DISERTASI

FERMENTASI BIJI KAKAO KERING TERKENDALI MENGGUNAKAN INOKULUM MIKROBIA

MULONO APRIYANTO
11/324227/STP/0149

**PROGRAM STUDI ILMU PANGAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA**

2016

DISERTASI

FERMENTASI BIJI KAKAO KERING TERKENDALI MENGGUNAKAN INOKULUM MIKROBIA

Untuk memenuhi sebagian persyaratan
untuk mencapai derajat Sarjana S3
Program Studi Ilmu Pangan
Fakultas Teknologi Pertanian

Diajukan Oleh :

MULONO APRIYANTO
11/324227/STP/0149

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA**

2016

HALAMAN PENGESAHAN

**FERMENTASI BIJI KAKAO KERING TERKENDALI
MENGUNAKAN INOKULUM MIKROBIA**

**DISERTASI
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU PANGAN**

Telah dipertanggung jawabkan dan diuji oleh Dewan Penguji serta disetujui dan
disahkan sebagai syarat kelengkapan studi jenjang strata tiga (S-3)
Program Studi Ilmu Pangan Fakultas Teknologi Pertanian UGM
Pada tanggal 25 Juli 2016

Oleh
MULONO APRIYANTO
11/324227/STP/0149

Disetujui oleh tim promotor

Tanda tangan dan tanggal

1, Prof. Dr. Ir. Sutardi., M.App.Sc
Promotor

2. Prof. Dr. Ir. Supriyanto, M.S
Ko-Promotor

3. Prof. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc
Ko-Promotor

Mengetahui :

Dekan/Penanggung jawab Program Studi Ilmu Pangan
Program Pasca Sarjana Fakultas Teknologi Pertanian UGM

Pada Tanggal :

Prof. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Kehadirat Allah SWT atas segala limpahan Hidayah dan RahmatNya karena dengan kebesaran-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi dengan judul “Fermentasi Biji Kakao Kering Terkendali Menggunakan Inokulum Mikrobial”

Tujuan penulisan disertasi ini adalah untuk memenuhi sebagian persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Strata 3 pada Program Doktor Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Dengan setulus hati, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada
2. Dr. Ir. Retno Indrati, MSc selaku pengelola Program Studi S-3 Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada
3. Prof. Dr. Ir. Sutardi, M.AppSc. selaku Promotor yang telah meluangkan waktu memberikan bimbingan, arahan serta diskusi selama penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai penulisan disertasi.
4. Prof. Dr. Ir. Supriyanto MS. selaku Ko-promotor yang telah meluangkan waktu memberikan bimbingan, arahan serta diskusi selama penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai penulisan disertasi.
5. Prof. Dr. Ir. Eni Harmayani, M.Sc. selaku ko-promotor yang telah meluangkan waktu memberikan bimbingan, arahan serta diskusi selama penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian sampai penulisan disertasi.
6. Prof. Dr. Ir. Purnama Darmadji, M,Sc selaku Ketua Tim Penilai yang telah memberikan koreksi dan masukan untuk penyempurnaan penyusunan disertasi
7. Prof. Dr. Ir. Endang Sutriswati Rahayu, MS selaku anggota Tim Penilai yang telah memberikan koreksi dan masukan untuk penyempurnaan penyusunan disertasi.

8. Dr. Ria Arismunanto, MSi selaku anggota Tim Penilai yang telah memberikan masukan untuk penyempurnaan penyusunan disertasi.
9. Prof. Dr. Ir. Sri Anggraini, MS selaku Penguji yang telah memberikan masukan untuk penyempurnaan penyusunan disertasi.
10. Prof. Dr. Ir. Harijono, M.App.Sc. selaku Penguji yang telah memberikan masukan untuk penyempurnaan disertasi.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa dalam penulisan disertasi ini masih terdapat banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan disertasi ini. Penulis berharap semoga karya ilmiah dapat berguna bagi semua pihak khususnya bagi pemerhati pangan dan ilmuwan untuk mengembangkan ilmu pengetahuan melalui penelitian lanjut.

Yogyakarta, Oktober 2016

Penulis

Mulono Apriyanto

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Disertasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam Daftar Pustaka.

October 2016

Mulono Apriyanto

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	iv
PERNYATAAN.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR ISTILAH.....	xix
ABSTRAK.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
RINGKASAN.....	xxv
 I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	6
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
1.5. Kebaruan Penelitian.....	8
 II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Buah kakao.....	11
2.1.1. Pulp biji kakao.....	12
2.1.2. Biji kakao.....	13
2.2. Fermentasi.....	15

2.2.1. Tahap fermentasi dibagian luar biji	15
2.2.1.1. Yeast.....	17
2.2.1.2. Bakteri asam laktat	22
2.2.1.3. Bakteri asam asetat.....	25
2.2.2. Degradasi komponen penyusun dalam biji	29
2.3. Fermentasi biji kakao kering	30
2.3.1. Rehidrasi biji kakao kering	31
2.3.2. Substrat yang tersedia.....	31
2.4. Senyawa Calon Pembentuk Cita Rasa	33
2.4.1. Polifenol	33
2.4.2. Asam amino bebas	36
2.4.3. Gula	38
2.5. Pengeringan	39
2.6. Penyangraian	40
2.7. Flavor Biji Kakao	47
2.7.1. Aroma khas biji kakao.....	47
2.7.2. Cita rasa biji kakao	49
2.8. Landasan Teori	51
2.9. Hipotesis.....	55
2.10. Kerangka Penelitian	56
III. METODE PENELITIAN	
3.1. Bahan Penelitian.....	57
3.2. Alat Penelitian	58

3.3. Tempat Penelitian.....	58
3.4. Tahap Penelitian.....	59
3.4.1. Penelitian Tahap I. Identifikasi potensi pulp biji kakao kering sebagai media fermentasi	61
3.4.2. Penelitian Tahap II. Variasi teknik fermentasi dengan penambahan inokulum <i>Saccaromyces. cerevisiae</i> (FNCC 3056), <i>Lactobacillus. lactis</i> (FNC 0086) dan <i>Acotobacter. aceti</i> (FNCC 0016).....	62
3.4.3. Penelitian Tahap III. Evaluasi profil senyawa volatil pasca sangrai	64
3.5. Rancangan Percobaan	65
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Komposisi <i>pulp</i> biji kakao kering	66
4.2. Variasi teknik fermentasi dengan penambahan inokulum <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i>	70
4.3. Evaluasi profil senyawa volatil biji kakao pasca sangrai	101
4.3.1. Analisis senyawa volatil biji kakao kering.....	101
4.3.2. Uji sensori biji kakao kering jemur kering.....	118
4.3.2.1. Uji rasa masam, rasa pahit, rasa sepat dan aroma	118
4.3.2.2. Tingkat kesukaan panelis	121
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	123
5.2. Saran.....	124
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1.1. Kebaruan penelitian dibanding penelitian sebelumnya.....	8
Tabel.2.1. Yeast yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara.....	19
Tabel.2.2. Bakteri asam laktat yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara	23
Tabel 2.3. Bakteri asam asetat yang diisolasi dari fermentasi biji kakao di 5 negara.	28
Tabel 2.4. Asam amino hidropobik bebas (<i>Alanin, Valin, Leusin, Isoleusin, Phenil alanin</i>) sebagai prekursor pembentuk senyawa volatile aldehid, asam, alkohol, ester.	37
Tabel 2.5. Senyawa volatil bij kakao pasca sangrai pada suhu dan lama waktu penyangraian yang berbeda	46
Tabel 2.6. Karakteristik cita rasa dan konsentrasi dalam hasil sangrai biji kakao terfermentasi	48
Tabel 4.1. Perubahan kadar air <i>pulp</i> biji kakao kering sebelum dan setelah rehidrasi yang difermentasi selama 120 jam	66
Tabel 4.2. Komposisi <i>pulp</i> biji kakao segar, biji kakao kering sebelum dan sesudah rehidrasi	68
Tabel 4.3. Populasi <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i> pada <i>pulp</i> biji kakao segar dan <i>pulp</i> biji kakao kering.....	69
Tabel 4.4. Hasil analisis statistik perubahan suhu fermentasi, indeks fermentasi, warna keping biji, pH biji, kadar gula total dan kadar gula reduksi.	71
Tabel 4.5. Hasil analisis statistik populasi <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> , <i>A. aceti</i> , etanol, asam laktat, asam asetat, total polifenol dan asam amino hidrofobik.	84
Tabel 4.6. Kandungan asam amino bebas biji kakao hasil perlakuan kontrol selama fermentasi berturut – turut 72, 96 dan 120 jam (µg/g)	94

Tabel 4.7. Kandungan asam amino bebas biji kakao hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak selama fermentasi berturut – turut 72, 96 dan 120 jam ($\mu\text{g/g}$).....	96
Tabel 4.8. Kandungan asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi berturut – turut 72, 96 dan 120 jam ($\mu\text{g/g}$)	97
Tabel 4.9. Profil senyawa volatil kelompok pirazin setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	103
Tabel 4.10. Profil senyawa volatil kelompok ester setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	105
Tabel 4.11. Profil senyawa volatil kelompok aldehid setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	108
Tabel 4.12. Profil senyawa volatil kelompok alkohol setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	109
Tabel 4.13. Profil senyawa volatil kelompok asam setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	111
Tabel 4.14. Profil senyawa volatil kelompok hidrokarbon setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	113
Tabel 4.15. Profil senyawa volatil kelompok keton setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	115
Tabel 4.16. Profil senyawa volatil kelompok lainnya setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	116
Tabel 4.17. Golongan, jenis, kelompok, jumlah dan total konsentrasi senyawa volatil setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	118

Tabel 4.18. Hasil uji rasa masam, rasa pahit, rasa sepat dan aroma setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap	119
--	-----

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Potongan membujur buah kakao segar jenis foresteri (atas) dan buah kakao matang optimal (Anonim, 2013 ^b).....	11
Gambar 2.2. Biji kakao segar (A) dan bagian sel penyimpan cadangan makanan (B) (Afoakwa, 2010).....	14
Gambar 2.3. Populasi mikrobial dan suksesi mikroba selama fermentasi biji kakao. Yeast (---), bakteri asam laktat (___), bakteri asam asetat (- -), khamir (___), bakteri pembusuk(_ _ _), , angka menunjukkan konsentrasi etanol (1), asam laktat (2) dan asam asetat (3) pada suhu maksimum (Vuyst. <i>et al.</i> , 2010).....	17
Gambar 2.4. Struktur molekul polifenol dalam biji kakao (Beckett, 2009)	35
Gambar 2.5. Pembentukan senyawa Amadori dari glukosa dan asam amino (Beckett. 2009)	41
Gambar 2.6. Pembentukan pirazin dari amino keton (Beckett,2009)	43
Gambar 2.7. Reaksi degradasi Strecker asam amino	43
Gambar 2.8. Model reaksi Mailard pada biji kakao sangrai (Afoakwa <i>et al.</i> 2008).....	44
Gambar 2.9. Skema kerangka penelitian	56
Gambar 3.1. Buah kakao masak optimum yang digunakan untuk penelitian	57
Gambar 3.2. Empat tahapan penelitian fermentasi terkendali biji kakao kering menggunakan inokulum mikrobial.....	60
Gambar 3.3. Alur penelitian tahap 1. Identifikasi potensi pulp biji kakao kering sebagai media fermentasi	61
Gambar 3.4. Alur penelitian tahap 2. Variasi teknik fermentasi dan evaluasi hasil fermentasi tanpa penambahan inokulum dengan penambahan inokulum <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i> secara serentak diawal dan secara bertahap.....	63

