

**Monograf :**  
**PENINGKATAN MUTU**  
**BIJI KAKAO PETANI**

Dr. Mulono Apriyanto, STP. MP



**Monograf :**  
**PENINGKATAN MUTU BIJI KAKAO PETANI**

Nuta Media, Yogyakarta  
Ukuran. 15,3 x 23  
Halaman 80 + vi

Cetakan : I, Juni 2021  
ISBN : 978-623-6040-28-7

Penulis : Dr. Mulono Apriyanto, STP. MP

Editor : Latarus Fangohoi  
Sampul : Team Creative  
Layout : NuNaNev

Diterbitkan oleh :  
Nuta Media  
Jl. P. Romo, No. 19 Kotagede Jogjakarta/  
Jl. Nyi Wiji Adhisoro, Prenggan Kotagede Yogyakarta  
[nutamediajogja@gmail.com](mailto:nutamediajogja@gmail.com); 081228153789

@2020, Hak Cipta dilindungi undang-undang, dilarang keras menterjemahkan,  
memfotokopi atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari penerbit

ISI DI LUAR TANGGUNGJAWAB PENERBIT DAN PERCETRAKAN  
dicetak olah : Nuta Media

## **Kata Pengantar**

Puji Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala limpahan Hidayah dan RahmatNya karena dengan kebesaran-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan buku monograf dengan judul PENINGKATAN MUTU BIJI KAKAO PETANI. Penulisan buku monograf ini didasarkan dari hasil penelitian penulis dengan judul FERMENTASI BIJI KAKAO KERING TERKENDALI MENGGUNAKAN INOKULUM MIKROB.

Buku monograf ini diharapkan bisa menjadi tambahan referensi bagi para akademisi dan masyarakat pada umumnya dalam rangka menambah khasanah pengetahuan tentang perbaikan mutu biji kakao petani.

Penulis tentunya menyadari bahwa dalam penulisan buku monograf ini masih banyak kekuarangan sehingga saran dan kritik diterima dengan lapang. Terakhir, semoga buku monograf ini memberikan manfaat bagi semua. Aamiin.

Pekanbaru, 2021  
Penulis

## **Sinopsis**

Biji kakao kering ditingkat petani sebagian besar dihasilkan tanpa fermentasi yang mempunyai beberapa kelemahan diantaranya tidak menghasilkan prekursor flavour khas kakao. Upaya untuk mendapatkan biji kakao kering yang memiliki prekursor flavour khas kakao dapat dilakukan, apabila masih terdapat substrat yang dapat difermentasi oleh mikrobia yang terlibat dalam fermentasi biji kakao segar dengan kondisi proses yang sesuai. Mendasari hal tersebut dengan niat memperbaiki mutu biji kakao petani maka penulis melakukan penelitian dan menulisnya dalam buku monograf.

Biji kakao petani dapat ditingkatkan mutunya melalui proses fermentasi, yang didahului rehidrasi. Rehidrasi bertujuan untuk mengembalikan kadar air pulp biji kakao kering mendekati kadar air pulp biji kakao segar. Dalam buku ini dijelaskan cara dan hasil perbaikan mutu biji kakao petani. Secara umum mutu biji kakao petani bisa diperbaiki dengan mensyaratkan kondisi kadar air pada pulp, populasi mikrobia endigenus dan suhu fermentasi. Setelah dilakukan fermentasi mutu biji kakao petani dapat ditingkatkan mendekati mutu biji kakao hasil fermentasi alami. Indikator pengukur mutu adalah indeks fermentasi, populasi mikrobia, jumlah asam amino dan gula selama fermentasi. Setelah fermentasi dilakukan sangria dan digunakan indikator flavor yang dihasilkan identik dengan biji kakao dari fermentasi biji segar. Seluruh pengujian baik sifat fisik atau kimia mengaju beberapa peneliti sebelumnya.

Diakhir semoga buku ini dapat menambah kasanah penanganan pasaca panen biji kakao dan meningkatkan tingkat pengetahuan petani kakao serta para pemerhati buah kakao.

## DAFTAR ISI

Kata Pengantar .....	iii
Sinopsis .....	iv
I. PENDAHULUAN.....	1
II. KAKAO.....	8
1. Buah Kakao .....	8
2. Pulp Biji Kakao .....	8
3. Biji Kakao .....	9
4. Fermentasi .....	10
5. Degradasi komponen penyusun dalam biji.....	18
6. Rehidrasi Biji Kakao Produk Petani.....	19
7. Senyawa Pembentuk Aroma.....	19
a. Polifenol.....	19
b. Asam Amino .....	22
c. Gula .....	23
III. PERUBAHAN SIFAT FISIK DAN KIMIA BIJI KAKAO.	33
1. Komposisi <i>pulp</i> biji kakao kering .....	33
2. Perubahan Fisik dan Kimia Biji Kakao.....	36
3. Profil Senyawa Volatil Biji Kakao Pasca Sangrai .....	58
IV. PENUTUP.....	79



## I. PENDAHULUAN

Penanganan pasca panen biji kakao segar ditingkat petani meliputi 2 cara yaitu produksi biji kakao kering fermentasi dan biji kakao kering tanpa fermentasi. Produksi kakao kering pada tahun 2013 mencapai  $\pm$  5.450.000 ton tanpa fermentasi sebesar  $\pm$  385.000 ton merupakan biji kakao kering hasil fermentasi [1]–[3]. Pada umumnya petani kakao hanya merendam biji kakao segar dalam air dalam upaya untuk membantu menghilangkan pulp dan menjemur.

Biji kakao tanpa fermentasi adalah biji kakao segar atau biji kakao segar dibersihkan pulpanya dan langsung dikeringkan [4]–[6]. Biji kakao terfermentasi adalah biji kakao yang dihasilkan dari biji kakao segar yang melalui proses fermentasi selama 5 hari sedangkan biji kakao terfermentasi sebagian merupakan biji kakao yang mengalami fermentasi selama 2 hari [7]–[10]. Biji kakao kering yang tidak diketahui kadar airnya, dijual tanpa memperhatikan kualitas baik dari aspek kadar air maupun kondisi biji kering [11]–[14], sehingga hal tersebut menjadikan mutu biji kakao kering dari petani sangat jelek. Padahal biji kakao kering tanpa proses fermentasi dihasilkan biji kakao dengan cita rasa pahit dan tidak dihasilkan aroma khas kakao [15]–[17].

Fermentasi adalah salah satu faktor penting dalam pengolahan biji kakao khususnya dalam pembentukan senyawa prekursor flavor [18]–[20]. Fermentasi biji kakao segar terdiri atas 2 tahap yaitu tahap pertama dimulai dengan pelepasan pulp dari permukaan biji dan kedua reaksi hidrolitik didalam kotiledon biji [16], [18], [21], [22].

Cita rasa dan aroma khas cokelat (flavor cokelat) ditentukan oleh mutu kakao [23]–[25]. Prekursor aroma yang terbentuk selama fermentasi dikembangkan pada proses penyangraian melalui reaksi kimia non enzimatis yang memegang peranan penting pada pembentukan flavor yaitu reaksi Maillard [26]. Prekursor aroma yang penting dalam reaksi Maillard adalah gula reduksi (glukosa) dan asam amino hidrofobik [27]–[30].

Fermentasi biji kakao kering menghadapi beberapa permasalahan [31]–[34] seperti 1). rendahnya kadar air pulp yang dapat menyebabkan tumpukan biji kakao kering bersifat aerob sehingga menurunkan aktivitas yeast yang lazim aktif pada kondisi anaerob dan rentan terjadinya kontaminasi jamur, 2). keberadaan substrat seperti komposisi pulp sangat mempengaruhi keberhasilan

fermentasi biji kakao kering. Kadar air pulp yang dibutuhkan agar fermentasi berlangsung secara baik adalah  $\geq 35\%$  [28], [35], [36]. Substrat yang berperan sebagai media fermentasi biji kakao adalah gula dan asam sitrat didalam pulp [37], [38].

Penelitian tentang fermentasi biji kakao kering telah banyak dilakukan oleh peneliti terdahulu. Perendaman biji kakao kering selama 1 jam dapat memberikan kelembaban pulp yang masih menempel pada bagian kulit biji setara dengan kadar air pulp biji kakao segar yaitu  $\pm 87,96\%$ , dan memiliki indeks warna biji kakao hasil fermentasi sebesar 0,95 - 1 [35], [39], [40]. Penambahan inokulum mikrobia yang terdiri atas *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* dalam fermentasi biji kakao segar mempengaruhi perubahan komposisi kimia substrat selama fermentasi [10], [14], [41], berlangsung sebagai dampak terjadinya perubahan ekologi mikrobia didalamnya sehingga memperpendek waktu fermentasi.

Biji kakao kering tanpa fermentasi tidak akan menghasilkan cita rasa kakao yang khas setelah penyangraian. Biji kakao kering tanpa fermentasi yang umum dilakukan petani sangat rentan terhadap kontaminasi jamur yang akan memperburuk cita rasanya, pulp yang menempel masih mengandung gula-gula sederhana dan asam-asam organik yang mempunyai potensi dimanfaatkan untuk proses fermentasi dan mengandung mikro organisme alami seperti yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat dalam jumlah kecil dan tidak dapat tumbuh atau berkativitas karena kurang air.

Upaya perbaikan mutu biji kakao kering menghadapi beberapa masalah antara lain: Komposisi dan kadar air pulp biji kakao kering sangat berbeda dengan pulp biji kakao segar, Komposisi mikrobia biji kakao kering kemungkinan berbeda dengan biji kakao segar sehingga diperlukan starter untuk memicu dan memacu proses fermentasi, Populasi penambahan inokulum murni *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* baik secara sendiri – sendiri maupun dalam bentuk campurannya pada fermentasi biji kakao kering tanpa fermentasi mampu menghasilkan biji kakao kering mendekati hasil fermentasi biji kakao segar. Perbaikan mutu biji kakao kering melalui proses fermentasi terkendali menggunakan inokulum mikrobia *S. cerevisiae* (FNCC 305), *L. lactis* (FNCC 0856) dan *A. aceti* (FNCC 0016) agar berlangsung pembentukan senyawa prekursor flavor khas kakao. Adapun cara menguji keberhasilan dilakukan antara lain : Mengetahui dan evaluasi komposisi pulp biji kakao kering memenuhi persyaratan sebagai substrat untuk fermentasi, Mengevaluasi kualitas biji kakao kering hasil tiga variasi teknik



fermentasi biji kakao kering rehidrasi dengan suhu terkendali, Mengevaluasi pengaruh pemberian inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) secara serentak diawal fermentasi dan secara bertahap selama fermentasi dibandingkan tanpa penambahan inokulum terhadap mutu hasil fermentasi.

#### **Daftar Pustaka :**

- [1] Hartono, *Kabupaten Indragiri Hilir Dalam Angka 2020*. 2020.
- [2] B. S. Nasional, *Biji kakao*. 2002.
- [3] N. Luh, P. Novi, A. Aryani, N. L. Yulianti, and G. Arda, "Karakteristik Biji Kakao Hasil Fermentasi Kapasitas Kecil dengan Jenis Wadah dan Lama Fermentasi yang Berbeda". *Jurnal Beta (Biosistem dan Teknik Pertanian*, vol. 6, pp. 17–24, 2018.
- [4] A. H. M. Farah, D.M.H., Zaibunnisa, "Optimization of cocoa beans roasting process using Response Surface Methodology based on concentration of pyrazine and acrylamide," *Int. Food Res. J.*, vol. 19, no. 4, pp. 1355–1359, 2012.
- [5] M. Sulistyowati, "Effects of alkali concentration and conching temperature on antioxidant activity and physical properties of chocolate," *Int. Food Res. J.*, vol. 15, no. 90, pp. 297–304, 2008.
- [6] Misnawi, "Physico-Chemical Changes during Cocoa Fermentation and Key Enzymes Involved Perubahan Fisiko-Kimia Selama Fermentasi Biji Kakao Cocoa beans are obtained from," *Rev. Penelit. Kopi dan kakao*, vol. 24, no. 1, pp. 47–64, 2008.
- [7] P. C. G. Júniora, A. S. L. Vagner Bezerra dos Santosa, J. P. I. de Souzaa, J. R. S. Pinaa, G. C. A. C. Júniorc, and Patrícia Santana Barbosa Marinhoa, "Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation," *Food Control*, vol. 108, no. September 2019, p. 106887, 2020, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106887.
- [8] L. O. Sabarudin, R. Melati, P. Studi, P. Kimia, and U. Haluoleo, "Waktu Optimum Fermentasi Limbah Pulp Kakao ( *Theobroma cacao* L .) Menggunakan Kulit Bakau ( *Sonneratia* sp .)," 2010.
- [9] H. S. Nur, "Suksesi mikroba dan aspek biokimiawi fermentasi

- mandai dengan kadar garam rendah,” vol. 13, no. 1, pp. 13–16, 2009.
- [10] M. Apriyanto, “Suksesi Mikrobial Terhadap Penurunan Etanol, Asam Laktat Dan Asam Asetat Selama Fermentasi Biji Kakao,” *J. Teknol. Pertan.*, vol. 7, no. 2, pp. 30–39, 2018.
- [11] C. Pasau, “Pemeraman Biji Kakao Segar sebagai Analog Analog Fermentation : Effectiveness Of Acetic Acid Solution As Soaking Agent On Depulped Fresh Cocoa Beans Laboratorium Nutrisi dan Makanan Ternak,” vol. 1, no. 2, pp. 113–120, 2013.
- [12] E. O. Afoakwa, *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell, 2010.
- [13] E. O. Afoakwa, J. E. Kongor, J. F. Takrama, and A. S. Budu, “Effects of Pulp Preconditioning on Total Polyphenols, O-diphenols and Anthocyanin Concentrations during Fermentation and Drying of cocoa (theobroma cacao) Beans,” vol. 3, pp. 235–245, 2013.
- [14] M. Apriyanto, Y. Riono, and Rujiah, “Pengaruh Populasi Mikroba pada Re-fermentasi terhadap Kualitas Biji Kakao Tanpa Fermentasi,” *AGRITEKNO J. Teknol. Pertan.*, vol. 9, no. 2, pp. 64–71, 2020, doi: 10.30598/jagritekno.2020.9.2.64.
- [15] T. Hofmann, P. Mu, and P. Schieberle, “Quantitative Model Studies on the Formation of Aroma-Active Aldehydes and Acids by Strecker-Type Reactions,” pp. 434–440, 2000.
- [16] E. O. Afoakwa, J. Quao, J. Takrama, and A. S. Budu, “Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation,” vol. 50, no. December, pp. 1097–1105, 2013, doi: 10.1007/s13197-011-0446-5.
- [17] E. O. Afoakwa, J. E. Kongor, J. Takrama, and A. S. Budu, “Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (Theobroma cacao) beans,” 2013.
- [18] R. F. Schwan and A. E. Wheals, “The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 4, pp. 205–21, Jan. 2004, doi: 10.1080/10408690490464104.
- [19] R. F. Schwan and A. E. Wheals, “The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 4, pp. 205–221, 2004, doi: 10.1080/10408690490464104.

- [20] M. Apriyanto, Sutardi, Supriyanto, and H. Eni, "Study on effect of fermentation to the quality parameter of cocoa bean in Indonesia," *Asian J. Dairy Food Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 160–163, 2016, doi: 10.18805/ajdfr.v35i2.10724.
- [21] I. M. D. V. Moreira, M. G. D. C. P. Miguel, W. F. Duarte, D. R. Dias, and R. F. Schwan, "Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids," *Food Res. Int.*, vol. 54, no. 1, pp. 9–17, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.001.
- [22] Apriyanto Mulono, Sutardi, Supriyadi, and E. Harmayani, "Fermentasi biji kakao kering menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, *Acetobacter aceti*," *AGRITECH*, vol. 37, no. 3, pp. 302–311, 2017, doi: <http://doi.org/10.22146/agritech.17113>.
- [23] Misnawi, S. Jinap, B. Jamilah, and S. Nazamid, "Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting," *Food Qual. Prefer.*, vol. 15, no. 5, pp. 403–409, Jul. 2004, doi: 10.1016/S0950-3293(03)00097-1.
- [24] J. Rodriguez-Campos, H. B. Escalona-Buendía, S. M. Contreras-Ramos, I. Orozco-Avila, E. Jaramillo-Flores, and E. Lugo-Cervantes, "Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa," *Food Chem.*, vol. 132, no. 1, pp. 277–288, May 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.078.
- [25] J. Rodriguez-Campos, H. B. Escalona-Buendía, I. Orozco-Avila, E. Lugo-Cervantes, and M. E. Jaramillo-Flores, "Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 1, pp. 250–258, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.028.
- [26] Misnawi, "Influences of Cocoa Polyphenols and Enzyme Reactivation on The Flavor Development of Unfermented and Under-Fermented Cocoa Beans," *Thesis, Univ. Putra Malaysia*, 2003.
- [27] M. Apriyanto, Sutardi, E. Harmayani, and Supriyanto, "Amino acid analysis of cocoa fermented by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)," *Asian J. Dairy Food Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 156–160, 2017.

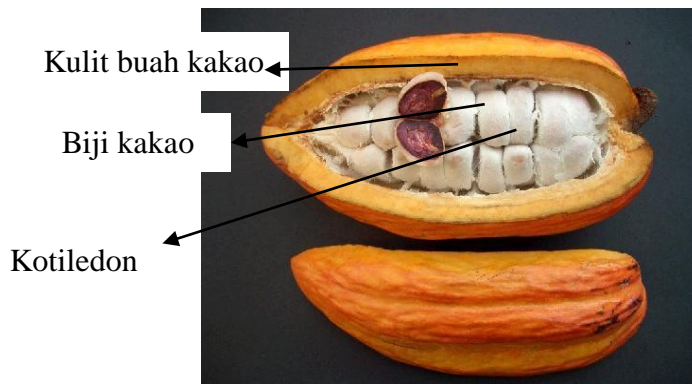
- [28] M. Apriyanto, “Studi Mikrobial dan Biokimia Fermentasi Biji Kakao Kering,” *J. Teknol. Pertan.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–5, 2020.
- [29] E. S. De Brito, N. H. P. García, M. I. Gallão, A. L. Cortelazzo, P. S. Fevereço, and M. R. Braga, “Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma cacao* L) during fermentation, drying and roasting,” *J. Sci. Food Agric.*, 2001, doi: 10.1002/1097-0010(20010115)81:2<281::AID-JSFA808>3.0.CO;2-B.
- [30] M. E. Kustyawati and S. Setyani, “Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat,” vol. 13, no. 2, pp. 73–84, 2008.
- [31] M. Apriyanto, Sutardi, E. Harmayani, and Supriyanto, “Fermentation Process Improvement of Cocoa Beans with Addition of Non Fermentation Inoculum of *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, and *Acetobacter aceti*,” *AGRITECH*, vol. 36, no. 4, pp. 410–415, 2016.
- [32] M. Apriyanto, S. Sutardi, S. Supriyanto, and E. Harmayani, “Fermentasi Biji Kakao Kering Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, dan *Acetobacter aceti*,” *agriTECH*, vol. 37, no. 3, pp. 302–311, 2017.
- [33] P. S. Dimick, “Analysis of Non-volatile Organic Acids in Fermented and Dried Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography .,” vol. 13, no. 1, pp. 107–111, 1990.
- [34] S. Jinap, P. S. Dimick, and R. Hollender, “Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries,” vol. 6, no. 2, pp. 105–110, 1995.
- [35] Samuel. F.K., “Pengaruh fermentasi biji kakao kering non fermentasi terhadap Indeks fermentasi.” Fakultas Teknologi Pertanian UGM, 2013.
- [36] R. Hayati, Yusmanizar, Mustafri, and H. Fauzi, “Kajian Fermentasi dan Suhu Pengeringan pada Mutu Kakao (*Theobroma cacao* L.),” *J. Keteknikan Pertan.*, vol. 26, no. 2, pp. 129–136, 2012, doi: 10.19028/jtep.26.2.129-136.
- [37] M. Apriyanto, S. Sutardi, S. Supriyanto, and E. Harmayani, “Cocoa Beans Dry Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* and *Acetobacter aceti*,” *Agritech*, vol. 37, no. 3, p. 302, 2017, doi: 10.22146/agritech.17113.
- [38] A. Pirazin and B. Kakao, “Analysis of Pyrazine and Volatile Compounds in Cocoa Beans Using Solid Phase Microextraction,” vol. 27, no. 90, pp. 24–35, 2011.

- [39] N. Nurhayati and M. Apriyanto, "Sensory evaluation of chocolate bar production materials of dry cocoa seeds in various fermentation treatments," *Czech J. Food Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 58–62, 2021, doi: 10.17221/272/2020-CJFS.
- [40] M. Apriyanto, "Perubahan pH , Keasaman dan Indeks Fermentasi Biji Kakao Selama Fermentasi Hasil Biji Kakao (*Theobroma cacao*)," *J. Teknol. Pertan.*, vol. 6, no. 1, pp. 12–18, 2017, doi: <https://doi.org/10.32520/jtp.v6i1.97>.
- [41] M. E. Kustyawati and S. Setyani, "Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat," *J. Teknol. Ind. Has. Pertan.*, vol. 13, no. 2, pp. 73–84, 2012.

## II. KAKAO

### 1. Buah Kakao

Bahan dasar produksi komoditi coklat adalah biji buah kakao atau biji kakao [1]–[3]. Mutu produk olahan biji kakao yang dihasilkan sangat tergantung pada mutu biji kakao hasil petikan dan teknik pengolahan biji kakao yang dilakukan. Salah satu faktor penentu mutu kakao olahan adalah dilakukannya fermentasi biji kakao [4], [5]. Potongan membujur buah kakao segar jenis forestero (atas) dan buah kakao matang optimal gamabr 2.1.



Gambar 2.1. Potongan membujur buah kakao segar jenis forestero (atas) dan buah kakao matang optimal [1], [6]

### 2. Pulp Biji Kakao

Biomassa semi padat yang menempel pada bagian kulit biji kakao dan memiliki rasa manis ketika buah kakao telah mencapai masak optimal disebut Pulp [7]–[10]. Pulp tersebut berwarna putih dalam keadaan steril (sebelum dibuka), dan saat terbuka sangat mudah mengalami kontaminasi oleh mikrobia khususnya yeast [11]–[13]. kandungan gula pulp relatif tinggi keasamannya (pH 3,5). Pulp kakao secara normal memiliki kadar air 82 – 87 %, gula 10 – 15 %, pektin 1 - 5 %, asam sitrat 1 – 3 %, asam non volatil 0,1 – 0,4 %, protein 0,5 – 0,7 % dan mineral 8 – 10 % [10], [14], [15].

Gula pulp terdiri atas sukrosa 60% dan campuran antara glukosa dan fruktosa 40%. Kadar sukrosa, glukosa dan fruktosa berkaitan erat dengan umur buah dan tingkat kematangannya. Buah kakao

kelewat matang mengandung lebih banyak sukrosa. Buah kakao matang optimal kandungan fruktosa dan glukosa paling tinggi. Bobot total pulp kakao sekitar 12 - 15% dari bobot biji basah. Pulp menjadi cairan berbentuk lendir (sweatings) mulai dari awal fermentasi sampai fermentasi berlangsung 36 jam. Setelah fermentasi berlangsung selama 24 – 36, cairan yang terbentuk telah berhenti serta biji kakao kehilangan pulp [8], [16]–[18].

Vitamin C merupakan vitamin penting yang dijumpai dalam pulp, asam amino, asam sitrat sedangkan pH pulp relatif rendah yaitu 3 – 4 yang disebabkan oleh kandungan asam sitrat. Kandungan pektin dan polisakarida lain seperti selulosa, hemiselulosa dan lignin menjadikan pulp kakao bersifat semi padat, lengket dan kompak [18].

