan udara dapat masuk kedalam biji kakao (Vuyst & Weckx, 2016; Vuyst et al., 2010).

Dikutip dari Vuyst dan Weckx (2016), etanol yang merupakan metabolit dari *yeast* selanjutnya diubah menjadi asam asetat oleh BAA, dikonsumsi oleh *yeast* aerob atau hilang karena *sweating* atau evaporasi, sehingga jumlahnya menurun seiring berjalannya fermentasi. Sedangkan penurunan jumlah *yeast* seiring berjalannya fermentasi diakibatkan oleh bertambahnya jumlah udara pada biji, pH yang meningkat serta suhu yang tinggi sehingga peran *yeast* akan digantikan oleh BAL dan BAA.

Profil Bakteri Asam Laktat

Gambar 4 menunjukkan profil pertumbuhan bakteri asam laktat pada 3 kultur *starter* yang berbeda. Dikutip dari Vuyst et al. (2010), nilai optimal profil BAL yaitu 7—9 log cfu.g⁻¹ pada waktu ke-48 jam fermentasi.



*Keterangan

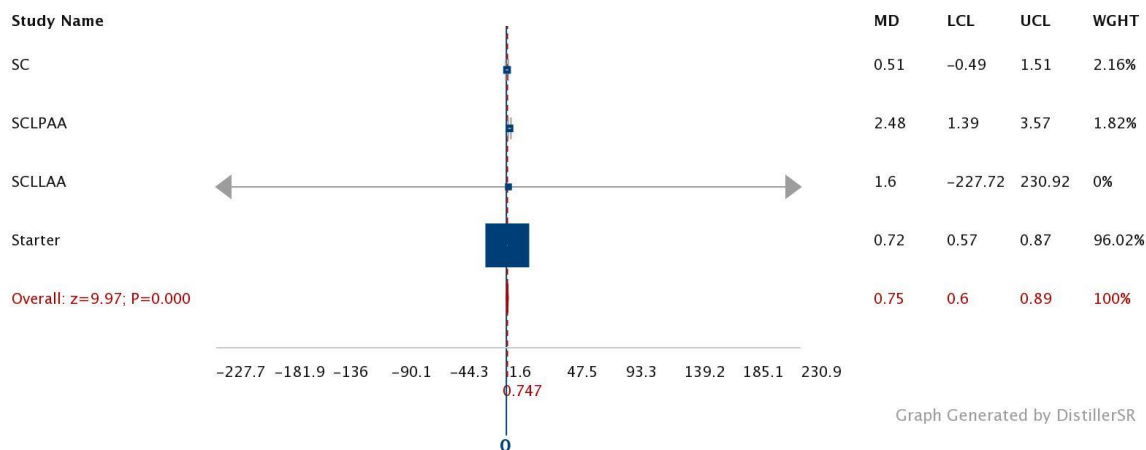
SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCLLAA (*S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*)

Gambar 4. Rerata gabungan profil pertumbuhan BAL

Dari data yang didapat, seluruh proses fermentasi menggunakan kultur *starter* maupun kontrol memiliki nilai profil BAL yang kurang dari standar pada waktu ke-48 jam fermentasi. Dimana penambahan kultur *starter* SCLLAA memiliki nilai profil BAL tertinggi, yaitu $9,85 \pm 1,61$ log cfu.g⁻¹ dan berada diatas standar. Nilai profil BAL yang mendekati standar yaitu dengan kultur *starter* SCLPAA sebesar $7,27 \pm 2,29$. Sedangkan nilai profil BAL dari perlakuan kontrol tertinggi yaitu $8,25 \pm 0,01$ log cfu.g⁻¹. Untuk nilai profil BAL dengan penambahan *starter* secara keseluruhan yaitu $6,48 \pm 0,96$ log cfu.g⁻¹.

Pada penambahan kultur *starter* SCLPAA dan SCLLAA memiliki nilai profil BAL yang tinggi dikarenakan adanya penambahan kultur *starter* asam laktat seperti *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus lactis*. Sehingga jumlahnya tinggi pada kedua perlakuan tersebut dibandingkan dengan perlakuan yang hanya menambahkan kultur *starter yeast Saccharomyces cerevisiae* pada proses fermentasinya.