Gambar 3.6. Alur penelitian tahap 3. Evaluasi senyawa volatil pasca sangrai biji kakao hasil fermentasi dan pengeringan.....	65
Gambar 4.1. Suhu 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.....	72
Gambar 4.2. Perubahan nilai indeks warna biji kakao 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	73
Gambar 4.3. Persentase populasi biji kakao belah 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.	75
Gambar 4.4. Persentase populasi biji kakao belah berwarna ungu kecoklatan selama fermentasi hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum diawal 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.....	76
Gambar 4.5. Persentase populasi biji kakao belah berwarna coklat 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	76
Gambar 4.6. Warna keping biji kakao kering pasca fermentasi.....	77
Gambar 4.7. pH biji kakao 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	78

Gambar 4.8. Perubahan gula total selama fermentasi biji kakao kering 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	80
Gambar 4.9. Gula reduksi biji kakao 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.	82
Gambar 4.10. Hubungan populasi <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i> terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat biji kakao selama fermentasi 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	85
Gambar 4.11. Hubungan populasi sel <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i> terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat biji kakao selama fermentasi hasil penambahan inokulum serentak diawal. 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	87
Gambar 4.12. Hubungan populasi sel <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i> terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat biji kakao selama fermentasi hasil 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	90
Gambar 4.13. 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.	92

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Prosedur analisa biji kakao kering jemur	
Lampiran 1.1. Kadar air pulp atau kotelidon biji kakao kering jemur metode gravimetri (Sudarmadji <i>et al.</i> , 1997)	137
Lampiran 1.2. Analisis kadar gula pulp dan kadar gula reduksi pulp metode Nelson-Somogy	137
Lampiran 1.3. Analisis pH dan keasaman biji kakao kering dengan metoda Nazaruddin <i>et al.</i> , (2006) dengan sedikit modifikasi	139
Lampiran 1.4. Analisis indeks fermentasi	140
Lampiran 1.5. Analisis warna biji (cut test) metode Mulato <i>et al.</i> , (2008) dengan sedikit modifikasi	140
Lampiran 1.6. Analisis suhu fermentasi selama fermentasi	141
Lampiran 1.7. Analisis total polifenol biji kakao kering jemur hasil fermentasi dengan mengacu metode (Noor-Soffalina <i>et al.</i> , 2009) dengan sedikit modifikasi	141
Lampiran 1.8. Analisis asam amino mengacu metoda Ikrawan <i>et al.</i> (1997) dengan sedikit modifikasi	143
Lampiran 1.9. Penentuan populasi mikroba menggunakan metode <i>pour plate</i> (Kustyawati dan Setyani, 2008)	144
Lampiran 1.10. Analisis senyawa volatil metode Misnawi dan Ariza (2011).....	145
Lampiran 1.11. Konsentrasi asam sitrat, ethanol, asam laktat, dan asam asetat pada <i>pulp</i> dan biji kakao selama fermentasi (Kresnowati <i>et. al.</i> ,2013) dengan sedikit modifikasi	146
Lampiran 1.12. Peremajaan inokulum dan penyiapan inokulum (Ardana dan Fleets, (2003) dengan sedikit modifikasi.....	147
Lampiran 1.13. Form kuisioner uji cita-rasa	150

Lampiran 2. Hasil analisis asam amino bebas, senyawa volatil dan uji statistik parameter mutu biji kakao kering jemur pasca sangrai	
Lampiran 2.1 Hasil analisis asam amino bebas biji kakao kering perlakuan kontrol	152
Lampiran 2.2. Hasil analisis asam amino bebas biji kakao kering perlakuan penambahan inokulum serentak	156
Lampiran 2.3. Hasil analisis asam amino bebas biji kakao perlakuan secara bertahap	160
Lampiran 2.4. Hasil analisis senyawa volatil biji kakao kering perlakuan kontrol setelah sangrai	164
Lampiran 2.5. Hasil analisis senyawa volatil biji kakao perlakuan penambahan inokulum secara serentak setelah sangrai.....	166
Lampiran 2.6. Hasil analisis senyawa volatil biji kakao perlakuan secara bertahap setelah sangrai	169
Lampiran 2.7. Nilai suhu fermentasi biji kakao kering selama fermentasi (°C).....	172
Lampiran 2.8. Nilai pH biji kakao kering selama fermentasi	173
Lampiran 2.9. Nilai polifenol biji kakao kering selama fermentasi (mg asam galat/g)	174
Lampiran 2.10. Kadar gula total biji kakao kering selama fermentasi (%)	175
Lampiran 2.11. Kadar gula reduksi biji kakao kering selama fermentasi (%)	176
Lampiran 2.12. Indeks fermentasi biji kakao kering selama fermentasi.....	177
Lampiran 2.13. Konsentrasi etanol selama fermentasi biji kakao kering (%)	178
Lampiran 2.14. Konsentrasi asam laktat selama fermentasi biji kakao kering (%).....	179
Lampiran 2.15. Konsentrasi asam asetat selama fermentasi biji kakao kering (%).....	180

Lampiran 2.16. Populasi <i>S. cereviciai</i> selama fermentasi biji kakao kering	181
Lampiran 2.17. Populasi <i>L.lactis</i> selama fermentasi biji kakao kering.....	183
Lampiran 2.18. Populasi <i>A. aceti</i> selama fermentasi biji kakao kering	185
Lampiran 2.19. Persentase warna <i>slaty</i> keping biji kakao kering selama fermentasi (%)	187
Lampiran 2.20. Persentase warna ungu keping biji kakao kering selama fermentasi (%)	188
Lampiran 2.21. Persentase warna coklat keping biji kakao kering selama fermentasi (%)	189
Lampiran 2.22. Hasil analisis statistik pengaruh perlakuan kontrol, penambahan inokulum diawal dan secara bertahap terhadap suhu, ph,kosentrasi etanol, asam laktat, asam asetat, polifenol, <i>S.cerevisiae</i> , <i>L.lactis</i> , <i>A. aceti</i> , indeks fermentasi, warna <i>slaty</i> , ungu kecoklatan, coklat, kadar gula total dan kadar gula reduksi.....	190
Lampiran 2.23. Hasil analisis statistik pengaruh perlakuan kontrol, IA dan IB terhadap asam amino hidrofobik	201

DAFTAR ISTILAH

1. Biji kakao kering petani adalah biji kakao segar yang dikeringkan langsung dengan sinar matahari.
2. Biji kakao kering adalah biji kakao segar tanpa fermentasi yang dikeringkan menggunakan pengering tipe kabinet (almari) pada suhu $40^{\circ}\text{C} \pm 0,10$ sampai kadar air $15 \pm 0,1\%$ selanjutnya jenis biji kakao kering ini digunakan sebagai sampel penelitian.
3. Biji kakao kering rehidrasi adalah biji kakao kering yang direndam dalam air jumlah dan cara tertentu.
4. Fermentasi terkendali adalah fermentasi pada suhu yang dikehendaki dengan inokulum mikrobial dalam jumlah yang sudah ditentukan.
5. Suhu fermentasi dikendalikan pada $35^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ untuk 24 jam pertama, $45^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ untuk 24 jam kedua dan $55^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ untuk 24 jam ketiga.
6. Mikrobial yang digunakan terdiri atas yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam cuka.
7. Inokulasi mikrobial diberikan dengan dua cara berbeda: (1) serempak pada awal fermentasi, (2) bertahap, yeast pada awal 24 jam pertama fermentasi; bakteri asam laktat pada awal 24 jam kedua dan bakteri asam cuka pada awal 24 jam ketiga.
8. Perlakuan kontrol (fermentasi spontan) adalah fermentasi biji kakao kering terhidrasi tanpa penambahan inokulum selama 3×24 jam.
9. Warna keping biji kakao pasca fermentasi dibelah membujur dan menghasilkan kategori

- a. *Slaty* adalah warna abu-abu kehitaman
- b. Ungu
- c. coklat

ABSTRAK

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 mikrobial yang terlibat dalam fermentasi biji kakao segar dengan kondisi proses yang sesuai.

Tujuan penelitian adalah: 1) mengetahui komposisi *pulp* biji kakao kering sebagai substrat untuk fermentasi; 2) mengevaluasi pengaruh variasi teknik fermentasi biji kakao kering terhadap parameter mutu biji kakao kering hasil fermentasi; dan 3) mengevaluasi prekursor flavour dan senyawa volatil yang dihasilkan biji kakao hasil fermentasi pasca sangrai. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut: 1) pengujian komposisi dan kadar air *pulp* biji kakao kering sebagai substrat fermentasi; 2) fermentasi biji kakao kering dengan 3 variasi teknik fermentasi; 3) Analisis senyawa volatil biji kakao hasil fermentasi dari tiga perlakuan tersebut. Ketiga variasi teknik fermentasi yaitu tanpa penambahan inokulum (kontrol), perlakuan kedua menggunakan inokulum *Sacharomyces cerevisiae* (FNCC 3056), *Lactobacillus lactis* (FNC 0086) dan *Acetobacter aceti* (FNCC 0016), masing-masing sekitar 10^8 cfu/g diberikan serentak diawal fermentasi (IA) dan perlakuan ketiga, pemberian inokulum secara bertahap yaitu yeast di awal fermentasi, bakteri asam laktat pada jam ke 24 dan bakteri asam asetat pada jam ke 48 dengan populasi mikrobial sama dengan perlakuan kedua (IB). Fermentasi dilaksanakan selama 120 jam. Suhu diatur selama fermentasi, berturut-turut 35 °C (24 jam pertama), 45 °C (24 jam kedua), 55 °C (24 jam ketiga) dan 35 °C (48 jam terakhir)..

Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah direhidrasi sebanyak 50% dari berat bahan menghasilkan komposisi *pulp* biji kakao kering dapat digunakan sebagai substrat fermentasi. Selama fermentasi, biji kakao kering yang telah direhidrasi mengalami penurunan kadar gula total, pH dan total polifenol pada ketiga perlakuan. *Cut test* keping biji kakao kering menunjukkan persentase warna coklat naik pada ketiga perlakuan. Kadar gula reduksi dan indeks fermentasi biji kakao menunjukkan kenaikan pada seluruh perlakuan. Konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat pada semua perlakuan mencapai jumlah puncaknya berturut – turut pada jam ke 24, 60 dan 108 fermentasi. *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* dari ketiga perlakuan mencapai populasi tertinggi berturut – turut pada jam ke 24, 48 dan 72 fermentasi. Biji kakao kering pasca fermentasi menghasilkan asam amino hidrofobik yaitu alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin dan methionin sebagai prekursor flavor dengan total asam amino hidrofobik dimiliki oleh perlakuan penambahan inokulum secara serentak. Setelah penyangraian biji kakao kering hasil fermentasi menghasilkan senyawa volatil antara lain aldehid, asam, alkohol dan ester.

Seluruh pengujian parameter tersebut diatas menunjukkan perlakuan penambahan inokulum secara bertahap mencapai nilai tertinggi dibandingkan kedua perlakuan yang lain. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa

rehidrasi *pulp* biji kakao kering dapat memperbaiki komposisi *pulp* sebagai substrat fermentasi. Parameter pengujian, prekursor aroma dan senyawa volatil tertinggi ditunjukkan pada perlakuan penambahan inokulum secara bertahap.

