

## PENINGKATAN KUALITAS BIJI KAKAO NON FERMENTASI MELALUI PERLAKUAN PENDAHULUAN SEBELUM INKUBASI

### QUALITY IMPROVEMENT OF NON FERMENTED COCOA BEAN THROUGH PRE-INCUBATION TREATMENTS

\* M. Iqbal Prawira Atmaja<sup>1)</sup>, Haryadi<sup>2)</sup>, dan Supriyanto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Mahasiswa Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada

<sup>2)</sup> Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada

Jalan Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281 Indonesia

\* [iqbalprawira@mail.ugm.ac.id](mailto:iqbalprawira@mail.ugm.ac.id)

(Tanggal diterima: 10 Desember 2015, direvisi: 5 Januari 2016, disetujui terbit: 18 Maret 2016)

#### ABSTRAK

Biji kakao yang dihasilkan petani di Indonesia sebagian besar non fermentasi sehingga rasa dan aromanya kurang baik. Inkubasi biji kakao dalam medium *buffer* asetat terbukti dapat memperbaiki kualitas biji kakao kering non fermentasi. Perlakuan pendahuluan biji kakao non fermentasi dengan perlakuan fisik, seperti perendaman dan pemecahan biji sebelum diinkubasi dalam *buffer* asetat, diharapkan dapat lebih meningkatkan kualitas biji (indeks fermentasi dan polifenol). Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh perlakuan pendahuluan biji kakao kering non fermentasi sebelum diinkubasi dalam medium *buffer* asetat terhadap indeks fermentasi dan kadar total polifenol. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan dan Laboratorium Kimia, Biokimia Pangan, dan Hasil Pertanian, Universitas Gadjah Mada, mulai bulan April sampai Desember 2013. Penelitian menggunakan tiga perlakuan, yaitu biji hancuran ukuran 4 mm, biji utuh direndam dalam air (45°C; 16 jam), dan biji utuh tanpa perendaman (kontrol). Inkubasi dilakukan dengan dua tahap, 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 hancuran pada biji kakao kering non fermentasi sebelum inkubasi dapat meningkatkan nilai indeks fermentasi biji dari 1,15 menjadi 1,54 dan menurunkan kadar total polifenol dari 55,69 menjadi 24,16 mg GAE/g.

**Kata kunci:** Kakao, non fermentasi, *buffer* asetat, indeks fermentasi, kadar polifenol

#### ABSTRACT

The cocoa beans produced by farmers in Indonesia are mostly non fermented with unfavourable taste and flavour. Incubating the cocoa beans in acetate buffer medium has been shown to improve the quality of non fermented dried cocoa beans. Pre-incubation treatments of non fermented cocoa beans by physical treatments such as soaking and crushing them prior to the incubation in acetate buffer is expected to improve the beans quality (i.e. fermentation index and polyphenol). The aim of the research was to determine the effect of pre-incubation treatment of non fermented dried cocoa beans in acetate buffer medium on fermentation index and total polyphenols content. The research was carried out in Process Engineering Laboratory, Food Chemical and Biochemical Laboratory, and Postharvest Technology Laboratory at Gadjah Mada University from April to December 2013. The research used three treatments, first: the crushed beans size 4 mm, whole beans soaked in water (45°C; 16 hours), and beans without soaking (control). The incubation was performed in two stages, the first stage was in the acetate buffer medium at pH 2.7; 600 mM for 24 hours, then subsequently at pH 5.5; 600 mM for 12 hours. The results showed that crushed bean treatment of non fermented cocoa beans prior to incubation increased the fermentation index values, from 1.15 to 1.54 and decreased total polyphenol content from 55.69 to 24.16 mg GAE/g.

**Keywords:** Cocoa, non fermented, acetate buffer, fermentation index, total polyphenol

## PENDAHULUAN

Produk kakao Indonesia sebagian besar dihasilkan oleh perkebunan rakyat, hanya sedikit oleh perkebunan swasta dan perkebunan milik negara (Neilson, 2007). Kelemahan dari produk biji kakao kering yang dihasilkan oleh petani adalah tingkat keasaman rendah, kadar biji *slaty* relatif tinggi, dan citarasa khas kakao yang lemah karena tidak terbentuknya prekursor citarasa. Hal itu terjadi karena petani umumnya tidak melakukan fermentasi biji kakao, melainkan langsung menjemurnya setelah dipisahkan dari kulit buah (Hashim, Selamat, Syed Muhammad, & Ali, 1998; Misnawi, Jinap, Jamilah, & Nazamid, 2003; Putra, Wartini, & Anggreni, 2010).

