

PERLAKUAN PENDAHULUAN PADA BIJI KAKAO KERING NON-FERMENTASI SELAMA INKUBASI PADA LARUTAN BUFFER ASETAT DAN PENGARUHNYA TERHADAP INDEKS FERMENTASI DAN TOTAL POLIFENOL

M. Iqbal Prawira-Atmaja¹⁾, Haryadi²⁾, Supriyanto³⁾

¹⁾ Mahasiswa Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada

²⁾ Staf Pengajar Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada

Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

Email: iqbalprawira06@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk Mengetahui pengaruh perlakuan awal pada biji kakao kering non fermentasi berupa bentuk hancuran dan perlakuan perendaman air (45°C; 16 jam) pada inkubasi buffer asetat terhadap perubahan pH biji, indeks fermentasi dan spektral, dan total polifenol. Perlakuan awal tersebut juga akan dibandingkan dengan biji kakao kering non fermentasi yang langsung diinkubasi pada buffer asetat. Inkubasi dilakukan dengan dua tahap, yaitu tahap pertama pada medium buffer asetat pH 2,7; 600 mM selama 24 jam dan dilanjutkan tahap kedua pada medium buffer asetat pH 5,5; 600 mM selama 12 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan awal sebelum inkubasi buffer asetat berpengaruh terhadap perubahan nilai pH biji, indeks fermentasi, perubahan spektra UV-vis, dan total polifenol biji. Secara keseluruhan nilai indeks warna fermentasi dari semua perlakuan diperoleh nilai > 1 yang setara dengan indeks warna fermentasi biji kakao fermentasi.

Kata kunci: Biji kakao kering non fermentasi, Perlakuan pendahuluan, Inkubasi buffer asetat, polifenol.

Abstract

This research was aimed to find out the influences of pretreatment of unfermented dried cocoa beans with fragment treatment and a water immersion treatment (45°C; 16 hours) on incubation in acetate buffer to change of pH beans, fermentation index and spectral, and total polyphenols. The pretreatment will also be compared with unfermented dried cocoa beans were directly incubated in acetate buffer. Incubation was carried out in two stages, the first stage in acetic buffer medium pH 2.7, 600 mM for 24 hours, then a second stage in acetic buffer medium pH 5.5, 600 mM for 12 hours. The results showed that pretreatment before incubation has given effect to changes in the pH value, fermentation index, UV-vis spectra, and total polyphenols of beans. Overall fermentation index values obtained of all treatment value > 1 which is equivalent to the fermentation index of cocoa bean fermentation.

Keywords: Unfermented dried cocoa beans, Pre-treatment, Acetate buffer incubation, Polyphenol

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara penghasil kakao terbesar ketiga setelah Pantai Gading dan Ghana. Produksi kakao di Indonesia mencapai 450.000 Ton pada tahun 2010/2011 dan diperkirakan pada tahun 2015 produksi kakao Indonesia mencapai 500.000 Ton (World Cocoa Foundation, 2014). Sebagian besar petani di Indonesia tidak melakukan proses fermentasi pada biji kakao tetapi lebih memilih langsung menjual biji kakao dalam bentuk basah maupun berupa biji kering. Biji kakao kering non fermentasi adalah biji kakao yang langsung dikeringkan tanpa melalui proses fermentasi terlebih dahulu (Misnawi et al., 2003). Biji kakao tersebut tidak

diperoleh aroma spesifik kakao saat penyangraian serta dihasilkannya rasa sepat dan pahit pada produk cokelat (Rohan, 1964; Hashim et al., 1998).

Biji kakao kering non fermentasi terkandung sekitar 72,4-81,5 mg/g total polifenol (Thomas-Barberan et al., 2007). Polifenol pada kakao merupakan komponen yang bertanggung jawab terhadap rasa sepat (Stark et al., 2005). Antosianin merupakan komponen Polifenol yang memberikan warna ungu pada biji kakao. selama fermentasi kakao antosianin akan terhidrolisis menjadi antosianidin. Hidrolisis antosianin menyebabkan hilangnya warna ungu pada biji kakao. Antosianin hampir 93% hilang setelah 4 hari fermentasi (Wollgast & Anklam, 2000). Selama

pengeringan biji kakao, jumlah polifenol akan berkurang akibat pencoklatan enzim yang dikatalisis oleh polifenol oksidase dan akan terdifusi keluar dari biji (Kim & Keeney, 1983). Mekanisme perubahan warna dari ungu menjadi cokelat bisa digunakan sebagai parameter kualitas biji kakao fermentasi. Biji kakao fermentasi memiliki nilai indeks warna fermentasi lebih dari 1.