ABSTRACT

Most dried cocoa beans produced by farmer are processed without fermentation. Those dried cocoa beans do not produce typical cocoa flavor precursors. Attempts to get dried cocoa beans that have a typical cocoa flavor precursors may be done, if there is still enough substrate which can be fermented by microbes involved in the fermentation of fresh cocoa beans with appropriate processing conditions. The purpose of this research were: 1) to determine the composition of dried pulp beans as a substrate for fermentation; 2) to evaluate the effect of variations in fermentation technique of dried cocoa beans on the quality parameters of dry beans; 3) to evaluate the precursors of flavor and volatile compounds produced after the cocoa bean roasted. The research was conducted with the following steps: 1) analysis of composition and moisture content of the dry beans pulp as a fermentation substrate; 2) fermentation of dried cocoa beans with three fermentation techniques; and 3) roasting the fermented cocoa beans resulted from three fermentation techniques and analyzed their volatile compounds. The fermentation variations were conducted as follows: first, fermentation without the addition of inoculum (control), the second treatment using inoculum of *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) and *A. aceti* (FNCC 0016), each of 10^8 cfu/g given simultaneously at the beginning of fermentation. and the third treatment was sequential administration, i.e: yeast at the initial fermentation, lactic acid bacteria after 24 hours fermentation, and acetic acid bacteria after 48 hr of fermentation third with the same microbial population with the second treatment. The fermentation was conducted for 120 hours. The fermentation temperature were controlled during fermentation as follows: 35 °C for the first 24 hours, 45 °C for the next second 24- hours, 55 °C the third 24 hours and 35 °C for the last 48 hours of fermentation.

The results showed that after the rehydration, pulp composition of dry beans could be used as a substrate for fermentation. During fermentation, dry cocoa beans showed reduction of total sugar content, pH and total polyphenols for all the three treatments. Cut test of dried cocoa beans during the fermentation showed the increasing percentage of brown color of the three treatments. Reducing sugar and fermentation indexes increased for all treatments during fermentation. Concentration of ethanol, lactic acid and acetic acid reached highest level at 24, 60 and 108 hours of fermentation for all treatments. Highest populations of *S. cerevisiae*, *L. lactis* and *A. aceti* of three treatments obtained at 24, 48 and 72 hours of fermentation. After fermentation dry beans produced hydrophobic amino acids are alanine, tyrosine, valine, phenilalanin, isoleucine and methionine as a precursor flavor with a total of hydrophobic amino acids are owned by the addition of inoculum treatment simultaneously. After roasting dry beans produced volatile compounds are aldehydes, acids, alcohols and esters. All parameters above shows the addition of inoculum treatment gradually achieve the highest score compared to the other treatments.

These results it can be concluded that the pulp rehydrating dried cocoa beans can improve the composition of the pulp as a substrate fermentation. After

fermentation and roasting, dry beans produced hydrophobic amino acids as precursors of flavor and volatile compounds.

RINGKASAN

Biji kakao kering memiliki *pulp* dengan kadar air rendah dan tidak memiliki flavor khas biji kakao, sehingga bermutu rendah. Biji kakao kering 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. Setelah rehidrasi biji kakao dilakukan fermentasi selama 120 jam. Suhu diatur selama fermentasi, berturut-turut 35 °C (24 jam pertama), 45 °C (24 jam kedua), 55 °C (24 jam ketiga) dan 35 °C (48 jam terakhir). Perlakuan pertama adalah perlakuan kontrol atau tanpa penambahan inokulum, perlakuan kedua menggunakan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016), masing – masing 10^8 cfu/g yang diberikan serentak pada awal fermentasi. Perlakuan ketiga, pemberian inokulum secara bertahap yeast pada awal fermentasi, bakteri asam laktat pada awal 24 jam kedua dan bakteri asam cuka pada awal 24 jam ketiga dengan populasi mikrobial yang sama dengan perlakuan kedua.

Hasil penelitian Heriyawan (2015) dan Widiyanto *et al* (2013) menunjukkan bahwa komposisi *pulp* biji kakao kering dapat digunakan sebagai substrat fermentasi dengan berbagai perlakuan awal seperti pengembalian kadar air *pulp* dan penambahan tetes tebu. Kustyawati dan Setayni (2008), menunjukkan bahwa penambahan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* dapat meningkatkan populasi yeast, bakteri asam laktat, bakteri asam asetat, suhu fermentasi dan memperpendek waktu fermentasi. Perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya adalah perbaikan mutu hasil fermentasi biji kakao kering tidak saja

didasarkan pada indeks fermentasi, tetapi juga secara sensori dan senyawa volatil yang dihasilkan juga dikaji.

Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap yaitu 1) optimasi dan evaluasi komposisi *pulp* biji kakao kering sebagai substrat fermentasi, 2) variasi teknik fermentasi dan evaluasi hasil fermentasi dari variasi teknik fermentasi dan 3) evaluasi senyawa volatil dan sensori biji kakao hasil fermentasi pasca sangrai.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar gula total biji kakao kering turun baik yang berasal dari hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 8,55; 8,44 dan 8,67 % menjadi berturut - turut 3,07, 2,84 dan 2,82%. Kadar gula reduksi biji kakao naik dari hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 3,49; 3,69 dan 3,64 % menjadi berturut-turut 10,53; 10,63 dan 10,58%. PH biji kakao turun yang berasal dari hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 5,67; 5,67 dan 5,67 menjadi berturut – turut 3,98; 3,55 dan 3,50. Indeks fermentasi biji kakao selama fermentasi naik yang berasal dari hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 0,30; 0,32 dan 0,30 menjadi berturut-turut 0,88; 0,99 dan 1,03. Persentase warna coklat keping biji kakao mengalami kenaikan baik pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 5; 5 dan 5% menjadi berturut - turut 70, 95 dan 97%.

Persentase warna ungu kecoklatan keping biji kakao juga turun secara nyata baik pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan

secara bertahap berturut-turut dari 30,11; 30,14 dan 30,09% menjadi berturut-turut 5,03; 4,98 dan 3,02%. Persentase warna slaty keping biji kakao juga turun pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 64,84; 65,05 dan 65,09 menjadi berturut-turut 20,53; 0 dan 0%. Konsentrasi etanol dari awal fermentasi sampai 24 fermentasi naik baik pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut dari 0; 0; dan 0% menjadi berturut-turut 4,83; 5,23 dan 5,54%. Konsentrasi asam laktat dari awal fermentasi sampai 60 jam fermentasi naik pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut dari 0; 0; dan 0% menjadi berturut - turut 4,42; 4,54 dan 4,82%. Konsentrasi asam asetat dari awal fermentasi sampai 108 jam fermentasi naik pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut dari 0; 0; dan 0% menjadi berturut – turut 5,93; 6,33 dan 6,83%. Total polifenol biji kakao juga turun dari hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 0,17; 0,18 dan 0,17 meq asam galat/g menjadi berturut – turut 0,08; 0,07 dan 0,06 meq asam galat/g.

Populasi *S. cerevisiae* dari awal sampai 24 jam fermentasi juga naik baik hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut-turut dari 10^5 ; 10^8 dan 10^8 cfu/g menjadi berturut turut 10^7 , 10^{11} dan 10^{12} cfu/g. *L. lactis* dari awal sampai 48 jam fermentasi mengalami kenaikan dari hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut dari 10^6 ; 10^8 dan 10^6 cfu/g menjadi berturut - turut 10^8 , 10^{11} dan 10^{12} cfu/g. *A. aceti* dari awal sampai 72 jam fermentasi menunjukkan kenaikan baik

pada hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut dari 10^4 , 10^8 dan 10^4 cfu/g menjadi berturut – turut 10^6 , 10^{11} dan 10^{12} cfu/g.

Biji kakao kering selama fermentasi memiliki asam amino hidrofobik yang meliputi Alanin, Tirosin, Valin, Phenilalanin, Isoleusin dan Methionin dengan jumlah semakin besar sampai akhir fermentasi. Setelah sangrai biji kakao kering hasil fermentasi terbukti memiliki senyawa volatil seperti aldehid, asam, alkohol dan ester. Uji sensori menunjukkan bahwa semua panelis (25 orang) menyukai bubuk biji kakao kering hasil perlakuan secara bertahap.

SUMMARY

Dry beans pulp with low water levels and does not have a distinctive flavor cocoa beans. Dry beans can be enhanced through the fermentation process, which preceded rehydration. Rehydration aims to restore the moisture content of dried cocoa beans approaching pulp moisture content of fresh cocoa bean pulp. After rehydration cocoa beans are fermented for 120 hours. Regulated temperature during fermentation, respectively 35 ° C (24 hours), 45 ° C (24 second clock), 55 ° C (24-hour three) and 35 ° C (last 48 hours). The first treatment is the control treatment or without the addition of inoculum, the second treatment using inoculum of *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) and *A. aceti* (FNCC 0016), respectively - each of 108 cfu / g are given simultaneously at the beginning fermentation. The third treatment, administration of gradually yeast inoculum at the start of fermentation, lactic acid bacteria at the start of the second 24 hours and acetic acid bacteria at the start of a 24-hour party with the same microbial population with the second treatment.

Heriyawan research results (2015) and Widiyanto et al (2013) showed that the composition of the pulp dry beans can be used sebagai substrate fermentation with various pre-treatment such as the return of water levels penambahan pulp and molasses. Kustyawati and Setayni (2008), showed that the addition of *S. cerevisiae*, *L. lactis* and *A. aceti* can increase the population yeast, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, fermentation temperature and shorten the fermentation time. Distinguishing this study with previous research is improving the quality of

fermented dry cocoa beans are not only based on the index of fermentation, but also sensory and volatile compounds produced are also reviewed.

This research was done in three stages: 1) the optimization and evaluation of pulp composition of dry beans as a fermentation substrate, 2) variations in the fermentation engineering and evaluation of fermented variety of fermentation techniques and 3) evaluation of volatile compounds and sensory fermented cocoa beans after roasting. The results showed that the total sugar content of dry cocoa beans down both derived from the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually successively from 8.55; 8.44 and 8.67% to respectively - were 3.07, 2.84 and 2.82%. Reducing sugar cocoa beans rose from the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually successively from 3.49; 3.69 and 3.64% to 10.53 respectively; 10.63 and 10.58%. PH down cocoa beans derived from the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually successively from 5.67; 5.67 and 5.67 be consecutive - were 3.98; 3.55 and 3.50. Index fermentation of cocoa beans during the fermentation rose from the proceeds of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually successively from 0.30; 0.32 and 0.30 becomes 0.88 respectively; 0.99 and 1.03. The percentage of pieces of brown cocoa beans has increased both on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually a row of five; 5 and 5% to respectively - were 70, 95 and 97%.

Percentage of purple-brown pieces of cocoa beans also fell significantly both on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and

gradually row from 30.11; 30.14 and 30.09% to 5.03 respectively; 4.98 and 3.02%. Percentage of slaty color pieces of cocoa beans also fell on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually row from 64.84; 65.05 and 65.09 respectively became 20.53; 0 and 0%. Concentration of ethanol from fermentation beginning of fermentation to 24 rose both on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually a row - succession of 0; 0; and 0% to 4.83 respectively; 5.23 and 5.54%. Concentration of lactic acid from the beginning of fermentation to 60 hours of fermentation rose on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually a row - succession of 0; 0; and 0% to respectively - were 4,42; 4.54 and 4.82%. Concentration of acetic acid from the beginning of fermentation to 108 hours of fermentation rose on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually a row - succession of 0; 0; and 0% to respectively - were 5.93; 6,33 and 6,83%. Total polyphenol cocoa beans also fell from the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually successively from 0.17; 0.18 and 0.17 meq gallic acid / g be consecutive - were 0.08; 0.07 and 0.06 meq gallic acid / g.