Fermentasi merupakan tahapan penting dalam pengolahan biji kakao. Selama proses fermentasi, lapisan *pulp* kaya gula yang melapisi biji kakao diubah menjadi etanol, asam asetat, dan asam laktat melalui proses fermentasi oleh kapang, bakteri asam asetat, dan bakteri asam laktat (Ardhana & Fleet, 2003; Schwan & Wheals, 2004). Kondisi tersebut memicu difusi asam ke dalam biji dan terjadinya peningkatan suhu hingga 50°C sehingga menyebabkan kematian biji kakao dan membran selnya menjadi *permeable* (Fowler, 2009). Selain itu, selama fermentasi dihasilkan komponen volatil dan non volatil (Jinap & Dimick, 1990; Rodriguez-Campos, Escalona-Buendía, Orozco-Avila, Lugo Cervantes, & Jaramillo-Flores, 2011; Rodriguez-Campos *et al.*, 2012).

Dalam proses fermentasi, bakteri asam asetat memegang peranan penting dalam pembentukan senyawa prekursor *flavor* (Giacometti, Jolic, & Josic, 2015). Ketika produksi asam asetat berhenti maka terjadi oksidasi asam asetat yang menyebabkan peningkatan pH menjadi 5. Derajat keasaman pada 3,8 dan 5,8 sangat dibutuhkan untuk kondisi optimal aktivitas *endogenous protease* yang akan memengaruhi degradasi protein biji dan menghasilkan berbagai macam prekursor aroma (Afoakwa, Peterson, Fowler, & Ryan, 2008; Ho, Zhao, & Fleet, 2014).

Untuk meningkatkan kualitas biji kakao kering non fermentasi salah satunya dapat dilakukan dengan cara menginkubasi biji kakao kering di dalam medium *buffer* asetat. Inkubasi biji kakao non fermentasi dalam medium asam terbukti dapat memperbaiki kualitasnya hingga setara dengan biji kakao fermentasi (Biehl, Brunner, Passern, Quesnel, & Adomako, 1985; Misnawi *et al.*, 2003). Hal ini disebabkan selama proses inkubasi dalam medium asam, larutan asam akan terdifusi ke dalam biji kakao basah sehingga terjadi peningkatan berat biji dan menyebabkan kerusakan *subcellular* biji dan *vacuola* protein mengembang (Biehl, Passern, & Sageman, 1981). Perlakuan biji kakao kering

non fermentasi sebelum diinkubasi dalam *buffer* asetat diharapkan dapat mempercepat difusi asam asetat ke dalam biji sehingga kualitasnya meningkat. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh perlakuan biji kakao kering non fermentasi sebelum inkubasi dalam *buffer* asetat terhadap nilai indeks fermentasi dan kadar polifenol.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan dan Laboratorium Kimia, Biokimia Pangan, dan Hasil Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, mulai bulan April sampai Desember 2013.

### Persiapan Biji Kakao

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kakao kering non fermentasi yang diperoleh dari perkebunan PT Pagilaran, Samigaluh, Kabupaten Kulon Progo, Jawa Tengah. Buah kakao dipecah menggunakan kayu untuk diambil bijinya, kemudian dibersihkan dengan air mengalir dan dijemur pada sinar matahari hingga kadar air  $\leq 7\%$  seperti yang dilakukan oleh petani. Biji kakao kering non fermentasi disimpan dalam kemasan plastik vakum pada suhu ruangan.

### Perlakuan Biji Kakao Kering Non Fermentasi sebelum Inkubasi dalam Buffer Asetat

Penelitian menggunakan tiga perlakuan terhadap biji kakao kering non fermentasi, yaitu (1) biji kakao kering dalam bentuk hancuran ukuran 4 mm, (2) biji utuh direndam dalam air, dan (3) biji utuh tanpa perendaman (kontrol). Untuk memperoleh biji kakao hancuran, lapisan *husk* biji kakao kering non fermentasi dikupas hingga bersih. Biji kakao kemudian dihancurkan dengan mortar hingga diperoleh ukuran kira-kira 4 mm. Pada perlakuan perendaman, biji kakao direndam dalam air (45°C; 16 jam) di *waterbath* (Misnawi *et al.*, 2003). Perbandingan biji kakao kering non fermentasi pada perendaman air adalah 30 biji di dalam 100 ml akuades. Setelah perendaman, biji kakao ditiriskan dan langsung dipindahkan ke dalam *buffer* asetat. Sebagai kontrol (pembanding), biji kakao kering non fermentasi langsung diinkubasi pada *buffer* asetat. Tahapan penelitian disajikan pada Gambar 1.