Inkubasi biji kakao dalam medium asam bisa dihasilkan biji kakao dengan kualitas setara biji kakao fermentasi (Biehl et al., 1985; Misnawi et al., 2003). Selama inkubasi dalam medium asam, larutan asam berdifusi kedalam biji kakao basah sehingga terjadi peningkatan berat biji. Difusi asam juga menyebabkan kerusakan subcelluler biji kakao dan vacuola protein mengembang (Biehl et al., 1981). Inkubasi bubuk kakao defatted pada medium asam asetat diperoleh perubahan spectral dan indeks fermentasi yang menyerupai dengan biji kakao fermentasi serta penurunan komponen polifenol (Misnawi et al., 2002a; Misnawi et al., 2003)

Sepengetahuan kami, masih sedikit penelitian terhadap perlakuan awal biji kakao kering non fermentasi sebelum diinkubasi pada buffer asetat. Penelitian Biehl et al. (1982), melaporkan bahwa perendaman biji kakao segar didalam air pada suhu 30-40°C mampu menyerap air hingga 27,5% dari berat awal biji. Penelitian lebih lanjut oleh Misnawi et al. (2003), dengan perendaman biji kakao kering pada suhu 45°C selama 16 jam dihasilkan peningkatan nilai indeks fermentasi meskipun lebih rendah dari biji kakao fermentasi. Perlakuan bentuk hancuran biji kakao bertujuan supaya diperoleh proses asidifikasi yang seragam pada biji kakao. Penetrasi asam lebih cepat dikarenakan luas permukaan yang besar jika dibandingkan dengan bentuk biji kakao utuh.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan awal biji kakao kering non fermentasi berupa bentuk hancuran dan perlakuan perendaman air 45 oC selama 16 jam sebelum inkubasi pada buffer asetat terhadap perubahan indeks fermentasi, perubahan spektral dan total polifenol. Perlakuan awal tersebut juga akan dibandingkan dengan biji kakao kering non fermentasi yang langsung diinkubasi pada buffer asetat.

2. METODE

2.1. Persiapan Biji Kakao

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kakao kering non fermentasi yang diperoleh dari perkebunan PT. Pagilaran, Samigaluh, Kulon Progo. Buah kakao dipecah menggunakan kayu untuk diambil biji kakao. Biji kakao yang telah dibersihkan dengan air mengalir selanjutnya dijemur pada sinar matahari hingga k.a \leq 7-8%. Biji kakao kering non fermentasi disimpan dalam kemasan

plastik vakum pada suhu ruangan hingga digunakan dalam penelitian.

2.2. Perlakuan Pendahuluan Sebelum Inkubasi pada Buffer Asetat

Perlakuan pendahuluan biji kakao kering non fermentasi meliputi perlakuan bentuk hancuran dan perlakuan perendaman. Untuk memperoleh biji kakao hancuran maka biji kakao kering non fermentasi dikupas lapisan husk hingga bersih. Biji kakao kemudian dihancurkan dengan mortar hingga diperoleh ukuran kira-kira 4 mm. Sedangkan perlakuan perendaman biji kakao pada air dilakukan dengan cara biji kakao kering non fermentasi direndam selama 16 jam, suhu 45°C pada waterbath. Perbandingan biji kakao kering non fermentasi pada Perendaman air adalah 30 biji didalam 100 ml aquades (1,3 ml/biji). Setelah perendaman biji kakao ditiriskan dan langsung dipindahkan kedalam buffer asetat. Sebagai kontrol, biji kakao kering non fermentasi langsung di Inkubasi pada buffer asam asetat.