Penambahan Starter terhadap BAL



***Keterangan**

SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae, L. plantarum, A. aceti*); SCLLAA (*S. cerevisiae, L. lactis, A. aceti*)

Gambar 5. Grafik forest plot pengaruh penambahan starter terhadap profil BAL

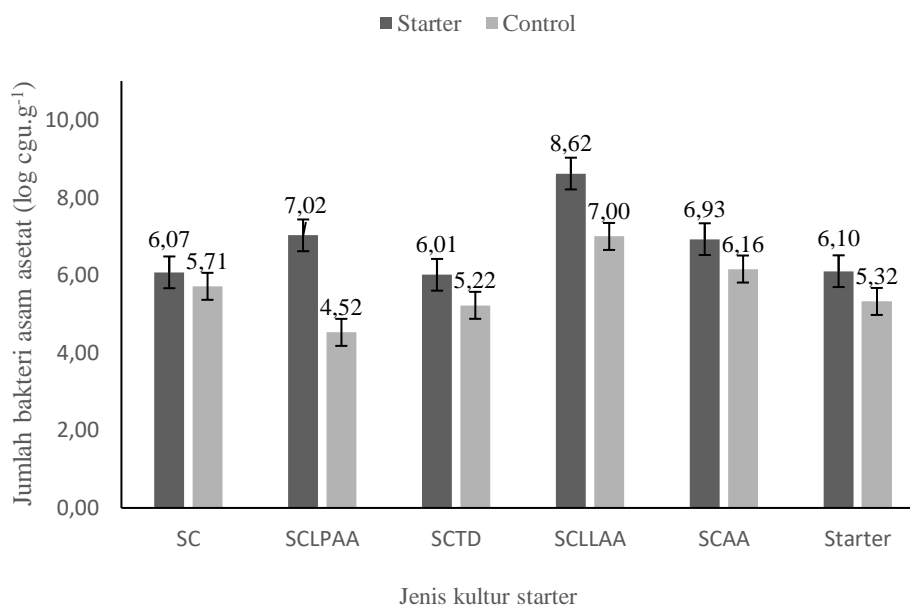
Dari perhitungan nilai p dan I² untuk menentukan heterogenitas antarpencapaian, didapatkan hasil nilai p sebesar 0,018 dan I² sebesar 70,2%. Hal ini menunjukkan bahwa antarpencapaian bersifat heterogen atau tidak sama, sehingga dapat dikatakan bahwa dari setiap pencapaian didapatkan hasil yang belum akurat. Sedangkan dari nilai p untuk melihat signifikansi, didapatkan hasil p = 0,000, dengan nilai ES (*effect size*) 0,747 dan 95% CI dari 0,600 hingga 0,894. Berdasarkan hasil metaanalisis (Gambar 5), keseluruhan kultur tidak banyak berpengaruh terhadap peningkatan maupun penurunan profil BAL.

Fase *microarobic enterobacterial* atau pertumbuhan BAL yang mengubah gula dan sebagian asam organik menjadi asam laktat yang terjadi secara optimal pada waktu 48 – 96 jam fermentasi (Beckett, 2009). Pada fase ini terjadi perubahan gula dan asam organik menjadi asam laktat oleh BAL (Vuyst et al., 2010). BAL akan memecah asam sitrat selama fermentasi menjadi asam asetat dan asam piruvat, termasuk asam laktat (Camu et al., 2007). Penurunan jumlah BAL dan asam laktat seiring berjalannya fermentasi dikarenakan sumber energi yang habis dan konsentrasi ethanol serta suhu yang tinggi.

Penambahan kultur *starter* BAL dan BAA dalam proses fermentasi dapat mempercepat waktu fermentasi karena dapat mempercepat proses konversi asam sitrat dan asam laktat (Lefeber et al., 2012). Turunnya nilai profil BAL dan BAA akan sejalan dengan meningkatnya oksidasi asam asetat sehingga menurunkan nilai keasaman biji.

Profil Bakteri Asam Asetat

Gambar 6 menunjukkan nilai profil pertumbuhan bakteri asam asetat pada 5 kultur *starter* yang berbeda dan *starter* secara keseluruhan. Dikutip dari Vuyst et al. (2010), nilai optimal profil BAA yaitu 5—8 log cfu.g⁻¹ pada waktu ke-72 jam fermentasi.