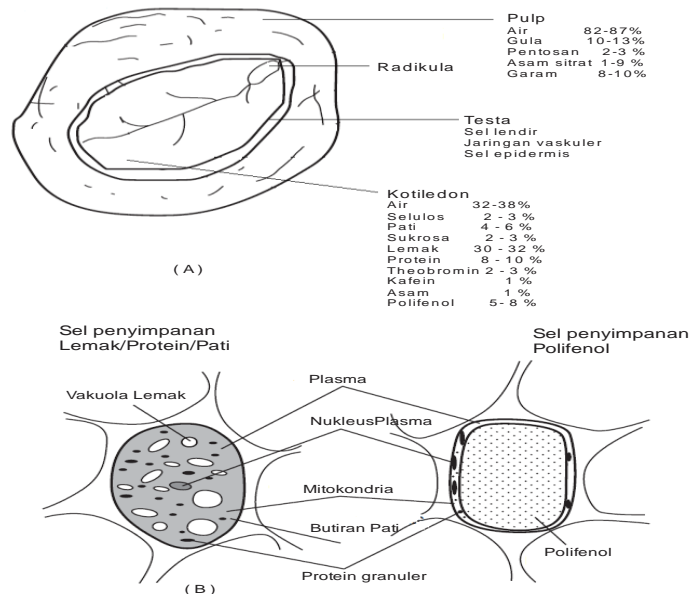
### 3. Biji Kakao

Biji kakao mempunyai bentuk oval (panjang 2 - 3 cm, lebar 1 - 1,7 cm dan tebal 0,7 - 1,2 cm) dengan bobot rata-rata 2,5 g/biji kakao segar [19]–[21]. Biji kakao segar mengandung air  $\pm$  65% yang akan dikeringkan untuk mendapatkan biji kakao kering sampai kadar air  $\pm$  10% [20]. Biji kakao terdiri atas 2 bagian yaitu bagian kulit biji atau testa, dan bagian dalam yang meliputi embrio dan keping biji yang lebih dikenal sebagai "nib". Testa biji kakao bersifat tidak permeabel bagi senyawa dengan bobot molekul besar seperti asam sitrat, poliphenol dan alkaloid. Sedangkan beberapa senyawa volatil seperti etanol dan asam asetat mudah masuk kedalam jaringan keping biji [21], [22].

Sel penyimpanan makanan dalam keping biji terdiri atas 2 tempat yaitu bagian berwarna putih adalah tempat penyimpanan lemak, protein, polisakarida, dan bagian berwarna ungu tempat penyimpanan poliphenol dan methylxanthines dengan jaringan parenkim sebagai pembatas keduanya [18], [23]. Lemak biji kakao merupakan komponen penting dan penentu karakteristik atau mutu coklat yang dihasilkan selain memberikan tampak mengkilap pada permukaan produk coklat [24], [25]. Lemak kakao terdiri atas lemak jenuh dan tidak jenuh dengan komposisi asam palmitat ( $C_{16:0}$  sebesar 25%), asam stearat ( $C_{18:0}$  sebesar 35%), asam oleat (*cis*- $C_{18:1}$ , satu ikatan rangkap) sebesar 5%. Senyawa alkaloid biji kakao sebesar 0,7 – 3% dalam bentuk senyawa theobromin, 0,1 – 0,7% dalam bentuk senyawa kafein. Senyawa anthosianin tersimpan dalam bagian poliphenol yang memberikan wana ungu sebesar 10 – 20% (berat

kering) per keping biji [26]–[28]. Tiga kelompok senyawa polifenol biji kakao adalah flavan 3-ols sebesar 37%, proantosianidin sebesar 58% dan antosianidin sebesar 4% [12], [29]–[31].

Senyawa polifenol tersebut mudah bereaksi dengan gula dan asam amino yang perannya memberikan kontribusi pada pembentukan flavor dan warna produk coklat. Sedangkan alkaloid memberikan cita rasa pahit [32], [33]. Biji kakao (penampang membujur) dan bagian sel penyimpan cadangan makan bagi biji disajikan pada Gambar 2.2



Gambar 2.2. Biji kakao segar (A) dan bagian sel penyimpan cadangan makanan dalam biji (B) (Afoakwa, 2010).

#### 4. Fermentasi

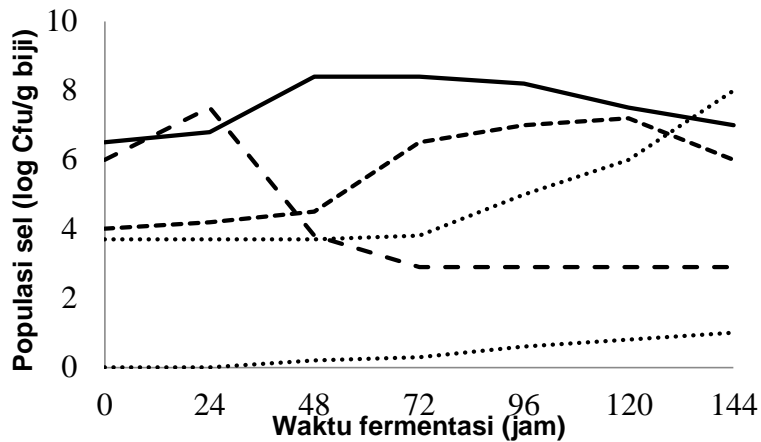
Fermentasi adalah proses perubahan biomassa oleh mikrobia yang merupakan salah satu faktor sangat penting dalam pembentukan senyawa prekursor flavor [35]–[38]. Secara garis besar fermentasi biji kakao terdiri atas 2 tahap yaitu 1) tahap fermentasi yang berlangsung dibagian luar biji oleh mikrobia peristiwanya juga enzimatik. 2). Tahap degradasi protein secara enzimatik terjadi didalam keping biji [39], [40]. Mikrobia yang berperan dalam fermentasi biji kakao secara alami berasal dari kontaminasi spontan saat biji kakao dikeluarkan dari bagian dalam buah (*pod*). Mikrobia yang lazim memiliki peran penting dalam fermentasi biji kakao



adalah yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat [41], [42]. Mikrobial melakukan aktivitas dan memecah *pulp* menjadi alkohol dan pemecahan lanjut menjadi asam dan kemudian senyawa hasil dekomposisi *pulp* tersebut terpenetrasi ke dalam massa biji kakao dan dilanjutkan oleh pembentukan senyawa prekursor flavor.

Keberhasilan fermentasi biji kakao tidak lepas dari berlangsungnya suksesi mikrobial yang terlibat dalam fermentasi sedangkan kerja atau aktivitas mikrobial dipengaruhi oleh berbagai hal seperti ketersediaan kecukupan beberapa faktor seperti, suhu, pH, oksigen, jenis dan jumlah substrat sebagai media fermentasi [23], [25], [41], [43]. Pada awal fermentasi (24 jam fermentasi) dengan kondisi lingkungan anaerob atau keberadaan oksigen terbatas adalah merupakan kondisi ideal bagi pertumbuhan yeast hingga fermentasi berlangsung selama 36 jam. Pasca 36 jam fermentasi maka gula sebagai media fermentasi makin berkurang dan aerasi lingkungan fermentasi menjadi lebih baik dan diikuti oleh pertumbuhan bakteri asam laktat. Pertumbuhan bakteri asam laktat mulai turun setelah fermentasi berlangsung 96 jam. Setelah 96 jam fermentasi maka kondisi lingkungan fermentasi memiliki ketersediaan oksigen yang lebih besar, dengan demikian kondisi tersebut sangat cocok untuk pertumbuhan dan perkembangan bakteri asam asetat.

Fermentasi biji kakao diawali oleh peran yeast yang mengubah gula pulp menjadi alkohol, yang diiringi oleh kenaikan suhu media fermentasi selanjutnya peran yeast dilanjutkan oleh peran bakteri asam laktat yang karena perubahan kondisi lingkungan yang cocok bagi aktivitas bakteri. Peran bakteri pada tahap fermentasi ini adalah mengubah alkohol menjadi asam asetat. Pada akhir tahap fermentasi biji kakao berlangsung peristiwa fisik yaitu berlangsungnya difusi asam asetat ke dalam biji kakao yang menjadikan biji kakao pada keadaan mati (tidak bisa tumbuh saat biji kakao dikecambahkan). Populasi mikrobial selama fermentasi biji kakao terlihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Populasi mikrobial dan suksesi mikrobial selama fermentasi biji kakao. Yeast (—), bakteri asam laktat (---), bakteri asam asetat (- - -), , bakteri pembusuk (· · ·), jamur (-·-·), angka menunjukkan konsentrasi etanol (1), asam laktat (2), asam asetat (3) pada suhu maksimum (Vuyst. *et al.*, 2010)

Yeast merupakan fungi uniseluler yang melakukan reproduksi secara pertunasan (budding) atau pembelahan (fission). Yeast tidak berklorofil, tidak berflagella, berukuran lebih besar dari bakteri, tidak dapat membentuk miselium, berbentuk bulat telur, batang silendris, seperti buah jeruk dan sosis, kadang - kadang mengalami demorfisme, bersifat saprofit namun beberapa bersifat parasit.

Pertumbuhan yeast dipengaruhi oleh suhu, pH, sumber karbon serta air bebas ( $a_w$ ). Suhu optimum pertumbuhan yeast adalah 20 – 28 °C, tetapi dijumpai pula yeast yang mampu tumbuh pada suhu  $\pm 4^\circ\text{C}$ . Nilai pH yang cocok untuk yeast adalah 4,5 – 6,4, namun ada pula yeast yang mampu tumbuh pada pH 2,8 – 3. Peran yeast dominan pada tahap awal fermentasi yang berlangsung selama kurun waktu 24 – 48 jam pertama fermentasi. Pulp biji dengan kandungan gula relatif tinggi dan memiliki keasaman dan pH rendah cocok bagi pertumbuhan yeast. Kondisi tersebut menjadikan pertumbuhan yeast tumbuh dan berkembang secara optimal dengan kecepatan pertumbuhan dari  $10^6$  menjadi  $10^7$  cfu/g biji kakao. Yeast selama 24 jam fermentasi memiliki peran mengubah gula (sukrosa, glukosa dan atau fruktosa) menjadi etanol dan  $\text{CO}_2$  [45]–[48].

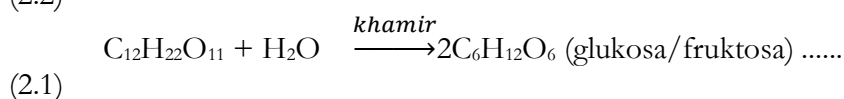
Yeast yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara penghasil kakao kering disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Yeast yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara

Brazil*)	Ghana*)	Malaysia*)	Belgia*)	Indonesia **)
<i>Candida bombi</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>K. javanica</i>
<i>C. Pelliculosa</i>	<i>Hansenula spp</i>	<i>Debaryomyces spp</i>	<i>C. boidinii</i>	<i>K. africana</i>
<i>C. rugospelliculosa</i>	<i>Kloeckera spp</i>	<i>Hanseniaspora</i>	<i>C. cacaoi</i>	<i>K. apis</i>
<i>K. apiculata</i>	<i>Pichia spp</i>	<i>spp</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>K. marsiamus</i>	<i>Saccharomyces spp</i>	<i>Kloeckera spp</i>	<i>C. intermedia</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>K. thermotolerans</i>	<i>Saccharomycopsis spp</i>	<i>Rhodotorula spp</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. pelliculosa</i>
<i>S. cerevisiae var.</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Saccharomyces spp</i>	<i>K. apis</i>	<i>C. humicola</i>
<i>Chevalieri</i>	<i>spp</i>	<i>Torulopsis spp</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Torulopsis spp</i>		<i>S. chevalieri</i>	<i>R. glutinis</i>
<i>Torulopsis</i>				
<i>pretoriensis</i>				

Sumber :\*) [28], [46]

Kondisi fermentasi sebagaimana diuraikan diatas merupakan kondisi yang sangat cocok bagi pertumbuhan yeast. Peran utama yeast adalah memecah gula menjadi alkohol, dan reaksi pemecahan gula menjadi alkohol dapat dilihat pada persamaan reaksi (2.1) dan (2.2)



Beberapa yeast seperti *Candida spp* menggunakan asam sitrat untuk keperluan metabolismenya dan menjadikan pH pulp naik, sehingga kondisi demikian cocok untuk pertumbuhan bakteri selanjutnya (pasca pertumbuhan yeast) [49]–[51]. Aktivitas yeast selama fermentasi biji kakao menghasilkan enzim pektinolitik yang berperan dalam mendergradasi pektin testa. Kerusakan struktur testa memudahkan asam asetat mengalami difusi kedalam massa biji dan akibatnya adalah kematian biji (biji tidak mampu berkecambah) [15], [46], [50], [52].

Yeast umumnya mampu melakukan fermentasi dengan substrat bermacam–macam gula, misalnya sukrosa, fruktosa, galaktosa, maltosa dan maltotriosa. Yeast memotori proses fermentasi alkohol yang menghasilkan CO<sub>2</sub> dan panas. Selain itu fermentasi biji kakao oleh yeast disertai perusakan dan melepaskan pulp biji kakao. Yeast spesifik yang sering ditemukan selama fermentasi biji kakao adalah *S. cerevisiae*, *Elipsoideus*, *Saccharomyces sp.*, *Torulopsis sp.*, *Koeckera spiculata*, dan *Hansenula anomal* [28], [49]. Yeast ternyata mampu menghasilkan senyawa pembentuk aroma seperti alkohol, asam lemak dan asam lemak ester serta beberapa senyawa pembentuk aroma yang lain [19],

[23], [53]. *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. cereveciseae var chevalieri* menghasilkan senyawa volatil seperti isopropil asetat, etil asetat, methanol, 1-propanol, isoamil alkohol, 2,3, butanediol, diethyl suksinat, dan 2-pheniletanol [45], [46], [54].

Gula adalah sumber utama karbon dan energi bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Polisakarida, seperti karbohidrat sebelumnya harus dihidrolisis terlebih dahulu oleh  $\alpha$ -amilase menjadi dekstrin dan selanjutnya dihidrolisis lanjut oleh aktivitas enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh bakteri asam laktat menjadi maltosa. Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri gram positif, biasanya non -metil, tidak membentuk spora, katalase negatif, aerob fakultatif, metabolisme fermentatif bentuk bulat, batang bulat, atau batang dan menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utama dari hasil degradasi karbohidrat [20], [22], [44], [54]. Bakteri asam laktat memiliki 2 tipe fermentasi yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Kelompok bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif memproduksi asam laktat sebagai metabolit utama, sedangkan beberapa yang lain tergolong heterofermentatif yaitu selain memproduksi asam laktat, juga menghasilkan asam asetat, gas CO<sub>2</sub> dan etanol sebagai metabolit sampingan.

Bakteri asam laktat sebagai salah satu mikrobia yang berperan penting dalam fermentasi biji kakao terdiri atas 10 genus, yaitu; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* dan *Carnobacterium* (Nanik, 2014). Spesies bakteri asam laktat yang sering ditemukan dalam fermentasi biji kakao adalah *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. cellobiosus* dan *Lactococcus (Streptococcus) lactis*. *L. plantarum* dan *L. cellobiosus* merupakan spesies bakteri asam laktat yang banyak ditemukan di Indonesia selama proses fermentasi biji kakao [46], [49], [55], [56]. Bakteri asam laktat yang telah berhasil diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara tersaji pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari fermentasi biji

kakao di 5 negara

Brazil*)	Ghana*)	Malaysia*)	Beligia*)	Indonesia**)
<i>L. fermentum</i> ,	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. cellobiosus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. lactis</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. lactis</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. mesenteroides</i>		<i>L. cellobiosus</i>		

Sumber :\*) [46], [49]

*Lactobacillus sp* pada umumnya adalah bakteri mesofilik akan tetapi beberapa spesies merupakan psikotropik, thermodurik atau thermofilik. Beberapa spesies sangat toleran terhadap garam, tekanan osmotik dan  $a_w$  rendah dan toleran pula terhadap kondisi asam atau pH rendah. *Lactobacillus* berdasarkan tipe fermentasinya dapat dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok obligat homofermentatif yang mampu memfermentasi heksosa menjadi asam laktat melalui jalur EMP (*Embden-Mayerhoff-Parnas Pathway*).

Kelompok ini menghasilkan enzim 1,6-difosfat aldose namun tidak menghasilkan fosfoketolase, sehingga tidak dapat memfermentasi glukonat ataupun pentosa. Kelompok bakteri asam laktat heterofermentatif fakultatif yang menggunakan jalur EMP sebagai jalur utama metabolisme, namun dapat menghasilkan enzim aldose dan fosfoketolase sehingga mampu memfermentasi heksosa dan pentosa. Kelompok obligat heterofermentatif tidak menghasilkan enzim aldolase, tapi menghasilkan enzim fosfoketolase, sehingga metabolisme heksosa dilakukan melalui jalur fosfoglukonat dan menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol dan  $CO_2$  [42], [57]. Bakteri asam laktat mampu bertahan tumbuh selama 36 jam setelah puncak produksi etanol dicapai dan pada saat tersebut populasi yeast turun secara drastis. Puncak produksi asam laktat setelah fermentasi biji kakao berlangsung selama 48 jam [42], [57].

Bakteri asam laktat sejak awal fermentasi hingga tahap ini tumbuh secara optimal kecepatan tumbuh bakteri asam laktat pada tahap fermentasi selama 24 – 72 jam mulai  $10^7$  menjadi  $10^9$  cfu/g. Peran utama bakteri asam laktat adalah mengubah gula (khususnya glukosa dan fruktosa) menjadi asam organik seperti asam sitrat, asam malat, asam laktat dan asam asetat [20], [46], [58]. Pada fermentasi biji kakao tahap ini (24 -72 jam fermentasi) maka bakteri asam laktat mengubah gula menjadi asam laktat dan asam asetat, melalui jalur *heksa monophospat* sedangkan bakteri asam asetat mengubah etanol menjadi asam asetat melalui jalur *Embden-Meyerhof* [28], [46], [49], [59]. Bakteri asam asetat memberikan kontribusi terhadap kenaikan pH media fermentasi karena makin banyaknya asam asetat dihasilkan.

Pada kondisi aerasi substrat atau media fermentasi yang semakin baik dan kenaikan produksi alkohol serta makin berkurangnya kadar gula *pulp* maka populasi bakteri asam laktat turun secara nyata. Berkurangnya populasi bakteri asam laktat diikuti oleh tumbuh dan berkembangnya bakteri asam asetat. Pada tahap fermentasi ini (24 –

112 jam fermentasi) kondisi lingkungan fermentasi menjadi aerobik yaitu kondisi fermentasi dengan oksigen yang membaik. Setelah massa *pulp* mulai hilang dan suhu fermentasi mencapai  $\pm 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  sehingga bakteri termotoleran yang mampu tumbuh dan berkembang yaitu bakteri asam asetat dengan kecepatan pertumbuhan dari  $10^4$  menjadi  $10^8$  cfu/g [45], [46], [60]. Peran utama bakteri asam asetat adalah mengoksidasi etanol menjadi asam asetat,  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$  [39], [44], [46]. Pengaruh eksotermis bakteri asam asetat adalah kenaikan suhu fermentasi mencapai  $\pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pengaruh suhu dan terdifusinya senyawa asam organik yang terbentuk selama fermentasi menyebabkan kematian biji kakao dan pada waktu yang bersamaan terjadi hidrolisis protein biji kakao sebagai tanda awal peran enzim endogenous dalam pembentukan senyawa prekursor flavor [23], [41], [45], [53]. Hasil fermentasi pulp secara perlahan masuk kedalam massa biji, dan menjadikan biji kakao gembung (*swealing*) dan terjadi stimulasi reaksi enzim atas pembentukan senyawa prekursor flavor, dan flavor spesifik akan muncul saat kakao nib disangrai. Fermentasi biji kakao adalah untuk membentuk senyawa prekursor cita rasa khas kakao serta mengurangi cita rasa pahit (*biiter taste*). beberapa aspek penting untuk kesempurnaan fermentasi biji kakao antara lain adalah bobot biji kakao (volume biji) yang difermentasi, pengadukan dan lama fermentasi.

Mengingat selama fermentasi telah terjadi kerusakan pelepasan *pulp* dari bagian kulit biji, juga kematian biji yang berdampak pembentukan senyawa flavor dan aroma yang muncul pasca sangrai kakao nib kering. [51], menyatakan bahwa penggunaan campuran inokulum mikrobial murni dapat mempercepat fermentasi dan secara tidak langsung mempercepat kematian biji. Penggunaan yeast (ragi) sebanyak 0,5 g/kg biji kakao segar, maka waktu fermentasi dapat dipercepat dari 108 jam menjadi 84 jam [38].

[38] menyatakan bahwa faktor penting yang berpengaruh pada fermentasi biji kakao adalah rasio antara *pulp* dan biji. Perbandingan antara kadar *pulp* terhadap biji kakao dapat menyebabkan perbedaan perbandingan jumlah substrat terhadap biji kakao. Perbandingan ini secara langsung berpengaruh terhadap kondisi aerasi, jumlah asam laktat dan asam asetat yang dihasilkan selama fermentasi biji kakao.

Bakteri asam asetat termasuk ordo *Acetobacteraceae*, dan genus penghasil asam asetat, dan terdiri atas *Acetobacter*, *Acidomonas* dan *Gluconobacter*. *Acetobacter* bersifat motil ataupun non-motil, obligat aerob, katalase positif, oksidase negatif, tidak membentuk indole atau tidak menghasilkan  $\text{H}_2\text{S}$  [42].

Setelah fermentasi biji kakao selama 72 jam maka populasi bakteri asam laktat turun dan disusul oleh kenaikan populasi bakteri asam asetat yang diiringi oleh kondisi aerasi lebih baik setelah pulp biji kakao mengalami degradasi selama fermentasi yaitu pembentukan etanol. Selanjutnya etanol yang terbentuk dioksidasi yang diikuti oleh turunnya suhu secara drastis pada tumpukan biji kakao. Sedangkan asam asetat yang terbentuk selama fermentasi biji kakao berperan dalam kematian biji kakao [42].

*Acetobacter* mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat atau asam laktat dan jika dioksidasi lebih lanjut dihasilkan CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O. Suhu optimum untuk aktivitas bakteri asam asetat adalah 25 – 30° C. Terdapat 7 spesies dari genus *Acetobacter* yaitu *A. aceti*, *A. diazotrophicus*, *A. hansenii*, *A. liquefaciens*, *A. methanolicus*, *A. pasteurianus* dan *A. xylinum* [42], [62]. Beberapa spesies bakteri asam asetat yang berhasil diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara tersaji pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. Bakteri asam asetat yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara

Brazil*)	Ghana*)	Malaysia*)	Belgia*)	Indonesia**)
<i>A. peroxydans</i>	<i>A. rancens</i>	<i>A. ancens</i>	<i>Acetobacter</i> spp	<i>A. pasteurianus</i>
<i>Gluconobacter</i>	<i>A. xylinum</i>	<i>A. xylinum</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>A. aceti</i>
<i>oxydans</i> subsp.	<i>A. ascendens</i>	<i>A. lovaniensis</i>		
<i>Suboxydans</i> spp	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>		
<i>A. pasteurianus</i>				

Sumber : \*) [46], \*\*[49].

*A. aceti* mampu membentuk dihidroksi aseton dari gliserol, sedangkan asam 5-ketoglukonat dapat disintesa dari D-glukosa. Etanol dan natrium asetat merupakan sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri asam asetat. Namun demikian sebagian *A. aceti* tidak membentuk asam dari metanol ataupun dulsitol. Pada kadar etanol ±10% dalam media fermentasinya maka *A. aceti* tidak dapat tumbuh sama sekali. Populasi bakteri asam asetat meningkat sampai 80-90% dari total mikrobia setelah fermentasi berlangsung selama 2 hari (±48 jam). Keberadaan bakteri asam asetat tersebut maupun mengubah alkohol menjadi asam asetat dan air yang diikuti oleh kenaikan suhu biji kakao sampai 45 - 50°C.