2.3. Inkubasi Biji Kakao dalam Buffer Asetat.

Proses inkubasi biji kakao dilakukan secara 2 tahap. Inkubasi pertama dilakukan pada medium buffer asetat 600 mM pH 2.7 (41°C; 24 jam). Selanjutnya biji kakao dipisahkan dengan medium buffer lalu dilanjutkan pada inkubasi kedua pada medium buffer asetat 600 mM; pH 5,5 (41°C; 12 jam). Perbandingan biji dan buffer asam asetat yang digunakan adalah 30 biji didalam 90 ml larutan buffer. Sedangkan pada perlakuan bentuk hancuran, Perbandingannya adalah 40 g didalam 90 ml larutan asam.

Setelah proses inkubasi biji kakao selanjutnya dikeringkan dengan pengering artifisial oven (55°C; kecepatan sirkulasi udara 1,25 m/s) hingga diperoleh kadar air < 7% (tercapai pada kisaran hari ke-4).

2.4. Persiapan Defatted Bubuk Kakao

Biji kakao kering dihancurkan dengan mortar hingga berukuran 0,3 mm. Kemudian dibagi dalam tiap bagian dimana perbagian berkisar 10 g sampel. Setiap sampel diekstraksi menggunakan pelarut petroleum eter (b.p. 40–60°C) selama 8 jam menggunakan Soxhlet aparatus. Setelah solvent menguap, sampel dihancurkan menjadi serbuk dengan blender. Sampel *defatted* biji kakao digunakan dalam analisis total polifenol.

2.5. Analisis Total Polifenol

Pengukuran total polifenol mengacu pada metode Folin-Ciocalteu yang dilakukan oleh Noor-Sofalina et al. (2009). Serbuk kakao bebas lemak sebanyak 500 mg dicampurkan dengan 80 ml aquos aseton 80%. Campuran larutan tersebut kemudian disonikasi selama 30 menit. Selama proses sonikasi, larutan campuran tersebut selalau dijaga tetap dingin dengan penambahan es batu kedalam wadah sonikator.

Campuran larutan kemudian disaring dengan vakum filter menggunakan kertas saring Whatmann no 1 hingga didapatkan ekstrak yang bersih. Residu dan glassware dibilas dengan aseton 80% hingga diperoleh volume 100 ml pada labu volume. Sebanyak 1 ml ekstrak dipipet kedalam 10 ml labu ukur. Masukkan 7 ml air kedalam tabung reaksi. Ekstrak polifenol kemudian direaksikan dengan 0,5 ml reagent Folin-Ciocalteu (1:1 air) biarkan selama 2-3 menit. Setelah 2-3 menit kemudian ditambahkan 1 ml Na₂CO₃ 15% (15 g dilarutkan dengan aquades) untuk menstabilkan pembentukan warna. Pembentukan warna biru berlangsung sedikitnya sekitarnya 2 jam. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 760 nm. Hasil total polifenol disajikan dalam miligram asam galat equivalent/gram yang diperoleh dari persamaan kurva standar dari larutan asam galat dengan konsentrasi kisaran 1-100 mg/L (ppm).

2.6. Pengukuran Indeks fermentasi

Metode pengukuran Indeks fermentasi dilakukan mengacu pada Misnawi et al. (2003). Sampel kakao sebanyak 0,5 g yang telah dihancurkan kemudian di ekstrak dengan 50 ml larutan campuran metanol:HCl (97:3). Campuran sampel dengan larutan kemudian dibiarkan homogen didalam refrigrator (8 oC) selama 16-19 jam. Filtrat selanjutnya disaring menggunakan kertas Whatmann no 1. Absorpsi Spektral diamati pada panjang gelombang 400-700 nm menggunakan UV-Vis Shimadzu UV-1601 Spectrophotometer (Tokyo, Japan). Sedangkan untuk Indeks fermentasi dihitung berdasarkan rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 460 nm dengan absorbansi 530 nm (IF=A₄₆₀/A₅₃₀).

2.7. Pengukuran Nilai pH Biji Kakao

Nilai pH biji kakao diamati pada setiap tahapan akhir inkubasi dan setelah pengeringan biji kakao berdasarkan metode Jinap et al. (2008). Biji kakao sebanyak 5 g yang telah dihaluskan dengan mortar dimasukkan kedalam erlenmayer 150 ml. tambahkan 45 ml aquades dan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 10 menit. Selanjutnya suspensi sampel disentrifugasi selama 10 menit dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring *Whatmann* no 4. Dinginkan larutan hingga suhu 27±2°C dan kemudian diukur Nilai pH. Sebelumnya pH meter dikalibrasi dengan larutan buffer pH 4,00 dan pH 7,00.