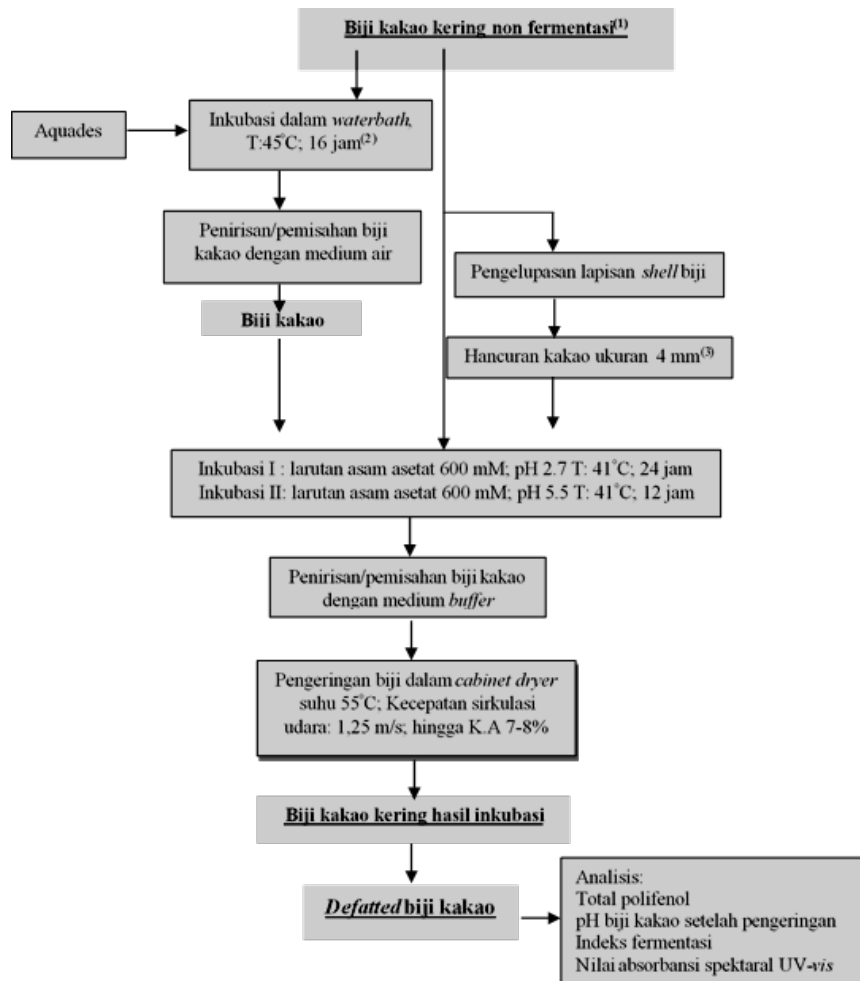
### Inkubasi Biji Kakao dalam Buffer Asetat

Proses inkubasi biji kakao dilakukan dalam 2 tahap, tahap pertama biji diinkubasi dalam *buffer* asetat 600 mM (pH 2,7; 41°C; 24 jam), selanjutnya biji kakao dikeluarkan dari medium *buffer* dan dilanjutkan ke

inkubasi kedua pada medium *buffer* asetat 600 mM (pH 5,5; 41°C; 12 jam) (Bernaert, Camu, & Lochmueller, 2011). Perbandingan biji dan *buffer* asetat yang digunakan adalah 30 biji di dalam 90 ml larutan *buffer*. Khusus perlakuan biji hancuran, perbandingannya adalah 40 g di dalam 90 ml larutan asam. Setelah proses inkubasi, biji kakao selanjutnya dikeringkan menggunakan oven (55°C; kecepatan sirkulasi udara 1,25 m/s) hingga diperoleh kadar air  $\leq 7\%$  (sekitar hari ke-4).

### Penentuan Nilai Absorpsi Spektrum dan Indeks Fermentasi

Metode pengukuran indeks fermentasi mengacu pada Misnawi *et al.* (2003). Sebanyak 0,5 g sampel biji kakao yang telah dihancurkan diekstrak menggunakan 50 ml larutan campuran metanol : HCl (97 : 3). Campuran sampel dengan larutan kemudian dibiarkan homogen di dalam *refrigerator* (8°C) selama 16–19 jam. Filtrat selanjutnya disaring menggunakan kertas *Whatmann* No 1. Absorpsi spektrum diamati pada panjang gelombang 400–700 nm menggunakan UV-*vis* Shimadzu UV-1601 spektrofotometer. Indeks fermentasi dihitung berdasarkan rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 460 nm dengan absorbansi 530 nm ( $IF = A_{460} / A_{530}$ ).