***Keterangan**

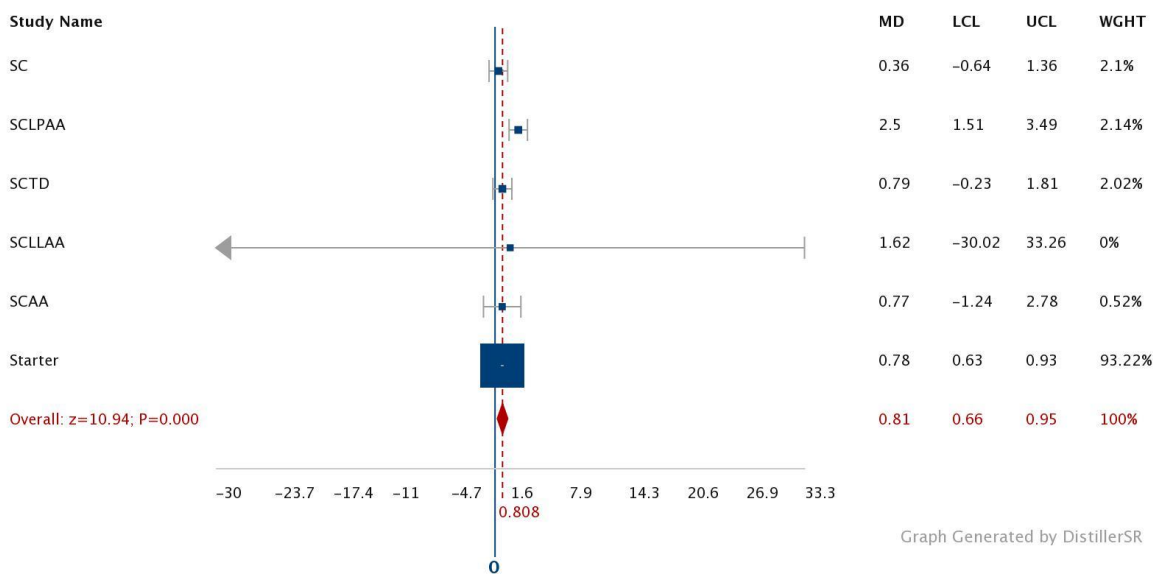
SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCTD (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*); SCLLAA (*S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*); SCAA (*S. cerevisiae*, *A. aceti*)

Gambar 6. Rerata gabungan profil pertumbuhan BAA

Hasil studi menunjukkan penggunaan kultur *starter* SCLLAA memiliki nilai profil BAA tertinggi, yaitu $8,62 \pm 1,78 \log \text{ cfu.g}^{-1}$ namun nilai ini termasuk lebih tinggi daripada standar. Penggunaan kultur *starter* SCLPAA memiliki nilai $7,02 \pm 2,13 \log \text{ cfu.g}^{-1}$ yang masih berada di kisaran standar. Sedangkan nilai profil BAA dari perlakuan kontrol tertinggi yaitu $7,00 \pm 0,05 \log \text{ cfu.g}^{-1}$. Untuk nilai profil BAA dengan penambahan *starter* secara keseluruhan yaitu $6,1 \pm 0,98 \log \text{ cfu.g}^{-1}$.

Pada penambahan kultur *starter* SCLPAA, SCLLAA dan SCAA memiliki nilai profil BAA yang tinggi dikarenakan adanya penambahan kultur *starter* asam asetat seperti *Acetobacter aceti*. Sehingga jumlahnya tinggi pada ketiga perlakuan tersebut dibandingkan dengan perlakuan SC dan SCTD, dimana kultur *starter* tersebut termasuk kedalam genus *yeast*.

Penambahan Starter terhadap BAA



***Keterangan**

SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCTD (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*); SCLLAA (*S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*); SCAA (*S. cerevisiae*, *a. aceti*)

Gambar 7. Grafik forest plot pengaruh penambahan starter terhadap profil BAA

Dari perhitungan nilai p dan I^2 untuk menentukan heterogenitas antarpelitian, didapatkan hasil nilai p sebesar 0,033 dan I^2 sebesar 58,8%. Hal ini menunjukkan bahwa antarpelitian bersifat heterogen atau tidak sama, sehingga dapat dikatakan bahwa dari setiap penelitian didapatkan hasil yang belum seragam. Sedangkan dari nilai p untuk melihat signifikansi, didapatkan hasil $p = 0,000$, dengan nilai ES (*effect size*) 0,808 dan 95% CI dari 0,663 hingga 0,953. Hal ini menandakan bahwa penambahan kultur starter berpengaruh terhadap perubahan nilai profil BAA selama fermentasi berlangsung. Berdasarkan Gambar 7, profil BAA dengan adanya penambahan kultur identik mengalami penurunan secara signifikan .