2.8. Analisis Statistik

Data yang diperoleh dalam penelitian dianalisis menggunakan one way ANOVA pada tingkat signifikansi 95% dan dilanjutkan dengan uji Duncan Multiple Range Test (DMRT).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Perubahan Nilai pH Biji Kakao Selama Inkubasi dan Pengeringan

Nilai pH merupakan parameter penting untuk menentukan tingkat keasaman biji kakao fermentasi. Perubahan nilai pH diamati setiap tahap inkubasi (24 jam dan 12 jam) dan juga setelah pengeringan. Sebelum inkubasi Biji kakao kering tanpa fermentasi memiliki kisaran pada pH 6,12. Tahap awal inkubasi biji kakao kering non fermentasi menunjukkan bahwa semua perlakuan mengalami penurunan pH. Perlakuan biji kakao dengan bentuk hancuran (4 mm) mengalami penurunan nilai pH paling rendah jika dibandingkan dengan perlakuan perendaman air (45°C; 16 jam) (P<0,05). Inkubasi tahap kedua mengakibatkan peningkatan pH biji kakao hingga kisaran pH 4,35-4,55. Secara statistik tidak terjadi perbedaan nyata antar tiap perlakuan setelah inkubasi tahap kedua. Setelah pengeringan pada oven suhu 55°C nilai pH biji kakao hasil inkubasi berkisar antara 4,65-5,68. Perlakuan bentuk hancuran memiliki nilai pH biji lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan perendaman air (45 oC;16 jam) dan juga kontrol (p<0,05). Perubahan pH biji kakao selama inkubasi dan setelah pengeringan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perubahan Nilai pH Biji Kakao Selama Inkubasi Buffer Asetat dan Setelah Pengeringan.

Perlakuan awal Biji Kakao	Tahap Inkubasi		Nilai pH Biji kakao setelah pengeringan
	Inkubasi I (pH 2,7; 600 mM; 24 jam)	Inkubasi II (pH 5,5; 600 mM; 12 jam)	
Perendaman air 45°C; 16 jam.	3,90 ± 0,17 ^b	4,35 ± 0,16	4,81 ± 0,12 ^a
Biji kakao hancuran (4 mm)	3,48 ± 0,14 ^a	4,55 ± 0,12	5,68 ± 0,28 ^b
Biji kakao kering non fermentasi (Kontrol)	3,96 ± 0,26 ^b	4,39 ± 0,19	4,65 ± 0,09 ^a

Data±Std dari tiga kali ulangan. Biji kering non fermentasi sebelum inkubasi nilai pH 6,12. Inkubasi dengan medium asam asetat dilakukan pada suhu 41 °C. Pengeringan dilakukan pada pengering kabinet suhu 55°C; sirkulasi udara 12,5 m/s; kadar air akhir biji 7-8%.

Selama inkubasi, asam asetat akan terpenetrasi ke dalam biji kakao dan terjadi proses asidifikasi sehingga mengubah pH biji kakao. Kecepatan penetrasi asam

asetat juga dipengaruhi oleh luas permukaan biji dan konsentrasi dari asam asetat (Biehl et al., 1982). Perubahan pH biji kakao berhubungan dengan reaksi enzimatis yang terjadi di dalam kotiledon. Asam terdifusi kedalam substrat didalam dinding sel sehingga bereaksi dengan enzim menyebabkan kematian biji (Biehl et al., 1985; Kirchoff et al., 1989).

Pengeringan biji kakao bertujuan untuk mengurangi kelebihan asam yang akan berpengaruh terhadap flavor coklat (Jinap et al., 1995). Saat pengeringan biji, senyawa asam volatil menguap bersama dengan menguapnya air. Selain itu juga menurut Haryadi & Supriyanto (2012) selama pengeringan udara dari luar akan masuk melalui kulit biji sehingga cairan sel yang terdapat dibawah kulit biji segera berubah menjadi warna cokelat. Selanjutnya kotiledon secara perlahan akan berubah menjadi cokelat. Pencokelatan adalah reaksi oksidasi dari senyawa polifenol dengan bantuan udara dan *Polifenol oksidase*.