Populations of *S. cerevisiae* from start up to 24 hours of fermentation also gained good results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually in a row of 105; 108 and 108 cfu / g to row 107, 1011 and 1012 cfu / g. *L. lactis* from start up to 48 hours of fermentation rose from the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually a row - succession of 106; 108 and 106 cfu / g be consecutive - were 108,

1011 and 1012 cfu / g. *A. aceti* from start up to 72 hours of fermentation showed a good rise on the results of the control treatment, the addition of inoculum simultaneously and gradually a row - succession of 104, 108 and 104 cfu / g be consecutive - were 106, 1011 and 1012 cfu / g.

Dry beans during fermentation have hydrophobic amino acids which include Alanine, Tyrosine, Valine, Phenilalanin, isoleucine and Methionin with an increasingly large number until the end of fermentation. Once toasted dried cocoa beans fermented proven volatile compounds such as aldehydes, acids, alcohols and esters. Sensory test showed that all the panelists (25 people) like powder dry beans treatment results gradually.

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Kakao merupakan salah satu komoditas perkebunan andalan bagi perekonomian Indonesia, karena menghasilkan devisa negara, menyediakan lapangan kerja dan mendorong pertumbuhan agribisnis dan agroindustri. 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 ± 385.000 ton merupakan biji kakao kering hasil fermentasi (Anonim, 2013a). Biji kakao kering terfermentasi mempunyai flavor dan aroma yang khas dan kuat, sedangkan biji kakao kering tanpa fermentasi tidak mempunyai flavor khas dan hanya didominasi rasa sepat dan pahit saja.

Produksi biji kakao kering dari perkebunan rakyat pada umumnya tidak menggunakan proses fermentasi baik secara alami maupun dengan penambahan inokulum. Pada umumnya petani kakao hanya merendam biji kakao segar dalam air dalam upaya untuk membantu menghilangkan *pulp* dan menjemur. Biji kakao kering yang tidak diketahui kadar airnya, dijual tanpa memperhatikan kualitas baik dari aspek kadar air maupun kondisi biji kering. Hal ini sebabkan oleh jumlah produksi kakao petani relatif sedikit dan waktu yang dibutuhkan untuk fermentasi terlalu lama. Kedua 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 (Thomson *et al.*, 2000).

Fermentasi adalah salah satu faktor penting dalam pengolahan biji kakao khususnya dalam pembentukan senyawa prekursor flavor. 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. Perubahan jenis dan jumlah mikrobial selama berlangsungnya fermentasi biji kakao lebih dikenal dengan istilah suksesi mikrobial. Pada tahap awal fermentasi keberadaan mikrobial didominasi oleh yeast, selanjutnya diikuti oleh bakteri asam laktat dan akhir fermentasi oleh bakteri asam asetat (Schwan dan Wheals, 2004). Aktivitas mikrobial tersebut menghasilkan etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi diikuti oleh kenaikan suhu lingkungan fermentasi. Alkohol dan asam asetat didifusi kedalam biji kakao dan diikuti oleh kenaikan suhu yang berdampak pada kematian biji (tidak dapat berkecambah). Reaksi hidrolitik dalam biji kakao diawali oleh kematian biji sehingga struktur kotiledon biji berubah lebih berongga dan kotiledon berwarna coklat.

Proses fermentasi kakao umumnya berlangsung secara alami dibantu oleh mikrobial dari udara berlangsung selama 6 hari serta dilakukan pembalikan pertama dihari ke 2 dan selanjutnya dilakukan pada setiap 24 jam (Schwan, 1998). *S. cerevisiae* memiliki beberapa kelebihan seperti pertumbuhannya sangat baik, toleran terhadap etanol, serta aktivitas pektinolitik dan tahan terhadap pH rendah. *Lactobacillus sp* yang dijumpai pada media fermentasi biji kakao segar adalah *L. lactis*, dengan kelebihan yaitu lebih kompetitif, lebih toleran terhadap asam dan

etanol dan tahan dikondisi lingkungan dengan jumlah oksigen lebih banyak. Bakteri asam asetat didominasi *A. aceti* dengan kemampuan tumbuh dikonsentrasi etanol sampai 6,0 %, suhu 45°C dan pada pH 3,5 serta etanol dioksidasi menjadi asam asetat dan dikonversi lanjut asam asetat menjadi CO₂ dan air (Schwan, 1998).

Biji kakao tanpa fermentasi adalah biji kakao segar atau biji kakao segar dibersihkan *pulpnya* dan langsung dikeringkan. 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 (Misnawi *et al.*, 2002).

Cita rasa dan aroma khas cokelat (*flavor cokelat*) ditentukan oleh mutu kakao. Aroma khas cokelat baru akan timbul pada saat penyangraian. 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. Prekursor aroma yang penting dalam reaksi Maillard adalah gula reduksi (glukosa) dan asam amino hidrofobik. Asam amino bebas hidrofobik yang dihasilkan selama fermentasi biji kakao antara lain : alanin, valin, leusin, fenilalanin, tyrosin, dan isoleusin. Prekursor aroma yang dihasilkan dari reaksi asam amino dan gula reduksi antara lain aldehid, asam, alkohol dan ester (Owusu, 2010; Campos *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2012). Pasca biji kakao disangrai dihasilkan senyawa volatil khas yaitu 2-metil pirazin, 2,5-dimetil-, 2,3-dimetil-, 2,3,5- trimetil-, dan 2,3,5,6-tetrametilpirazin (Misnawi, *et al.*, 2003).

Fermentasi biji kakao kering menghadapi beberapa permasalahan 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 (Lopez dan Dimick, 1995), 2). keberadaan substrat seperti komposisi *pulp* sangat mempengaruhi keberhasilan fermentasi biji kakao kering.

Kadar air *pulp* berperan dipertumbuhan mikrobial dan reaksi enzimatik didalam biji kakao selama fermentasi. Kadar air *pulp* yang dibutuhkan agar fermentasi berlangsung secara baik adalah $\geq 35\%$. Thomson *et al.* (2000) menyatakan bahwa substrat yang berperan sebagai media fermentasi biji kakao adalah gula dan asam sitrat didalam *pulp*. Selama fermentasi berlangsung *pulp* dirombak menjadi asam - asam organik oleh mikrobial dan selanjutnya didifusi kedalam masa biji dan diinisiasi reaksi enzimatik pada pembentukan senyawa prekursor cita rasa, aroma dan warna.

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 (Semuel, 2013). Penambahan inokulum mikrobial yang terdiri atas *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada fermentasi biji kakao segar dapat mempengaruhi perubahan komposisi kimia substrat selama fermentasi berlangsung sebagai dampak terjadinya perubahan ekologi mikrobial didalamnya sehingga memperpendek waktu fermentasi (Kustyawati dan Setyani, 2008).

Biji kakao kering memiliki mutu rendah dan setelah disangrai tidak menghasilkan flavor khas biji kakao, agar dapat ditingkatkan mutunya harus dilakukan fermentasi. Di *pulp* biji kakao kering terdapat mikrobia indogenous dalam jumlah yang relatif sedikit, agar dapat berlangsung proses fermentasi secara optimal perlu dilakukan penambahan inokulum yang diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada dengan nomer Strain Food and Nutrition Culture Collection (FNCC) yaitu *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNCC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016). Pengendalian suhu yang dilakukan pada penelitian ini agar dicapai suhu ideal pertumbuhan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*. Proses fermentasi biji kakao kering dengan dikendalikan suhu lingkungan dan populasi mikrobianya seperti diyakini mutu dapat ditingkatkan, warna keping biji kakao kering.

1.2. Perumusan Masalah

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 yeaast, 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:

1. Komposisi dan kadar air *pulp* biji kakao kering sangat berbeda dengan *pulp* biji kakao segar.
2. Komposisi mikrobial biji kakao kering kemungkinan berbeda dengan biji kakao segar sehingga diperlukan starter untuk memicu dan memacu proses fermentasi.
3. Kondisi proses fermentasi biji kakao kering perlu dibuat mendekati kondisi proses fermentasi pada biji kakao segar supaya didapatkan prekursor flavour.
4. Belum diketahui apakah 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 dan memiliki profil senyawa volatil pasca sangrai.

Penelitian ini melakukan kajian tentang teknik penambahan inokulum mikrobial pada model fermentasi biji kakao kering dan mengevaluasi pengaruhnya terhadap perubahan parameter mutu biji kakao kering hasil fermentasi. Pada penelitian ini telah menjadi pembeda dengan penelitian sebelumnya yaitu optimasi pencapaian kadar air *pulp* minimum biji kakao kering sebagai syarat dapat berlangsungnya proses fermentasi. Biji kakao kering direndam dan ditambah inokulum mikrobial selanjutnya difermentasi dengan suhu lingkungan diatur agar dihasilkan mutu biji kakao kering lebih baik.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian adalah memperbaiki mutu biji kakao kering melalui proses fermentasi terkendali menggunakan inokulum mikrobial *S. cerevisiae* (FNCC 305), *L. lactis* (FNCC 0856) dan *A. aceti* (FNCC 0016) agar berlangsung

pembentukan senyawa prekursor flavor khas kakao. Adapun tujuan khususnya adalah untuk:

1. Mengetahui dan evaluasi komposisi pulp biji kakao kering memenuhi persyaratan sebagai substrat untuk fermentasi.
2. Mengevaluasi kualitas biji kakao kering hasil tiga variasi teknik fermentasi biji kakao kering rehidrasi dengan suhu terkendali.
3. 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 perubahan suhu fermentasi, indeks fermentasi, kadar gula reduksi, persentase jumlah warna coklat keping biji, konsentrasi asam asetat, populasi *S. Cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*, pH, total asam amino hidrofobik.
4. Mengevaluasi senyawa volatil hasil biji kakao kering pasca fermentasi dan penyangraian menggunakan GC-MS dan uji sensori meliputi rasa masam, rasa sepat, aroma.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu dan teknologi pangan khususnya pengolahan biji kakao kering melalui fermentasi dengan penambahan inokulum mikrobial *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada awal fermentasi baik secara sendiri – sendiri maupun campurannya secara bertahap
2. Memberikan informasi tentang perbaikan mutu hasil fermentasi biji kakao kering khususnya dalam pembentukan senyawa prekursor flavor khas biji

kakao kering yang difermentasi agar mutu yang dimiliki setara dengan biji kakao segar hasil fermentasi.