Gambar 1. Diagram alir tahapan penelitian  
Figure 1. Research flowchart

### Analisis Total Polifenol

Pengukuran total polifenol mengacu pada metode *Folin-Ciocalteu* yang dilakukan oleh Noor-Soffalina, Jinap, Nazamid, & Nazimah (2009). Serbuk kakao bebas lemak sebanyak 500 mg dicampurkan ke dalam 80 ml *aqueous acetone* 80% kemudian disonikasi selama 30 menit pada kondisi dingin melalui penambahan es batu ke dalam wadah sonikator. Campuran kemudian disaring menggunakan kertas saring *Whatmann* No. 1 hingga didapatkan ekstrak yang bersih. Residu dan *glassware* dibilas dengan aseton 80% hingga diperoleh volume 100 ml. Sebanyak 1 ml ekstrak dipipet ke dalam 10 ml labu ukur dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 7 ml. Ekstrak polifenol kemudian direaksikan dengan 0,5 ml *reagent Folin-Ciocalteu* (1:1 air) dan dibiarkan selama 2–3 menit, selanjutnya ditambahkan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}$  15% (15 g dilarutkan dengan akuades) untuk menstabilkan pembentukan warna biru. Pembentukan warna biru disebabkan reaksi spesifik polifenol dengan reagen Folin. Sampel uji disimpan selama 2 jam pada ruang gelap, selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada 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 1–100 mg/L (ppm). Sebagai pembanding nilai total polifenol digunakan biji kakao hasil fermentasi dari PT. Bumiloka, Jawa Barat.

### Pengukuran Nilai pH Biji Kakao

Pengukuran nilai pH biji kakao berdasarkan metode Jinap, Ikrawan, Bakar, Saari, & Lioe (2008). Biji kakao sebanyak 5 g yang telah dihaluskan dengan mortar dimasukkan ke dalam erlenmeyer 150 ml, kemudian ditambahkan 45 ml akuades dan diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 10 menit. Selanjutnya, suspensi sampel disentrifugasi selama 10 menit dan dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring *Whatmann* No. 4. Larutan didinginkan hingga suhu  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , kemudian diukur nilai pH-nya menggunakan pH meter yang terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan *buffer* pH 4 dan 7.

### Penghilangan Lemak (*Defatting*) Biji Kakao

Penghilangan lemak biji kakao mengacu pada Jinap *et al.* (2010) menggunakan metode *soxhlet* dengan pelarut *petroleum eter* (*b.p.*  $40^\circ\text{C}$ – $60^\circ\text{C}$ ). Sebanyak 10 gram biji kakao yang telah dihancurkan hingga berukuran 0,3 mm dimasukkan ke dalam kertas saring kemudian ke dalam *soxhlet apparatus* dan diekstraksi selama 8 jam. Sampel *defatting* diletakkan di ruang terbuka selama 24 jam untuk menguapkan pelarut yang

tersisa, selanjutnya dihancurkan menjadi serbuk bebas lemak menggunakan *blender*. Sampel tersebut digunakan untuk analisis total polifenol.

### Analisis Data

Data hasil uji yang diperoleh dianalisis *one way ANOVA* menggunakan program *IBM® SPSS® Statistic* 23. Jika terdapat perbedaan pengaruh yang nyata pada variabel bebas maka dilanjutkan dengan uji *Duncan* (DMRT).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Nilai pH Biji Kakao Selama Inkubasi dan Pengerangan

Nilai pH merupakan parameter penting untuk menentukan tingkat keasaman biji kakao fermentasi. Perubahan nilai pH diamati pada setiap tahap inkubasi (12 dan 24 jam), dan setelah pengeringan. Biji kakao kering tanpa fermentasi sebelum diinkubasi memiliki pH 6,12. Pada tahap awal inkubasi, semua perlakuan mengalami penurunan pH (3,48–3,96). Inkubasi tahap kedua mengakibatkan peningkatan pH biji kakao dibandingkan dengan inkubasi tahap pertama hingga 4,35–4,55 (Tabel 1). Penurunan nilai pH disebabkan asam asetat terdifusi ke dalam lapisan biji kakao sehingga terjadi proses asidifikasi. Asam yang terdifusi ke dalam dinding sel akan menyebabkan kematian sel biji kakao (Biehl *et al.*, 1985; Kirchoff, Biehl, & Crone, 1989).

Perlakuan hancuran biji kakao pada tahap inkubasi I memiliki nilai pH paling rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan perbedaan kecepatan difusi asam ke dalam kotiledon. Bentuk hancuran menyebabkan luas permukaan biji yang kontak dengan asam asetat lebih besar sehingga berpengaruh terhadap kecepatan penetrasi asam asetat (Biehl & Passern, 1982). Pada tahap inkubasi II (akhir proses inkubasi) dan setelah pengeringan, nilai pH pada perlakuan hancuran biji justru paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal tersebut terjadi karena selama proses pengeringan senyawa asam volatil menguap bersama dengan menguapnya air (Jinap, Dimick, & Hollender, 1995). Selain itu, selama pengeringan udara dari luar akan masuk melalui kulit biji sehingga cairan sel yang terdapat di bawah kulit biji menguap dan secara perlahan kotiledon akan berubah menjadi cokelat. Pencokelatan adalah reaksi oksidasi senyawa polifenol dengan bantuan udara dan *polifenol oksidase* (Haryadi & Supriyanto, 2012).