Apabila dimasukan kedalam kategori karakteristik keasaman yang diusulkan Jinap & Dimick (1990) maka biji kakao bentuk hancuran masuk dalam kategori pH tinggi (5,50-5,80) sedangkan perlakuan biji utuh masuk dalam kategori pH rendah (4,75-5,19). Biji kakao yang masuk pada kategori pH rendah, memiliki tingkat keasaman yang tinggi, yang disertai dengan tingginya konsentrasi asam asetat dan asam sitrat.

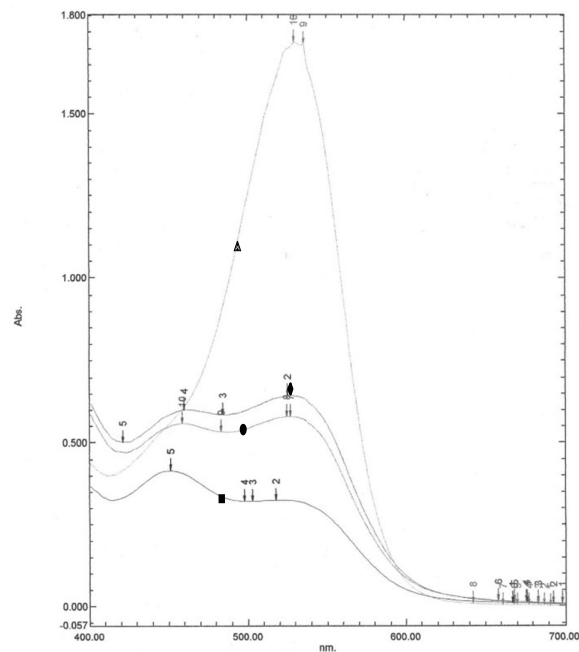
3.2. Perubahan Indeks Fermentasi dan Spektral Uv-Vis Biji Kakao Hasil Inkubasi Buffer Asetat.

Proses inkubasi biji kakao pada medium buffer asetat berperan dalam perubahan indeks fermentasi biji kakao. Tabel 2 menunjukkan bahwa biji kakao kering non fermentasi memiliki indeks fermentasi 0,36 sedangkan biji kakao hasil inkubasi memiliki nilai indeks fermentasi ≥ 1 . Pemberian perlakuan awal sebelum inkubasi memberikan perbedaan yang nyata terhadap nilai indeks fermentasi biji kakao. Biji kakao dalam bentuk hancuran memiliki indeks fermentasi lebih tinggi (1,54) jika dibandingkan dengan perlakuan perendaman air (45°C;16 jam) dan biji kakao kering non fermentasi (kontrol).

Biji kakao hasil fermentasi konvensional memiliki Indeks fermentasi ≥ 1 dikarenakan pembentukan warna coklat-kuning hasil oksidasi dari polifenol (Misnawi et al., 2003; Nazaruddin et al., 2006). Indeks fermentasi merupakan parameter untuk mengukur derajat fermentasi biji kakao. Indeks fermentasi secara tidak langsung bisa digunakan sebagai alat pengukur kandungan antosianin pada biji kakao. Antosianin merupakan salah satu komponen utama polifenol biji kakao dimana pada kondisi asam akan dihasilkan

warna merah ke ungu dengan absorbansi maksimum pada 500-550 nm (Misnawi et al., 2003).

Hasil pengukuran spektral menunjukkan bahwa biji kakao kering tanpa fermentasi memiliki titik maksimum pada absorbansi pada kisaran 500-530 nm. Perubahan spektral UV-vis terhadap masing masing perlakuan memberikan spektral grafik yang berbeda-beda. Perlakuan biji kakao dalam bentuk hancuran memiliki absorbansi lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Penelitian oleh Misnawi et al. (2003) terhadap perubahan spektral UV-vis biji kakao hasil inkubasi dan penelitian Romero-cortes et al. (2013), pada biji kakao fermentasi dari Meksiko menunjukkan bahwa selama proses fermentasi biji kakao akan dihasilkan perubahan spektral pada panjang gelombang antara 530 nm. Perubahan spektral UV-vis biji kakao dengan perlakuan awal sebelum diinkubasi buffer asam asetat disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Perubahan Spektral UV-vis biji kakao sebelum dan sesudah inkubasi buffer asetat yang diekstraks dengan metanol:HCl (97:3). (▲) Biji kakao non fermentasi sebelum inkubasi; (■) Biji kakao hancuran (4 mm); (●) Biji kakao kering non fermentasi (kontrol); (◇) Perendaman air 45 oC; 16±2 jam. Inkubasi medium buffer asetat pada suhu 41 oC. Tahap I: buffer asetat pH 2,7; 600 mM. Tahap II: buffer asetat pH 5,5; 600 mM. Pengukuran pada panjang gelombang 400-700 nm.