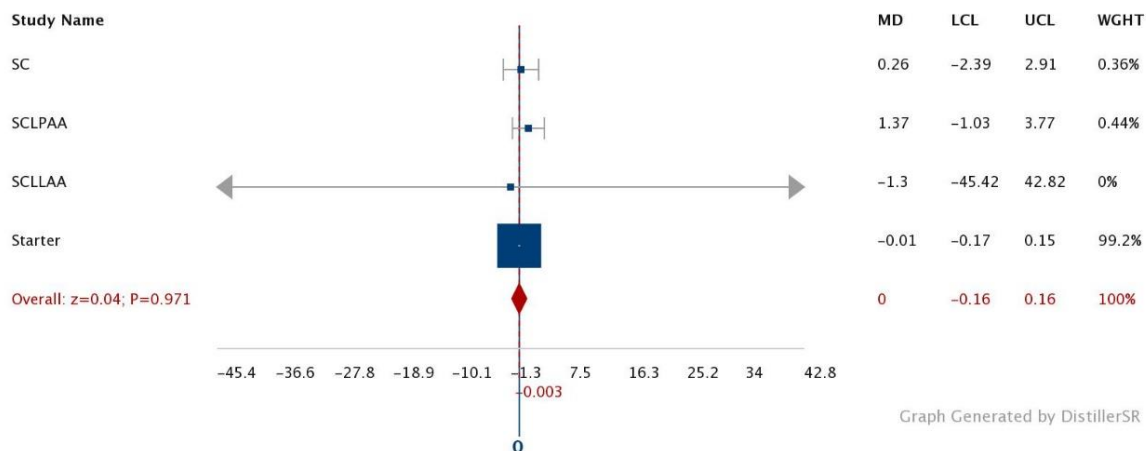
Fase *aerobic* BAA atau pertumbuhan BAA mengubah alkohol (etanol) menjadi asam asetat. Pada tahap ini BAA seperti *Acetobacter* mendominasi dan dapat mengoksidasi ethanol menjadi asam asetat serta oksidasi asam laktat menjadi asam asetat (Vuyst et al., 2010). Pengurangan konsentrasi etanol dan asam laktat menjadi keberhasilan aktivitas BAA (Adler et al., 2014). Penurunan jumlah BAA diakibatkan oleh suhu fermentasi yang tinggi sehingga terjadi evaporasi serta konsentrasi etanol yang rendah, maka proses fermentasi akan terhenti.

Metabolit Hasil Fermentasi

Asam laktat

Dari perhitungan nilai p dan I^2 untuk menentukan heterogenitas antarpelitian, didapatkan hasil nilai p sebesar 0,728 dan I^2 sebesar 0%. Hal ini menunjukkan bahwa antarpelitian bersifat homogen atau sama. Nilai signifikansi menunjukkan $p = 0,971$, dengan nilai ES (*effect size*) -0,003 dan 95% CI dari -0,162 hingga 0,156 (Gambar 8). Hal ini menandakan bahwa penambahan kultur starter tidak berpengaruh terhadap perubahan nilai kadar asam laktat selama fermentasi berlangsung.

Hal ini juga dapat diketahui secara statistik dengan melihat nilai *overall* dari grafik *forest plot* yang melewati garis vertikal/garis efek gabungan.



*Keterangan

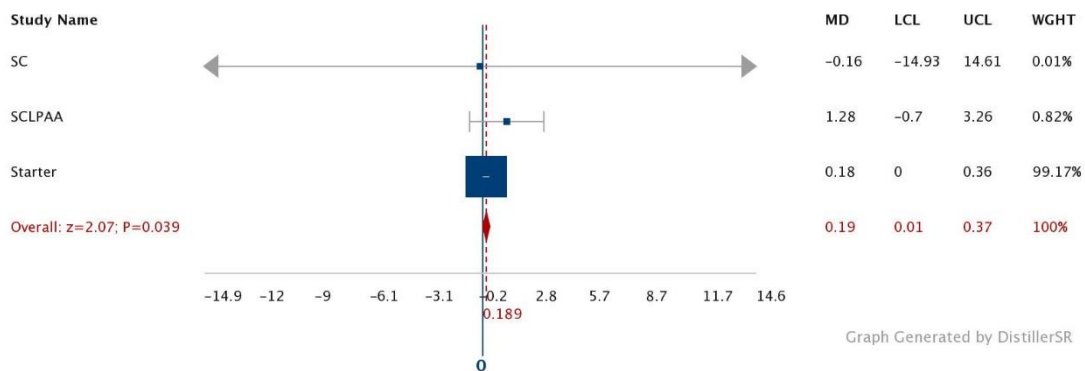
SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCLLAA (*S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*)

Gambar 8. Grafik *forest plot* pengaruh penambahan starter terhadap kadar asam laktat

Berdasarkan gambar 8, kultur SCLLAA memiliki pengaruh yang cukup besar terhadap kadar asam laktat. Asam laktat merupakan produk metabolit yang terbentuk pada fase ke 2 fermentasi atau *microarobic enterobacterial phase*. Dimana asam laktat akan mempengaruhi pH biji dan aktivitas enzim selama proses fermentasi, sehingga akan mempengaruhi citarasa dari biji kakao. Selain itu, asam laktat bersifat *nonvolatil*, sehingga jumlahnya akan tinggi, bahkan setelah proses fermentasi berlangsung. Hal ini dapat menjadi alasan mengapa kadar asam laktat diseluruh perlakuan memiliki nilai yang tinggi dan melebihi standar. Adanya asam laktat menandakan bahwa selama proses fermentasi berlangsung terjadi pertumbuhan dan aktivitas BAL. Namun, jumlah kadar asam laktat yang berlebihan ini tidak disukai, karena dapat meningkatkan tingkat keasaman coklat (Schwan et al., 2015). Namun, studi metaanalisis ini menyatakan bahwa fermentasi tidak berpengaruh secara signifikan terhadap kadar asam laktat pada biji kakao (Gambar 8).