## 5. Degradasi komponen penyusun dalam biji

Tahap degradasi protein ditandai oleh kerusakan jaringan testa oleh kerja enzim pektinase, yang diikuti oleh difusi asam asetat kedalam massa biji kakao yang menyebabkan kematian biji, sebagaimana yang diharapkan pada akhir fermentasi biji kakao. Perubahan komponen dalam biji kakao dimulai pada fase *anaerob hydrolytic*, pada awal fermentasi (24 jam fermentasi) serapan air oleh keping biji melalui testa (kulit biji) setelah fase kematian biji diikuti oleh hidrolisis protein oleh enzim endogenous protease dan sukrosa dihidrolisis oleh enzim invertase, dan antosianin dihidrolisis oleh enzim glikosidase [42], [43].

Enzim endogenous mulai aktif dengan keberadaan senyawa gula dan protein yang selanjutnya dihasilkan senyawa prekursor flavor khas kakao. Fase fermentasi *anaerobic* berlangsung pembentukan senyawa pigmen oleh *glycosidase* dan dihasilkan senyawa *cyanidin*, dan berlangsung pada hidrolisis gula. Enzim invertase mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Enzim proteinase mendegradasi protein menjadi peptida dan asam amino sedangkan senyawa polifenol diubah menjadi senyawa quinon oleh enzim endogenous polifenol oksidase [25].

Fase fermentasi *aerobic* maka cyanidin, protein dan senyawa kompleks teroksidasi membentuk warna coklat keping biji. Quinon sebagai hasil degradasi senyawa polifenol bereaksi dengan hidrogen pada gugus asam amino dan amina, dan membentuk ikatan dengan sulfur sehingga rasa sepat (*astringency*) dan rasa pahit (*bitterness*) biji kakao berkurang pasca penyangraian kakao nib kering. Pada fase fermentasi *aerobic* maka penetrasi oksigen kedalam massa biji melalui testa adalah untuk mengoksidasi protein dan senyawa polifenol kompleks yang berlangsung setelah 4 hari fermentasi [25]. Reaksi enzimatik yang relatif singkat terjadi karena kondisi pH kurang optimal (pH biji turun), suhu naik selama fermentasi berlangsung.

Beberapa enzim seperti amino peptidase, invertase, dan polifenol oksidase sangat tidak aktif atau enzim karboksipeptidase kurang aktif selama fermentasi, kecuali untuk enzim aspartat endoprotease dan glikosidase yang selalu aktif selama fermentasi berlangsung [63], [64]. Peran enzim glukosidase adalah menghidrolisis glukosida menjadi gula dan sianin. Enzim invertase mengubah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, enzim protease mengubah protein menjadi peptida dan asam amino. Enzim polifenol oksidase mengubah senyawa polifenol dan epikatekin menjadi o-kuinon dan o-dikuinon yang berlangsung pada pH dan



suhu yang sesuai dengan kondisi optimum masing-masing enzim [46], [65], [66].

## 6. Rehidrasi Biji Kakao Produk Petani

Biji kakao kering hasil produksi petani yang direhidrasi mudah ditumbuhi jamur saat difermentasi. *Pulp* yang telah kehilangan soliditasnya berakibat kondisi anaerob tidak terjadi, sehingga kondisi ini sangat cocok untuk tumbuh dan berkembangnya jamur. Untuk meminimalkan kontaminasi jamur maka dilakukan pengeringan biji kakao segar menggunakan pengering kabinet.

Biji kakao kering telah banyak kehilangan air pasca pengeringan. Ketersediaan air dalam *pulp* dan massa biji kakao memiliki peran sebagai pengendali saat fermentasi biji kakao berlangsung. Jumlah air didalam *pulp* dapat dikembalikan melalui proses rehidrasi. Rehidrasi biji kakao kering didasarkan pada kadar air yang memungkinkan untuk dilakukan fermentasi. Menurut [46], [62], dan [67] bahwa biji kakao segar memiliki sumber substrat yang memadai berupa *pulp* segar. *Pulp* biji kakao segar mengandung gula dan asam sitrat yang cukup dan cocok untuk media pertumbuhan mikrobial dalam melakukan fermentasi.

Keberhasilan fermentasi biji kakao membutuhkan suksesi mikrobial atau aktivitas mikrobial yang optimum sesuai dengan kondisi lingkungan yang dibutuhkan untuk kegiatan metabolisme yang didukung oleh ketersediaan komponen *pulp* kakao sebagai substrat [49]. Komposisi substrat pada *pulp* terdiri atas 82-87% air, 10-15% gula, 1-3% asam sitrat dan 1-15% pektin dengan pH 3,4 – 4. [68] menyatakan bahwa *pulp* biji kakao kering memiliki komposisi substrat sebagai berikut, air  $\pm 15\%$ , gula  $\pm 15\%$ , asam  $\pm 1\%$  sitrat dan pH  $\pm 3,4$  sehingga perlu ditambahkan berbagai komponen seperti air biji kakao kering tersebut sebelum difermentasi. Pada penelitian pendahuluan biji kakao kering setelah direndam dalam air selama  $\pm 1$  jam memiliki komposisi 78-80% air, 9-12% gula, 1-2% asam sitrat dan pH 4. Dengan demikian agar biji kakao kering dapat difermentasi dengan baik tanpa penambahan komponen lain kecuali air.

## 7. Senyawa Pembentuk Aroma

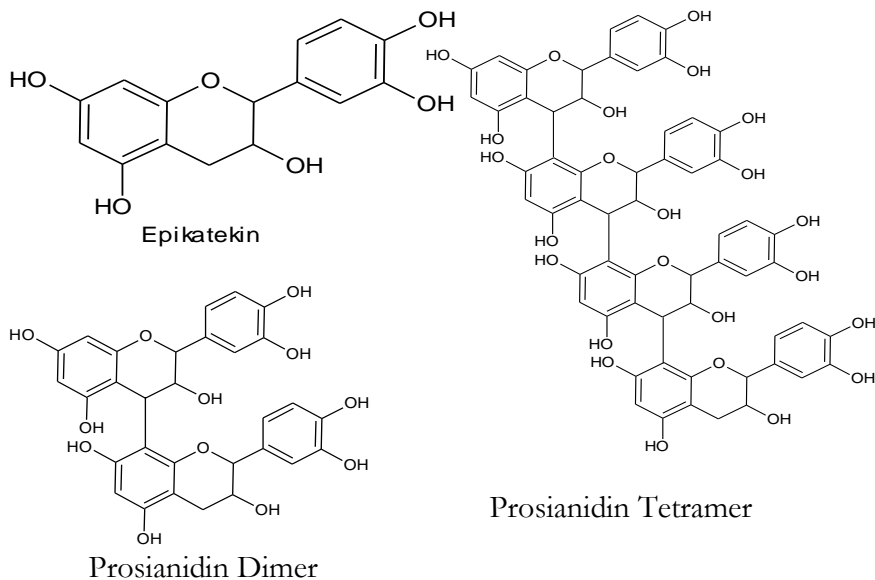
### a. Polifenol

Senyawa prekursor pembentuk flavor khas kakao dapat dihasilkan selama fermentasi berlangsung dan muncul pasca

pengeringan biji dan berlanjut pasca penyangraian kakao nib kering [69], [70]. Warna coklat pada biji kakao kering dapat terbentuk akibat senyawa polifenol biji kakao kering dapat mengalami oksidasi oleh enzim endogenous *polifenol oksidase*. Hal ini juga membentuk senyawa prekursor flavor dan diikuti oleh hilangnya integritas membran sel biji kakao.

Senyawa polifenol merupakan senyawa pembentuk rasa sepat (*astringent*) produk coklat yang dijumpai pada keping biji coklat sampai 10 – 20% (bk). Selama pengeringan biji kakao hasil fermentasi akan terjadi reaksi pencoklatan non enzimatis dan enzimatis oleh reaksi oksidasi enzimatis dari senyawa fenol [71]. Kerusakan senyawa antosianin terjadi selama pengeringan biji kakao hasil fermentasi berlangsung. Oksidasi senyawa antosianin yang terjadi berkaitan erat dengan keberadaan oksigen selama pengeringan dan epikatekin sebagai senyawa pembentuk warna bereaksi dengan enzim *polifenol oksidase*. Reaksi oksidasi enzimatis tersebut menghasilkan perubahan warna cairan sel dan membentuk padatan berwarna coklat pada bagian dalam massa biji kakao. Pencoklatan biji kakao dapat berlangsung melalui 2 tahap reaksi yaitu pembentukan senyawa kuinon oleh oksidasi polifenol dengan bantuan enzim polifenol oksidase, dan selanjutnya senyawa kuinon mengalami polimerisasi dan kondensasi membentuk senyawa berwarna coklat dengan bobot molekul besar dan sukar larut dalam air [71].

Selama fermentasi maka rasa sepat biji kakao makin berkurang dan diikuti oleh perubahan warna dari ungu menjadi coklat sebagai akibat berkurangnya senyawa polifenol hasil oksidasi dan polimerisasi. Kakao kaya akan polifenol khususnya di-katekin (flavan-3-ols) dan procyanidins. Polifenol dalam biji kakao disimpan dalam pigmen Sel-sel dari kotiledon dan daun kakao [25], [30], [72]. Epikathekin dan prosianidin membentuk trimer yang bersifat larut dan merupakan senyawa pembentuk rasa sepat pada biji kakao kering. Epikathekin terpolimerisasi karena adanya oksigen seperti terlihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur molekul polifenol dalam biji kakao [41]

Epikatekin adalah monomer sedangkan proisianidin adalah dimer yang terdiri atas 2 molekul epikatekin dan proisianidin tetramer terbentuk dari empat epikatekin. Selain proisianidin maka senyawa asam amino N-phenilpropenoil memberikan kontribusi rasa sepat pada biji kakao tanpa fermentasi. Polifenol merupakan senyawa yang secara alami terdapat dalam kakao, juga mempunyai kontribusi besar terhadap rasa sepat serta pahit. Polifenol dalam biji menyumbang 12-18% berat kering keseluruhan biji. Polifenol dan alkaloid, dalam biji terdapat sekitar 14 - 20 % dari berat biji, sangat penting dalam mempengaruhi kualitas biji kakao [47], [73], [74]. Selama fermentasi berlangsung difusi asam asetat kedalam vakuola sel biji kakao, dan difusi asam asetat kedalam keping biji berpotensi merusak struktur sel. Dengan demikian dapat berlangsung kontak antara polifenol sebagai substrat dengan enzim polifenol sebagai katalis oksidasi memfasilitasi reaksi oksidasi senyawa polifenol berlangsung cepat. Oksidasi senyawa polifenol biji kakao akan dihasilkan warna khas cokelat dan dihilangkan rasa sepat dan pahit pada produk olahan kakao [75]–[77]. Fermentasi biji kakao memicu hidrolisis polifenol dan degradasi asam amino menjadi asam amino bebas sebagai senyawa prekursor aroma biji kakao [75]–[78].

b. Asam Amino

Protein biji kakao tersebut dipecah dalam 2 tahap yaitu, pertama diawal fermentasi saat pH dibawah 4 oleh senyawa *protease* menjadi peptida hidropobik. Kedua selama fermentasi berlangsung hingga pH mencapai diatas 5, dan peptida diubah menjadi asam amino bebas dapat dimanfaatkan oleh enzim karboksi peptidase [13], [60], [79]. Selama fermentasi biji kakao, protein dihidrolisis secara enzimatik menghasilkan 1 – 2% (bk) asam amino bebas [13], [60], [79]. Fermentasi biji kakao dapat meningkatkan kadar peptida-N dan gula reduksi sebesar berturut – turut 55 dan 100%. Sebaliknya sukrosa dan gula total jumlahnya turun berturut – turut sebesar 89 dan 75% [80], [81]. Fermentasi biji kakao dapat menurunkan kadar asam amino bebas hidropobik dan asam amino bebas lainnya. Alanin, valin, leusin, phenilalanin, tyrosin, dan isoleusin merupakan asam amino bebas hidropobik yang dihasilkan selama fermentasi biji kakao. Komposisi asam amino bebas biji kakao tiap daerah memiliki rasio jumlah yang berbeda. Asam amino bebas hidropobik merupakan prekursor pembentukan aroma kakao. Asam amino bebas hidropobik akan bereaksi dengan gula reduksi menghasilkan senyawa amadori dan reaksi Strecker [80], [81]. Beberapa contoh senyawa volatile dari asam amino bebas tersaji pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Asam amino bebas hidropobik (*Alanin, Valin, Leusin, Isoleusin, Phenil alanin*) sebagai prekursor pembentuk senyawa volatile aldehid, asam, alkohol, ester.

Asam Amino	Aldehid	Asam	Alkohol	Ester
<i>Alanin</i>	Asetaldehid	Asam asetat	Etanol	Etil asetat
<i>Valin</i>	2-Metil propanal	2-Metil asam propionat	2-Metil-1-propanol	2-Metil propil asetat, Etil 2-metilpropionat
<i>Leusin</i>	3-Metil butanal	3-Metil asam butanoik	3-Metil-1-butanol	3 Metilbutil asetat, Etil 3-metil butanoat
<i>Isoleusin</i>	2-Metil-butanal	2-Metil asam butanoik	2-Metil-1-butanol	2-Metilbutil asetat, Etil 2-metil butanoat
<i>Phenil alanin</i>	Phenilasetaldehid, benzaldehid, asetophenon	Asam phenilasetat, asam benzoik	2-Pheniletanol, 1-pheniletanol, benzil alkohol	Pheniletil asetat, benzil asetat, etil benzoat

Sumber : [10]

Senyawa alanin yang bereaksi dengan gula reduksi selama penyangraian biji kakao menghasilkan senyawa aldehid (asetaldehid), senyawa asam (asam asetat), senyawa alkohol (etanol)

dan senyawa ester (etil asetat) yang keseluruhannya merupakan senyawa volatil. [80], [81] menyatakan bahwa selama fermentasi biji kakao, proteolisis dikatalis oleh enzim aspartat endoprotease dan enzim karboksipetidase menjadikan asam amino dan oligopeptida naik.

Aspartat endoprotease memiliki peran memecah protein pada residu asam amino hidropobik untuk menghasilkan oligopeptida dengan residu asam amino hidropobik [80], [81]. Rohsius *et al.* (2006) menjelaskan bahwa asam amino bebas dari 108 jenis biji kakao komersial yang berasal dari berbagai negara berkisar antara 5-25 mg/g biji kakao kering [42], [80], [81]. Asam amino bebas hidropobik seperti *alanin*, *valin*, *leusin*, *isoleusin*, *phenilalanin* dan peptida hidropobik lainnya merupakan senyawa prekursor penting yang membentuk aroma coklat. *Proteolysis* didalam biji mulai aktif setelah 24 jam fermentasi atau setelah terdifusinya asam asetat kedalam biji, terutama membentuk asam amino hidropobik bebas [42], [80], [81].

### c. Gula

Biji kakao segar mengandung pati 5 – 9 % dan gula bebas 2 – 4%, saat fermentasi berlangsung maka sukrosa dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa [46], [82], [83]. Sukrosa adalah merupakan komponen utama penyusun pulp biji kakao yang pada awal fermentasi biji kakao mengalami pemecahan menjadi fruktosa dan glukosa. [46], [82], [83] menyatakan bahwa perendaman nib kakao dapat meningkatkan nilai pH, makin naik pH menjadi senyawa gula yang terbuka cicinnya dan dalam bentuk reduksi. Makin tinggi pH, maka laju reaksi gula dengan senyawa lain seperti protein makin tinggi, sehingga gugus aktif gula menjadi terbuka. Dalam kondisi demikian gula pentose lebih cepat terbuka dari pada heksosa. Glukosa sangat mudah bereaksi dengan senyawa lain saat pemanasan, karena dengan panas maka atom H sangat mudah terlepas, gugus asam amino mudah bereaksi dengan glukosa. Glukosa merupakan sumber komponen karbonil bagi pirazin. Pembentukan pirazin lebih besar pada sistem dengan glukosa, jika dibandingkan dengan fruktosa. [84] menyatakan bahwa Glukosa sangat reaktif dibandingkan fruktosa. Gula reduksi yang bereaksi dengan senyawa asam amino bebas hidropobik menghasilkan senyawa aldehid, senyawa asam, senyawa alkohol dan senyawa ester.

## Daftar Pustaka

- [1] Anonim, “Produksi Perkebunan Besar menurut Jenis Tanaman, Indonesia,” *http://www.bps.go.id*. Diakses tanggal 29/03/014, 2013.
- [2] S. N. Indonesia and B. S. Nasional, “SNI biji kakao,” *Anonim*, 2002.
- [3] E. O. Afoakwa, J. Quao, J. Takrama, A. S. Budu, and F. K. Saalia, “Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 50, no. 6, pp. 1097–105, Dec. 2013, doi: 10.1007/s13197-011-0446-5.
- [4] Y. M. Rahmadewi and P. Darmadji, “Evaluasi Sensoris Coklat Batang dari Biji Kakao Rakyat dengan Kondisi Fermentasi dan Pengeringan yang Berbeda,” *J. Dunia Gizi*, vol. 2, no. 1, pp. 56–62, 2019, doi: 10.33085/jdg.v2i1.4404.
- [5] M. Apriyanto and R. Rujiah, “Penurunan total polifenol, etanol, asam laktat, asam asetat, dan asam amino selama fermentasi biji kakao asalan dengan penambahan inokulum,” *J. Gizi dan Diet. Indones. (Indonesian J. Nutr. Diet.)*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, 2018, doi: 10.21927/ijnd.2017.5(1).1-8.
- [6] Anonim, “Indragiri hilir,” *BPS, INHIL*, 2013.
- [7] H. S. Nur, “Suksesi mikroba dan aspek biokimiawi fermentasi mandai dengan kadar garam rendah,” vol. 13, no. 1, pp. 13–16, 2009.
- [8] M. Apriyanto, “Suksesi Mikrobial Terhadap Penurunan Etanol, Asam Laktat Dan Asam Asetat Selama Fermentasi Biji Kakao,” *J. Teknol. Pertan.*, vol. 7, no. 2, pp. 30–39, 2018.
- [9] E. Ofosu-ansah, A. S. Budu, H. Mensah-brown, J. F. Takrama, and E. Ohene, “Changes in Nib Acidity, Proteolysis and Sugar Concentrations as Influenced by Pod Storage and Roasting Conditions of Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans,” *J. Food Sci. Eng.*, vol. 3, pp. 635–647, 2013.
- [10] R. F. Schwan and A. E. Wheals, “The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 4, pp. 205–21, Jan. 2004, doi: 10.1080/10408690490464104.
- [11] B. Kulczyński, A. Gramza-Michałowska, and J. B. Królczyk, “Optimization of extraction conditions for the antioxidant potential of different pumpkin varieties (*Cucurbita Maxima*),” *Sustain.*, vol. 12, no. 4, pp. 1–30, 2020, doi:

- 10.3390/su12041305.
- [12] R. Nazaruddin, L. K. Seng, O. Hassan, and M. Said, "Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans ( *Theobroma Cacao* ) during fermentation," vol. 24, pp. 87–94, 2006, doi: 10.1016/j.indcrop.2006.03.013.
  - [13] E. O. Afoakwa, A. S. Budu, H. Mensah-brown, and J. Felix, "Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa ( *Theobroma cacao* ) Beans," *J Nutr. Heal. Food Sci*, 2014.
  - [14] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
  - [15] R. F. Schwan, "Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 4, pp. 1477–1483, 1998.
  - [16] M. Apriyanto and M. C. B. Umanailo, "Decrease Polyphenols , Ethanol , Lactic Acid , and Acetic Acid during Fermentation with Addition of Cocoa Beans Inoculum," *Int. J. Sci. Technol. Res.*, vol. 8, no. 10, pp. 461–465, 2019.
  - [17] A. Aprianita, U. Purwandari, B. and Watson, and T. Vasiljevic, "Physico-chemical properties of flours and starches from selected commercial tubers available in Australia," *Int. Food Res. J.*, vol. 16, no. 4, pp. 507–520, 2009.
  - [18] Beckett S.T., *Industrial Chocolate*. Wiley-Blackwell, 2009.
  - [19] N. Camu, T. De Winter, S. K. Addo, J. S. Takrama, H. Bernaert, and L. De Vuyst, "Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 88, no. 13, pp. 2288–2297, Oct. 2008, doi: 10.1002/jsfa.3349.
  - [20] K. De Bruyne, N. Camu, L. De Vuyst, and P. Vandamme, "Lactobacillus fabifermentans sp. nov. and Lactobacillus cacaonum sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 59, no. Pt 1, pp. 7–12, Jan. 2009, doi: 10.1099/ijs.0.001172-0.
  - [21] T. Lefeber, Z. Papalexandratou, W. Gobert, N. Camu, and L. De Vuyst, "On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof," *Food Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 379–92, Jun. 2012, doi:

- 10.1016/j.fm.2011.12.021.
- [22] N. Camu *et al.*, “Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 1, pp. 86–98, Jan. 2008, doi: 10.1128/AEM.01512-07.
- [23] T. Lefeber, M. Janssens, F. Moens, W. Gobert, and L. De Vuyst, “Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 18, pp. 6694–8, Sep. 2011, doi: 10.1128/AEM.00594-11.
- [24] R. J. Robbins *et al.*, “Method performance and multi-laboratory assessment of a normal phase high pressure liquid chromatography-fluorescence detection method for the quantitation of flavanols and procyanidins in cocoa and chocolate containing samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 24, pp. 4831–40, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.006.
- [25] E. O. Afoakwa, A. Paterson, M. Fowler, and A. Ryan, “Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 48, no. 9, pp. 840–57, Oct. 2008, doi: 10.1080/10408390701719272.
- [26] R. Pätzold and H. Brückner, “Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell,” *Amino Acids*, vol. 31, no. 1, pp. 63–72, Jul. 2006, doi: 10.1007/s00726-006-0330-1.
- [27] A. C. Aprotosoai, S. V. Luca, and A. Miron, “Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, no. 1, pp. 73–91, 2016, doi: 10.1111/1541-4337.12180.
- [28] N. Luh, P. Novi, A. Aryani, N. L. Yulianti, and G. Arda, “Karakteristik Biji Kakao Hasil Fermentasi Kapasitas Kecil dengan Jenis Wadah dan Lama Fermentasi yang Berbeda Characteristics of Cocoa Beans on Small Capacity Fermentation Results Based on Different Types of Containers and Different Fermentation Lengths A,” vol. 6, pp. 17–24, 2018.
- [29] N. Ramli, S. R. Omar, F. Y. Jin, and L. S. Thien, “Physico-Chemical Properties Of Chocolate of *Lactobacillus Plantarum*



- From Fermented Cocoa Beans,” vol. 13, no. 1, pp. 75–81, 2012.
- [30] N. Ramli, O. Hassan, M. Said, W. Samsudin, and N. O. R. A. Idris, “Influence Of Roasting Conditions On Volatile Flavor Of Roasted Malaysian Cocoa Beans,” vol. 30, no. 2006, pp. 280–298, 2005.
- [31] E. O. Afoakwa, A. S. Budu, H. Mensah-brown, and J. Felix, “Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (Theobroma cacao ) Beans,” 2014.
- [32] A. Othman *et al.*, “Epicatechin content and antioxidant capacity of cocoa beans from four different countries,” vol. 9, no. 7, pp. 1052–1059, 2010.
- [33] A. M. M. Jalil and A. Ismail, “Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health?,” *Molecules*, vol. 13, no. 9, pp. 2190–2219, Sep. 2008, doi: 10.3390/molecules13092190.
- [34] E. O. Afoakwa, *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell, 2010.
- [35] S. Jinap, B. Jamilah, and S. Nazamid, “Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting,” *Food Qual. Prefer.*, vol. 15, no. 5, pp. 403–409, Jul. 2004, doi: 10.1016/S0950-3293(03)00097-1.
- [36] Nurhayati and M. Apriyanto, “Sensory evaluation of chocolate bar products materials of dry cocoa seeds in various fermentation treatment,” *Czech J. Food Sci.*, 2021.
- [37] M. Apriyanto, Y. Riono, and Rujiah, “Pengaruh Populasi Mikroba pada Re-fermentasi terhadap Kualitas Biji Kakao Tanpa Fermentasi,” *AGRITEKNO J. Teknol. Pertan.*, vol. 9, no. 2, pp. 64–71, 2020, doi: 10.30598/jagritekno.2020.9.2.64.
- [38] M. Apriyanto and M. C. B. Umanailo, “Decrease polyphenols, ethanol, lactic acid, and acetic acid during fermentation with addition of cocoa beans inoculum,” *Int. J. Sci. Technol. Res.*, vol. 8, no. 10, pp. 461–465, 2019.
- [39] M. Apriyanto, “Changes in chemical properties of dreid cocoa (Theobroma cacao) beans during fermentation,” *Int. J. Fermented Foods*, vol. 5, no. 1, pp. 11–16, 2016.
- [40] N. Nurhayati, F. M. C. S. Setyabudi, D. W. Marseno, and S. Supriyanto, “The Effects of Roasting Time of Unfermented Cocoa Liquor Using the Oil Bath Methods on Physicochemical Properties and Volatile Compound

- Profiles,” *agriTECH*, vol. 39, no. 1, p. 36, 2019, doi: 10.22146/agritech.33103.
- [41] S. T. Beckett, *Industrial Chocolate*. 2009.
- [42] E. O. Afoakwa, “Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans,” *J. Nutr. Heal. Food Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 1–8, 2014, doi: 10.15226/jnhfs.2014.00121.
- [43] E. O. Afoakwa, A. Paterson, M. Fowler, and A. Ryan, “Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry,” *Food Chem.*, vol. 113, no. 1, pp. 208–215, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.088.
- [44] L. de Vuyst., T. Lefeber., Z. Papalexandratou., and N. Camu, *The functional Role of Lactic Acid Bacteria in Book Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applicaton*. Wiley Blackwell, 2010.
- [45] I. M. D. V. Moreira, M. G. D. C. P. Miguel, W. F. Duarte, D. R. Dias, and R. F. Schwan, “Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids,” *Food Res. Int.*, vol. 54, no. 1, pp. 9–17, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.001.
- [46] R. F. Schwan and A. E. Wheals, “The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 4, pp. 205–221, 2004, doi: 10.1080/10408690490464104.
- [47] M. Apriyanto, S. Sutardi, S. Supriyanto, and E. Harmayani, “Cocoa Beans Dry Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* and *Acetobacter aceti*,” *AgriTech*, vol. 37, no. 3, p. 302, 2017, doi: 10.22146/agritech.17113.
- [48] T. F. Djaafar, L. Elghina, S. Widodo, T. Marwati, T. Utami, and E. S. Rahayu, “Study of Good Handling Practices and Critical Control Point Determination of Dried Fermented Cocoa Bean in Gunung Kidul Study of Good Handling Practices and Critical Control Point Determination of Dried Fermented Cocoa Bean in Gunung Kidul Regency , Yogya,” in *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 309*, 2019, pp. 1–10, doi: 10.1088/1755-1315/309/1/012015.
- [49] M. Ardhana and G. Fleet, “The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol.