1.5. Kebaruan Penelitian

Kebaruan penelitian ini dibanding penelitian sebelumnya adalah kajian tentang perbaikan mutu biji kakao kering dengan perlakuan rehidrasi yang diikuti oleh fermentasi terkendali menggunakan inokulum *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada fermentasi terkendali. Perjalanan penelitian tentang biji kakao menggunakan kebaruan penelitian seperti disajikan pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1 Kebaruan penelitian dibanding penelitian sebelumnya

No	Tema	Penelitian sebelumnya	Kebaruan penelitian
1	Pengembalian kadar air pulp biji kakao kering melalui perendaman	<ul style="list-style-type: none"> • Samuel, (2013), perendaman biji kakao kering selama 1 jam tanpa perbandingan volume air : biji kakao kering secara jelas sehingga terjadi sweating karena masuknya air kedalam keping biji. 	Perbandingan volume air dengan berat biji kakao kering saat perendaman sangat berpengaruh pada hasil fermentasi biji kakao kering. Volume air yang ditambahkan adalah 60% dari berat biji kakao kering, sehingga penambahan air hanya cukup membasahi pulp saja.
2	Fermentasi biji kakao	<ul style="list-style-type: none"> • Samuel, (2013), fermentasi biji kakao kering dengan fermentasi spontan dapat memperbaiki indeks fermentasi biji kakao kering. • Kustyawati dan Setyani (2008), penambahan inokulum (<i>S. cerevisiae</i>, <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i>) fermentasi biji kakao 	Fermentasi biji kakao kering dilakukan 3 level yaitu kontrol (tanpa penambahan inokulum), penambahan inokulum campuran (<i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i>) diawal fermentasi dan penambahan inokulum <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. lactis</i> dan <i>A. aceti</i> secara bertahap serta fermentasi dilakukan pada suhu yang

	<p>segar tanpa pengaturan suhu dapat mempercepat fermentasi meskipun pada penambahan inokulum campuran tidak tercapai suhu kematian biji.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Widiyanto et al. 2013. Penambahan tetes tebu sebagai sumber karbon dan enersi, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> dan <i>Acetobacter aceti</i> sebagai mikrobia pemfermentasi, dalam fermentasi biji kakao kering dapat memperbaiki proses biokimia yang terjadi, sehingga mampu memperbaiki kualitas biji terfermentasi yang dihasilkan walaupun belum memenuhi standar SNI. 	<p>terkontrol yaitu 35°C sampai 24 jam, selanjutnya 45°C sampai 36 jam dan selanjutnya 55 °C sampai 48 jam dan kembali suhu 35°C sampai 120 jam dapat menghasilkan biji kakao kering terfermentasi dengan mutu baik da warna keping biji sesuai standar SNI 01-2323-2002 serta dilakukan uji senyawa volatil. Pembedanya dengan penelitian sebelumnya penelitian ini melakukan uji senyawa asam amino hidrofobik yang terbentuk selama fermentasi dan senyawa volatil yang dihasilkan.</p>	
3	<p>Ativitas enzim pada biji kakao non fermentasi, biji kakao fermentasi sebagian (<i>partly fermented</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Misnawi <i>et al</i>,(2002). Terdapat aktivitas enzim pada biji kakao unfermented, partly fermented, fermented selama fermentasi biji kakao segar. Terjadi peningkatan kandungan asam amino bebas pada biji kakao non fermentasi, <i>partly fermented</i> mendekati asam amino biji kakao segar selama fermentasi. 	<p>Penelitian ini menggunakan biji kakao kering, kemudian dilakukan perendaman dan difermentasi selama 120 jam.</p>

Sebagai ungkapan kebaruan dalam penelitian ini adalah optimasi komposisi *pulp* biji kakao kering dilakukan sebelum dan setelah rehidrasi selanjutnya dilakukan fermentasi pada suhu lingkungan terkendali. Biji kakao kering dilakukan uji perubahan kandungan asam amino selama fermentasi. Selanjutnya biji kakao kering hasil fermentasi dilakukan uji senyawa volatil.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Buah kakao

Bahan dasar produksi komoditi coklat adalah biji buah kakao atau biji kakao. 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.

Jumlah biji untuk setiap buah kakao ukuran sedang sampai besar berkisar 35-55 biji dengan bobot biji rata-rata 2,5 g/biji basah. Biji kakao umumnya terdiri atas 2 bagian yaitu bagian kulit (*seed coat* atau *shell*) yang membungkus seluruh bagian biji. Bagian biji yang diselimuti oleh bagian *pulp* berwarna putih. Biji kakao tersusun atas embrio (*germ*) dan kotiledon. Kotiledon merupakan nib pada biji kakao tanpa bagian testa. Kotiledon pada dasarnya tersusun atas sel-sel penyimpan (*storage cells*) cadangan makanan untuk biji. Gambar potongan membujur buah kakao segar (atas) dan buah kakao matang optimal tersaji pada Gambar 2.1.

Gambar 2.1. Potongan membujur buah kakao segar jenis forestero (atas) dan buah kakao matang optimal (Anonim, 2013^b)

2.1.1. Pulp biji kakao

Pulp kakao merupakan biomassa semi padat yang menempel pada bagian kulit biji kakao dan memiliki rasa manis ketika buah kakao telah mencapai masak optimal. Pulp tersebut berwarna putih dan rusak menjadi cairan pasca biji kakao mengalami fermentasi. Pulp biji kakao sebenarnya dalam keadaan steril (sebelum dibuka), dan saat terbuka sangat mudah mengalami kontaminasi oleh mikrobia khususnya yeast. Hal ini lebih disebabkan oleh 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 % (Schwan dan Wheals, 2004)

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*.

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 polisakrida lain seperti selulosa, hemiselulosa dan lignin menjadikan *pulp* kakao bersifat semi padat, lengket dan kompak.

2.1.2. 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. Biji kakao segar mengandung air $\pm 65\%$ yang akan dikeringkan untuk mendapatkan biji kakao kering sampai kadar air $\pm 10\%$. 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.

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 (Beckett, 2009 ;Vuyst.*et al.*, 2010). Lemak biji kakao merupakan komponen penting dan penentu karakteristik atau mutu coklat yang dihasilkan selain memberikan tampak mengkilap pada permukaan produk coklat. 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.

Tiga kelompok senyawa poliphenol biji kakao adalah *flavan 3-ols* sebesar 37%, *proantosianidin* sebesar 58% dan *antosianidin* sebesar 4% (Nazaruddin *et al.* 2006; Afoakwa, 2010). Poliphenol biji kakao non-fermentasi banyak dijumpai dalam bentuk senyawa tanin dan katekin (Jalil dan Ismail, 2008). Senyawa poliphenol 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. 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).

2.2. Fermentasi

Fermentasi adalah proses perubahan biomassa oleh mikrobia yang merupakan salah satu faktor sangat penting dalam pembentukan senyawa prekursor flavor. Sebelum dilakukan fermentasi maka biji kakao memiliki cita rasa sepat (*astringent*) dan pahit (*bitter*) dan tanpa ditandai oleh aroma coklat yang spesifik (khas). Selama fermentasi berlangsung, maka pulp yang melapisi luar biji kakao yang kaya kandungan gula diubah menjadi etanol oleh yeast yang diikuti oleh aktivitas, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Secara garis besar fermentasi biji kakao terdiri atas 2 tahap yaitu 1) tahap fermentasi yang berlangsung dibagian luar biji oleh mikrobia peristiwanya juga enzimatis. 2). Tahap degradasi protein secara enzimatis terjadi didalam keping biji.

2.2.1. Tahap fermentasi dibagian luar biji

Tahap fermentasi dibagian luar biji terjadi pada bagian pulp dan tahap ini merupakan tahap terjadinya perombakan massa *pulp* secara alami oleh mikrobia kontaminan dari lingkungan tempat fermentasi. 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. Hal ini dikuatkan oleh pendapat Beckett (2009); Afoakwa *et al.* (2014) bahwa mikrobia yang tumbuh dan berkembang biak selama fermentasi biji kakao terdiri atas yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Selama fermentasi gula dalam *pulp* biji kakao dirombak menjadi etanol oleh yeast dan selanjutnya etanol dirombak menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat.

Mikrobia melakukan aktivitas dan memecah *pulp* menjadi alkohol dan pemecahan lanjut menjadi asam dan kemudian senyawa hasil dekomposisi *pulp* tersebut terpenetrasi kedalam massa biji kakao dan dilanjutkan oleh pembentukan senyawa prekursor flavor. Keberhasilan fermentasi biji kakao tidak lepas dari berlangsungnya suksesi mikrobia yang terlibat dalam fermentasi sedangkan kerja atau aktivitas mikrobia dipengaruhi oleh berbagai hal seperti ketersediaan kecukupan beberapa faktor seperti, suhu, pH, oksigen, jenis dan jumlah substrat sebagai media fermentasi. 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.

Aktivitas mikrobia yang terlibat dalam fermentasi biji kakao terdiri atas 3 tahap yaitu tahap awal saat mulainya fermentasi yang peran utama didominasi yeast, tahap fermentasi berurut pergantian yeast oleh bakteri asam laktat dan diakhir tahap fermentasi didominasi oleh bakteri asam asetat (Beckett, 2009; Vuyst. *et al.* 2010).

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 kedalam 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).

2.2.1.1. Yeast

Secara umum ukuran yeast lebih besar dari bakteri namun ukuran yeast yang terkecil tidak lebih besar dari bakteri yang terbesar (Schwan, 1998). Diameter yeast berkisar 1-5 μm dan panjang 5-30 μm atau lebih. Setiap spesies yeast memiliki bentuk khas namun dalam inokulum murni yeast masih terdapat strain yang

bervariasi baik ukuran dan bentuk sel individunya, dan hal ini tergantung pada umur sel dan lingkungan tumbuhnya. Pada umumnya, bentuk sel yeast bulat telur (oval) dan ada beberapa yang memanjang dan berbentuk bola. Yeast dapat tumbuh baik dalam kondisi aerob (banyak tersedia oksigen), namun ada beberapa jenis yeast dapat hidup dalam kondisi anaerob, meskipun pertumbuhannya lambat.

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 CO_2 (Schwan dan Wheals, 2004; Vuyst. *et al.*, 2010).

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 spp</i>	<i>C. cacaoi</i>	<i>K. apis</i>
<i>K. apiculata</i>	<i>Pichia spp</i>	<i>Kloeckera spp</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>K. marsiamus</i>	<i>Saccharomyces spp</i>	<i>Rhodotorula spp</i>	<i>C. intermedia</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>K. thermotolerans</i>	<i>Saccharomycopsis spp</i>	<i>Saccharomyces spp</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. pelliculosa</i>
<i>S. cerevisiae</i> var.	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Torulopsis spp</i>	<i>K. apis</i>	<i>C. humicola</i>
<i>Chevalieri</i>	<i>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>Torulasporea</i>				
<i>pretoriensis</i>				

Sumber :*) Schwan dan Wheals, (2004), **) Ardana dan Fleet (2003)

Aktivitas yeast selama fermentasi biji kakao didukung oleh kondisi lingkungan dengan oksigen terbatas dan tersedianya gula dalam *pulp* yang memadai, pH lingkungan rendah, kandungan asam sitrat *pulp* relatif tinggi. Pulp pada buah kakao masak optimal mengandung gula $\pm 10\%$ dan asam sitrat $\pm 2\%$. Kondisi pH rendah dan kandungan gula tinggi serta keberadaan oksigen terbatas dalam pulp, maka 24 jam pertama fermentasi yeast sangat dominan. 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) (Ardhana dan Fleet, 2003; Kustyawati dan Setyani, 2008). Pada awal (24 jam pertama) fermentasi

maka produksi etanol naik secara nyata yang disertai oleh integritas bentuk *pulp* berakibat pada jarak antar biji kakao semakin besar serta aerasi antar biji lebih baik dan kondusif bagi pertumbuhan bakteri. Makin meningkatnya suhu dan membaiknya aerasi serta makin banyak alkohol terbentuk pada massa *pulp* menjadikan populasi yeast turun dan kemudian peran yeast digantikan oleh bakteri asam laktat yang berarti pasca fermentasi biji kakao dalam 24 jam berlangsung suksesi peran mikrobial. Pada tahapan awal fermentasi kondisi lingkungannya bersifat *anaerobic hydrolitic* artinya berlangsung hidrolisis dengan oksigen terbatas. 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) (Schwan dan Wheals, 2004; Ganda Putra *et al.*, 2008).