Asam asetat

Dari perhitungan nilai p dan I^2 untuk menentukan heterogenitas antarpelitian, didapatkan hasil nilai p sebesar 0,55 dan I^2 sebesar 0%. Hal ini menunjukkan bahwa antarpelitian bersifat homogen atau sama. Sedangkan dari nilai p untuk melihat signifikansi, didapatkan hasil p = 0,039, dengan nilai ES (*effect size*) 0,189 dan 95% CI dari 0,010 hingga 0,368. Hal ini menandakan bahwa penambahan kultur *starter* akan berpengaruh terhadap perubahan nilai kadar asam laktat selama fermentasi berlangsung (Gambar 9).



***Keterangan**

SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*); SCLLAA (*S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*)

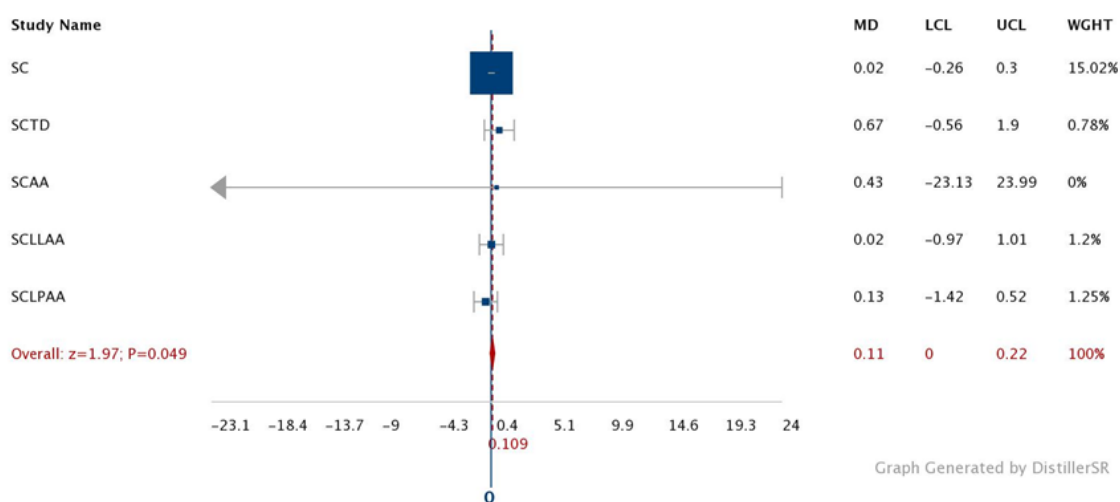
Gambar 9. Grafik *forest plot* pengaruh penambahan starter terhadap kadar asam asetat

Berdasarkan Gambar 9, kultur SC memiliki pengaruh yang cukup baik terhadap peningkatan kadar asam asetat. Namun, secara metaanalisis, proses fermentasi sedikit menurunkan kadar asam asetat pada biji kakao. Asam asetat merupakan produk metabolit yang terbentuk pada fase 3 fermentasi yaitu fase *aerobic* BAA. Asam asetat berperan dalam pengembangan citarasa biji kakao dan kematian biji (kotiledon). Selama proses fermentasi, asam asetat akan menghancurkan sel-sel kotiledon dan berdifusi ke dalam biji kakao dan terjadi reaksi-reaksi kimiawi antara senyawa fenolik, protein dan oksigen yang akan mengubah citarasa biji kakao menjadi tidak terlalu pahit serta citarasa cokelat yang khas (Bertazzo et al., 2013).

pH

Dari perhitungan nilai *p* dan *I*² untuk menentukan heterogenitas antarpelitian, didapatkan hasil nilai *p* sebesar 0,759 dan *I*² sebesar 0%. Hal ini menunjukkan bahwa antarpelitian bersifat homogen atau sama. Sedangkan dari nilai *p* untuk melihat signifikansi, didapatkan hasil *p* = 0,049 dengan nilai *ES* (*effect size*) 0,109 dan 95% *CI* dari 0,001 hingga 0,218 (Gambar 7). Hal ini menandakan bahwa penambahan kultur *starter* akan berpengaruh terhadap perubahan nilai kadar pH selama fermentasi berlangsung.