- 86, no. 1–2, pp. 87–99, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0168-1605(03)00081-3.
- [50] R. F. Schwan and G. H. Fleet, *Cocoa and Coffee Fermentations*. .
- [51] M. E. Kustyawati and S. Setyani, “Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat,” vol. 13, no. 2, pp. 73–84, 2008.
- [52] G. P. Ganda-Putra and N. M. Wartini, “Kakao yang Ditambahkan Ragi Tape untuk Produksi Cuka Makan,” 2008.
- [53] I. Cleenwerck, A. Gonzalez, N. Camu, K. Engelbeen, P. De Vos, and L. De Vuyst, “*Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, no. Pt 9, pp. 2180–5, Sep. 2008, doi: 10.1099/ij.s.0.65778-0.
- [54] T. Lefeber, W. Gobert, G. Vrancken, N. Camu, and L. De Vuyst, “Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels,” *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 3, pp. 457–464, 2011, doi: 10.1016/j.fm.2010.10.010.
- [55] V. T. T. Ho, G. H. Fleet, and J. Zhao, “Unravelling the contribution of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria to cocoa fermentation using inoculated organisms,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 279, pp. 43–56, 2018, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.040.
- [56] V. T. T. Ho, J. Zhao, and G. Fleet, “International Journal of Food Microbiology Yeasts are essential for cocoa bean fermentation,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 174, pp. 72–87, 2014, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014.
- [57] A. S. Afoakwa, Emmanuel Ohene., Kongor, J.E., Takrama, J. Badudu, “Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa ( *Theobroma cacao* ) beans,” *Int. Food Res. J.*, vol. 20, no. 4, pp. 1843–1853, 2013.
- [58] L. De Vuyst and F. Leroy, “Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 44, no. 4, pp. 432–453, 2020, doi: 10.1093/femsre/fuaa014.
- [59] M. Apriyanto, H. Mardesci, and R. Rujiah, “Perubahan Asam Asetat, Total Polifenol dan Warna Biji Kakao Asalan Selama Fermentasi,” *J. Ind. Has. Perkeb.*, vol. 15, no. 1, pp. 10–16, 2020.

- [60] M. Apriyanto, “Studi Mikrobial dan Biokimia Fermentasi Biji Kakao Kering,” *J. Teknol. Pertan.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–5, 2020.
- [61] M. E. Kustyawati and S. Setyani, “Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat,” *J. Teknol. Ind. Has. Pertan.*, vol. 13, no. 2, pp. 73–84, 2012.
- [62] E. O. Afoakwa, J. E. Kongor, J. F. Takrama, and A. S. Budu, “Effects of Pulp Preconditioning on Total Polyphenols, O-diphenols and Anthocyanin Concentrations during Fermentation and Drying of cocoa (theobroma cacao) Beans,” vol. 3, pp. 235–245, 2013.
- [63] T. Hofmann, P. Mu, and P. Schieberle, “Quantitative Model Studies on the Formation of Aroma-Active Aldehydes and Acids by Strecker-Type Reactions,” pp. 434–440, 2000.
- [64] R. W. Van de Water and T. R. R. Pettus, “o-Quinone methides: Intermediates underdeveloped and underutilized in organic synthesis,” *Tetrahedron*, vol. 58, no. 27, pp. 5367–5405, 2002, doi: 10.1016/S0040-4020(02)00496-9.
- [65] R. R. Utami, S. Supriyanto, S. Rahardjo, and R. Armunanto, “Aktivitas Antioksidan Kulit Biji Kakao dari Hasil Penyangraian Biji Kakao Kering pada Derajat Ringan, Sedang dan Berat,” *Agritech*, vol. 37, no. 1, p. 89, 2017, doi: 10.22146/agritech.10454.
- [66] M. Apriyanto, S. Sutardi, S. Supriyanto, and E. Harmayani, “Fermentasi Biji Kakao Kering Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, dan *Acetobacter aceti*,” *agriTECH*, vol. 37, no. 3, pp. 302–311, 2017.
- [67] S. Jinap, P. S. Dimick, and R. Hollender, “Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries,” vol. 6, no. 2, pp. 105–110, 1995.
- [68] O. Viegas, L. F. Amaro, I. M. P. L. V. O. Ferreira, and O. Pinho, “Inhibitory effect of antioxidant-rich marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 6235–6240, 2012, doi: 10.1021/jf302227b.
- [69] D. S. Nielsen, O. D. Teniola, L. Ban-koffi, M. Owusu, T. S. Andersson, and W. H. Holzapfel, “The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods,” vol. 114, pp. 168–186, 2007, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.010.
- [70] M. Owusu, “Influence of raw material and processing on

- aroma in chocolate,” no. October, 2010.
- [71] Supriyanto, Haryadi, B. R. P, and D. W. Marseno, “Perubahan Suhu, Kadar Air, Warna, Kadar Polifenol dan Aktivitas Antioksidatif Kakao Selama Penyangraian dengan Energi Gelombang Mikro,” *Agritech J. Fak. Teknol. Pertan. UGM*, vol. 27, no. 1, pp. 18–26, 2014, doi: 10.22146/agritech.9489.
- [72] H. Osman, R. Nasarudin, and S. L. Lee, “Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential,” *Food Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 41–46, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.foodchem.2003.08.026.
- [73] G. A. Reineccius, D. A. Andersen, T. E. Kavanagh, and P. G. Keeney, “Identification and Quantification of the Free Sugars in Cocoa Beans,” no. 2, pp. 199–202, 1972.
- [74] M. Hinneh *et al.*, “Pod storage with roasting: A tool to diversifying the flavor profiles of dark chocolates produced from ‘bulk’ cocoa beans? (part I: aroma profiling of chocolates),” *Food Res. Int.*, vol. 119, no. November 2018, pp. 84–98, 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.057.
- [75] L. Jespersen, D. S. Nielsen, S. Hønholt, and M. Jakobsen, “Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans,” *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, no. 4–5, pp. 441–53, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.femsyr.2004.11.002.
- [76] S. Lagunes Gálvez, G. Loiseau, J. L. Paredes, M. Barel, and J.-P. Guiraud, “Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 114, no. 1, pp. 124–30, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041.
- [77] M. Crafacck *et al.*, “Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 167, no. 1, pp. 103–16, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024.
- [78] J. Voigt, B. Biehl, and H. Heinrichs, “In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase,” vol. 49, no. 1994, pp. 173–180, 2003.
- [79] D. H. Ouattara, H. G. Ouattara, B. G. Goualie, L. M. Kouame, and S. L. Niamke, “Biochemical and functional properties of lactic acid bacteria isolated from Ivorian cocoa

- fermenting beans,” pp. 6489–6499, 2014.
- [80] T. W. Misnawi, “Potential Uses of Cocoa Bean Infested by *Conopomorpha cramerella* for Polyphenol Extraction,” *ASEAN Food J.*, vol. 15, no. 1, pp. 27–34, 2008.
- [81] Misnawi, “Perubahan Fisiko-Kimia Selama Fermentasi Biji Kakao Cocoa beans are obtained from,” *Rev. Penelit. Kopi dan kakao*, vol. 24, no. 1, pp. 47–64, 2008.
- [82] S. Fitriani, A. Ali, and D. A. N. Widiastuti, “Pengaruh Suhu dan Lama Pengeringan terhadap Mutu Manisan Kering Jahe (*Zingiber Officinale* Rosc) dan Kandungan Antioksidannya,” *SAGU*, vol. 12, no. 2, pp. 1–8, 2013.
- [83] M. Apriyanto, “Analysis of Amino Acids in Cocoa Beans Produced during Fermentation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC),” *Int. J. Food Ferment. Technol.*, vol. 7, no. 1, pp. 25–31, 2017.
- [84] N. Yamabe *et al.*, “Increase in antioxidant and anticancer effects of ginsenoside Re-lysine mixture by Maillard reaction,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 876–883, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.004.

### III. PERUBAHAN SIFAT FISIK DAN KIMIA BIJI KAKAO

#### 1. Komposisi *pulp* biji kakao kering

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar air biji kakao sebelum rehidrasi dan banyak air yang digunakan untuk rehidrasi sangat menentukan kondisi akhir keping biji selama fermentasi. Pada Tabel 3.1 disajikan kadar air *pulp* biji kakao terhidrasi dan kondisi keping biji setelah perlakuan kontrol selama 120 jam.

Tabel 3.1. Perubahan kadar air *pulp* biji kakao kering sebelum dan setelah rehidrasi yang difermentasi selama 120 jam.

Kadar air <i>pulp</i> sebelum rehidrasi (%)	Kadar air <i>pulp</i> setelah rehidrasi(%, bk)			Kondisi keping biji setelah fermentasi (120 hari)		
	(60:100) v/b	(80:100) v/b	(100:100) v/b	(60:100) v/b	(80:100) v/b	(100:100) v/b
10	77,2	82,5	80,6	Berjamur	Hitam busuk	Berjamur
15	78,5	83,5	84,7	Warna coklat	Warna coklat	Busuk, berjamur
20	79,3	85,7	89,5	Warna coklat	Berjamur	Berjamur

Kadar air sebelum rehidrasi 10% pada berbagai perbandingan rehidrasi menghasilkan biji yang berjamur, hitam dan busuk hal ini dapat diduga pada pengeringan hingga mencapai kadar air *pulp* 10% menyebabkan terjadinya penyusutan yang terlalu banyak, sehingga jaringan sel dipermukaan biji menjadi lebih padat dan massif [1], [2].

Pada saat rehidrasi, penetrasi air kedalam keping biji berjalan lambat sehingga air lebih banyak menjadi air bebas di permukaan biji. Pada biji kakao kering berkadar air *pulp* awal sebesar 15% yang direhidrasi dengan perbandingan (60:100) dan (80:100) terjadi perubahan warna keping biji dari slaty menjadi coklat. Hal ini dapat diduga bahwa telah terjadi proses fermentasi. Pada perbandingan rehidrasi (100:100) biji busuk dan berjamur, patut diduga adanya pertumbuhan kontaminan jamur lebih dominan dibandingkan mikrobia pembantu fermentasi [3].

Biji kakao kering berkadar air *pulp* awal 20% direhidrasi dengan perbandingan (60:100) mengalami perubahan warna keping biji dari slaty menjadi coklat. Selanjutnya pada perbandingan (80:100) dan (100:100) setelah difermentasi biji berjamur. Hal ini dapat diduga bahwa kondisi anaerob tidak terjadi sehingga jamur lebih

dominan tumbuh. Berdasarkan hasil di atas, maka biji kakao kering yang digunakan dalam penelitian ini adalah berkadar air *pulp* 15% dan direhidrasi dengan perbandingan (60:100) [3].

Pengukuran komposisi *pulp* biji kakao kering dilakukan untuk didapatkan beberapa informasi awal tentang komposisi *pulp* biji kakao kering antara lain kadar air, gula total, gula reduksi, asam sitrat dan pH sehingga fermentasi dapat berlangsung. Seperti pada fermentasi biji kakao secara spontan komposisi *pulp* merupakan substrat dalam fermentasi biji kakao kering [3], [4].

Penurunan gula total dan gula reduksi karena telah terjadi perombakan gula oleh mikrobial selama pengeringan, tetapi asam organik yang terbentuk menguap selama pengeringan sehingga pH *pulp* biji kakao kering terjadi kenaikan. Penurunan kadar air diduga disebabkan oleh penguapan air karena panas [3], [5], [6]. Perendaman biji kakao dengan aquades pada perbandingan air : berat biji kakao kering (60:100). Setelah perendaman *pulp* biji kakao kering memiliki komposisi berturut-turut sebagai berikut kadar air  $\pm 78,5\%$ , kadar gula total  $\pm 7,5\%$  dan gula reduksi  $\pm 3,8\%$  [3], [5], [6]. Komposisi *pulp* biji kakao segar, komposisi *pulp* biji kakao kering sebelum perendaman dan komposisi *pulp* biji kakao kering setelah perendaman disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Komposisi *pulp* biji kakao segar, biji kakao kering sebelum dan sesudah rehidrasi

Komposisi	<i>Pulp</i> biji kakao segar	<i>Pulp</i> biji kakao kering sebelum rehidrasi	<i>Pulp</i> biji kakao kering setelah rehidrasi
Air (% <sub>w</sub> )	80,5	15,2	78,5
Gula total (% <sub>w</sub> )	10,2	9,3	7,5
Gula reduksi (% <sub>w</sub> )	5,5	4,2	3,8
Asam organik (% <sub>w</sub> )	2,1	1,2	0,95
pH	4,7	4,5	4,3

Setelah perendaman terjadi kenaikan kadar air dapat diduga disebabkan oleh jumlah air yang digunakan cukup membasahi *pulp* biji kakao kering jemur. Kadar gula total mengalami penurunan dari 9,3% menjadi 7,5% patut diduga telah terjadi proses larutnya sebagian gula total. Jika ditinjau dari kadar air, kadar gula total dan kadar gula reduksi *pulp* biji kakao kering yang telah mengalami perendaman layak untuk difermentasi [7]–[9].

Penurunan populasi *S. cerevisiae* karena air dalam *pulp* biji kakao menguap sehingga pertumbuhan *S. cerevisiae* terganggu dan



menyebabkan kematian sel. *L. lactis* mengalami penurunan diduga karena suhu pengeringan menurunkan kadar air bebas sehingga bakteri tidak dapat tumbuh optimal. Pertumbuhan bakteri membutuhkan air bebas yang lebih banyak dibandingkan yeast [7]–[9]. Pada proses pengeringan Aw turun, artinya air bebas yang tersisa tidak mencukupi untuk kebutuhan pertumbuhannya, walaupun pulp menyediakan nutrisi yang diperlukan.

Proses pengeringan menguapkan air dalam *pulp* serta seluruh alkohol hasil perombakan gula oleh *S. cerevisiae* berakibat pada tidak berkembang populasi *A. aceti*. Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* sebesar berturut-turut  $3,5 \times 10^5$  cfu/g,  $4,7 \times 10^6$  cfu/g dan  $4,2 \times 10^4$  cfu/g (cfu= Colony Forming Unit) [7]–[9]. Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang terdapat pada *pulp* biji kakao segar dan *pulp* biji kakao kering tersaji pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada *pulp* biji kakao segar dan *pulp* biji kakao kering

Mikrobia	<i>Pulp</i> biji kakao segar (cfu/g)	<i>Pulp</i> biji kakao kering (cfu/g)
<i>S. cerevisiae</i>	$4,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$
<i>L. lactis</i>	$4,2 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$
<i>A. aceti</i>	$4,6 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$

Hasil penelitian menunjukkan selama pengeringan biji kakao terjadi penurunan komposisi *pulp* biji kakao kering dan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*, untuk dapat berlansungnya proses fermentasi *pulp* biji kakao kering harus memenuhi syarat sebagai substrat. Gula total dan gula reduksi *pulp* biji kakao kering masih memenuhi untuk digunakan sebagai substrat fermentasi.

Kadar air *pulp* biji kakao kering tidak memenuhi agar terjadinya proses enzimatik pada fermentasi biji kakao, sehingga untuk terjadinya sebuah fermentasi dilakukan pengembalian kadar air *pulp* biji kakao kering minimal kadar air *pulp* menjadi 35%. *Pulp* merupakan media untuk fermentasi biji kakao, karena *pulp* memiliki kandungan gula, keasaman serta air yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikrobia selama fermentasi.

Air pada pulp sebagai media untuk substrat pada pulp dan massa biji kakao, sehingga proses hidrolisis dan oksidasi senyawa prekursor cita-rasa, dapat berlangsung dengan baik. Selain komposisi *pulp* biji kakao penelitian ini diperoleh hasil bahwa mikrobia endogenus juga dijumpai pada *pulp* biji kakao kering. Hasil penelitian

tahap ini menunjukkan bahwa pada biji kakao kering telah memiliki populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*, meskipun populasi tersebut belum memadai untuk berlangsungnya fermentasi biji kakao terutama pada awal fermentasi.

## 2. Perubahan Fisik dan Kimia Biji Kakao

Suhu fermentasi merupakan suhu yang terjadi karena adanya aktivitas mikrobia selama fermentasi. Pengukuran suhu fermentasi dilakukan untuk mengetahui fenomena perubahan suhu selama fermentasi dan pencapaian suhu tertinggi, dimana suhu tertinggi merupakan salah satu penyebab kematian biji. Karakteristik produk nib dari ketiga cara fermentasi disajikan pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4. Hasil analisis statistik perubahan suhu fermentasi, indeks fermentasi, warna keping biji, pH biji, kadar gula total dan kadar gula reduksi.

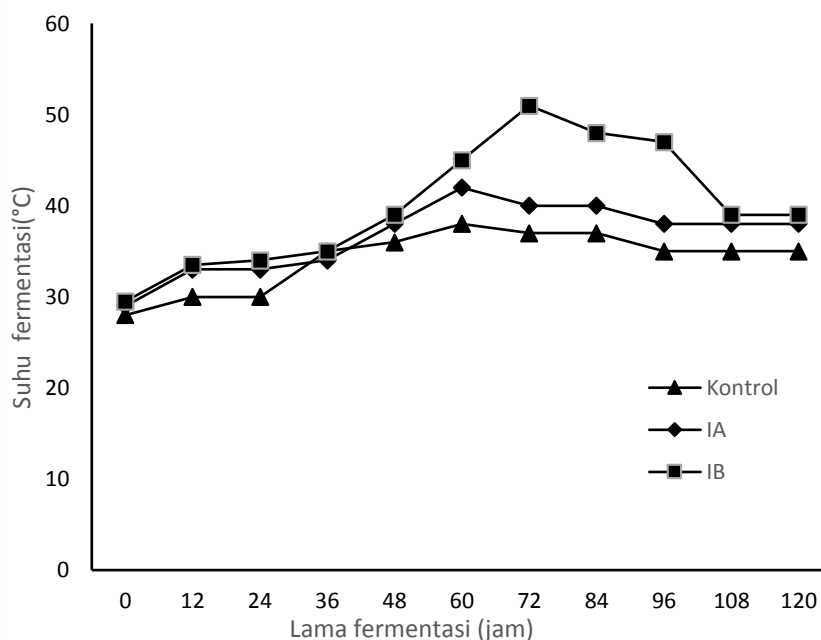
Parameter	Perlakuan		
	kontrol	IA	IB
Suhu fermentasi (°C)	34,6 ± 0,007a	36,6 ± 0,18ab	40,5 ± 0,12b
Indeks fermentasi	0,55 ± 0,07a	0,70 ± 0,07a	0,78 ± 0,08a
Warna keping biji (%):			
Slaty	40,15 ± 0,20b	22,19 ± 0,56a	17,78 ± 0,15a
Ungu kecoklatan	25,49 ± 0,43a	20,25 ± 0,86a	17,70 ± 0,83a
Coklat	34,36 ± 0,15a	57,56 ± 0,80a	64,52 ± 0,39a
Kadar gula total (% bk)	5,07 ± 0,67a	4,60 ± 0,65a	4,70 ± 0,7a
Kadar gula reduksi (% bk)	9,91 ± 0,55a	9,97 ± 0,53a	10,02 ± 0,52a
pH biji	4,45 ± 0,17a	4,28 ± 0,2a	4,20 ± 0,2a

Keterangan : Huruf berbeda dibelakang angka pada baris sama menunjukkan beda nyata  $p \leq 0,05$   
Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis

Suhu awal perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 28, 29 dan 29,5°C. Suhu fermentasi tertinggi untuk perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 38, 42 dan 51°C. Suhu fermentasi di 120 jam untuk perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 35, 38 dan 39°C. Gambar 4.1. menunjukkan bahwa selama fermentasi seluruh perlakuan fermentasi menunjukkan kenaikan suhu. Pengendalian suhu inkubator bertujuan untuk menyesuaikan suhu fermentasi alami, dan selain itu dimaksudkan untuk mendapatkan kondisi suhu optimum pertumbuhan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*.

Perubahan suhu massa biji kakao selama proses dari ketiga cara fermentasi disajikan pada Gambar 3.1. Peningkatan suhu fermentasi

diikuti peningkatan indeks fermentasi. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa variasi teknik fermentasi tidak berpengaruh terhadap indeks fermentasi. Indeks fermentasi rata – rata berturut – turut 0,55, 0,70 dan 0,78 serta antar perlakuan tidak berbeda nyata. Indeks fermentasi perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 0,3, 0,32 dan 0,33. Jika ditinjau dari indeks fermentasi menunjukan bahwa perlakuan kontrol memiliki indeks fermentasi yang terendah sampai 120 jam fermentasi, dapat diduga bahwa rendahnya indeks fermentasi ini disebabkan oleh tidak tercapainya suhu fermentasi tertinggi untuk kematian biji.