Tabel 1. Perubahan nilai pH biji kakao selama inkubasi *buffer* asetat dan setelah pengeringan  
Table 1. Changes in pH value of cocoa beans during incubation in acetate buffer and after drying

Perlakuan pada biji kakao kering non fermentasi	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)	
Biji utuh dengan perendaman air 45°C; 16 jam	3,90 ± 0,17 b	4,35 ± 0,16 a	4,81 ± 0,12 a
Biji hancuran 4 mm tanpa perendaman	3,48 ± 0,14 a	4,55 ± 0,12 b	5,68 ± 0,28 b
Biji utuh tanpa perendaman air (kontrol)	3,96 ± 0,26 b	4,39 ± 0,19 a	4,65 ± 0,09 a

Keterangan : Nilai pH biji kering non fermentasi sebelum inkubasi = 6,12. Inkubasi dalam 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%.  
Notes : pH value of non fermented dried cocoa beans before incubation = 6.12. Incubation in acetate buffer medium at 41°C. Beans dehydrated in the cabinet dryer at 55°C; air circulation at 12.5m/s; water content of dried beans 7%–8%.

Apabila dimasukkan ke dalam 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 tinggi, disertai dengan tingginya konsentrasi asam asetat dan asam sitrat. Tingkat keasaman berpengaruh terhadap karakteristik citarasa dan aroma produk cokelat yang dihasilkan. Biji kakao dengan pH 5,0–5,5 menghasilkan potensi aroma lebih tinggi jika dibandingkan dengan pH 4,0–4,5 yang memberikan aroma lebih rendah (Biehl *et al.*, 1985; Afoakwa *et al.*, 2011; Ofoosu-Ansah *et al.*, 2013).

### Indeks Fermentasi dan Spektrum UV-vis Biji Kakao Hasil Inkubasi *Buffer* Asetat

Indeks fermentasi merupakan parameter untuk mengukur derajat fermentasi biji kakao dengan cara mengukur perubahan warna dari ungu menjadi cokelat. Selain itu, indeks fermentasi secara tidak langsung dapat digunakan sebagai alat pengukur kandungan antosianin pada biji kakao. Antosianin merupakan salah satu komponen utama polifenol biji kakao yang pada kondisi asam menghasilkan warna merah hingga ungu dengan absorbansi maksimum pada 500–550 nm (Misnawi *et*

*al.*, 2003). Biji kakao hasil fermentasi konvensional memiliki indeks fermentasi ≥ 1 disebabkan oleh pembentukan warna cokelat-kuning hasil oksidasi polifenol (Misnawi *et al.*, 2003; Nazaruddin, Seng, Hassan, & Said, 2006).

Proses inkubasi dalam medium *buffer* asetat berperan dalam perubahan indeks fermentasi biji kakao. Tabel 2 menunjukkan biji kakao kering non fermentasi memiliki indeks fermentasi 0,36; sedangkan biji kakao hasil inkubasi memiliki nilai indeks fermentasi 1,04–1,54. 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) dibandingkan dengan perlakuan perendaman air dan kontrol.

Antosianin merupakan komponen polifenol yang memberikan warna ungu pada biji kakao. Hal itulah yang menyebabkan nilai indeks fermentasi biji kakao kering non fermentasi lebih kecil dari 1. Selama inkubasi biji kakao dalam *buffer* asetat, antosianin akan terhidrolisis menjadi antosianidin (Wollgast & Anklam, 2000). Selama pengeringan biji kakao, jumlah polifenol akan berkurang akibat pencokelatan enzim yang dikatalisis oleh *polifenol oksidase* dan akan terdifusi keluar dari biji (Kim & Keeney, 1983).

Tabel 2. Indeks warna fermentasi pada perlakuan inkubasi biji kakao kering non fermentasi  
Table 2. Fermentation colour index of non fermented dried cocoa bean during treatment

Perlakuan pada biji kakao kering non fermentasi	Abs 460 nm	Abs 530 nm	Indeks fermentasi (Rasio 460/530 nm)
Biji utuh perendaman air 45°C; 16 jam	0,38	0,37	1,04 ± 0,02 b
Biji hancuran 4 mm tanpa perendaman	0,23	0,15	1,54 ± 0,15 a
Biji utuh tanpa perendaman (kontrol)	0,45	0,39	1,15 ± 0,12 b

Keterangan : Data ± 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 (55°C; sirkulasi udara 12,5 m/s; 4 hari).