Berdasarkan Gambar 10, kultur SCTD dan SCAA dapat digunakan untuk menurunkan nilai pH biji kakao, dimana nilai pH yang turun berkorelasi dengan peningkatan kualitas biji kakao. pH merupakan salah satu parameter utama setelah proses fermentasi biji kakao yang menandakan bahwa selama fermentasi berlangsung terjadi difusi asam-asam ke dalam biji kakao. Hal ini ditandakan dengan menurunnya nilai pH biji selama fermentasi berlangsung. Penambahan kultur *starter* selama fermentasi akan mempengaruhi keasaman dari biji kakao selama fermentasi berlangsung. Berdasarkan studi meta-analisis, pH tidak mengalami perubahan yang signifikan. Namun demikian menurut Santos (2020), penambahan kultur *starter* tidak mempengaruhi kualitas biji berdasarkan nilai pH selama fermentasi. Perubahan pH lebih dipengaruhi oleh konsentrasi gula pada *pulp*, mikroorganisme selama fermentasi dan difusi metabolit asam ke dalam biji.



*Keterangan

SC (*Saccharomyces cerevisiae*); SCTD (*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*); SCAA (*S. cerevisiae*, *A. aceti*); SCLLAA (*S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*); SCLPAA (*S. cerevisiae*, *L. plantarum*, *A. aceti*)

Gambar 10. Grafik forest plot pengaruh penambahan starter terhadap pH

KESIMPULAN

Proses fermentasi biji kakao melibatkan mikroorganisme seperti yeast, BAL, dan BAA. Walaupun secara alami, mikroorganisme tersebut akan ada selama proses fermentasi, penambahan kultur starter akan mempengaruhi proses fermentasi dan produk akhir yang dihasilkan. Pada penambahan kultur starter, masing-masing perlakuan memberikan nilai profil metabolit yang berbeda-beda. Hal ini dapat dikarenakan metabolisme dari tiap mikroorganisme yang berbeda-beda. Untuk nilai profil yeast, penggunaan kultur starter SCTD memiliki nilai yang paling optimal, yaitu $6,8 \pm 0,3 \log \text{ cfu.g}^{-1}$ dan secara keseluruhan, penggunaan kultur starter berpengaruh pada nilai profil yeast ($p = 0,0$). Untuk nilai profil BAL, kultur starter SCLPAA memiliki nilai yang paling optimal, yaitu $7,27 \pm 2,99 \log \text{ cfu.g}^{-1}$ dan secara keseluruhan, penggunaan kultur starter berpengaruh pada nilai profil BAL ($p = 0,00$). Untuk nilai profil BAA, kultur starter SCLPAA memiliki nilai yang paling optimal, yaitu $7,02 \pm 2,13 \log \text{ cfu.g}^{-1}$ dan secara keseluruhan, penggunaan kultur starter berpengaruh pada nilai profil BAA ($p = 0,00$). Sedangkan untuk kadar asam laktat, penggunaan kultur starter maupun perlakuan kontrol memiliki nilai yang berada diluar kisaran standar dan secara penggunaan kultur starter tidak berpengaruh pada kadar asam laktat ($p = 0,971$). Untuk kadar asam asetat, kultur starter SCLPAA memiliki nilai yang paling optimal, yaitu $1,72\% \pm 0,17$ dan secara penggunaan kultur starter berpengaruh pada kadar asam asetat ($p = 0,039$). Untuk nilai pH, kultur starter SCLPAA memiliki nilai yang paling optimal, yaitu $4,88 \pm 0,96$ dan secara keseluruhan, penggunaan kultur starter tidak berpengaruh pada nilai pH ($p = 0,049$). Penambahan kultur starter akan meningkatkan jumlah mikroorganisme secara signifikan. Baik yeast, bakteri asam laktat maupun bakteri asam asetat akan meningkat jumlahnya jika ditambahkan pada proses fermentasi. Namun, penambahan bakteri asam laktat tidak mengubah jumlah asam laktat yang dihasilkan pada biji, sebaliknya asam asetat mengalami penurunan signifikan pada akhir fermentasi. Pada kadar pH masing-masing penambahan kultur tidak berpengaruh secara signifikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi, Indonesia, dengan nomor kontrak 069/E5/PG.02.00.PT/2022; 435/LL3/AK.04/2022; 238/SPK/LPP-UB/VI/2022, dan Universitas Bakrie dengan nomor kontrak 249/SPK/LPP-UB/VI/2022.