Yeast umumnya mampu melakukan fermentasi dengan substrat bermacam-macam gula, misalnya sukrosa, fruktosa, galaktosa, maltosa dan maltotriosa. Yeast memotori proses fermentasi alkohol yang menghasilkan CO₂ dan panas. Selain itu fermentasi biji kakao oleh yeast disertai perusakan dan pelepasan 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* (Ardhana dan Fleet, 2003).

Semua jenis yeast tersebut menggunakan glukosa, fruktosa, galaktosa, sukrosa, maltosa dan maltotriosa sebagai substrat dalam aktivitasnya. Aktivitas yeast pada 24 jam pertama fermentasi biji kakao menghasilkan alkohol $\pm 3,7\%$. Kenaikan kadar

alkohol pada media fermentasi menyebabkan populasi yeast akan turun, karena pertumbuhan yeast dihambat oleh keberadaan alkohol yang bersifat sebagai desinfektan. Setelah 48 jam fermentasi dapat dikatakan tidak dijumpai lagi keberadaan yeast yang berarti seluruh sel yeast mati.

Beberapa jenis yeast juga memproduksi enzim pektinolitik yaitu protopektinase, pektase dan pektinase. Pektase mengurai pektin menjadi alkohol dan asam pektinat, sedangkan enzim pektinase mengurai pektinat menjadi galaktosa, arabinosa dan asam asetat. Protopektin yang merupakan bahan perekat pada lamela tengah sel biomassa juga mengalami hidrolisa, maka jaringan massa pulp rusak dan berubah menjadi cairan kental dan cairan *pulp* hasil hidrolisa enzimatis oleh mikrobial dan selanjutnya menetes dari tumpukan biji kakao difermentasi (Ganda *et al.*, 2010).

Fermentasi biji kakao oleh yeast berlangsung seperti halnya fermentasi biji kakao oleh mikrobial dan sebagian besar perubahan substrat terjadi melalui jalur reaksi Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). Jalur ini secara teoritis menghidrolisa 1 g glukosa menjadi 0,51 g etanol dan 0,49 g CO₂. Saat jumlah etanol yang dihasilkan oleh yeast mencapai konsentrasi $\pm 20\%$ maka sebagai penyebab kematian yeast dan jika kondisi lingkungan fermentasi menyebabkan terjadi pengantar pesan yeast oleh mikrobial lain seperti bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat.

Yeast ternyata mampu menghasilkan senyawa pembentuk aroma seperti alkohol, asam lemak dan asam lemak ester serta beberapa senyawa pembentuk aroma yang lain (Vuyst. *et al.*, 2010). *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 (Schwan dan Wheals, 2004; Vuyst. *et al.*, 2010).

2.2.1.2. Bakteri asam laktat

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 (Camu *et al.*, 2008). 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 CO₂ dan etanol sebagai metabolit sampingan.

Bakteri asam laktat homofermentatif dalam melakukan aktivitasnya menggunakan jalur glikolisis sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif menggunakan jalur 6-fosfoglukonat/fosfoketolase. Gula adalah sumber utama karbon dan energi bagi pertumbuhan bakteri asam laktat. Polisakarida, seperti karbohidrat sebelumnya harus dihidrolisis terlebih dahulu oleh α -amilase menjadi dekstrin dan selanjutnya dihidrolisis lanjut oleh aktivitas enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh bakteri asam laktat menjadi maltosa.

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 (Schwan dan Wheals, 2004; Ardana dan Fleet, 2003). 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 :*) Schwan dan Wheals, (2004), **) Ardana dan Fleet (2003)

Lactobacillus sp pada umumnya adalah bakteri mesofilik akan tetapi beberapa spesies merupakan psikotropik, thermodurik atau termofilik. 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 (*Emden-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 CO₂ (Afoakwa, 2010). 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 (Afoakwa, 2010).

Setelah produksi etanol dan diikuti perubahan oleh yeast, aerasi lingkungan makin baik dan kenaikan suhu sampai $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dan pH mendekati 4 adalah kondisi yang sangat cocok untuk pertumbuhan bakteri pasca fermentasi oleh yeast. Pertumbuhan bakteri berlangsung pada rentang waktu fermentasi 24 – 72 jam, bakteri *micro aerophilic* dan *aciduric* telah mendominasi peran mikrobial. 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 (Schwan dan Wheals, 2004; Vuyst *et al.*, 2010).

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 monophosphat* sedangkan bakteri asam asetat mengubah etanol menjadi asam asetat melalui jalur *Embden-Meyerhof* (Schwan dan Wheals, 2004; Vuyst. *et al.*, 2010). 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.

2.2.1.3. 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 thermotoleran yang mampu tumbuh dan berkembang yaitu bakteri asam asetat dengan kecepatan pertumbuhan dari 10^4 menjadi 10^8 cfu/g (Schwan dan Wheals, 2004; Vuyst. *et al.*, 2010). Peran utama bakteri asam asetat adalah mengoksidasi etanol menjadi asam asetat, CO_2 dan H_2O (Schwan dan Wheals, 2004; Vuyst. *et al.*, 2010).

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 (Beckett, 2009; Schwan dan Wheals, 2004; Moreira *et al.*, 2013).

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. Menurut Clapperton, (1994) bahwa fermentasi biji kakao adalah untuk membentuk senyawa prekursor cita rasa khas kakao serta mengurangi cita rasa pahit (*biiter taste*). Sulistyowati (1999) menyatakan bahwa 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.

Terdapat beberapa mikrobia yang berperan pada fermentasi biji kakao antara lain *Saccharomyces sp.*, *Lactobacillus sp.*, dan *Acetobacter sp* (Ardana dan Fleet, 2003). Dengan demikian mikrobia dimaksud dapat digunakan untuk melakukan percepatan fermentasi. Kustyawati dan Setyani, (2008) menyatakan bahwa penggunaan campuran inokulum mikrobia 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 (Siregar *et al*, 1997).

Dougan (1980) 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. Lapisan *pulp* yang terlalu tebal dan saat biji kakao ditumpuk maka *pulp* tersebut menghalangi pertukaran udara dalam tumpukan biji dan

menciptakan kondisi anaerobik. Menurut Carr *et al*, (1981) bahwa dalam suasana anaerobik bakteri asam laktat tumbuh dan berkembang pesat, sementara bakteri asam asetat sedikit terhambat pertumbuhannya. Asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi biji kakao telah menurunkan pH biji kakao secara nyata.

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 H₂S.

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 (Afoakwa, 2010). *Acetobacter* mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat atau asam laktat dan jika dioksidasi lebih lanjut dihasilkan CO₂ dan H₂O. 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* (Schwan dan Wheals, 2004; Ardana dan Fleet, 2003). Genus bakteri asam asetat yang sering dijumpai pada media fermentasi biji kakao adalah *Acetobacter* dan *Gluconobacter*, dan *Acetobacter* lebih sering muncul dari pada *Gluconobacter*.

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 subsp.</i>	<i>A. ascendens</i>	<i>A. lovaniensis</i>		
<i>Suboxydans spp</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>		
<i>A. pasteurianus</i>				

Sumber : *) Schwan dan Wheals, (2004), **) Ardana dan Fleet (2003)

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 $\pm 10\%$ dalam media fermentasinya maka *A. aceti* tidak dapat tumbuh sama sekali. Populasi bakteri asam asetat meningkat sampai 80-90% dari total mikrobial 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.

Wood dan Lass (2001) menyatakan bahwa inokulum murni mikrobial yang digunakan sebagai inokulum yang ditambahkan pada tumpukan biji kakao yang difermentasi cukup efektif dan efisien. Jenis dan konsentrasi mikrobial dalam bentuk inokulum mikrobial yang lazim digunakan sebagai inokulum merupakan faktor utama penyebab berlangsungnya fermentasi biji kakao kering.

2.2.2. Degradasi komponen penyusun dalam biji

Fermentasi bertujuan untuk menghancurkan *pulp* dan mengusahakan kondisi terjadinya reaksi kimia dan biokimia dalam keping 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 (Afoakwa *et al.*, 2008; Afoakwa *et al.*, 2014).

Enzim endogenous mulai aktif dengan keberadaan senyawa gula dan protein yang selanjutnya dihasilkan senyawa prekursor flavor khas kakao (Afoakwa, 2010; Beckett, 2009; Schwan dan Wheals, 2004). 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 poliphenol diubah menjadi senyawa quinon oleh enzim endogenous poliphenol oksidase.

Selama fermentasi biji kakao berlangsung secara anaerob maka warna keping biji secara perlahan berubah dari ungu gelap menjadi merah kecoklatan (Afoakwa, 2010; Beckett, 2009; Schwan dan Wheals, 2004). Fase fermentasi *aerobic* maka cyanidin, protein dan senyawa kompleks teroksidasi membentuk

warna coklat keping biji. Quinon sebagai hasil degradasi senyawa poliphenol bereaksi dengan hidrogen pada gugus asam amino dan amina, dan membentuk ikatan dengan sulfur sehingga rasa sepat (*astringency*) dan rasa pahit (*bitternes*) 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.

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. 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 (Haryadi dan Supriyanto, 2012; Schwan dan Wheals, 2004; Afoakwa, 2010).

2.3. Fermentasi biji kakao kering

Suksesi mikrobial pada fermentasi biji kakao kering dan biji kakao segar tidak berbeda. Biji kakao kering telah banyak kehilangan sebagian besar air dan menjadikan *pulp* kurang cocok sebagai substrat untuk berlangsungnya

fermentasi biji kakao. Keberadaan air *pulp* maupun massa biji selama fermentasi digunakan sebagai media berlangsungnya dalam reaksi enzimatik komponen dalam biji kakao dan untuk sarana pertumbuhan mikrobial pada massa *pulp*. Thomson *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa air sebagai media untuk mempertemukan enzim dengan substrat (komponen) dalam biji agar hidrolisis dan oksidasi senyawa prekursor cita rasa, warna dan aroma biji kakao dapat terbentuk. Kandungan air yang dibutuhkan dalam fermentasi biji kakao diatas 35%. Moriera *et al.*, (2013) menyatakan bahwa kondisi *pulp* yang baik akan berpengaruh terhadap kecepatan dan perkembangan mikrobial lebih – lebih yang memiliki peran dalam fermentasi biji kakao.