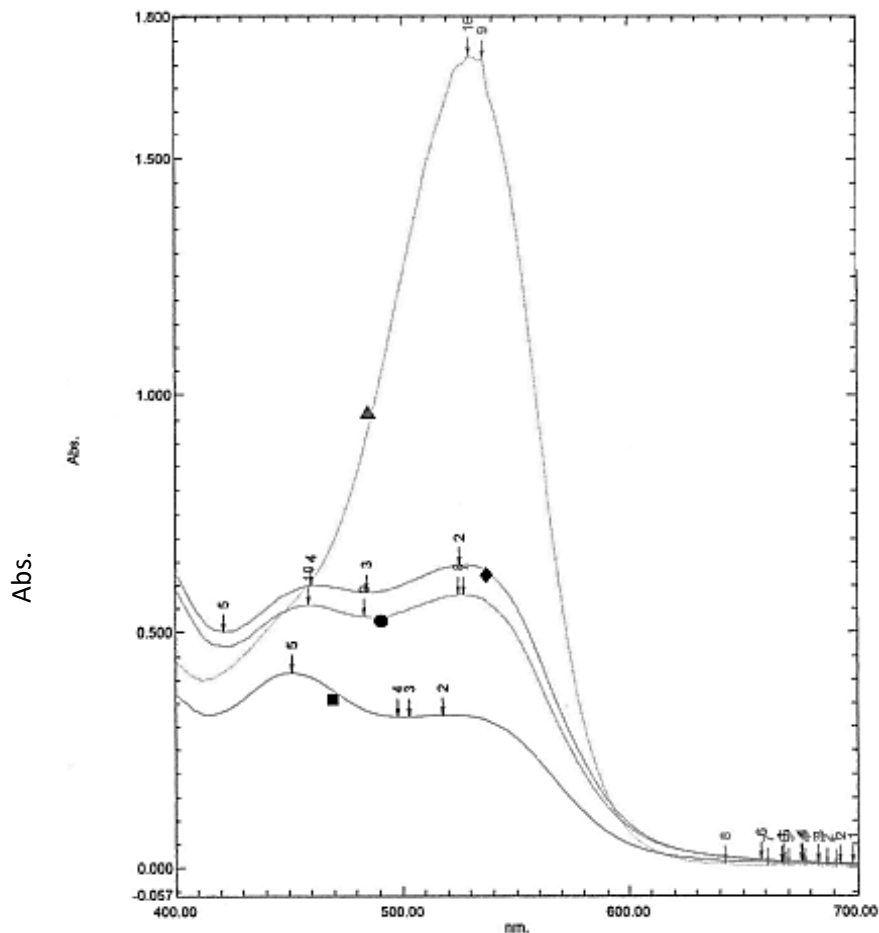
Notes : Data ± Std from three replications. Incubation in acetate buffer medium at 41°C. Phase I: acetate acid pH 2.7; 600mM. Phase II: acetate acid pH 5.5; 600mM. Fermentation index measured after beans dehydration in cabinet dryer (55°C; air circulation at 12.5m/s; 4 days).

Selain itu, asam asetat juga berperan dalam mengaktivasi enzim *polifenol oksidase* yang akan membantu oksidasi pada biji kakao kering sehingga biji menjadi warna coklat. Hansen, del Olmo, & Burri, (1998) dan Misnawi, Selamat, Bakar, & Saari (2002a) menyatakan bahwa pada biji kakao kering masih terdapat aktivitas enzim yang tersisa. Aktivitas enzim *polifenol oksidase* pada biji kakao kering rata-rata  $157,49 \pm 58,03$  U/gram (bk) biji kakao dengan aktivitas maksimum 258,22 U/gram (Putra *et al.*, 2010).

Hasil pengukuran spektrum menunjukkan biji kakao kering tanpa fermentasi memiliki titik maksimum absorbansi pada 500–530 nm. Perubahan spektrum UV-vis terhadap masing-masing perlakuan memberikan spektrum grafik yang berbeda-beda. Setelah inkubasi, semua perlakuan biji kakao mengalami penurunan secara nyata pada absorbansi 530 nm. Sebaliknya, pada absorbansi di bawah 500 nm justru mengalami peningkatan. Perlakuan biji kakao dalam bentuk

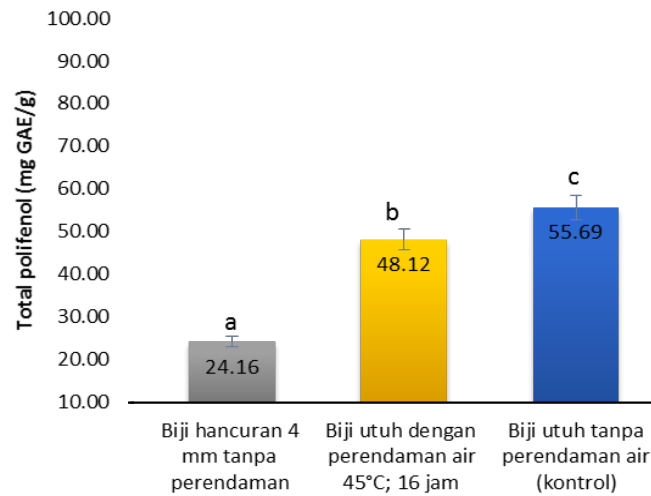
hancuran memiliki absorbansi lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya (Gambar 2). Perubahan kurva spektrum UV-vis biji kakao sebelum dan sesudah fermentasi juga telah dilaporkan oleh Misnawi *et al.* (2003) dan Romero-cortes *et al.* (2013).