Gambar 3.1. Suhu selama fermentasi hasil perlakuan kontrol, IA dan IB selama fermentasi. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C

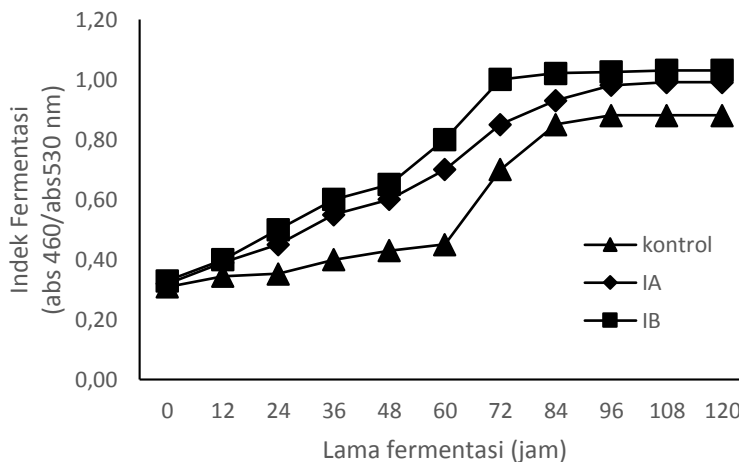
Tidak tercapainya suhu kematian biji menyebabkan kurang efektifnya enzim endogenous sehingga perubahan warna biji slaty menjadi coklat tidak terjadi. Indeks fermentasi 1,02 tercapai pada 84 jam fermentasi pada perlakuan IB hal ini menunjukkan bahwa setelah

suhu fermentasi mencapai suhu kematian biji akan tercapai indeks fermentasi  $\geq 1$ .

Perubahan suhu fermentasi dan indeks fermentasi yang dihasilkan ini sesuai dengan yang diperoleh Widiyanto *et al*, (2013) yang telah mempelajari perbaikan proses fermentasi biji kakao kering dengan penambahan tetes tebu, yeast dan bakteri asam asetat. Pada perlakuan secara bertahap kemungkinan *S. cerevisiae* merombak gula *pulp* lebih banyak sehingga dihasilkan etanol lebih besar serta pada saat yang tepat etanol di ubah menjadi asam asetat oleh *A. aceti* dimana reaksi perombakan etanol menjadi asam asetat juga menghasilkan panas yang menyebabkan suhu fermentasi meningkat.

Penambahan inokulum secara serentak menghasilkan suhu kematian biji tidak dicapai dapat diduga terjadi persaingan antar *S. cerevisiae* dan *L. lactis*. Perubahan indeks fermentasi diikuti oleh perubahan warna keping biji kakao kering. Persentase warna slaty keping biji kakao kering antara perlakuan kontrol dan penambahan inokulum secara serentak menunjukkan berbeda nyata. Rata - rata warna slaty keping biji kakao kering perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 40,15, 22,19 dan 17,78%. Presentase warna slaty keping biji kakao perlakuan kontrol, IA dan IB menunjukkan dari 65% turun berturut – turut menjadi 20,53, 0 dan 0% di 120 jam fermentasi.

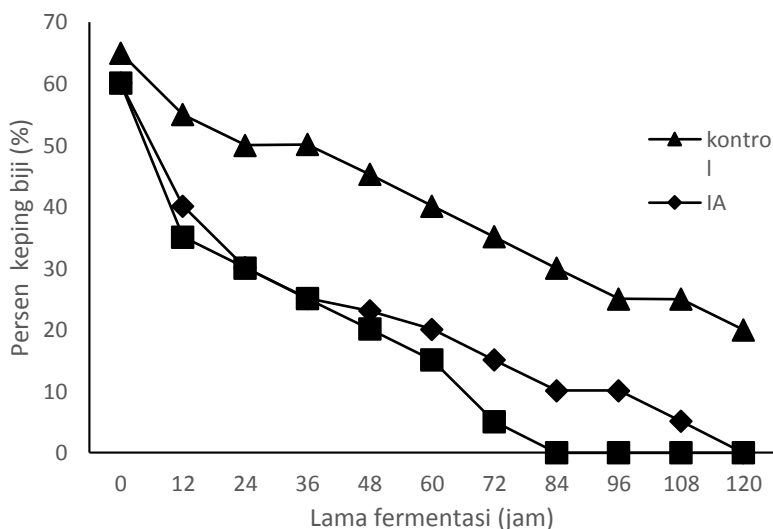
Indeks fermentasi perlakuan kontrol, IA dan IB menunjukkan naik di jam ke 96 fermentasi berturut – turut menjadi 0,88; 0,93 dan 1,03 seperti disajikan Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Perubahan nilai indeks warna biji kakao hasil perlakuan kontrol, IA dan IB selama fermentasi. Awal (0) – 24

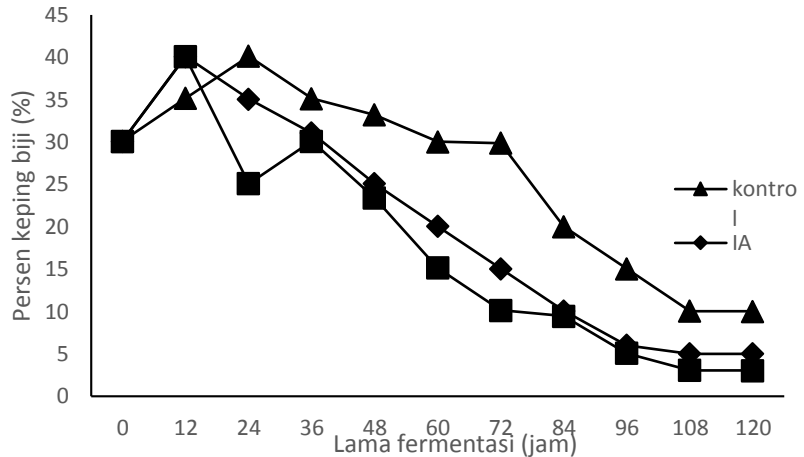
jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Rata – rata warna ungu kecoklatan keping biji kakao perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 25,49, 20,25 dan 17,70%. Presentase warna ungu kecoklatan keping biji kakao kering diawal perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 30,11, 30,13 dan 30,09%. Presentase warna ungu kecoklatan perlakuan kontrol, IA dan IB menunjukkan penurunan berturut – turut yaitu 5,03, 4,98 dan 3,02% di akhir fermentasi. Warna coklat keping biji kakao perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap menunjukkan bahwa tidak berbeda nyata  $p \leq 0,05$ . Rata- rata keping biji berwarna coklat perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap masing – masing yaitu 34,36, 57,56 dan 64,52%. Presentase keping biji berwarna coklat perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap diawal fermentasi berturut – turut yaitu 5,02, 5,02 dan 5,01% menunjukkan peningkatan diakhir fermentasi berturut – turut yaitu 70,01, 95,03 dan 97,01%. Selanjutnya perubahan warna keping biji kakao kering pada perlakuan kontrol, IA dan IB tersaji pada Gambar 3.3, 3.4 dan 3.5.

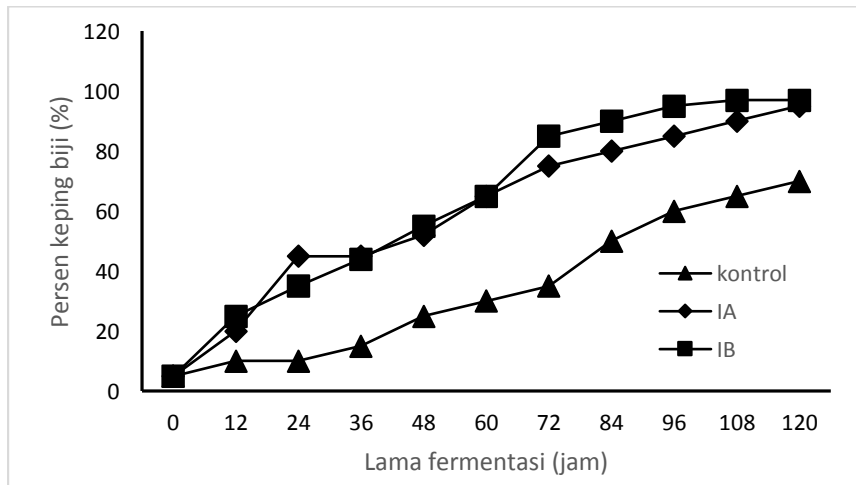


Gambar 3.3. Persentase keping biji kakao berwarna slaty selama fermentasi hasil perlakuan kontrol, IA dan IB. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu

inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.



Gambar 3.4. Persentase keping biji kakao belah berwarna ungu kecoklatan selama fermentasi hasil perlakuan kontrol, IA dan IB. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.



Gambar 3.5. Persentase biji kakao belah berwarna ungu kecoklatan selama fermentas hasil perlakuan

kontrol, IA dan IB. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

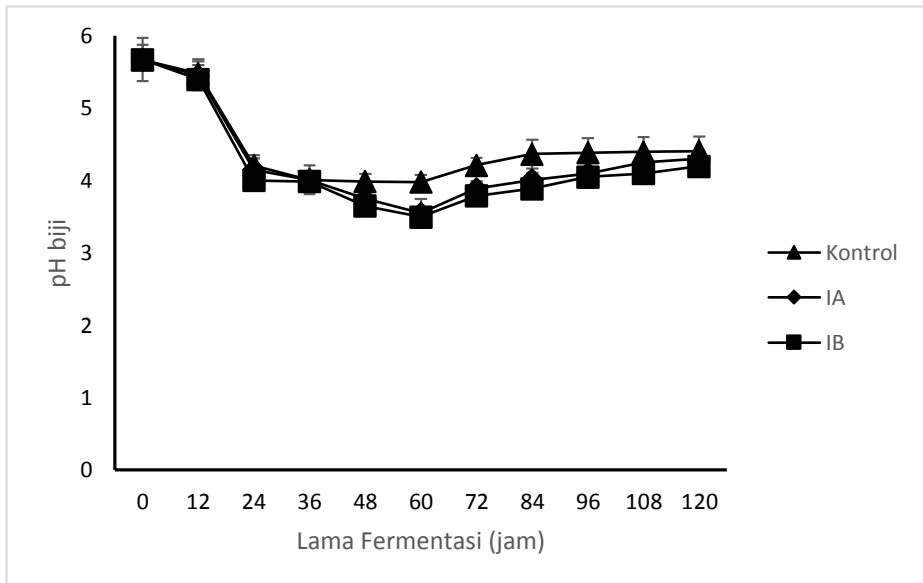
Selain itu antosianin sebagai hasil hidrolisis polifenol dapat mengubah warna biji menjadi ungu sedangkan jika terjadi oksidasi senyawa tanin oleh enzim polifenol oksidase mengakibatkan terbentuknya warna coklat pada biji.

Warna keping biji kakao kering berwarna slaty, ungu kecoklatan dan coklat pasca fermentasi seperti Gambar 3.6.



Gambar 3.6. Warna keping biji kakao kering pasca fermentasi  
Penambahan inokulum mikrobial memberikan pengaruh pada peningkatan populasi mikrobial dan naiknya suhu fermentasi didukung oleh beberapa penelitian berikut. Penambahan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* secara bertahap pada fermentasi biji kakao segar dapat meningkatkan suhu fermentasi sehingga mempercepat fermentasi [10], [11]. Oleh sebab itu diduga penambahan inokulum yeast dan bakteri asam asetat mampu mempercepat reaksi gula menjadi asam asetat sehingga mempercepat tercapainya suhu kematian biji [11], [12].

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pH awal biji kakao kering seluruh perlakuan adalah 5,6. pH biji kakao kering perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan secara bertahap (IB) menurun dari 5,6 menjadi berturut – turut 3,95, 3,56 dan 3,50 di 60 jam fermentasi. Perubahan pH biji kakao kering yang dihasilkan sesuai dengan yang diperoleh [3], [5], [11] yang telah mempelajari perubahan pH nib selama fermentasi dengan perlakuan penambahan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*.

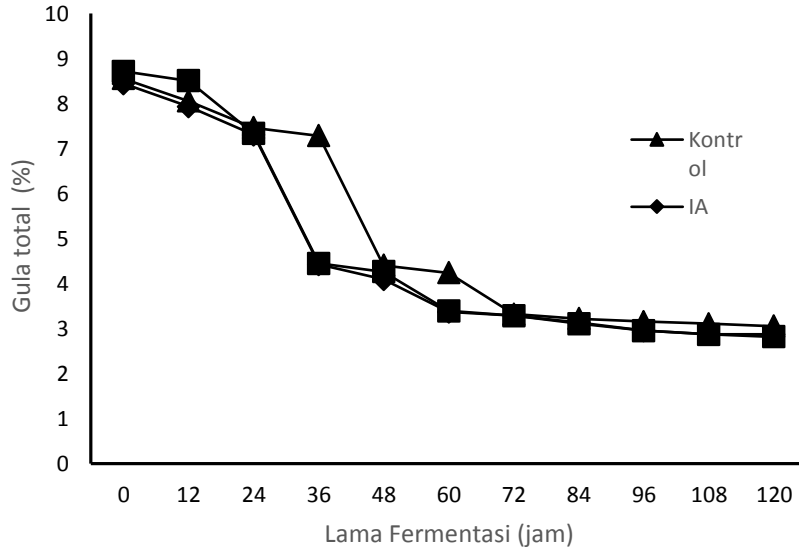


Gambar 3.7. pH biji kakao selama fermentasi hasil perlakuan kontrol, IA dan IB selama fermentasi. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Jika ditinjau pH biji kakao kering, seluruh perlakuan terjadi penurunan dari awal sampai 60 jam fermentasi di 120 jam fermentasi ini disebabkan oleh peningkatan konsentrasi asam asetat yang terdifusi kedalam kotelidon. Setelah 60 jam fermentasi pH biji kakao kering terjadi kenaikan sampai di 120 jam fermentasi hal ini disebabkan terjadinya penguapan asam asetat seiring naiknya suhu fermentasi.

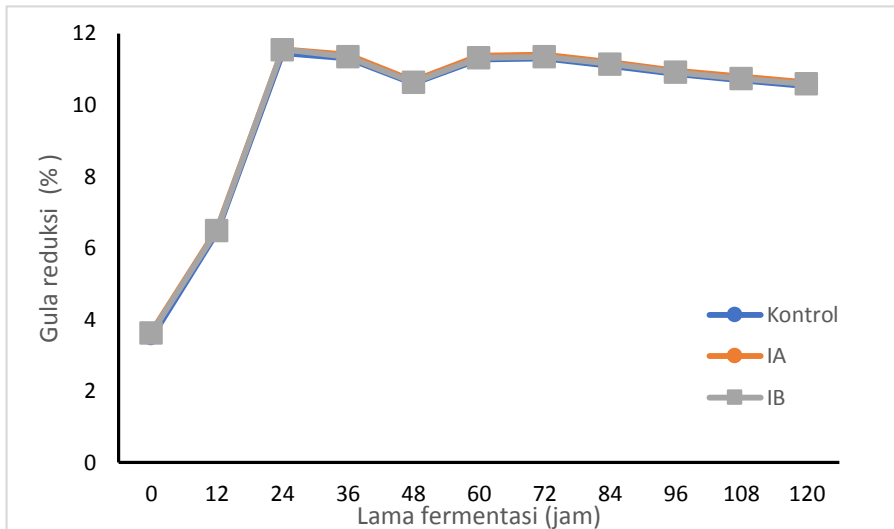
Gula dalam biji kakao adalah sukrosa, fruktosa dan glukosa [13], [14] dengan sukrosa (90 % dari total gula), diikuti oleh fruktosa dan glukosa yaitu 6 % dari total gula ( 0,9 dan 0,7%) dan termasuk manitol dan inositol kurang dari 0,50 mg/g. Penurunan kadar gula total diduga adanya selama fermentasi biji kakao, sukrosa hampir seluruhnya dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa oleh enzim invertase. Kemungkinan yang lain terjadi perombakan gula menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* sehingga semakin banyak populasi *S. cerevisiae* maka gula yang di ubah menjadi etanol semakin banyak.





Gambar 3.8. Perubahan gula total selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan kontrol, IA dan IB selama fermentasi. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Gula total biji kakao kering diawal fermentasi perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 8,45; 8,45 dan 8,5%. Pada 120 jam fermentasi gula total biji kakao kering perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 3,05; 2,86 dan 2,82%. Jika ditinjau dari gula reduksi biji kakao selama fermentasi dapat diduga naiknya gula reduksi dari awal fermentasi sampai 24 jam fermentasi disebabkan oleh hidrolisis gula total (sukrosa) biji menjadi fruktosa dan glukosa oleh enzim invertase. Setelah 24 jam fermentasi terjadi hidrolisis lanjut yang berakibat turunnya gula reduksi biji kakao sampai 120 jam fermentasi. Peningkatan kadar gula reduksi selama fermentasi sebagai hasil dari reaksi enzimatik oleh enzim invertase  $\beta$ -galaktosidase,  $\alpha$ -arbinosidase, dan  $\alpha$ -annosidase. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gula reduksi selama fermentasi naik dari 3,6 menjadi 10,5%. Jika ditinjau kadar gula reduksi dapat dikatakan terjadi proses fermentasi biji kakao kering.



Gambar 3.9. Gula reduksi selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan kontrol, IA dan IB selama fermentasi. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Hasil penelitian tahap ini menunjukkan bahwa proses fermentasi biji kakao kering pada seluruh perlakuan bahwa kadar gula reduksi, indeks fermentasi, persen jumlah keping biji berwarna coklat mengalami kenaikan. Kadar gula total dan pH biji menurun selama fermentasi. Suhu fermentasi tertinggi 51°C ditunjukkan perlakuan secara bertahap serta kematian biji dapat dicapai.

Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan rata – rata gula total biji kakao kering seluruh perlakuan tidak berbeda nyata ( $p \leq 0,05$ ). Penurunan gula total biji kakao kering yang dihasilkan penelitian ini tidak sesuai dengan yang diperoleh [15] populasi total gula diawal fermentasi adalah 19% menurun selama fermentasi sampai habis di 120 jam fermentasi. Gula reduksi perlakuan kontrol, IA dan IB di awal fermentasi berturut – turut yaitu 3,49, 3,63 dan 3,63% selanjutnya mengalami kenaikan di 24 jam fermentasi. Pada 24 jam fermentasi gula reduksi perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 11,44; 11,53 dan 11,55%. Selanjutnya diakhir fermentasi gula reduksi perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu

10,53; 10,63 dan 10,57%. Perubahan gula reduksi yang dihasilkan sesuai dengan yang diperoleh [3] yang telah mempelajari perubahan keasaman dan reaksi biokimia nib biji kakao selama fermentasi pada biji kakao segar. Jika ditinjau dari gula reduksi biji kakao selama fermentasi dapat diduga naiknya gula reduksi dari awal fermentasi sampai 24 jam fermentasi disebabkan oleh hidrolisis gula total (sukrosa) biji menjadi fruktosa dan glukosa oleh enzim invertase. Setelah 24 jam fermentasi terjadi hidrolisis lanjut yang berakibat turunnya gula reduksi biji kakao sampai 120 jam fermentasi. Peningkatan kadar gula reduksi selama fermentasi sebagai hasil dari reaksi enzimatik oleh enzim invertase  $\beta$ -galaktosidase,  $\alpha$ -arbinosidase, dan  $\alpha$ -annosidase. Kadar gula total dan pH biji menurun selama fermentasi. Suhu fermentasi tertinggi 51°C ditunjukkan perlakuan secara bertahap serta kematian biji dapat dicapai.

Evaluasi proses fermentasi merupakan salah satu cara mengetahui keberhasilan proses fermentasi dengan beberapa parameter seperti suksesi mikrobial dan perubahan total polifenol selama fermentasi. Suksesi mikrobial merupakan kondisi perkembangan serta aktivitas yang terjadi pada *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* selama fermentasi menghasilkan etanol, asam laktat dan asam asetat yang terdifusi ke dalam biji serta menghasilkan suhu tinggi dan berakibat pada kematian biji kakao. Konsentrasi etanol tertinggi diduga disebabkan perombakan gula total menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* terjadi pada 24 jam fermentasi sebesar 4,8%, selanjutnya *L. lactis* menghasilkan konsentrasi asam laktat tertinggi pada 60 jam fermentasi, dan konsentrasi asam asetat tertinggi dihasilkan pada 108 jam fermentasi.

Pada perlakuan kontrol populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* di awal fermentasi berturut-turut 5,55, 6,66 dan 4,65 log (cfu/g) [10], [16], [17]. Pada perlakuan kontrol di awal fermentasi konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat seluruhnya 0%. Pada 24 jam fermentasi terjadi perubahan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut-turut yaitu 7,24; 6,70 dan 6,71 log (cfu/g). Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut-turut yaitu 4,83, 1,83 dan 1,53% [10], [16], [17]. Pada 48 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* masing-masing yaitu 5,88, 8,66 dan 6,64 log (cfu/g). Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut-turut yaitu 2,63, 3,44 dan 2,35% [10], [16], [17]. Pada 72 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut-turut yaitu 4,23, 8,43 dan 6,11 log (cfu/g). Konsentrasi etanol, asam

laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 1,02, 4,03 dan 3,46% [10], [16], [17].

Rata – rata populasi *L. lactis* menunjukkan bahwa perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 6,90, 8,6 dan 8,55 log(cfu/g) dan perlakuan kontrol menunjukkan berbeda nyata terhadap perlakuan yang lain. Rata- rata populasi *A. aceti* menunjukkan bahwa perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap yaitu 5,57, 7,78 dan 8,74 log (cfu/g).

Hasil analisis statistik evaluasi hasil fermentasi melalui perubahan kimia dan mikrobiologi dengan perlakuan kontrol, IA dan IB tersaji pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5. Hasil analisis statistik populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*, etanol, asam laktat, asam asetat, total polifenol dan asam amino hidrofobik.