DAFTAR PUSTAKA

- Adler, P., Frey, L., Berger, A., Bolten, C., Hansen, C., & Wittmann, C. (2014). The key to acetate: Metabolic fluxes of acetic acid bacteria under cocoa pulp fermentation simulating conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 4702-4716.
- Ahn, E., & Kang, H. (2018). Introduction to systematic review and meta-analysis. *Korean Journal of Anesthesiology* 71(2), 103-112.
- Alamilla, P.G., Galvez, L.M.L., Fernandez, J.B., & Alamilla, R.G. (2017). Physicochemical changes of cocoa beans during roasting process. *Journal of Food Quality*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/2969324>.
- Apriyanto, M., & Rujiah, R. (2017a). Penurunan Total polifenol, etanol, asam laktat, asam asetat dan asam amino selama fermentasi biji kakao asalan dengan penambahan inokulum. *Jurnal Gizi dan Dietetik Indonesia*, 5(1), 1-8. [http://dx.doi.org/10.21927/ijnd.2017.5\(1\).1-8](http://dx.doi.org/10.21927/ijnd.2017.5(1).1-8)
- Apriyanto, M., Sutardi, S., Supriyanto, S., & Harmayani, E. (2017b). Fermentasi biji kakao kering menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti*. *Agritech*, 37(3), 302-311.
- Apriyanto, M., Sutradi, S., Harmayani, S., & Supriyanto, S. (2016). Perbaikan proses fermentasi biji kakao non fermentasi dengan penambahan biakan murni *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti*. *Agritech*, 36(4), 410-415. <http://dx.doi.org/10.22146/agritech.16764>
- Ariyanti, M. (2017). Karakteristik mutu biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan perlakuan fermentasi berdasar SNI 2323-2008. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, 12(1), 34-42.
- Aryani, N. A., Yulianti, N. L., & Arda, G. (2018). Karakteristik biji kakao hasil fermentasi kapasitas kecil dengan jenis wadah dan lama fermentasi yang berbeda. *Jurnal Biosistem dan Teknik Pertanian*, 6(1), 17-24.
- Bertazzo, A., Comai, S, Mangiarini, F., & Chen, S. (2013). Composition of Cacao Beans. In W. R.R, & et al., *Chocolate in Health and Nutrition* (pp. 105-117). Springer Science and Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_8
- Calvo, A.M., Botina, B.L., Garcia, M.C., Cardona, W.A., Montenegro, A.C., & Criollo, J. (2021). Dynamics of cocoa fermentation and its effect on quality. *Scientific reports*: 11:16746. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95703-2>
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Takrama, J., Vancanneyt, M., & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria populations involved in spontaneous heap fermentations of cocoa beans in Ghana. *Applied Environmental and Microbiology*, 73(6), 1809-1824.

- Cempaka, L., Aliwarga, L., Purwo, S., & Kresnowati, M.T.A.P. (2014). Dynamics of cocoa bean pulp degradation during cocoa bean fermentation: Effects of yeast starter culture addition. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 46(1), 14-25.
- Crafack, M., Keul, H., Eskildsen, C.E., Petersen, M.A., Saerens, S., Blennow, A., Larsen, M.S., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., & Nielsen, D.S. (2014). Impact of starter cultures and fermentation techniques on the volatile aroma and sensory profile of chocolate. *Food Research International*, 63: 306-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.032>
- Crafack, M., Mikkelsen, M.B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J.H., Petersen, G.B., Heimdal, H., Nielsen, D.S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024>
- Darius, Y. (2016). *Perbandingan produk beras sosoh dan tidak sosoh dengan pendekatan meta analisis* [Unpublished undergraduate thesis]. Universitas Bakrie.
- Fang, Y., Li, R., Chu, Z., Zhu, K., Gu, F., and Zhang, Y. (2020). Chemical and flavor profiles changes of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) during primary fermentation. *Food Science and Nutrition*, 8 (8), 4121-4133.
- Ganeswari, I., Khairul, B., Amizi, M., & Sim, K. (2015). Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*, 22(1), 70-76.
- Gutierrez, J. M., Botta, C, Ferrocino, I., Giordano, M., Bertolino, M., Dolci, P., Cannoni, M., & Cocolin, L. (2018). Dynamics and biodiversity of bacterial and yeast communities during the fermentation of cocoa beans. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), e01164-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01164-18>
- Holzapfel, W. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Journal Food Microbiology*, 75(3), 197-212.
- Jamili, J., Yanti, N. A., & Susilowati, P. E. (2016). Diversity and the role of yeast in spontaneous cocoa bean fermentation from Southeast Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 17(1), 90-95.
- Kongor, J.E., Hinnah, M., Walle, D.V.d., Afoakwa, E.O, Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016). Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. *Food Research Journal*, 82, 44-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kresnowati, M.T.A.P., & Febriami, H. (2015). Mapping the effects of starter culture addition on cocoa bean fermentation. *ASEAN Engineering Journal Part B*, 5(1), 25-37.
- Kresnowati, M.T.A.P, Suryani, S., & Affifah, M. (2013). Improvement of cocoa beans fermentation by LAB starter addition. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(4), 274-278. <https://doi.org/10.12720/jomb.2.4.274-278>
- Kustyawati, M., & Setyani, S. (2008). Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, 13(2), 73-84.
- Lefeber, T., Papalexandratou, Gobert, W, Camu, N., & Vuyst, L.D. (2012). On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of