Setelah inkubasi, semua perlakuan biji kakao mengalami penurunan secara signifikan pada absorbansi 530 nm. Sedangkan, absorbansi dibawah 500 nm mengalami peningkatan. Perlakuan hancuran

biji kakao menunjukkan grafik spektral yang paling rendah kisaran absorbansinya. Kemungkinan besar dikarenakan antosianin pada biji kakao bentuk hancuran lebih banyak terlarut pada medium asam. Hal itu terlihat dari medium asam berubah menjadi warna ungu pekat jika dibandingkan dengan kedua perlakuan lainnya. Hal yang sama juga terjadi pada inkubasi tahap kedua warna larutan menjadi berwarna merah.

Sebagaimana dikemukakan oleh Misnawi et al. (2002), absorbansi 530 nm menunjukkan keberadaan antosianin. Kemungkinan besar peningkatan absorbansi dibawah 500 nm dikarenakan produk oksidasi dari aktivitas polifenol oksidase yang terjadi selama proses pengeringan. Quinon merupakan produk hasil oksidasi polifenol yang bersifat sangat reaktif (Kim & Keeney, 1984). Gourieva & Tserevinov (1979) didalam Romero-cortes et al. (2013), menyatakan bahwa produk hasil oksidasi polifenol biji kakao bisa dideteksi pada panjang gelombang 460 nm.

3.3. Perubahan Total Polifenol Biji Kakao Hasil Inkubasi Buffer Asetat

Biji kakao merupakan salah satu sumber polifenol. Perubahan polifenol kakao banyak dipengaruhi oleh pengolahan kakao seperti fermentasi, pengeringan, dan penyangraian. Hansen et al. (1998), menyatakan bahwa polifenol oksidase sangat sensitif terhadap proses fermentasi dan pengeringan. selama proses pengeringan mampu menurunkan aktivitas enzim polifenol oksidase. Akibatnya, kandungan polifenol pada biji kakao akan berbeda dengan produk turunannya (Tomas-barberan et al., 2007). Total polifenol biji kakao hasil inkubasi buffer asetat dan fermentasi alami disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2. menunjukkan bahwa biji kakao tanpa fermentasi sebelum di inkubasi memiliki total polifenol sebesar $90,38 \pm 4,76$ mg GAE/g. Sedangkan biji kakao fermentasi dan biji kakao hasil inkubasi memiliki total polifenol berkisar antara

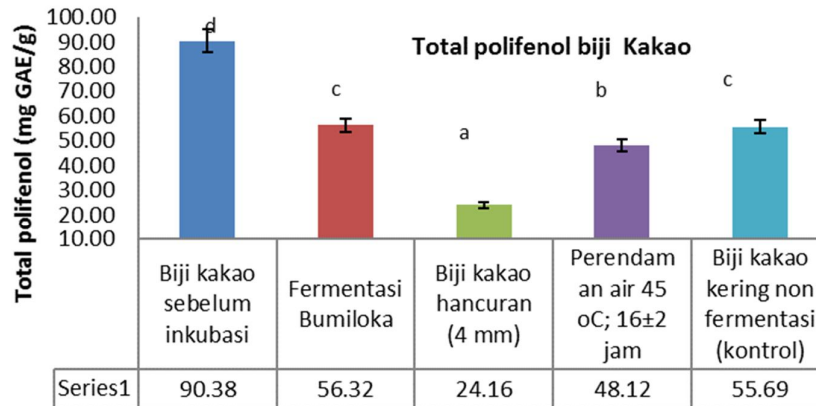
24,16-56,32 mg GAE/g. Perlakuan awal pada inkubasi memberi pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap jumlah total polifenol biji kakao. Perlakuan perendaman air (45°C ; 16 jam) pada biji kakao kering non fermentasi menunjukkan total polifenol lebih banyak jika dibandingkan dengan perlakuan hancuran ($p < 0,05$). Total polifenol dari perlakuan perendaman adalah 48,12 mg GAE/g sedangkan perlakuan hancuran adalah 24,16 mg GAE/g. Total polifenol biji kakao fermentasi konvensional dari Bumiloka tidak berbeda dengan biji kakao kering non fermentasi (kontrol) hasil inkubasi buffer asetat. (55,69 mg GAE/g).