Semuel (2013) menjelaskan bahwa pengembalian kadar air biji kakao kering dengan metoda perendaman dapat memperbaiki mutu biji kakao kering dengan parameter indeks fermentasi. Heriyawan, (2015) menyatakan bahwa *pulp* biji kakao kering pada umumnya sudah banyak kehilangan air, sehingga tidak cocok untuk pertumbuhan mikrobial. Variasi penambahan tetes tebu dan penambahan yeast dan bakteri asam asetat pada fermentasi biji kakao kering memberikan hasil peningkatan indeks fermentasi menjadi ≥ 1 (Widianto *et al.*, 2013). Mengacu hal tersebut diatas maka diperlukan upaya menjadikan komposisi *pulp* dan biji kakao kering pada kondisi cocok untuk pertumbuhan mikrobial dan berlangsungnya fermentasi seperti halnya biji kakao segar. Populasi mikrobial endogenus yang relatif rendah menjadikan perlu ditambah inokulum mikrobial murni seperti *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* baik secara berurutan maupun dengan model campuran sehingga fermentasi dapat berlangsung baik. Hal ini menjadi dasar

dilakukannya penelitian fermentasi biji kakao kering untuk memperbaiki mutu biji kakao produksi masyarakat.

2.3.1. Rehidrasi biji kakao kering

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 kontaminan 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.

2.3.2. Substrat yang tersedia

Menurut Lopez dan Dimick (1995), Schwan dan Wheal, (2004), dan Afoakwa, (2010) 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 mikrobia dalam melakukan fermentasi. Keberhasilan fermentasi biji kakao membutuhkan suksesi mikrobia atau aktivitas mikrobia yang optimum sesuai dengan kondisi lingkungan yang dibutuhkan untuk kegiatan metabolisme yang didukung oleh ketersediaan komponen *pulp* kakao sebagai substrat (Ardana dan Fleet., 2003).

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. Heriyawan (2015) menyatakan bahwa *pulp* biji kakao kering memiliki komposisi subtrat sebagai berikut, air $\pm 15\%$, gula $\pm 15\%$, asam $\pm 1\%$ citrat 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 ± 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 penambah komponen lain kecuali air.

2.4. Senyawa Calon Pembentuk Cita Rasa

2.4.1. Polifenol

Fermentasi biji kakao pada dasarnya hidrolisa sukrosa dan protein sedangkan senyawa polifenol akan teroksidasi dan glukosa diubah menjadi alkohol, selanjutnya dioksidasi menjadi asam asetat pada penghujung fermentasi. Senyawa prekursor pembentuk flavor khas kakao dapat dihasilkan selama fermentasi berlangsung dan muncul pasca pengeringan biji dan berlanjut pasca penyangraian kakao nib kering (Owusu, 2010). 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 (Afoakwa *et al*, 2009). 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. Kerusakan senyawa antosianin terjadi selama pengeringan biji kakao hasil fermentasi berlangsung. Antosianin tersebut membentuk warna ungu, sedangkan senyawa katekin dan epikatekin kurang berwarna yaitu dalam bentuk senyawa dimer, trimer, tetramer dan polimer yang lazim disebut prosianidin. 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 (Haryadi dan Supriyanto, 2012).

Epikathekin dan prosianidin membentuk trimer yang bersifat larut dan merupakan senyawa pembentuk rasa sepat pada biji kakao kering. 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 (Osman *et al.* 2004).

Epikathekin terpolimerisasi karena adanya oksigen seperti terlihat pada Gambar 2.4.

Gambar 2.4. Struktur molekul polifenol dalam biji kakao (Beckett, 2009)

Gambar 2.4. menunjukkan bahwa senyawa epikathekin adalah monomer sedangkan prosianidin adalah dimer yang terdiri atas 2 molekul epikathekin dan prosianidin tertramer terbentuk dari empat epikathekin. Selain prosianidin 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. Perubahan polifenol kakao banyak dipengaruhi oleh pengolahan kakao seperti fermentasi, pengeringan, penyangraian. Polifenol dan alkaloid, dalam biji terdapat sekitar 14 - 20 % dari berat

biji, sangat penting dalam mempengaruhi kualitas biji kakao (Kim dan Keeney, 1983).

Selama fermentasi berlangsung difusi asam asetat kedalam vakoula 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 (Hansen *et al.*, 1998). Fermentasi biji kakao memicu hidrolisis polifenol dan degradasi asam amino menjadi asam amino bebas sebagai senyawa prekursor aroma biji kakao (Biehl dan Voigt, 1996; Hashim *et al.* 1998a)

2.4.2. Asam amino bebas

Ziegleder (2009) menyatakan bahwa biji kakao matang mengandung 10 – 16% (bk) protein. 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. Selama fermentasi biji kakao, protein dihidrolisis secara enzimatis menghasilkan 1 – 2% (bk) asam amino bebas. Menurut Hashim *et al.* (1998^b) 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%. Fermentasi biji kakao dapat menurunkan kadar asam amino bebas hidropobik dan asam amino bebas lainnya.

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 : Schwan dan Wheals, (2004)

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.

Tabel 2.4 menunjukkan bahwa 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. Misnawi *et al.* (2002) 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. 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. 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 (Beckett, 2009; Afoakwa, 2010).

2.4.3. Gula

Schwan (1998) menjelaskan bahwa biji kakao segar mengandung pati 5 – 9 % dan gula bebas 2 – 4%, saat fermentasi berlangsung maka sukrosa dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa. Sukrosa adalah merupakan komponen utama penyusun pulp biji kakao yang pada awal fermentasi biji kakao mengalami pemecahan menjadi fruktosa dan glukosa. Widanto *et al* (2013) 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. Martin dan Ames (2001) menyatakan bahwa glukosa merupakan sumber komponen karbonil bagi pirazin. Pembentukan pirazin lebih besar pada sistem dengan glukosa, jika dibandingkan dengan fruktosa. Baxter (1995) 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.

2.5. Pengerinan

Pembentukan flavor dan perubahan warna keping biji kakao terus berlanjut sampai pengerinan. Selama proses pengerinan terjadi oksidasi polifenol sehingga terjadi pembentukan warna coklat biji kakao. Setelah fermentasi dan pengerinan, target untuk kadar air biji kakao adalah sekitar 6-8%. Biji berkualitas baik adalah berwarna coklat, hilangnya rasa pahit, rasa sepat dan rasa asam (Hoskin dan Dimick, 1994).

Biji kakao setelah fermentasi dilakukan pengerinan menggunakan sinar matahari selama 7–8 hari dengan tujuan agar pembentukan prekursor flavor berlanjut serta kadar air mencapai 7,5%. Kadar air 7,5% ditandai dengan kulit biji rapuh serta keping biji semakin coklat dan berongga. Fermentasi biji kakao berperan sangat penting dalam pembentukan senyawa volatil (alkohol, ester dan

asam lemak), tetapi juga penyediaan prekursor flavour (asam amino dan gula pereduksi). Pengeringan mengurangi tingkat keasaman dan astringency di biji kakao dengan menurunkan asam volatil dan jumlah polifenol.

2.6. Penyangraian

Sebelum disangrai biji kakao memiliki cita-rasa sepat, pahit, asam, hambar, dan agak pengap. Setelah biji kakao disangrai umumnya dihasilkan aroma khas kakao lebih kuat dan keasamannya berkurang (Ziegleder, 2009). Selama biji kakao disangrai, komponen penyusun keping biji kakao dengan bobot molekul rendah menguap bersama air sehingga kadar air dan keasaman keping biji kakao turun secara nyata. Penyangraian dimaksudkan untuk mengembangkan cita rasa biji kakao dan hal ini muncul akibat reaksi pencoklatan yang tingkat reaksinya dipengaruhi oleh kecepatan penetrasi panas dan lama biji kakao terpapar dengan panas atau dipanaskan.

Haryadi dan Supriyanto (2012) menyatakan bahwa penyangraian biji kakao (nib) kering dilakukan pada suhu dan lama waktu tertentu yang memungkinkan berlangsungnya reaksi fisiko kimia, terutama reaksi Maillard sebagai pembentuk senyawa cita-rasa coklat. Metoda penyangraian yang lazim digunakan oleh industri kakao meliputi penyangraian biji kakao utuh, penyangraian nib tanpa testa, dan penyangraian hancuran nib agar berbentuk pasta (Afoakwa, 2010). Tujuan utama penyangraian nib kakao adalah untuk pembentukan flavor khas kakao, mengurangi kadar air, menurunkan keasaman serta untuk memudahkan pemisahan keping biji dari bagian kulitnya. Jinab *et al.*, (1997) menyatakan bahwa cita-rasa coklat tidak akan muncul pada biji kakao yang diolah tanpa fermentasi. Biji kakao hasil

fermentasi kurang optimal memiliki cita-rasa sangat asam, dan memerlukan suhu penyangraian lebih tinggi dari yang biasanya. Suhu dan lama penyangraian sangat bervariasi yaitu pada suhu sekitar 80° - 140°C selama 15 - 17 menit.

Flavor khas kakao sangrai yang terbentuk berasal dari senyawa prekursor flavor kakao yang dihasilkan selama fermentasi dan pengeringan biji kakao. Prekursor flavor dimaksudkan adalah asam amino bebas, peptida, dan gula reduksi, yang secara simultan bereaksi membentuk warna coklat secara non-enzimatis dan melalui degradasi Strecker oleh panas sangrai (Beckett., 2009).

Pembentukan senyawa Amadori dimulai dengan reaksi antara glukosa dengan phenilalanin. Meskipun demikian senyawa Amadori tidak terdeteksi dengan pengamatan warna atau bau. Sebagai contoh terbentuknya senyawa Amadori dari glukosa dan asam amino seperti disajikan pada Gambar 2.5.

Gambar 2.5. Pembentukan senyawa Amadori dari glukosa dan asam amino (Beckett. 2009)

Biji kakao kering akan mengalami perubahan fisik seperti rusaknya lapisan *shell*, berkurangnya kadar air biji hingga mencapai 2%, warna keping biji berubah menjadi coklat dan bersifat lebih rapuh, jumlah mikrobia berkurang secara nyata,

komponen asam volatil banyak yang hilang dan senyawa yang memiliki kontribusi terhadap keasaman dan cita-rasa pahit juga berkurang (Afoakwa, 2010 dan Vuyst, *et al.* 2010). Penyangraian biji kakao merupakan tahap penting dalam proses produksi coklat yang akan diharapkan memiliki sebagian besar komponen pembentuk aroma.

Pembentukan aroma kakao saat penyangraian dapat melalui 2 tahap yaitu, pembentukan senyawa Amadori, dan pirazin. Granvogl *et al.* (2006) menjelaskan bahwa aroma biji kakao yang terbentuk berasal dari senyawa prekursor aroma kakao yang dihasilkan selama fermentasi dan pengeringan yaitu asam amino bebas, peptida dan gula reduksi yang bereaksi membentuk warna coklat secara non-enzimatis dan melalui degradasi reaksi Strecker oleh panas.

Senyawa pirazin tersusun atas 2 atom nitrogen didalam cincin segi enam (heksan) dan bentuk senyawa pirazin biji kakao terdiri atas berbagai ragam sebagai contoh *metil-*, *etil-*, *propil-*, *butil-*, *2-metil-butil-*, *isopropil-*, *isobutil-*, *vinil-*, *isopropenil-*, *isobutenil-*, dan gugus asetil (Voigt *et al.* 1993).

Senyawa golongan aldehid memiliki peran dalam pembentukan senyawa volatil dan non volatil sedangkan aminoketon memiliki peran dalam pembentukan senyawa pirazin yang terjadi saat penyangraian biji kakao atau kakao nib berlangsung. Selama penyangraian biji kakao akan dihasilkan senyawa pirazin melalui reaksi Maillard dan reaksi degradasi *Strecker* asam amino dan gula. Pirazin merupakan senyawa penentu pembentukan aroma dari kakao dan produk olahan kakao. Pembentukan senyawa pirazin mencapai optimum pada penyangraian biji kakao atau kakao nib pada suhu tinggi (Ikrawan *et al.*, 1997; Bonvehi dan Coil,

1997). Mekanisme pembentukan pirazin adalah ”dimerisasi” amino keton menjadi dihidropirazin melalui oksidasi seperti disajikan pada Gambar 2.6.