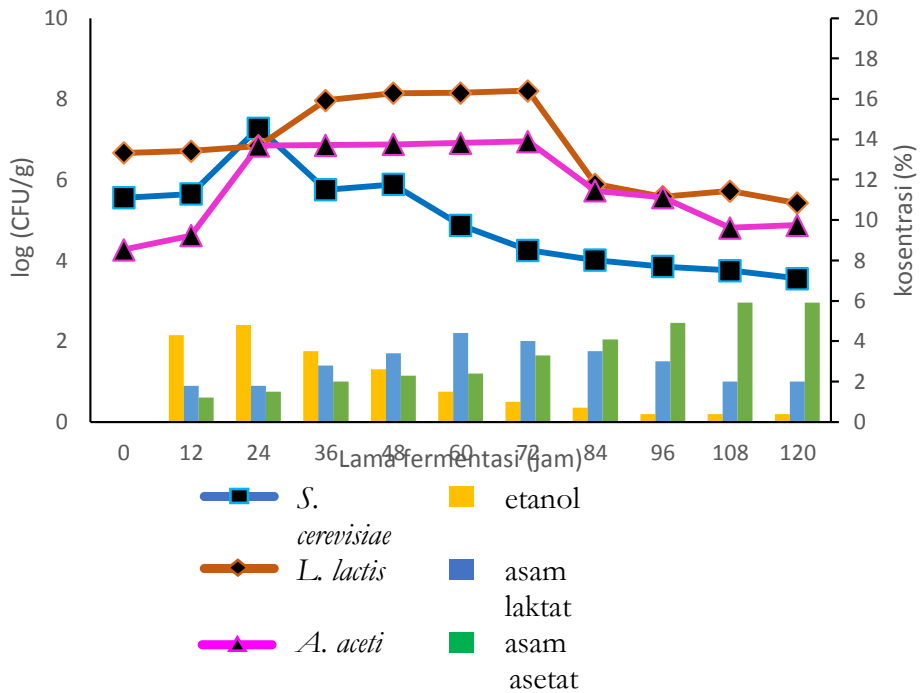
Parameter	Perlakuan		
	Kontrol	IA	IB
<i>S. cerevisiae</i> (log cfu/g)	4,93 ± 0,35a	5,86 ± 0,95a	5,66 ± 0,05a
<i>L. lactis</i> (log cfu/g)	6,90 ± 0,37a	8,6 ± 0,46b	8,55 ± 0,66b
<i>A. aceti</i> (log cfu/g)	5,57 ± 0,27a	7,78 ± 0,48b	4,67 ± 0,81b
Etanol (%)	1,81 ± 0,50a	1,93 ± 0,57a	1,94 ± 0,6a
Asam laktat (%)	2,64 ± 0,37a	2,47 ± 0,39a	2,54 ± 0,40a
Asam asetat (%)	3,09 ± 0,58a	3,25 ± 0,62a	3,43 ± 0,70a
Total polifenol (mg asam galat/g)	0,13 ± 0,04a	0,14 ± 0,06a	0,12 ± 0,04a
Alanin (µg/g)	1,52 ± 0,1a	1,59 ± 0,27a	1,60 ± 0,20a
Tirosin (µg/g)	1,7 ± 0,36a	0,7 ± 0,06a	0,7 ± 0,05a
Valin (µg/g)	0,89 ± 0,06a	1,01 ± 0,06b	1,15 ± 0,06c
Phenilalanin (µg/g)	1,16 ± 0,09a	1,33 ± 0,09b	1,43 ± 0,1b
Isoleusin (µg/g)	0,84 ± 0,04a	1,01 ± 0,05b	1,03 ± 0,02b
Leusin (µg/g)	1,42 ± 0,06a	1,70 ± 0,09b	1,87 ± 0,09c
Methionin	0,64 ± 0,01a	0,72 ± 0,004b	0,74 ± 0,005c

Keterangan : Huruf berbeda dibelakang angka pada baris sama menunjukkan beda nyata  $p \leq 0,05$   
 Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis

Perubahan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang dihasilkan perlakuan kontrol sesuai dengan hasil penelitian [3], dan [18], yang telah mempelajari pertumbuhan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat selama fermentasi biji kakao segar. Hasil

analisis Anova penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata produksi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi tidak berbeda nyata ( $p \leq 0,05$ ) sesuai dengan hasil penelitian [15] yang telah mempelajari ekologi mikrobia pada fermentasi biji kakao di Indonesia.

Selanjutnya hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat biji kakao pada kontrol selama fermentasi tersaji pada Gambar 3.10.



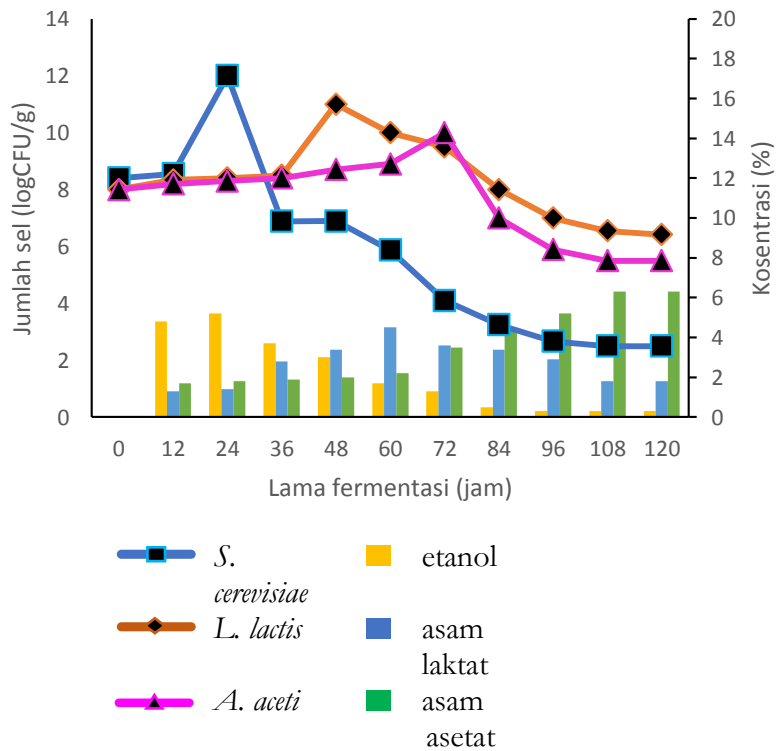
Gambar 3.10. Hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan kontrol. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Jika ditinjau konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi pada perlakuan kontrol masih relatif rendah,

dapat diduga rendahnya konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat disebabkan oleh populasi dan aktivitas *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* rendah. Rendahnya populasi dan aktivitas *S. cerevisiae* dapat disebabkan karena kondisi suhu dan pH yang tidak ideal, sejalan dengan hasil penelitian [19] dan [20] bahwa kondisi suhu dan pH optimum aktivitas enzim poligalaturonase (PG) akan terjadi depolimerisasi *pulp* biji kakao.

Hubungan antara populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak adalah sebagai berikut : Pada 24 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti* masing – masing yaitu 12,41, 8,39 dan 8,38 log (cfu/g), terjadi kenaikan populasi *S. cerevisiae* dari awal fermentasi. Pada 48 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti* berturut – turut 5,88, 11,82 dan 8,82 log (cfu/g), populasi *L. lactis* tertinggi terjadi di 48 jam fermentasi. pada 72 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut – turut yaitu 4,23, 9,11 dan 10,72 log (cfu/g), terjadi populasi *A. aceti* tertinggi disini. Selanjutnya populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* menunjukkan penurunan berturut – turut yaitu 2,5, 6,39 dan 5,45 log (cfu/g). Jika ditinjau konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat menunjukkan berturut – turut diawal fermentasi yaitu 0%. Pada 24 jam fermentasi dihasilkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 5,23, 1,433 dan 1,87%. Pada 48 jam fermentasi dihasilkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 3,02, 3,46 dan 2,05%. Pada jam ke 72 fermentasi menunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 1,35, 3,64 dan 3,54%. Diakhir fermentasi menunjukan penurunan konsentrasi etanol asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 0,33, 1,82 dan 6,32%. Kosentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat yang dihasilkan lebih tinggi dari perlakuan kontrol dapat diduga bahwa penambahan inokulum meningkatkan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* sebanyak  $10^8$  cfu/g. Setelah 24 jam fermentasi terjadi kenaikan suhu fermentasi dan pH lingkungan fermentasi berakibat pada kondisi optimum aktivitas enzim PG dan dihasilkan etanol lebih banyak sehingga kondisi tidak sesuai untuk *S. cerevisiae* dan perannya digantikan oleh *L. lactis*. Setelah 48 jam fermentasi substrat gula sudah relatif sedikit, aerasi semakin baik dan konsentrasi etanol yang relatif tinggi, pH *pulp* semakin kecil menjadikan kondisi ideal untuk *A. aceti*.

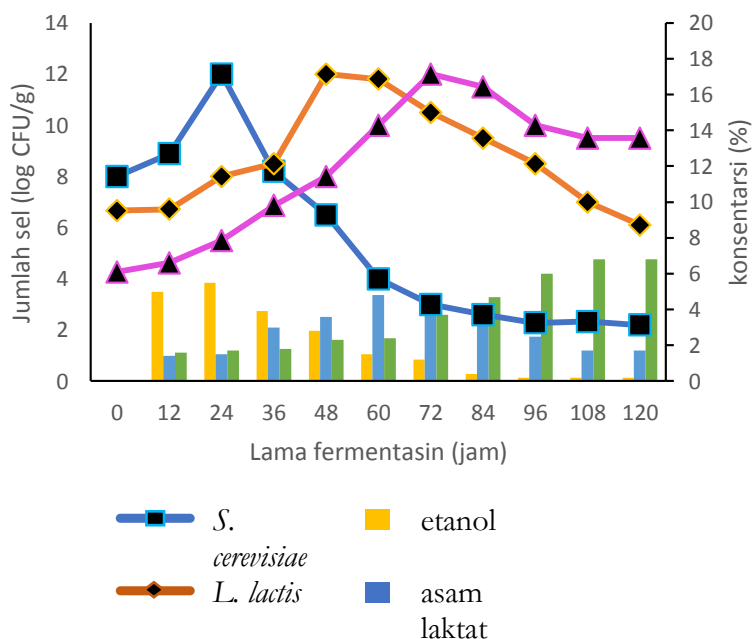
Pertumbuhan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang dihasilkan sesuai dengan yang diperoleh Kustyawati dan Setyani, (2008); yang telah mempelajari penambahan *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNCC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) pada proses fermentasi biji kakao segar varietas lindak. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan hasil yang diperoleh [21], [22] yang mempelajari perbaikan proses fermentasi dengan penambahan tetes tebu dan penambahan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan secara bertahap populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* diawal fermentasi berturut – turut yaitu 8,66, 6,64 dan 4,67 log (cfu/g). Pada 24 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* naik menjadi berturut – turut 12,55, 8,23 dan 5,53 log (cfu/g). Pada 48 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terjadi perubahan berturut – turut yaitu 6,54, 12,53 dan 8,73 log (cfu/g). Pada 72 jam fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut – turut yaitu 3,87, 10,64 dan 12,13 log (cfu/g).



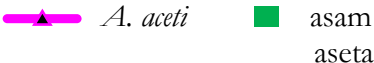
Gambar 3.11. Hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Selanjutnya diakhir fermentasi populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* turun menjadi berturut – turut 2,22, 6,23 dan 9,22 log cfu/g. Perlakuan penambahan inokulum secara bertahap mempunyai konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat diawal fermentasi seluruhnya 0%.

Pada 24 jam fermentasi ditunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat naik berturut – turut yaitu 5,54, 1,55 dan 1,70%. Pada 48 jam fermentasi menunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 2,84, 3,67 dan 2,37%. Hubungan antara populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat pada perlakuan penambahan inokulum secara bertahap tersaji pada Gambar 3.12.

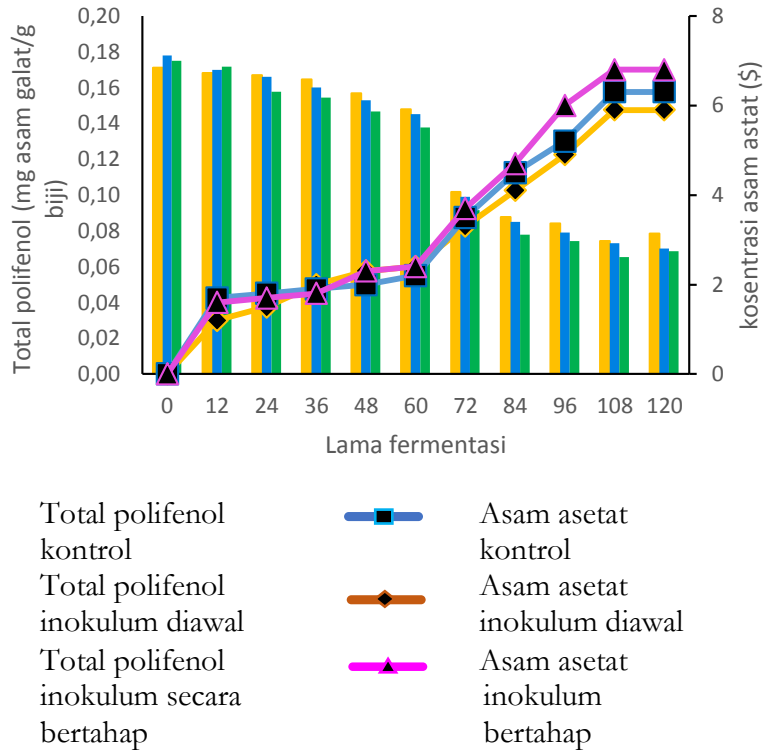




Gambar  3.12. Hubungan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi biji kakao hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Pada 72 jam fermentasi ditunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 1,23, 3,83 dan 3,32%. Kosentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat tertinggi terjadi berturut – turut di 24, 60, dan 108 jam fermentasi hal ini dapat diduga inokulum yang ditambahkan mengalami adaptasi dan kompetisi dengan mikrobia endogenus yang ada. Perlakuan secara bertahap menunjukan rata – rata populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* berturut – turut yaitu 5,66, 8,55 dan 4,47 log (cfu/g)

Jika ditinjau dari perlakuan variasi teknik fermentasi menunjukan kosentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat naik, diduga suhu lingkungan yang dihasilkan penambahan inokulum yaitu 39 - 51°C merupakan suhu optimum untuk aktivitas enzim pektinolitik seperti enzim Poli Galaktoranase (PG) dan menaikan kemampuan depolimerisasi *pulp* biji kakao sejalan dengan hasil penelitian [19] yang melakukan optimasi kondisi depolimerisasi *pulp* biji kakao oleh enzim bahwa kondisi optimum untu aktivitas enzim PG pada suhu 42,5°C dan pH 4,6.



Gambar 3.13. Hubungan konsentrasi asam asetat terhadap perubahan total polifenol biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap. Awal (0) – 24 jam fermentasi suhu inkubator 35°C, 24 – 48 jam fermentasi suhu inkubator 45°C, 48 – 72 jam fermentasi suhu inkubator 55°C dan 72 – 120 jam fermentasi suhu inkubator 35°C.

Penurunan total polifenol dan peningkatan konsentrasi asam asetat yang dihasilkan sesuai dengan hasil penelitian yang diperoleh [10], [11], yang telah mempelajari penambahan inokulum mikroba *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada fermentasi biji kakao segar varietas lindak. Peningkatan konsentrasi asam asetat diikuti oleh penurunan total polifenol dalam biji kakao kering selama fermentasi. Jika ditinjau dari konsentrasi asam asetat yang dihasilkan maka dapat diartikan perlakuan secara bertahap adalah yang terbaik. Asam asetat merupakan asam organik yang terdifusi ke dalam keping

biji sehingga mengakibatkan aktifnya enzim polifenol oksidase yang mengoksidasi polifenol.

Pada 72 jam fermentasi total polifenol perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 0,102; 0,099 dan 0,092, dengan konsentrasi asam asetat berturut- turut yaitu 3,46; 3,53 dan 3,32%. Pada 108 jam fermentasi konsentrasi asam asetat perlakuan kontrol, IA dan IB menunjukkan konsentrasi tertinggi masing – masing yaitu 5,94; 6,31 dan 6,83% [10], [11]. Pada 108 jam total polifenol perlakuan kontrol, penambahan inokuum secara serentak dan secara bertahap fermentasi menunjukkan nilai terendah berturut – turut yaitu 0,074; 0,073 dan 0,066 (mg asam galat/g).

Jika ditinjau dari total polifenol yang rendah diawal fermentasi dapat diduga telah terjadi oksidasi polifenol oleh panas saat pengeringan. Penurunan total polifenol selama fermentasi dapat diduga disebabkan oleh oksidasi aktifitas enzimatik dan non enzimatik setelah kematian biji [23], [24]. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil yang diperoleh [23], [25] yang mempelajari aktivitas enzim pada biji kakao kering terhadap pembentukan prekursor flavor. Semakin tinggi suhu fermentasi dapat diduga semakin banyak polifenol yang terdegradasi. Berdasarkan penelitian tahap II menunjukkan bahwa suhu fermentasi yang terjadi pada perlakuan secara bertahap merupakan suhu optimum bagi aktivitas enzim PG sehingga konsentrasi etanol relatif tinggi, hasil ini sesuai dengan hasil penelitian [19] yang mempelajari kondisi suhu, pH optimum enzim PG dalam depolimerisasi *pulp* biji kakao. Suhu fermentasi pada perlakuan secara bertahap juga merupakan suhu optimum untuk aktivitas enzim polifenol oksidase hasil ini sesuai dengan perolehan [26], [27] yang telah mempelajari pengaruh polifenol terhadap pembentukan prekursor flavor biji kakao serta enzim polifenol oksidase sangat peka terhadap kondisi lingkungan fermentasi dan suhu pengeringan [28], [29].

Hasil analisis asam amino biji kakao kering pada perlakuan kontrol, IA dan IB menunjukkan bahwa protein biji kakao kering mengalami degradasi selama fermentasi menjadi asam amino hidrofobik seperti Alanin, Valin, Tirosin, Phenilalanin, Isoleusin, Leusin dan Methionin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan asam amino hidrofobik pada perlakuan kontrol adalah alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin, dan methionin, diawal fermentasi berturut – turut yaitu 0,72; 0,78; 0,82; 1,26; 0,92 dan 0,65 $\mu$ g/g. Pada 72 jam fermentasi turun menjadi berturut – turut 1,32; 0,69; 0,95; 1,18; 0,87; 1,47 dan 0,64  $\mu$ g/g. Pada 96 jam

fermentasi kandungan alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin, dan methionin menjadi berturut – turut 1,75, 0,61, 1,03, 0,82, 1,35 dan 0,63µg/g. Diakhir fermentasi kandungan alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin, dan methionin berturut – turut yaitu 1,65, 0,63, 0,95,1,19, 0,92, 1,48 dan 0,64 µg/g.

Hasil analisis kandungan asam amino bebas biji kakao kering pasca fermentasi jam 72, 96 dan 120 jam untuk perlakuan kontrol (µg/g) selanjutnya seperti tersaji pada Tabel 3.6.

Tabel 3.6. Kandungan asam amino bebas biji kakao hasil perlakuan kontrol selama fermentasi berturut – turut 72, 96 dan 120 jam (µg/g)

	Lama fermentasi (jam)			
	0	72	96	120
<b>Hidrofobik</b>				
Alanin	1,37ab	1,32a	1,75b	1,65ab
Tirosin	0,78a	0,69a	0,61a	0,63a
Valin	0,82a	0,95a	0,87a	0,95a
Phenilalanin	1,26a	1,18a	1,03a	1,19a
Isoleusin	0,92a	0,87a	0,82a	0,92a
Leusin	1,41a	1,47a	1,35a	1,48a
Methionin	0,65a	0,64a	0,63a	0,64a
<b>Total</b>	<b>7,21</b>	<b>7,12</b>	<b>7,06</b>	<b>7,46</b>
<b>Asam</b>				
Asam aspartat	3,21b	4,59b	4,65b	3,15a
Asam glutamat	15,74c	15,31b	14,89a	15,31b
Serin	1,24ab	1,19a	1,30ab	1,38b
Histidin	0,79ab	0,76a	0,74ab	0,77b
<b>Total</b>	<b>20,98</b>	<b>21,85</b>	<b>21,58</b>	<b>20,61</b>

Keterangan : Huruf berbeda dibelakang angka pada baris sama menunjukkan beda nyata  $p \leq 0,05$

Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis

Ditinjau dari keberhasilan proses fermentasi perlakuan kontrol dapat diduga bahwa ada aktivitas mikrobial endogenous mendegradasi asam amino menjadi asam amino bebas hidrofobik. Asam amino hidrofobik biji kakao naik sejalan dengan lama fermentasi yang dikendalikan oleh aktivitas enzim aspartat protease dan karboksi peptidase. Hasil penelitian ini, senyawa alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin dan methionin dari perlakuan

penambahan inokulum secara serentak menunjukan nilai diawal fermentasi berturut – turut yaitu 1,57, 0,85, 1,43, 1,02, 1,66 dan 0,72 µg/g.

Hasil analisis asam amino perlakuan penambahan inokulum secara serentak menunjukan bahwa total asam amino hidrofobik dan asam amino asam di akhir fermentasi berturut – turut yaitu 8,26 dan 21,41 µg/g, secara umum terjadi peningkatan pada asam amino hidrofobik tetapi terjadi penurunan pada asam amino asam seperti tersaji pada tabel 3.7.

Tabel 3.7. Kandungan asam amino bebas biji kakao hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak selama fermentasi berturut-turut 72, 96 dan 120 jam (µg/g)

	Lama fermentasi (jam)			
	0	72	96	120
<b>Hidrofobik</b>				
Alanin	1,57a	1,52a	1,66b	1,61ab
Tirosin	0,85a	0,77a	0,61a	0,62a
Valin	0,94a	1,07a	0,99a	1,06a
Phenilalanin	1,43a	1,35a	1,19a	1,35a
Isoleusin	1,02a	0,96a	0,97a	1,07a
Leusin	1,66a	1,72a	1,60a	1,83a
Methionin	0,72a	0,71a	0,70a	0,72a
<b>Total</b>	<b>8,19</b>	<b>8,10</b>	<b>7,72</b>	<b>8,26</b>
<b>Asam</b>				
Asam aspartat	3,81b	4,47b	4,53b	3,75a
Asam glutamat	15,86c	15,05b	15,03a	15,42b
Serin	1,39a	1,25a	1,35ab	1,44b
Histidin	0,82a	0,81a	0,78ab	0,80b
<b>Total</b>	<b>21,88</b>	<b>21,58</b>	<b>21,69</b>	<b>21,41</b>

Keterangan : Huruf berbeda dibelakang angka pada baris sama menunjukan beda nyata  $p \leq 0,05$

Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis

Pada 72 jam fermentasi senyawa alanin, tirosin, phenilalanin, isoleusin, dan methionin turun menjadi berturut – turut yaitu 1,52, 0,77, 1,07, 1,35, 0,96 dan 0,71 µg/g, sedangkan valin dan leusin naik berturut – turut yaitu 1,07 dan 1,72 µg/g. Hasil penelitian ini

menunjukkan bahwa senyawa alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin dan methionin diawal fermentasi berturut – turut yaitu 1,59, 0,89, 1,08, 1,53, 1,06, 1,85 dan 0,73 µg/g.

Pada 72 jam fermentasi senyawa leusin dan valin naik menjadi 1,89 dan 1,21 µg/g, sedang senyawa alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin dan methionin turun berturut – turut menjadi 1,55, 0,73, 1,46, 1,01 dan 0,73 µg/g. Pada 96 jam fermentasi senyawa alanin naik menjadi 1,65 µg/g, sedang senyawa tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin dan methionin turun menjadi berturut – turut yaitu 0,65, 1,12, 1,31, 1,01, 1,76 dan 0,72 µg/g.

Tabel 3.8. Kandungan asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan panambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi berturut – turut 72, 96 dan 120 jam (µg/g)

	Lama fermentasi (jam)			
	0	72	96	120
<b>Hidrofobik</b>				
Alanin	1,59ab	1,55a	1,65a	1,60ab
Tirosin	0,89	0,73a	0,65a	0,67a
Valin	1,08	1,21a	1,12a	1,19a
Phenilalanin	1,53a	1,46a	1,31a	1,51a
Isoleusin	1,06a	1,01a	1,01a	1,03a
Leusin	1,85a	1,89a	1,76a	1,99a
Methionin	0,73a	0,73a	0,72a	0,73a
<b>Total</b>	<b>7,65</b>	<b>8,58</b>	<b>8,22</b>	<b>8,72</b>
<b>Asam</b>				
Asam aspartat	3,99b	4,35b	4,43b	3,83a
Asam glutamat	15,95c	15,11b	14,6a	15,14b
Serin	1,41	1,28a	1,37ab	1,46b
Histidin	0,83ab	0,82a	0,79ab	0,82b
<b>Total</b>	<b>22,18</b>	<b>21,56</b>	<b>21,05</b>	<b>21,25</b>

Keterangan : Huruf berbeda dibelakang angka pada baris sama menunjukkan beda nyata  $p \leq 0,05$   
Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis

Diakhir fermentasi senyawa alanin turun menjadi 1,60 µg/g, tetapi senyawa tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin dan

methionin naik menjadi berturut – turut 0,67, 1,19, 1,51, 1,03, 1,99 dan 0,73 µg/g. Keberadaan asam amino bebas pada biji merupakan salah satu indikator keberhasilan fermentasi biji kakao. [7]–[9] menyatakan bahwa fermentasi biji kakao telah menurunkan hampir seluruh asam amino kecuali asam amino hidrofobik seperti alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin dan methionin. Biji kakao mengandung 10 – 15% [1] akan terdegradasi menjadi asam amino bebas hidrofobik dan asam amino lainnya [1], [30].