Selama proses inkubasi asam asetat terdifusi kedalam vacuola sel biji kakao. Difusi asam asetat menyebabkan kerusakan struktur sel sehingga ada kemungkinan kontak antara substrat polifenol dengan enzim polifenol oksidase menyebabkan oksidasi polifenol secara cepat. Oksidasi polifenol pada kakao akan dihasilkan warna khas cokelat dan menghilangkan rasa sepat dan pahit pada produk cokelat (Hansen et al., 1998). Berbedanya nilai total polifenol antara perlakuan perendaman air (45°C ; 16 jam) dengan tanpa perendaman air (kontrol) kemungkinan besar karena aktivitas enzim polifenol oksidase. Hal ini didukung Misnawi et al. (2002b), bahwa pada biji kakao kering masih terdapat aktivitas enzim yang tersisa. Sedangkan pada perlakuan hancuran dikarenakan adanya polifenol terlarut dalam medium asam. Aktivitas enzim pada biji kakao kering non fermentasi sangat rendah dan cenderung inaktif. Proses perendaman air suhu 45°C akan mengaktifkan enzim yang tersisa pada biji kakao kering. Polifenol oksidasae memiliki suhu optimum pada suhu 45°C (Misnawi, 2008).

Data \pm Std dari tiga kali ulangan. Inkubasi pada medium buffer asetat suhu 41°C . Tahap I: asam asetat pH 2,7; 600 mM. Tahap II: asam asetat pH 5,5; 600 mM. Indeks fermentasi diukur pada biji kakao setelah pengeringan pada pengering kabinet suhu 55°C ; sirkulasi udara 12,5 m/s; selama 4 hari.

Tabel 2. Indeks Warna Fermentasi Terhadap Perlakuan Biji Kakao pada Inkubasi Asam Asetat.

Perlakuan awal biji	Abs 460 nm	Abs 530 nm	Indeks Fermentasi (Rasio 460/530 nm)
Perendaman air 45°C ; 16 ± 2 jam	0,38	0,37	$1,04 \pm 0,02^b$
Biji kakao hancuran (4 mm)	0,23	0,15	$1,54 \pm 0,15^c$
Biji kakao kering non fermentasi (Kontrol)	0,45	0,39	$1,15 \pm 0,12^b$
Biji kakao non fermentasi sebelum inkubasi	0,80	2,24	$0,36 \pm 0,05^a$



Gambar 2. Perbandingan total polifenol (mg GAE/g) biji kakao fermentasi konvensional dengan hasil inkubasi buffer asetat. Inkubasi pada suhu 41°C. Tahap I: buffer asetat pH 2,7; 600 mM. Tahap II: buffer asetat pH 5,5; 600 mM. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata $p < 0,05$ pada uji DMRT

4. SIMPULAN

Perlakuan awal sebelum inkubasi buffer asetat berpengaruh terhadap perubahan nilai pH biji, indeks fermentasi, perubahan spektra UV-vis, dan total polifenol biji. Perlakuan awal biji kakao kering non fermentasi bentuk hancuran dihasilkan nilai pH, perubahan spektral, dan total polifenol yang lebih rendah jika dibandingkan dengan perlakuan perendaman air (45°C; 16 jam). Secara keseluruhan nilai indeks warna fermentasi dari semua perlakuan diatas nilai 1 yang setara dengan indeks warna fermentasi biji kakao fermentasi.

5. REKOMENDASI

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui deskripsi sensoris produk cokelat dan banyaknya profil senyawa aroma yang terbentuk pada produk cokelat gelap yang berasal dari biji kakao kering non fermentasi hasil inkubasi buffer asetat.

6. DAFTAR PUSTAKA

Biehl B., and Passern D. 1982. "Proteolysis during Fermentation-like Incubation of Cocoa Seeds". *J. Sci. Fd Agric.* 33.1280-1290.