- chocolates produced theorof. *Food Microbiology*, 30, 379-392. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.021>
- Meryandini, A., Fauzi, A.M., Syamsu, K., & Munarso, S.J. (2019). Peningkatan kualitas biji kakao (*Theobroma cacao* L) melalui fermentasi menggunakan *Lactobacillus* sp. dan *Pichia kudriavzevii*. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(1), 11-19.
- Miguel, M.G.d.C.P, Reis, L.V.d.C, Efraim, P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R.F. (2016). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 362-369. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.076>
- Misgiyarta, Fauzi, A. M., Syamsu, K., & Munarso, S. J. (2019). Pemilihan starter cair unggul untuk fermentasi biji kakao. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 16(1), 19-24.
- Misnawi, M., Tunjungsari, A.B., Febrianto, N.A., Adiandri, R.S., Fahrizal, F., & Fahrurrozi, F. (2017). Improvement of small scale cocoa fermentation using *Lactobacillus fermentum* as starter culture. *Pelita Perkebunan*, 33, 203-210.
- Munarso, S. J., Kun, T., & Zahra, H. (2016). Pengaruh penambahan starter mikroba serta pemerasan pulp terhadap kondisi fermentasi dan mutu biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 13(3), 156-166.
- Ooi, T., Ting, A., & Siow, L. (2020). Influence of Selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *Food Science and Technology*, 122, 108977.
- Pereira, G.V.M., Alvarez, J.P., Neto, D.P.d.C., Soccol, V.T., Tanobe, V.O.A., Rogez, H., Neto, A.G., Soccol, C.R. (2017). Great intraspecies diversity of *Pichia kudriavzevii* in cocoa fermentation highlights the importance of yeast strain selection for flavor modulation of cocoa beans. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.073>
- Purwanto, E.H., Setyabudi, S., & Supriyanto, S. (2019). Aktivitas mikrob dalam pulp biji kakao (*Theobroma cacao* L.) selama fermentasi dengan penambahan ragi tape. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 6(1), 21-32. <https://doi.org/10.21082/jtidp.v6n1.2019.p21-32>
- Qin, X.W., Lai, J.X., Tan, L.H., Hao, C.Y., Li, F.P., He, S.Z., & Song, Y.H. (2015). Characterization of volatile compounds in criollo, forastero and trinitario cocoa seeds in China. *International Journal of Food Properties*, 20(10), 2261-2275. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1236270>
- Ramos, C. L., Dias, D.R., Miguel, M.G.d.C.P., & Schwan, R.F. (2014). Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Sabahannur, S., Netty, Alimuddin, S., & Nirwana. (2018). Study of tape yeast and sucrose addition to cocoa bean fermentation (*Theobroma cacao* L.) on small scale. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 5(4), 271-275. <https://doi.org/10.18178/joaat.5.4.271-275>
- Sandhya, M.V.S., Yallappa, B.S., Varadaraj, M.C, Puranaik, J., Rao, L.J., Janardhan, P., & Murthy, P. S. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 731-738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.002>

- Santos, D.S. Rezende, R.P., Santos, T.F.d., Marques, E.d.L.S., Ferreira, A.C.R., Silva, A.B.d.C.e., Romano, C.C., Santos, D.W.d.C., Dias, J.C.T. & Bisneto, J.D.T. (2020). Fermentation in fine cocoa type scavina: Change in standard quality as the effect of use of starter yeast in fermentation. *Food Chemistry*, 328, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127110>
- Satryo, B.D., Arnata, I.W., & Arnata, I.W. (2015). Pengaruh penambahan ragi tape dan waktu fermentasi terhadap karakteristik cairan pulpa hasil samping fermentasi biji kakao. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 3(1), 11-18.
- Saunshi, Y.B, Sandhya, M.V.G., Rastogi, N.K., & Murthy, P.S. (2019). Starter consortia for on-farm cocoa fermentation and their quality attributes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(3), 272-280. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1689508>
- Schwan, R.F, & Fleet, G.H. (2015). *Cocoa and Coffee Fermentation*. CRC Press.
- Visintin, S., Ramos, C., Batista, N., Dolci, P., Schwan, R., & Cocolin, L. (2017). Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulospira delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.004>
- Vuyst, L.D., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5-17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Vuyst, L.D, Lefeber, T., Papalexandratou, Z., & Camu, N. (2010). The Functional Role of Lactic Acid Bacteria in Cocoa Bean Fermentation. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications* (pp. 301-322). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch16>
- Wahyuni, N.L., Sunarhanum, W.B., Muhammad, D.R.A., & Saputro, A.D. (2021). Formation and development of flavour of cocoa (*Theobroma cacao* L.) cultivar Criollo and Forastero: a review. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 733, No. 1, p. 012078)*. IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/733/1/012078>.
- Widianto, D., Pramita, A.D., & Wedhastri, S. (2013). Perbaikan proses fermentasi biji kakao kering dengan penambahan tetes tebu, khamir, dan bakteri asam asetat. *Jurnal Teknosains*, 3(1), 38-44.