Absorbansi 530 nm menunjukkan tingkat keberadaan antosianin pada biji kakao (Misnawi, Jinap, Nazamid, & Jamilah, 2002b). Inkubasi biji kakao pada medium *buffer* asetat menghasilkan penurunan spektrum pada absorbansi 530 nm dan terjadi peningkatan nilai spektrum pada nilai absorbansi di bawah 500 nm. Peningkatan absorbansi di bawah 500 nm kemungkinan besar karena produk oksidasi dari aktivitas *polifenol oksidase* seperti quinon yang terjadi selama proses pengeringan. Quinon merupakan produk hasil oksidasi polifenol yang bersifat sangat reaktif (Kim & Keeney, 1983). Hasil oksidasi polifenol biji kakao bisa dideteksi pada panjang gelombang 460 nm (Romero-cortes *et al.*, 2013).



Gambar 2. Perubahan spektrum UV-vis biji kakao kering non fermentasi sebelum (▲) dan setelah diinkubasi dalam medium *buffer* asetat dengan perlakuan pendahuluan biji hancuran (4 mm) (■), biji utuh direndam air 45°C; 16 jam (◆), dan biji utuh tanpa perendaman (kontrol) (●)

Figure 2. Changes in spectral UV-vis of dried non fermented cacao beans, pre- (▲) and post-incubation in acetate buffer medium with pre-treatments of crushed beans (4 mm) (■), water-soaked beans at 45°C; 16±2 hours (◆), and unsoaked beans (control) (●)



Gambar 3. Nilai total polifenol (mg GAE/g) biji kakao non fermentasi yang diinkubasi dalam medium *buffer* asetat pada tiga perlakuan pendahuluan. Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata pada uji Duncan taraf 5%

Figure 3. Total polyphenols value (mg GAE/g) of non fermented cocoa beans incubated in acetate buffer medium from the three pre-treatments. Different letters showed significantly different according to Duncan test at 5% level

### Total Polifenol Biji Kakao Hasil Inkubasi *Buffer* Asetat

Selama proses inkubasi, asam asetat terdifusi ke dalam vakuola sel biji kakao, menyebabkan kerusakan struktur sel sehingga senyawa polifenol keluar dari sel dan terhidrolisis. Hal ini menyebabkan senyawa katekin teroligomerisasi dan senyawa proantosianidin berubah menjadi bentuk yang lebih kompleks (Biehl & Ziegleder, 2003). Hidrolisis tersebut menyebabkan terjadinya perubahan nilai total polifenol pada biji kakao setelah perlakuan inkubasi. Perubahan polifenol kakao banyak dipengaruhi oleh pengolahan kakao, seperti fermentasi, pengeringan, dan penyangraian. Umumnya proses fermentasi mampu mengurangi total polifenol dari konsentrasi awal hingga 90% sehingga kandungan polifenol pada biji kakao akan berbeda dengan produk turunannya (Kothe *et al.*, 2013).

Biji kakao tanpa fermentasi sebelum diinkubasi memiliki total polifenol sebesar  $90,38 \pm 4,76$  mg GAE/g. Sebagai perbandingan, biji kakao fermentasi kandungan total polifenolnya sebesar 56,32 mg GAE/g, tidak berbeda jauh dengan biji kakao kering non fermentasi yang langsung diinkubasi ke *buffer* asetat, yaitu 55,69 mg GAE/g (Gambar 3). Perlakuan biji kakao kering sebelum dilakukan inkubasi dalam *buffer* asetat memberi pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap jumlah total polifenol biji kakao. Total polifenol pada perlakuan perendaman air dan hancuran dari biji kakao kering non fermentasi lebih rendah dibandingkan dengan yang langsung diinkubasi, yaitu masing-masing 48,12 dan 24,16 mg GAE/g.