Biehl B., Wewetzer C., and Passern D. 1982. "Vacuolar (Storage) Proteins of Cocoa Seeds and their Degradation during Germination and Fermentation". *J. Sci. Fd Agric.* 33.1291-1340.

Biehl B., Brunner E., Passern D., Quesnel V. C. and Adomako D. 1985. "Acidification, Proteolysis and Flavour Potential in Fermenting Cocoa Beans". *J. Sci. Fd Agric.* 36.583-598.

Hansen C. E., del Olmo M., and Burri C., 1998. "Enzyme activities in cocoa beans during fermentation". *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 77(2).273-281.

Haryadi dan Supriyanto. 2012. "Teknologi kakao". dalam buku: *Teknologi Cokelat* (p.56). Cetakan pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Hashim P., Selamat J., Syed Muhammad S. K. and Ali A., 1998. "Effect of mass and turning time on free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation". *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 78(4).543-550.

Jinap S., and Dimick, P. S. 1990. "Acidic Characteristics of Fermented and Dried Cocoa Beans from Different Countries of Origin". *Journal of Food Science.* 55(2). 547.

Jinap S., Dimick P. S., and Hollender R., 1995. "Flavour evaluation of chocolate formulated from cocoa beans from different countries". *Food Control.* 6(2). 105-110.

Jinap S., Ikrawan Y., Bakar J., Saari N., and Lioe H. N. 2008. "Aroma Precursors and Methylpyrazines in Underfermented Cocoa Beans Induced by Endogenous Carboxypeptidase". *J Food Sci.* 73(7). H141-H147.

Kim H., and Keeney P. G. 1983. "Method of Analysis for (-)-Epicatechin in Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography". *J Food Sci.* 48.548-551.

Kirchhoff P.-M., Biehl B., and Crone G. 1989. "Peculiarity of the Accumulation of Free Amino Acids during Cocoa Fermentation". *Food Chemistry.* 31.295-311.

Misnawi, Selamat J., Bakar J., and Saari N. 2002a. "Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa

- polyphenol oxidase and tyrosinase". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(5). 559-566.
- Misnawi, Jinap S., Nazamid S., and Jamilah B. 2002b. "Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation". *Food Chemistry*. 78.407-417.
- Misnawi, Jinap S., Jamilah B., and Nazamid S. 2003. "Effects of incubation and polyphenol oxidase enrichment on colour, fermentation index, procyanidins and astringency of unfermented and partly fermented cocoa beans". *International Journal of Food Science & Technology*. 38. 285-295.
- Misnawi. 2008. "Physico chemical changes during cocoa fermentation and key enzyme involved". *Review Penelitian kopi dan kakao*. 24(1). 54-71.
- Nazaruddin R., Seng L. K., Hassan O., and Said M., 2006. "Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation". *Industrial Crops and Products*. 24(1).87-94.
- Noor-Soffalina S. S., Jinap S., Nazamid S., and Nazimah S. A. H., 2009. "Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system". *International Journal of Food Science & Technology*. 44(1).168-180.
- Rohan T. A., 1964. "The precursors of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans". *J Food Sci*. 456-459.
- Romero-Cortes T., Salgado-Cervantes M. A., García-Alamilla P., García-Alvarado M. A., Rodríguez-Jimenes C. G., Hidalgo-Morales M., and Robles-Olvera V., 2013. "Relationship between fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(10). 2596-2604.
- Stark T., Bareuther S., and Hofmann T., 2005. "Sensory-Guided Decomposition of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) and Structure Determination of Taste-Active Polyphenols". *J Agric Food Chem*. 53(13). 5407-5418.
- Tomas-Barberán F. A., Cienfuegos-Jovellanos E., Marín, A., Muguera B., Gil-Izquierdo A., Cerdá B., Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Ibarra A., Pasamar M. A., Ramón D., and Espín, J. C., 2007. "A New Process To Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans". *J Agric Food Chem*. 55(10). 3926-3935.
- Wollgast J. and Anklam E., 2000. "Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification". *Food Research International*. 33(6). 423-447.
- World Cocoa Foundation, 2014. "Cocoa Market Update". <http://www.worldcocoa.org>. Diakses: 15-12-2015