Difusi asam asetat dan panas, mematikan biji serta mengaktifkan enzim endogenous guna menghidrolisa protein menjadi asam amino hidrofobik lebih banyak. Dugaan ini diperkuat dengan beberapa penelitian berikut enzim P G adalah salah satu enzim pektolitik yang pada kondisi suhu 42,5°C dan pH 4,6 dapat mendepolimerasi pektin lebih baik [19]. Enzim aspartat endopeptidase menghidrolisa ikatan peptida di *Vicilin-class globulins* (VCG) pada residu asam amino hidrofobik, selanjutnya membentuk oligopeptida hidrofobik sebagai substrat bagi karboksi serin (exopeptidase) yang memutus gugus karboksil pada residu asam amino hidrofobik setelah kematian biji [23], [26], [27]. Enzim endogenous aspartat endoprotease dan karboksipeptidase memainkan peran penting dalam konversi oligopeptida hidrofobik untuk membentuk senyawa prekursor aroma kakao, sedangkan oligopeptida yaitu hidrofilik dan hidrofobik dihidrolisa menjadi asam amino bebas terutama leusin, valin, alanin, isoleusin, dan phenilalani, yang diperlukan untuk pembentukan komponen senyawa aroma kakao khas bereaksi dengan gula reduksi saat penyangraian [31]–[34].

Proteolisis biji kakao selama inkubasi dan atau fermentasi konvensional akan dihasilkan peningkatan asam amino bebas hidrofobik jika dibandingkan dengan asam amino bebas asam [31]–[34]. Total asam amino hidrofobik yang terbentuk selama fermentasi pada seluruh perlakuan menunjukkan peningkatan hal ini dapat diduga disebabkan terjadi peningkatan konsentrasi asam asetat yang terdifusi kedalam biji mengakibatkan kematian biji juga aktivasi enzim endoprotease didalam keping biji serta menjadikan degradasi protein menjadi senyawa asam amino hasil ini sesuai yang diperoleh [31]–[35]. [35] yang mempelajari asam amino yang terbentuk dari fermentasi 3 varietas biji kakao lokal Sulawesi menggunakan HPLC (*High Pressure Liquid Chromatogram*).

Pembentukan senyawa prekursor rasa dimulai setelah kematian biji dipicu oleh difusi asam asetat dan etanol kedalam keping biji, dan dipercepat oleh panas yang timbul akibat reaksi

eksotermis oleh aktivitas mikroba selama proses fermentasi berlangsung [25]. VCG secara kuantitatif terdegradasi selama fermentasi menjadi prekursor rasa seperti peptida dan amino asam, yang merupakan prekursor penting bagi pembentukan flavor kakao melalui Maillard Reaksi selama penyangraian [4], [5], [32], [36]–[38]. Biji kakao yang beraroma baik di hasilkan dari biji kakao dengan konsentrasi asam amino bebas dan gula reduksi yang tinggi.

### 3. Profil Senyawa Volatil Biji Kakao Pasca Sangrai

Proses fermentasi bertujuan menghasilkan prekursor flavour yaitu asam amino hidrofobik dan gula reduksi, yang bereaksi saat penyangraian biji kakao menghasilkan flavour dan aroma khas kakao. Evaluasi profil senyawa volatil biji kakao dapat dilakukan setelah biji melalui proses fermentasi dan penyangraian [4], [30]–[32], [39]. Pasca penyangraian biji kakao kering terfermentasi melalui uji flavour menggunakan SPME (*Solid Phase Microextraction*) dan GC-MS (*Gas Chromatogram – Mass Spektrometer*) dihasilkan beberapa senyawa yang berperan dalam pembentukan aroma kakao antara lain; senyawa - senyawa hidrokarbon, etanol, aldehid, keton, asam karboksilat, ester, furan, fenol, eter, pirol (*pyroles*), *oxazoles*, *thiazoles*, piridin dan *quinolines*, pirazin, amina [4], [30]–[32], [39]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa pirazin yang dihasilkan yaitu 2,5-dimetil-pirazin, 2-ethyl-5-methyl-pirazine, Trimethyl-pirazine, Tetramethyl- pirazine, 2,3,5-trimethyl-6-ethylpirazine, 2,3-dimethyl-5-ethylpirazine, 2,3-dimethyl-pirazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-pirazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-pirazine, Methyl Pirazine. Senyawa pirazin yang dihasilkan penelitian ini sesuai dengan penelitian [5], [40]–[45] yang telah mempelajari pengaruh lama fermentasi dan perendaman biji terhadap prekursor senyawa flavour biji kakao yang dihasilkan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa 2,3 dimethyl pirazin hanya dihasilkan perlakuan IB yaitu 1,31 ppb, senyawa ini memberikan kesan bau *musty, cocoa powdery and roasted with potato and coffee nuances*, dan aroma tersebut adalah aorma yang diinginkan. Senyawa 2,5-dimetil-pirazin yang dihasilkan perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 4,69, 1,48 dan 1,35 ppb[40]–[45]. Senyawa 2,5-dimetil-pirazin menghasilkan odor sebagai berikut *Nutty, peanut, musty, earthy, powdery, and slightly roasted with a cocoa powder nuance* [40]–[45]. Adanya odor *earthy* pada senyawa ini membuat *off-flavour* dengan berkurangnya senyawa ini pada perlakuan inokulum secara bertahap lebih diinginkan *flavour* kakao nya [40]–[45].



Senyawa 2-etil 3,5-dimetil pirazin dengan bau *peanut, caramel, coffee, musty, cocoa, pyrazine and roasted* dan juga senyawa metil pirazin dengan bau *nutty, brown, nut skin, musty, pyrazine and coffee with a slight roasted* [40]–[45]. Senyawa 2 etil-3,5, dimetil pirazin dihasilkan oleh perlakuan penamabahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 2,05 dan 2,13 ppb [40]–[45].

Kandungan senyawa 2 etil 5 methil pirazine tertinggi dijumpai biji kakao kering hasil perlakuan IB selanjutnya diikuti oleh IA dan perlakuan kontrol dengan kandungan berturut-turut sebesar 0,72; 0,71 dan 0,68 ppb. Bau spesifik yang ditimbulkan oleh senyawa tersebut diatas adalah *coffe bean* dan *nutty*. Senyawa tetramethyl pirazin di hasil perlakuan kontrol, IA dan IB yaitu 41,90, 37,22 dan 37,05 ppb. Bau yang ditimbulkan jenis senyawa ini tetramethyl pirazin adalah *nutty, musty and vanilla with dry* [40]–[45].

Menurut [37] menyatakan bahwa senyawa pyrazin memiliki karakteristik aroma khas *nutty, roasted, green* dan *smoky*. Kelompok alkil pirazin dianggap menjadi komponen penting yang berkontribusi untuk flavor roasting. Pada penelitian ini teridentifikasi 7 senyawa kelompok pirazin untuk perlakuan kontrol, 8 senyawa untuk perlakuan inokulum diawal dan 9 perlakuan untuk inokulum secara bertahap. Senyawa pirazin yang menimbulkan flavor yang diinginkan adalah 2,3 dimetil pirazin, 2,5-dimetil pirazin, 2,3,5, trimethyl pirazin, dan 2,3,5,6, tetra methyl pirazin tersaji pada Tabel 3.9.

Tabel 3.9. Profil senyawa volatil kelompok pirazin setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Kosentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
2,5-dimetil-pirazin	4,69a	1,48b	1,35b	<i>Nutty, peanut, musty, earthy, powdery, and slightly roasted with a cocoa ponder nuance</i>
2-ethyl-5-methyl-pirazine	0,68a	0,71b	0,72b	<i>Coffee bean, nutty</i>
Trimethyl-pirazine	3,99a	5,08b	4,80b	<i>Nutty, musty, powder cocoa, potato and musty</i>
Tetramethyl-pirazine	41,90b	37,22a	37,05a	<i>Nutty, musty and vanilla with dry, brown cocoa nuance</i>

2,3,5-trimethyl-6-ethylpirazine	0,5a	0,53a	0,44b	<i>Candy, sweet</i>
2,3-dimethyl-5-ethylpirazine	1,85b	2,13a	2,02a	<i>Burn popcorn, roasted cocoa</i>
2,3-dimethyl-pirazine	-	-	1,31	<i>Musty, cocoa powdery and roasted with potato and coffee nuances</i>
3-ethyl-2,5-dimethyl-pirazine	1,17	-	-	<i>Potato, cocoa roasted and nutty</i>
2-ethyl-3,5-dimethyl-pirazine	-	2,05	2,13	<i>Peanut, caramel, coffee, musty, cocoa, pyrazine and roasted</i>
Methyl Pirazine	-	0,47	0,39	<i>Nutty, brown, nut skin, musty, pyrazine and coffee with a slight roasted</i>

Sumber \*: [40]–[45]

Hal ini tidak sama dengan penelitian [46] bahwa pada biji kakao setelah sangrai ditemukan 62 senyawa volatil kelompok pirazin.

Tabel 3.10. Profil senyawa volatil kelompok ester setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
Ethil oktanoat	16,72	19,91	20,01	<i>Sweet, soapy, apple, leafy</i>
3-phenil-ethyl 2-propenoat	0,55	-	-	<i>Sweet, balsamic, spice, cinnamic, fruity and powdery</i>
Ethil benzoat	-	2,73	2,93	<i>Sweet, winter green, fruity, medicinal, cherry, grape</i>
Ethil benzeneasetat	-	4,07	4,15	<i>Floral, honey, rosy with balsamic, dark chocolate and cocoa notes with anisic black licorice nuances</i>
Ethil heptadekanoat	-	0,65	0,72	<i>Fruity</i>
2-phenilethil heksanoat	-	3,83	3,90	<i>Sweet, honey, floral, waxy with woody and sweaty nuances.</i>

<b>pentil tetradecil sulfurat</b>	-	3,84	3,90	-
<b>Ethil dekanooat</b>	-	4,51	4,90	<i>Sweet, waxy, fruity, apple</i>
<b>Ethil sinnamat</b>	-	0,54	0,60	<i>Sweet, balsamic, spice, cinnamic, fruity and powdery</i>
<b>Ethil dodekanoat</b>	-	4,93	5,04	<i>Sweet, waxy, soapy and rummy with a creamy, floral nuance</i>
<b>2-ethylheksil oktanoat</b>	-	2,39	2,53	<i>Odorless mild fatty</i>

*Sumber* \*: [40]–[45]

Senyawa pirazin dan kelompok ester merupakan senyawa pembentuk aroma pada biji kakao yang terbentuk pasca penyangraian biji kakao pada suhu relatif tinggi [5], [47]–[49]. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa profil senyawa volatil kelompok ester pada biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap mempunyai total konsentrasi senyawa ester yaitu; 17,27, 47,39 dan 48,68 ppb. Penelitian ini telah mengidentifikasi senyawa volatil kelompok ester sebanyak 10 senyawa, dan hasil ini tidak sesuai hasil yang diperoleh [45] yang mempelajari senyawa volatil yang dihasilkan dari biji kakao yang disangrai pada berbagai alat sangrai dan teridentifikasi senyawa volatil kelompok ester sebanyak 8 senyawa.

Senyawa kelompok ester dalam bahan pangan umumnya memberikan karakteristik aroma seperti; *fruity*, *sweet*, dan *floral*. [45], [50] melaporkan bahwa ethil phenilasetat merupakan salah satu senyawa paling aktif pada pembentukan aroma kakao dan senyawa tersebut diidentifikasi sebagai senyawa yang memberikan sensasi aroma *sweet*, *honey*, *fruity flowery*, dan *rose like*. Penelitian ini menunjukkan senyawa pembentuk aroma penting biji kakao sangrai adalah phenil asetaldehid yang terbentuk dari senyawa prekursor aroma biji kakao hasil fermentasi. Senyawa aldehid merupakan komponen flavor yang umum dijumpai pada produk alami dan sering digunakan sebagai bahan penyedap makanan. Biji kakao dengan kandungan aldehid rendah mempunyai mutu flavor rendah [16], [51]. Kombinasi antara aldehid tertentu dengan komponen akil-sulfur adalah bertanggung jawab pada aroma penting pada coklat. Senyawa aldehid merupakan hasil degradasi asam lemak tak

jenuh dalam lemak coklat pada saat dilakukan penyangraian. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil yang diperoleh [16], [51] yang mempelajari senyawa aldehid pada buah-buahan.

Phenil asetaldehid atau Benzene asetaldehid dengan aroma *honey, floral rose, powdery, fermented, chocolate with a slight earthy nuance* terdeteksi dalam keping biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap sebesar berturut-turut 146,84; 210,66 dan 215,36 ppb [16], [51]. Bensaldehid terdeteksi dalam keping biji kakao kering jemur hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut sebesar 118,82; 128,25 dan 129,30 ppb. Senyawa tersebut mempunyai karakteristik cita-rasa pahit dan *almond-like, fruity, powder, nutty*. Hasil penelitian ini tidak teridentifikasi senyawa Isovaleraldehid dan isobutilaldehid tidak terdeteksi yang dapat disebabkan oleh rendahnya kandungan senyawa prekursor flavor seperti senyawa asam amino. Senyawa golongan alkohol merupakan hasil fermentasi yang terikut dalam biji kakao kering maupun lemak kakao. Selama penyangraian biji kakao, senyawa alkohol berkurang karena menguap atau karena terdestruksi oleh suhu tinggi. Kandungan alkohol yang tinggi memang diinginkan untuk memperoleh produk coklat aroma *flowery* dan *candy*.

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok aldehid biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.11.

Tabel 3.11. Profil senyawa volatil kelompok aldehid setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
<b>Bensaldehid</b>	118,82	128,25	129,30	<i>Almond, fruity, powdery, nutty</i>
<b>Benzeneaset aldehid</b>	146,84	210,66	215,36	<i>Honey, floral rose, powdery, fermented, chocolate with a slight earthy nuance</i>

<b>Nonanal</b>	57,19	92,50	93,60	<i>Waxy, aldehyde, citrus, with a fresh slightly green, lemon peel like nuance and cucumber fattines</i>
<b>Beta –methyl Sinnamaldehyde</b>	17,07	25,91	26,31	<i>Spicy cinnamon</i>
<b>Furfural</b>	-	2,99	3,07	<i>Sweet, brown, woody, bready, caramellic, with a slight phenolic nuance.</i>
<b>3-methyl butanal</b>	-	0,47	0,52	<i>Ethereal aldehydic, chocolate, peach, fatty</i>
<b>3-methylthio propanal.</b>	-	2,19	2,30	<i>Vegetable oil, creamy potato, potato skin and French fry, yeasty, bready, cheese with savory</i>
<b>1H-Pirole-2- karboksaldehyde</b>	-	0,87	0,92	<i>Musty, beefy, coffee</i>
<b>Decanal</b>	-	3,22	3,32	<i>Sweet, aldehydic, orange, waxy, citrus rind.</i>
<b>4-Methyl-2- phenil-2- pentenal</b>	-	2,11	2,23	<i>Sweet, floral, honey, powdery and cocoa like with rosy nuance.</i>
<b>E-14- Heksadekenal</b>	-	0,07	0,08	-
<b>Naphtalene 1,2,3- trimethyl-4- propenil- ,(E)-</b>	-	1,79	1,83	-
<b>3,5-di-tert- Butil-4- hidroksiben zaldehyde</b>	-	1,90	1,98	-

---

*Sumber \* : [40]–[45]*

Alkohol juga bertanggung jawab atas terbentuknya bau *fruity, floral, caramel-like, sweet* dan *boney* [5], [37]. Senyawa kelompok alkohol umumnya menghasilkan aroma *sweet, fruity, alcoholic, balsamic* dan *green* dan semuanya tergantung susunan molekulnya sesuai dengan yang peroleh [50], [54] yang mempelajari berbagai aroma dari berbagai tipe keju melalui *Gas Chromatography–Olfactometry*. Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok alkohol biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.12.

Tabel 3.12. Profil senyawa volatil kelompok alkohol setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
3,7-dimethyl 1,6-oktadien-3-ol.	36,58	36,19	36,20	<i>Citrus, orange, floral, terpy, waxy and rose</i>
Phenilethil alkohol	142,25	205,26	206,36	<i>Sweet, floral, bready with a rosey honey nuance</i>
3-methyl-1-Pentanol	7,76	9,12	10,01	<i>Pugent, fusel, cognac and wine, cocoa with green fruity undernotes</i>
2- Heptanol	10,76	--	-	<i>Lemon, orange, copper</i>
Benzil Alkohol	-	22,49	23,50	<i>Sweet, floral, fruity with chemica nuance</i>
p-Menth-1en-4-ol	-	1,29	1,40	<i>Woody, metholic, citrus terpy, spicy</i>
2-phenoksi	-	8,09	8,50	<i>Flowry, fresh</i>
Ethanol, Asetilenik glicol	-	0,68	0,70	-

Sumber \*: [40]–[45]

Hasil penelitian ini sesuai yang diperoleh [23], [49], [52], [53] yang mempelajari biji kakao jenis Caracas dan Trinidad memiliki mutu baik dengan intensitas flavor tinggi serta teridentifikasi memiliki kandungan isovaleraldehid (disintesa dari valin) dan isobutiraldehid (disentesa dari leusin) relatif tinggi, sedangkan kakao jenis Arriba, Bahisa, Accra, Costa rican, Sanchez dan Tobasco memiliki kandungan aldehid relatif rendah.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar senyawa oktadien-3-ol yang terdeteksi dari biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap sedikit berbeda dan konsentrasinya berturut-turut 36,58; 36,19 dan 36,20 ppb. Senyawa oktadien-3-ol merupakan jenis etanol tak jenuh yang menghasilkan aroma *earthy*, sedangkan senyawa phenylethil alkohol merupakan jenis etanol aromatik yang memberikan kesan aroma *floral, rose* dan madu. Kadar phenylethil alkohol keping biji kakao perlakuan kontrol, IA dan IB berturut – turut yaitu 142,25; 205,26 dan 206,36 ppb, hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan IB menghasilkan biji kakao dengan gula reduksi lebih banyak sehingga intensitas reaksi Maillard lebih besar dan flavor khas kakao sesuai yang diharapkan [40]–[45].

Senyawa golongan asam karboksilat mendorong pembentukan aroma khas kakao yang cukup besar. Hal penelitian ini menunjukkan bahwa identifikasi komponen seperti asam asetat dan 3-methylbutanoat, dan komponen tersebut merupakan 2 komponen dari 35 jenis senyawa pembentuk aroma paling kuat pada biji kakao sesuai hasil yang diperoleh Frauendorfer dan Schieberle, 2006; Mahajan *et al*, 2004 telah berhasil mengidentifikasi jenis senyawa tersebut dari *whey*, dengan senyawa asam asetat diketahui memberikan karakteristik aroma cuka (*vinegar like*), asam 2-methylpropanoat menghasilkan aroma khas *buttery*, asam 3-methylbutanoat memberikan aroma *sweat*, asam pentanoat berkarakteristik aroma sepat, asam heptanoat memberikan aroma keju (*cheesy*), asam oktanoat memberikan *animal like* dan asam dekanoat berkontribusi pada pembentukan aroma *soapy* [40]–[45].

Komponen hidrokarbon tidak jenuh merupakan komponen aroma yang penting dan berperan besar dalam pembentukan aroma bahan pangan, tetapi senyawa volatil golongan hidrokarbon mempunyai karakteristik aroma lemah. Senyawa volatil kelompok hidrokarbon muncul karena suhu sangrai terlalu tinggi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa volatil kelompok asam pada keping biji kakao hasil penyangraian dari perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut - turut 10,22, 72,45 dan 69,57 ppb. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan asam asetat biji kakao pada perlakuan kontrol, IA dan IB berturut turut 1,40, 1,68, dan 2,48 ppb. Hasil tersebut menunjukkan bahwa biji kakao kering hasil fermentasi perlakuan secara bertahap mempunyai keasaman lebih tinggi dan ini sejalan dengan Gambar 4.2 dimana pH biji kakao

kering perlakuan secara bertahap setelah 120 jam fermentasi paling rendah dibandingkan perlakuan yang lain.

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok asam biji kakao kering jemur hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.13.

Tabel 3.13. Profil senyawa volatil kelompok asam setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
Asam asetat	1,40	1,68	2,48	<i>Sharp pungent sour vinegar</i>
Asam Nanoat	8,82	-	-	<i>Waxy, dirty and cheesy with a cultured dairy nuance</i>
3-metil-asam butanoat	-	8,11	8,10	<i>Cheese, dairy, sour, pungent, fruity, ripe fatty.</i>
2-metil-asam butanoat	-	14,15	14,05	<i>Acidic, fruity, cheesy with a fermented nuance</i>
Asam tridekanoat		8,86	7,50	<i>Waxy woody</i>
n-Heksadekanoat		27,07	26,87	<i>Low heavy waxy, with a creamy, candle waxy</i>
cis-asam vasenat		10,7	9,89	-
Asam oleat		0,47	0,40	<i>Oily, waxy with lard.</i>
Asam oktadekanoat		1,41	1,36	<i>Odorless mild fatty.</i>

Sumber \* : [40]–[45]

Pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap terdeteksi berjumlah 15 senyawa hidrokarbon dengan kandungan 147,06 dan 149,52 ppb. Hasil penelitian ini sesuai yang diperoleh Maarse, (1991) yang mempelajari berbagai senyawa volatil pada minuman bahwa teridentifikasi senyawa hidrokarbon benzenoid. Komponen tersebut memberikan kontribusi pembentukan aroma *green* dan *rose-like flavor* [40]–[45].

Senyawa toluene terdeteksi pada biji kakao kering jemur hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut sebesar 1,08 dan 1,10 ppb. Karakteristik



bau yang ditimbulkan oleh senyawa tersebut adalah *sweet*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa biji kakao perlakuan kontrol terdeteksi senyawa hidrokarbon sebanyak 6 jenis senyawa dengan kandungannya sebesar 120,24 ppb. Jumlah senyawa volatil yang dijumpai pada penelitian ini lebih banyak dari hasil penelitian Yulius *et al.* (2014) yang mempelajari pengaruh perendaman biji kakao kering terfermentasi dan bahan alat sangrai terhadap sifat fisik dan profil senyawa volatil kakao sangrai serta sifat sensoris cokelat batang yang dihasilkan. Bau spesifik yang ditimbulkan oleh senyawa tersebut adalah *sweet, floral, nut skin dan pepery herbal tropical* [40]–[45].

Meskipun hasil identifikasi senyawa volatil kelompok hidrokarbon dari biji kakao kering seluruh perlakuan menunjukkan bahwa senyawa 2,6 dimethyl-2,4,6 oktatriena ini relatif kecil tetapi senyawa ini adalah senyawa yang diharapkan muncul. Senyawa tridecan, tetradecan dan dodecan menghasilkan karakteristik bau khas *gasoline-like odorless* yang relatif kurang diterima oleh konsumen [40]–[45].

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa 2,6 dimethyl 2,4,6 oktatriena tertinggi dimiliki perlakuan kontrol, perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan perlakuan secara bertahap berturut-turut sebesar 6,57; 1,89 dan 1,83 ppb [40]–[45].

Tridecan yang diidentifikasi dari hasil biji kakao kering jemur perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut 47,19; 73, 48 dan 74,01 ppb. Tridecan merupakan senyawa volatil kelompok hidrokarbon tertinggi yang dihasilkan biji kakao kering jemur [40]–[45].