### KESIMPULAN

Perlakuan pendahuluan sebelum inkubasi biji kakao non fermentasi dalam medium *buffer* asetat berpengaruh terhadap pH, indeks fermentasi, dan total polifenol. Nilai pH biji kakao setelah inkubasi pada perlakuan pendahuluan biji hancuran (5,68) lebih tinggi dibandingkan dengan biji direndam air (4,81) dan tanpa perendaman (4,65). Selain itu, perlakuan pendahuluan biji hancuran menyebabkan nilai indeks fermentasi meningkat dari 1,15 menjadi 1,54 dan nilai total polifenol menurun dari 55,69 menjadi 24,16. Dengan demikian, biji kakao hancuran merupakan perlakuan pendahuluan sebelum inkubasi terbaik untuk meningkatkan kualitas biji kakao non fermentasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada direksi dan karyawan PT Pagilaran atas bantuan tempat dan sampel biji kakao selama penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Susanto Purwo atas bantuan sampel lemak kakao serta biji kakao Ghana dan Bumiloka.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afoakwa, E.O., Peterson, A., Fowler, M., & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: A critical review. *Crit Rev Food Sci. Nutr.*, 48, 840–857.
- Afoakwa, E. O., Quao, J., Budu, A. S., Takrama, J., & Saalia, F. K. (2011). Effect of pulp preconditioning on acidification, proteolysis, sugars and free fatty acids concentration during fermentation of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 755–764. doi: 10.3109/09637486.2011.581224.
- Ardhana, M. M., & Fleet, G. H. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 87–99.
- Bernaert, H., Camu, N., & Lochmueller, T. (2011). *Method for processing cocoa beans*. US Patent No. 2011/0064849A1.
- Biehl, B., Passern, D., & Sageman, W. (1981). Effect of acetic acid on subcellular structure of cocoa bean cotyledon. *J.Sci. food. Agric.*, 33, 1101–1109.
- Biehl, B., & Passern, D. (1982). Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. *J. Sci. Fd Agric.*, 33, 1280–1290.
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnel, V. C., & Adomako, D. (1985). Acidification, proteolysis, and flavour potential in fermenting cocoa beans. *J. Sci. Fd Agric.*, 36, 583–598.
- Biehl, B., & Ziegleder, G. (2003). Cocoa: Chemistry of processing, 2nd edition. In B. Caballero, L. Trugo, P. M. Finglas (Eds), *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (pp. 1436–48). New York: Academic Press.
- Fowler, M.S. (2009). Cocoa beans: From tree to factory, 4th. In Beckett, S.T. (Ed), *Industrial chocolate manufacture and use* (pp.10–47). York, UK: Wiley Blackwell.
- Giacometti, J., Jolic, S.M., & Josic, D. (2015). Cocoa processing and impact on composition. In Preedy, V.R. (Ed), *Processing and impact on active components in food* (p. 605–12). London/Waltham/San Diego: Academic Press.
- Hansen, C. E., del Olmo, M., & Burri, C. (1998). Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(2), 273–281.
- Haryadi, & Supriyanto. (2012). Teknologi kakao. In *Teknologi coklat* (p. 56). Cetakan pertama. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Hashim, P., Selamat, J., Syed Muhammad, S. K., & 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.
- Ho, V.T.T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *Int J Food Microbiol.*, 174, 72–87.
- Jinap, S., & Dimick, P. S. (1990). Acidic characteristics of fermented and dried cocoa beans from different countries of origin. *Jurnal of Food Science*, 55(2), 547.
- Jinap, S., Dimick, P. S., & 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., & Lioe, H. N. (2008). Aroma precursors and methylpyrazines in underfermented cocoa beans induced by endogenous carboxypeptidase. *J. Food Sci.*, 73(7), 141–147.
- Jinap, S., Lioe, H., Yusep, I., Nazamid, S., & Jamilah, B. (2010). Role of carboxypeptidases to the free amino acid composition, methylpyrazine formation and sensory characteristic of under-fermented cocoa beans. *International Food Research Journal*, 17, 763–774.
- Kim, H., & 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., & Crone, G. (1989). Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation. *Food Chemistry*, 31, 295–311.
- Kothe, L., Zimmermann, B.F., & Galensa, R. (2013). Temperature influences epimerization and composition of flavanol monomers, dimers, and trimers during cocoa bean roasting. *Food Chem.*, 141, 3656–63.
- Misnawi, Selamat, J., Bakar, J., & 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., & 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., & 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.



- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & 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.
- Neilson, J. (2007). Global markets, farmers and the state: Sustaining profits in the Indonesian cocoa sector. *Bulletin of Indonesian Economic Studies*, 43(2), 227–250.
- Noor-Soffalina, S. S., Jinap, S., Nazamid, S., & 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.
- Ofosu-Ansah, E., Budu, A. S., Mensah-Brown, H., Takrama, J. F., & Afoakwa, E. O. (2013). Changes in nib acidity, proteolysis and sugar concentration as influenced by pod storage and roasting conditions of fermented cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Journal of Food Science and Engineering*, 3(12), 635.
- Putra, G.P.G., Wartini, N.M., & Anggreni, A.A.M. (2010). Karakterisasi enzim polifenol oksidase biji kakao (*Theobroma cacao* Linn.). *AGRITECH*, 30(30), 152–157.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Orozco-Avila, I., Lugo Cervantes, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2011). Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. *Food Research International*, 44, 250–258.
- Rodriguez-Campos, J., Escalona-Buendía, H. B., Contreras-Ramos, S. M., Orozco-Avila, I., Jaramillo-Flores, E., & Lugo-Cervantes, E. (2012). Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1), 277–288.
- Romero-Cortes, T., Salgado-Cervantes, M. A., García-Alamilla, P., García-Alvarado, M. A., del C Rodríguez-Jimenes, G., Hidalgo-Morales, M., ... 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. doi: 10.1002/jsfa.6088
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Review in food science and Nutrition*, 4, 205–221.
- Wollgast, J., & 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*. Retrieved from <http://www.worldcocoa.org/>.