Pengendalian proses sangrai yang kurang baik dapat menyebabkan pasta cokelat yang dihasilkan akan memiliki cita rasa hangus atau gosong (*burnt*). Fenomena tersebut terjadi karena energi panas yang berlebihan digunakan untuk proses pirolisis yang pada dasarnya merupakan reaksi dekomposisi senyawa hidrokarbon yang terkandung didalam biji kakao (Sivetz dan Desrosier, 1979; Sukrino *et al.*,2006). Senyawa keton berkontribusi terhadap pembentukan aroma *buttery*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa volatil kelompok keton pada perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut –turut 2, 4 dan 4 senyawa [40]–[45].

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok hidrokarbon biji kakao kering jemur perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.14.

Tabel 3.14. Profil senyawa volatil kelompok hidrokarbon setelah sangrai biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Kosentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
(E,Z)- 2,6-dimethyl- 2,4,6-Oktatrien,	6,57	1,83	1,89	<i>Sweet, floral, nut skin pepery</i>
Dodecan	26,68	32,25	33,20	<i>herbal tropical Gasoline-like odorless</i>
Tridecan	47,19	73,48	74,01	<i>Gasoline-like odorless</i>
Tetradecan	0,64	0,9	1,03	<i>Gasoline-like odorless</i>
1,3,5,7-Syklotetraen	8,05	-	-	-
1-Methylene-2-vinylcyclopentane	31,11	-	-	-
Toluene	-	1,08	1,10	<i>sweet</i>
1,3,5-Sikloheptatrien	-	0,53	0,62	-
3,7 -dimethyl-Decane	-	15,91	16,05	-
Siklopropane, oktil-	-	13,61	14,2	-
cis-1,4-dimethyl Siklooctane	-	1,05	1,1	-
Decane	-	0,29	0,25	<i>Gasoline-like odorless</i>
Tetradecane	-	0,90	1,03	<i>Gasoline-like odorless</i>
1-Tridecane	-	0,95	1,15	-
Tetratriacontyl heptafluoro butirate	-	0,4	0,5	-
4,11,11-Trimethyl-8 methilenebisiklo [7.2.0]undec-4-ene	-	0,55	0,60	<i>Woody, spicy, pepper like</i>
2-(p-Tolimethyl)-p-xilene	-	0,17	0,20	-
2.6-Diisopropilnaphthalene	-	2,76	2,90	-

1,1-Diphenilisobutylene	-	0,4	0,5	-
-------------------------	---	-----	-----	---

Sumber \* : [40]–[45]

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok keton biji kakao kering jamur perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.15.

Tabel 3.15. Profil senyawa volatil kelompok keton setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
Sikloheksan, 4-methyl	1,32	-	-	<i>Musty animal</i>
3,4-dihidro-8hidroksi-3-methyl, 1H-2-Benzopiran-1-on	1,04	-	-	-
2-Heptanon	-	3,12	3,35	<i>Cheese, fruity, ketonik, green banana with a creamy nuance</i>
1-(1H-pirol-2-il)-Ethanon	-	8,91	9,05	<i>Musty, nutty-like with a couman nuance</i>
2-Nonanon	-	49,12	49,25	<i>Fruity, sweet, waxy, soapy, cheese, green herbaceous, coconut like</i>
3,5-di-ter-butyl-4-hidroksi-propiofenon	-	1,10	1,35	-

Sumber \* : [40]–[45]

Pada perlakuan kontrol dapat diidentifikasi senyawa sikloheksan, 4-methyl sebesar 1,32 ppb memberikan kontribusi pada pembentukan bau *musty animal*. Senyawa keton yang paling besar adalah 2-nonanone terdeteksi pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap yaitu 49,12 dan 49,25 ppb. Senyawa 4-methyl dan 2-nonanone memberikan aroma karakteristik (khas) aroma biji kakao sangrai yang disukai oleh konsumen yaitu *fruity, sweet, waxy, soapy, cheese, green herbaceous, coconut like* [40]–[45].

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa 1-(1H-piro-2il)-ethanon diidentifikasi dari biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap masing-masing berturut-turut sebesar 8,91 dan 9,05 ppb [40]–[45]. Senyawa tersebut memberi kontribusi karakteristik khas bau *misty, nutty-like with couman nuance* [40]–[45]. Teridentifikasi senyawa volatil 3,4,-hidro-8-hidroksi-3-methyl, dari biji kakao kering hasil perlakuan kontrol sebesar 1,04 ppb tetapi senyawa tersebut belum diketahui perannya dalam memunculkan bau.

Hasil penelitian ini menunjukkan beberapa senyawa volatil yang teridentifikasi kelompok senyawa furan, benzen, benzoid hidrokarbon, fenol, furfural, sesquiterpenes, turunan aldehyd, methylxanthine dan phnylpropanoid. Senyawa (furaneol) memiliki aroma karakteristik (khas) *caramel-like*. sedangkan senyawa eugenol pada penelitian ini hanya teridentifikasi pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut sebesar 5,75 dan 5,85 ppb. Senyawa diatas memberikan aroma karakteristik (khas) seperti *carnation* (bunga anyelir), 4-hidroksi-2,5- dimethyl-3(2H)-furanon (furaneol) yang merupakan senyawa penting pembentuk aroma kakao, hasil ini didukung hasil penelitian sebelumnya yang diperoleh [40]–[45] dan Frauendofer dan Schieberle (2006) yang mengidentifikasi phenol, 2-methoksi-4-2- propenhil (Eugenol), 4-hidroksi- 2,5-dimethyl-3(2H)-furanon yang mempelajari senyawa fenol yang telah berhasil diidentifikasi pada produk olahan kakao [40]–[45]. Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok lain dalam biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.16.

Tabel 3.16. Profil senyawa volatil kelompok lainnya setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (ppb)			*Odor
	Kontrol	Inokulum secara serentak	Inokulum secara bertahap	
<b>Kelompok Furan</b>				
Furaneol		3.65	3,75	<i>Sweet, slightly burnt brown caramelic, cotton</i>

Cis-linalool Oksida		13,35	13,78	<i>candy with a savory nuance. Sweet, floral, creamy</i>
<b>Kelompok benzen</b>				
Benzonitrile	4,49	3,45	3,05	<i>Sweet almond</i>
Indole	0,51	0,95	1,05	<i>Pungent, floral, slightly naphtha like with a fecal and animatic musty character</i>
<b>Kelompok benzoid hidrokarbon</b>				
Beta-Mirsene	-	18,92	19,35	<i>Herbaceous, woody with a rosy celery and carrot nuance</i>
<b>Kelompok turunan fenol</b>				
Butilated	-	1,38	1,89	<i>Mild-phenolic campho</i>
Hidroksitoluene	-	1,90	2,15	-
Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methylpropil)	-	1,50	1,75	-
Mellein	-	5,75	5,85	<i>Sweet, spicy, clove like, woody with phenolic savory ham and bacon notes and cinnamon and allspice nuance</i>
Eugenol	-			
<b>Kelompok sesquiterpenes</b>				
Cadalene	-	5,38	5,65	-
<b>Kelompok turunan aldehid</b>				
3,5-di-tert-Butil-4-hidrksibaketophenon		1,09	1,15	-
<b>Kelompok methilsanthine</b>				
Caffein	-	0,019	0,03	<i>odorless</i>
Isobutil phtalate	-	10,24	10,95	<i>Faint odor</i>

*Sumber* \*: [40]–[45]

Hasil peneltiani ini menunjukkan bahwa jenis kelompok, jenis dan total kandungan senyawa volatil biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 3.17.

Tabel 3.17. Golongan, jenis, kelompok, jumlah dan total konsentrasi senyawa volatil setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Golongan senyawa	Perlakuan					
	Kontrol		Inokulum diawal		Inokulum secara bertahap	
	Jenis	Konsentrasi (ppb)	Jenis	Konsentrasi (ppb)	Jenis	Konsentrasi (ppb)
Pirazin	7	55,88	8	49,75	9	48,70
Ester	2	17,27	10	47,4	10	48,68
Aldehid	4	239,92	13	472,93	13	480,81
Etanol	4	197,35	7	283,12	7	286,77
Asam	2	11,3	8	72,45	8	69,57
Hidrokarbon	6	120,24	17	160,10	17	151,43
Keton	2	2,36	4	62,25	4	63
Furan	-	-	2	17	2	17,53
Benzen	2	5	2	4,4	2	4,1
Benzoid	-	-	1	18,92	1	19,35
hidrokarbon						
Fenol	-	-	4	10,53	4	11,64
sesquiterpenes	-	-	1	5,38	1	5,65
Turunan aldehid	-	-	1	1,09	1	1,15
methilsanthin	-	-	2	10,26	2	10,98

Selain asam amino dan gula, senyawa lain seperti peptida, protein, vitamin, polifenol, lipid dan produk oksidasi bereaksi saat penyangraian dan memengaruhi senyawa volatil yang terbentuk seperti: 1,2-Benzendiol (pirokatekol) dibentuk di kakao oleh dekomposisi termal dari catechine, serta thiazole oleh dekomposisi termal dari tiamin. Beberapa pyrones, seperti maltol, dihidro-hidroksimaltol, hidroksimethylfurfural, dan furaneol dari degradasi gula dalam kakao [40]–[45].

Hasil penelitian tahap ini ditunjukkan bahwa total senyawa volatil terbanyak diidentifikasi pada perlakuan penambahan inokulum secara bertahap dapat diduga bahwa memiliki total asam

amino hidrofobik dan gula reduksi tertinggi dibandingkan perlakuan yang lain sehingga saat penyangraian yang terbentuk terbentuk senyawa volatil lebih banyak [40]–[45].

### Daftar Pustaka

- [1] M. Apriyanto, “Analysis of Amino Acids in Cocoa Beans Produced during Fermentation by High Performance Liquid Chromatography (HPLC),” *Int. J. Food Ferment. Technol.*, vol. 7, no. 1, pp. 25–31, 2017.
- [2] M. Apriyanto, S. Sutardi, S. Supriyanto, and E. Harmayani, “Fermentasi Biji Kakao Kering Menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis*, dan *Acetobacter aceti*,” *agriTECH*, vol. 37, no. 3, pp. 302–311, 2017.
- [3] E. O. Afoakwa, “Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans,” *J. Nutr. Heal. Food Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 1–8, 2014, doi: 10.15226/jnhfs.2014.00121.
- [4] M. Apriyanto, “Changes in chemical properties of dreid cocoa (*Theobroma cacao*) beans during fermentation,” *Int. J. Fermented Foods*, vol. 5, no. 1, pp. 11–16, 2016.
- [5] E. O. Afoakwa, A. Paterson, M. Fowler, and A. Ryan, “Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review.,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 48, no. 9, pp. 840–57, Oct. 2008, doi: 10.1080/10408390701719272.
- [6] M. Apriyanto, S. Sutardi, S. Supriyanto, and E. Harmayani, “Cocoa Beans Dry Fermentation Using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* and *Acetobacter aceti*,” *Agritech*, vol. 37, no. 3, p. 302, 2017, doi: 10.22146/agritech.17113.
- [7] K. De Bruyne, N. Camu, L. De Vuyst, and P. Vandamme, “*Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. and *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations.,” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 59, no. Pt 1, pp. 7–12, Jan. 2009, doi: 10.1099/ijms.0.001172-0.
- [8] N. Camu *et al.*, “Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved ,” 2007, doi: 10.1128/AEM.02189-06.
- [9] I. Cleenwerck, A. Gonzalez, N. Camu, K. Engelbeen, P. De

- Vos, and L. De Vuyst, "Acetobacter fabarum sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, no. Pt 9, pp. 2180–5, Sep. 2008, doi: 10.1099/ijs.0.65778-0.
- [10] M. Apriyanto, "Studi Mikrobial dan Biokimia Fermentasi Biji Kakao Kering," *J. Teknol. Pertan.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–5, 2020.
- [11] M. E. Kustyawati and S. Setyani, "Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat," vol. 13, no. 2, pp. 73–84, 2008.
- [12] S. S. Noor-Soffalina, S. Jinap, S. Nazamid, and S. a. H. Nazimah, "Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system," *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 1, pp. 168–180, Jan. 2009, doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01711.x.
- [13] E. O. Afoakwa, A. Paterson, and M. Fowler, "Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate – a review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 18, no. 6, pp. 290–298, Jun. 2007, doi: 10.1016/j.tifs.2007.02.002.
- [14] E. O. Afoakwa, A. S. Budu, H. Mensah-brown, and J. Felix, "Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (Theobroma cacao) Beans," *J Nutr. Heal. Food Sci*, 2014.
- [15] M. Ardhana and G. Fleet, "The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 86, no. 1–2, pp. 87–99, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0168-1605(03)00081-3.
- [16] M. Apriyanto, Y. Riono, and Rujiah, "Pengaruh Populasi Mikroba pada Re-fermentasi terhadap Kualitas Biji Kakao Tanpa Fermentasi," *AGRITEKNO J. Teknol. Pertan.*, vol. 9, no. 2, pp. 64–71, 2020, doi: 10.30598/jagritekno.2020.9.2.64.
- [17] M. Apriyanto, "Suksesi Mikrobial Terhadap Penurunan Etanol, Asam Laktat Dan Asam Asetat Selama Fermentasi Biji Kakao," *J. Teknol. Pertan.*, vol. 7, no. 2, pp. 30–39, 2018.
- [18] R. F. Schwan and A. E. Wheals, "The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 4, pp. 205–21, Jan. 2004, doi: 10.1080/10408690490464104.
- [19] G. P. Ganda-Putra and N. M. Wartini, "Kakao yang Ditambahkan Ragi Tape untuk Produksi Cuka Makan," 2008.
- [20] D. Gandasari and D. Dwidienawati, "Content analysis of



- social and economic issues in Indonesia during the COVID-19 pandemic,” *Heliyon*, vol. 6, no. 11, p. e05599, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05599.
- [21] N. Luh, P. Novi, A. Aryani, N. L. Yulianti, and G. Arda, “Karakteristik Biji Kakao Hasil Fermentasi Kapasitas Kecil dengan Jenis Wadah dan Lama Fermentasi yang Berbeda Characteristics of Cocoa Beans on Small Capacity Fermentation Results Based on Different Types of Containers and Different Fermentation Lengths A,” vol. 6, pp. 17–24, 2018.
- [22] Supriyanto, Haryadi, B. R. P, and D. W. Marseno, “Perubahan Suhu, Kadar Air, Warna, Kadar Polifenol dan Aktivitas Antioksidatif Kakao Selama Penyangraian dengan Energi Gelombang Mikro,” *Agrotech J. Fak. Teknol. Pertan. UGM*, vol. 27, no. 1, pp. 18–26, 2014, doi: 10.22146/agrotech.9489.
- [23] T. W. Misnawi, “Potential Uses of Cocoa Bean Infested by *Conopomorpha cramerella* for Polyphenol Extraction,” *ASEAN Food J.*, vol. 15, no. 1, pp. 27–34, 2008.
- [24] Misnawi, “Influences Of Cocoa Polyphenols and Enzyme Reactivation On The Flavor Development Of Unfermented and Under-Fermented Cocoa Beans,” *Thesis, Univ. Putra Malaysia*, 2003.
- [25] M. Sulistyowati, “Effects of alkali concentration and conching temperature on antioxidant activity and physical properties of chocolate,” *Int. Food Res. J.*, vol. 15, no. 90, pp. 297–304, 2008.
- [26] Misnawi., S. Jinap, B. Jamilah, and S. Nazamid, “Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 38, no. 3, pp. 285–295, Mar. 2003, doi: 10.1046/j.1365-2621.2003.00674.x.
- [27] D. M. H. Farah, a. H. Zaibunnisa, J. Misnawi, and S. Zainal, “Effect of Roasting Process on the Concentration of Acrylamide and Pyrazines in Roasted Cocoa Beans from Different Origins,” *APCBEE Procedia*, vol. 4, pp. 204–208, 2012, doi: 10.1016/j.apcbee.2012.11.034.
- [28] S. Lagunes Gálvez, G. Loiseau, J. L. Paredes, M. Barel, and J.-P. Guiraud, “Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 114, no. 1, pp. 124–30, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041.

- [29] M. Crafacck *et al.*, “Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation.,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 167, no. 1, pp. 103–16, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.024.
- [30] N. Nurhayati and M. Apriyanto, “Sensory evaluation of chocolate bar production materials of dry cocoa seeds in various fermentation treatments,” *Czech J. Food Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 58–62, 2021, doi: 10.17221/272/2020-CJFS.
- [31] J. Voigt, B. Biehl, and H. Heinrichs, “In-vi o formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase,” vol. 49, no. 1994, pp. 173–180, 2003.
- [32] J. Voigt *et al.*, “Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin-like globulin of cocoa seeds,” vol. 50, 1994.
- [33] U. Kratzer, R. Frank, H. Kalbacher, B. Biehl, J. Wöstemeyer, and J. Voigt, “Subunit structure of the vicilin-like globular storage protein of cocoa seeds and the origin of cocoa- and chocolate-specific aroma precursors,” *Food Chem.*, vol. 113, no. 4, pp. 903–913, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.017.
- [34] J. Voigt, B. Biehl, and S. K. S. Wazir, “The major seed proteins of *Theobroma cacao* L.,” *Food Chem.*, vol. 47, no. 2, pp. 145–151, Jan. 1993, doi: 10.1016/0308-8146(93)90236-9.
- [35] S. Sabahannur, . Mursalim, L. Asrul, and M. Bilang, “Use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the Analysis of Amino Acid of Sulawesi and Local Clone Cocoa Bean Fermentation,” *J. Food Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 120–126, 2015, doi: 10.5539/jfr.v4n4p120.
- [36] H. H. M. Fadel, M. a. Abdel Mageed, A. K. M. E. Abdel Samad, and S. N. Lotfy, “Cocoa substitute: Evaluation of sensory qualities and flavour stability,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 223, no. 1, pp. 125–131, Jan. 2006, doi: 10.1007/s00217-005-0162-3.
- [37] E. O. Afoakwa, A. Paterson, M. Fowler, and A. Ryan, “Matrix effects on flavour volatiles release in dark chocolates varying in particle size distribution and fat content using GC–mass spectrometry and GC–olfactometry,” *Food Chem.*, vol. 113, no. 1, pp. 208–215, Mar. 2009, doi:

- 10.1016/j.foodchem.2008.07.088.
- [38] M. Apriyanto and R. Rujiah, "Pengaruh Perendaman Larutan Sulfat dan Pengasapan Belerang Terhadap Mutu Kopra Putih Di Kabupaten Indragiri Hilir," *J. Teknol. Pertan.*, vol. 8, no. 2, pp. 91–96, 2019.
- [39] J. Voigt *et al.*, "The proteolytic formation of essential cocoa-specific aroma precursors depends on particular chemical structures of the vicilin-class globulin of the cocoa seeds lacking in the globular storage proteins of coconuts, hazelnuts and sunflower seeds," vol. 51, pp. 197–205, 1994.
- [40] F. Frauendorfer and P. Schieberle, "Key aroma compounds in fermented Forastero cocoa beans and changes induced by roasting," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 245, no. 9, pp. 1907–1915, 2019, doi: 10.1007/s00217-019-03292-2.
- [41] L. Puzzo, G. Loprencipe, C. Tozzo, and A. D'Andrea, "Three-dimensional survey method of pavement texture using photographic equipment," *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 111, no. January, pp. 146–157, 2017, doi: 10.1016/j.measurement.2017.07.040.
- [42] a. Misnawi, S. Jinap, B. Jamilah, and S. Nazamid, "Sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting," *Food Qual. Prefer.*, vol. 15, no. 5, pp. 403–409, Jul. 2004, doi: 10.1016/S0950-3293(03)00097-1.
- [43] C. D. Kanakis, I. Hasni, P. Bourassa, P. a Tarantilis, M. G. Polissiou, and H.-A. Tajmir-Riahi, "Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols," *Food Chem.*, vol. 127, no. 3, pp. 1046–55, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.079.
- [44] S. T. Beckett, *Industrial Chocolate*. 2009.
- [45] Y. G. Lada and P. Darmadji, "Effect of Dry Bean Soaking and Roasting Instrument Material on Physical Properties, Volatile Compound Profile," *J. Agritech*, vol. 34, no. 4, pp. 439–447, 2014.
- [46] J. L. Koerner, V. L. Hsu, J. Lee, and J. a Kennedy, "Determination of proanthocyanidin A2 content in phenolic polymer isolates by reversed-phase high-performance liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 9, pp. 1403–9, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2008.12.086.
- [47] N. Nurhayati, F. M. C. S. Setyabudi, D. W. Marseno, and S. Supriyanto, "The Effects of Roasting Time of Unfermented

- Cocoa Liquor Using the Oil Bath Methods on Physicochemical Properties and Volatile Compound Profiles,” *agriTECH*, vol. 39, no. 1, p. 36, 2019, doi: 10.22146/agritech.33103.
- [48] T. Lefeber, M. Janssens, N. Camu, and L. De Vuyst, “Kinetic Analysis of Strains of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in Cocoa Pulp Simulation Media toward Development of a Starter Culture for Cocoa Bean Fermentation Kinetic Analysis of Strains of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria in,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 23, pp. 7708–16, Dec. 2010, doi: 10.1128/AEM.01206-10.
- [49] Misnawi, “Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter,” *Int. Food Res. J.*, vol. 19, no. 90, pp. 1589–1594, 2012.
- [50] G. Bosch, L. Heesen, K. de Melo Santos, W. F. Pellikaan, J. W. Cone, and W. H. Hendriks, “Evaluation of an in vitro fibre fermentation method using feline faecal inocula: repeatability and reproducibility,” *J. Nutr. Sci.*, vol. 6, no. c25, pp. 1–4, 2017, doi: 10.1017/jns.2017.22.
- [51] B. Y. Chung, K. Iiyama, and K. Han, “Compositional Characterization of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Hull,” vol. 46, no. 1, pp. 12–16, 2003.
- [52] Z. R. S. Elsi *et al.*, “Utilization of Data Mining Techniques in National Food Security during the Covid-19 Pandemic in Indonesia,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1594, no. 1, 2020, doi: 10.1088/1742-6596/1594/1/012007.
- [53] J. F. Hammerstone, S. A. Lazarus, A. E. Mitchell, R. Rucker, and H. H. Schmitz, “Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography / Mass Spectrometry,” pp. 490–496, 1999.
- [54] Misnawi, S. Jinab, S. Nazamid, and B. Jamilah, “Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation,” *Food Chem.*, vol. 78, no. 4, pp. 407–417, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0308-8146(02)00120-6.

#### IV. PENUTUP

Rehidrasi pulp dapat meningkatkan kadar air pulp biji kakao kering sehingga dapat digunakan sebagai substrat fermentasi. Komposisi pulp sebelum rehidrasi dapat menentukan keberhasilan proses fermentasi. komposisi pulp rehidrasi kadar air (78,5%), kadar gula total (7,5%), kadar gula reduksi (3,5%), asam organik (0,95%) dan pH (4,3). 2. Mutu biji kakao hasil fermentasi dapat ditingkatkan melalui proses fermentasi terkendali. Perlakuan penambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi dapat menaikkan suhu fermentasi (51°C), indeks fermentasi (1,03), kadar gula reduksi (10,79%), persentase jumlah warna coklat keping biji (97,01%), konsentrasi asam asetat (6,83%), populasi *S. Cerevisiae* (1012 cfu/g), *L. lactis* (1012 cfu/g) dan *A. aceti* (1012 cfu/g), meskipun pH biji kakao (4,22) masih rendah dibandingkan perlakuan kontrol dan penambahan inokulum secara serentak fermentasi. 3. Kandungan total asam amino bebas hidrofobik dapat dinaikan melalui fermentasi. Perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan penambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi dapat diidentifikasi senyawa volatil khas biji kakao yaitu 3 metil butanal, 3 metil butanoat, benzil alkohol dan etil benzoat