Gambar 2.6. Pembentukan pirazin dari amino keton (Beckett., 2009)

Aroma kakao yang terbentuk berasal dari senyawa prekursor aroma kakao yang dihasilkan saat fermentasi dan pengeringan yaitu dalam bentuk asam amino bebas, peptida dan gula reduksi. Ketiga senyawa tersebut bereaksi untuk membentuk warna coklat biji kakao secara non-enzimatis dan melalui degradasi Strecker oleh panas (Granvogl *et al.* 2006). Reaksi degradasi Strecker, terjadi karena reaksi antara asam amino hidropobik dengan gugus karbonil dari gula aldehid dan aminoketon seperti disajikan dalam Gambar 2.7.

Gambar 2.7. Reaksi degradasi Strecker asam amino

Pada penyangraian biji kakao maka terjadi reaksi antara asam amino dengan gula reduksi membentuk senyawa Maillard. Senyawa gula mengalami terhidrolisis

oleh air dan membentuk senyawa gula reduksi yang kemudian mengalami reaksi Maillard.

Model reaksi Maillard digambarkan oleh (Afoakwa *et al.* 2008) tersaji dalam Gambar 2.8.

Gambar 2.8 Model reaksi Maillard pada biji kakao sangrai (Afoakwa *et al.*, 2008)

Beberapa senyawa mudah menguap yang dijumpai ada biji kakao hasil sangrai antara lain asam organik, aldehyd, furan, pirazin, alkohol dan ester (Soria *et al.*, 2005). Fenema (1996); dan Ziegleder *et al.* (2009) menyatakan bahwa tahap akhir reaksi Maillard menghasilkan pigmen melanoidin berwarna coklat yaitu reaksi antara gugus karbonil dari gula reduksi dengan asam amino bebas yang

mengandung nitrogen dari asam amino yang bersifat tidak larut dalam air. Reaksi Maillard merupakan reaksi kimia yang melibatkan asam amino dan glukosa yang menghasilkan pigmen coklat, dan reaksi Maillard tersebut dapat berlangsung hanya pada kondisi suhu relatif tinggi dan pH diatas 3 (Afoakwa *et al.* 2008).

Reaksi Maillard arah kiri (Gambar 2.8) berperan dalam pembentukan senyawa flavor kakao, sedangkan arah kanan cenderung membentuk pigmen atau warna. 1-DH, 3-DH dan 4-DH (*Dioksiheksa selulus*) merupakan dikarbonil yang berperan dalam reaksi pembentukan senyawa aldehid dan aminoketon, dan selanjutnya bereaksi dengan asam amino melalui reaksi degradasi Strecker. Penyangraian biji kakao atau kakao nib menyebabkan konsentrasi asam volatil turun secara nyata, khususnya asam asetat, dan penurunan asam volatil mengurangi rasa asam pada produk akhir kakao.

Asam organik yang bersifat volatil seperti asam asetat, asam propionat, asam butirat dan asam isovalerat, dipengaruhi oleh suhu dan lama penyangraian namun tidak berpengaruh terhadap konsentrasi asam laktat. Menurut Jinab (1994), Suria *et al.*, (2005), bahwa penyangraian pada suhu 150°C selama 30 menit dapat menyebabkan kehilangan asam asetat sebesar 10-15%, dan asam propionat sebesar 10%. Biji kakao atau kakao nib kering pasca sangrai memiliki lebih dari 400 komponen aroma yang diidentifikasi oleh Misnawi *et al.*, (2008).

Misnawi *et al.* (2008) dan Counet *et al.* (2002) menyatakan bahwa biji kakao kering pasca sangrai dapat menghasilkan senyawa pirazin, ester, karbonil, fenol, alkohol, keton, hidrokarbon, monoterpen hidrokarbon, benzenoid hidrokarbon, furan dan asam.

Senyawa utama biji kakao hasil sangrai pada suhu dan lama penyangraian berbeda disajikan pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5. Senyawa volatil biji kakao pasca sangrai pada suhu dan lama penyangraian berbeda

Senyawa	Perlakuan penyangraian *)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pirazin	4	6	5	8	4	10	11	11	13	13
Ester	20	19	20	18	19	20	20	20	17	29
Karbonil	2	3	2	3	2	3	3	3	2	3
Fenol	2	2	1	2	3	3	3	2	3	2
Alkohol	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2
Keton	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2
Hidrokarbon	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Monoterpen	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
hidrokarbon										
Benzenoid	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hidrokarbon										
Furan	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
Asam	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1

Keterangan : Sumber : Misnawi *et al*, (2008).

1. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 115°C, lama 15 menit
2. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 115°C, lama 25 menit
3. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 115°C, lama 35 menit
4. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 115°C, lama 45 menit
5. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 115°C, lama 55 menit
6. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 120°C, lama 15 menit
7. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 120°C, lama 25 menit
8. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 120°C, lama 35 menit
9. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 120°C, lama 45 menit
10. perlakuan penyangraian biji kakao pada suhu 120°C, lama 55 menit

Tabel 2.5. menunjukkan bahwa senyawa pirazin pada biji kakao kering pasca sangrai makin banyak dihasilkan seiring dengan tinggi suhu dan lama waktu sangrai. Senyawa ester makin banyak dihasilkan pada suhu penyangraian 120°C dengan lama waktu penyangraian 55 menit. Senyawa asam biji kakao pasca sangrai makin turun seiring tinggi suhu dan lama waktu sangrai. Senyawa pirazin dan

senyawa ester adalah dua senyawa volatil yang banyak terdapat pada biji kakao kering pasca sangrai.

2.7. Flavor Biji Kakao

Flavor merupakan senyawa paling penting dalam penentuan tingkat penerimaan dan kesukaan produk coklat oleh konsumen. Kombinasi antara sensasi cita rasa dan aroma, konsentrasi serta kontinuitas cita-rasa memunculkan flavor. Aroma merupakan penentu flavor pangan, sementara cita-rasa terbatas pada cita-rasa manis, masin, asam, pahit dan gurih.

Marliayana, (2002) menjelaskan bahwa flavor pangan sangat mudah mengalami perubahan oleh perubahan aroma, namun demikian rasa dari produk tidak akan berubah. Menurut Owusu, (2010) bahwa flavor meliputi rasa dan bau atau aroma. Aroma makanan dapat diterima secara nasal, yaitu langsung melalui rongga hidung (*retronasally*), yang dirasakan oleh reseptor ketika dihirup ke hidung melalui tenggorokan setelah makanan dikunyah. Interaksi antara rasa, bau dan tekstur ketika makanan dikonsumsi disebut *flavor*.

2.7.1. Aroma khas biji kakao

Aroma dalam kondisi alamiah adalah campuran komponen senyawa volatil yang berasal dari kelompok senyawa berstruktur sederhana seperti alkohol atau berstruktur kompleks seperti senyawa organik heterosiklik. Hoskin dan Dimick, (1994), Owusu (2010), Campos *et al.*(2011) dan Campos *et al.* (2012) menyatakan bahwa senyawa flavor yang telah berhasil diidentifikasi antara lain furan, terpen, pirol, piran, piridin, fenol dan senyawa sulfur. Kelompok senyawa tersebut memberikan atribut sensoris tertentu dan berbeda-beda, sehingga flavor yang

terbentuk pada biji kakao kering maupun olahannya sangat spesifik. Owusu, (2010) menjelaskan bahwa aroma biji kakao dan coklat (hasil olahan biji kakao) terdiri atas sejumlah senyawa volatil yang berbeda, tetapi tidak ada satupun dari senyawa tersebut dapat mewakili karakteristik aroma biji kakao atau cokelat secara nyata, meskipun terdiri atas campuran beberapa senyawa volatil.

Beberapa peneliti telah melakukan identifikasi dan diperoleh hasil 11 senyawa utama penyusun cita-rasa cokelat. Diantara senyawa tersebut diketahui sebagai senyawa pirazin dan telah menyita banyak perhatian bagi kalangan peneliti kakao. Pirazin memberikan kontribusi nyata terhadap aroma dan cita rasa khas cokelat olahan biji kakao. Konsentrasi senyawa pirazin sangat ditentukan oleh suhu dan lama penyangraian biji kakao. Karakteristik senyawa priazin sebagai pembentuk cita-rasa dan yang ditimbulkan oleh masing – masing senyawa pembentuk disajikan pada Tabel 2.6.

Tabael 2.6. Karakter cita rasa dan konsentrasi pirazin dalam hasil sangrai biji kakao terfermentasi

Senyawa	Karakter cita rasa	Konsentrasi (µg/kg)
Pirazin	Tajam (pungent), manis	-
2-Metilpirazin	Seperti kacang, khas kakao, khas cokelat	4
2,5-Dimetilpirazin	Khas kakao, seperti kacang sangrai	60
2,6-Dimetilpirazin	Seperti kacang, khas kopi, bau rumput (green)	88
2-Etilpiarazin	Bau lemak kacang, apek, seperti kacang	-
2,3-Dimetilpirazin	Khas karamel, khas kakao	19
2,3,5-trimetilpirazin	Khas kakao, seperti kacang sangrai	1.200
2,3,5,6,-tetrametilpirazin	Khas cokelat, kahas kakao, khas kopi	2.900

Sumber : Misnawi *et a*, (2008) dan Aprotosoai, *et al*, (2016)

Pembentukan senyawa aroma kakao dimulai sejak fermentasi *pulp* yang banyak mengandung gula. Senyawa flavor pertama yang terbentuk adalah etanol, asam asetat dan asam laktat oleh aktivitas yeast. Beckett (2009) menjelaskan bahwa kondisi fermentasi sangat mempengaruhi mutu senyawa flavor biji kakao. Fermentasi kurang baik akan menghasilkan biji kakao dengan flavor pahit, sepat, masam, dan pembentukan coklat kurang berhasil sedangkan fermentasi yang berlebihan dapat menimbulkan *hammy-flavor* yang merugikan. Senyawa flavor ini disebabkan oleh serangga atau mikrobia aerofilik pada biji kakao, kenaikan pH dan pembentukan biji berwarna hitam, selanjutnya pembentukan aroma berlanjut saat pengeringan dan penyangraian biji kakao lebih disebabkan oleh reaksi Maillard dan diikuti pembentukan senyawa Amadori serta reaksi degradasi Strecker.

Minifie, (1982) menyatakan bahwa mekanisme pencoklatan pada makanan umumnya melibatkan reaksi kondensasi antara gugus amino atau protein dengan gugus karbonil dari gula reduksi yang lazim disebut reaksi sebagai karbonil amino. Aroma coklat merupakan hasil reaksi kompleks antara asam amino, peptide, gula dan komponen flavonoid saat dilakukan penyangraian biji kakao atau kakao nib, dan dipengaruhi oleh suhu, waktu, dan kadar air biji kakao (Rizzi dan Bunke, 1988). Senyawa aroma penting adalah dari kelompok aldehid seperti isovaleraldehid, sebagai hasil kondensasi aldehid, linalol untuk biji kakao, pirazin, oxazol, acetyl piridine methylvinylthiazol yang dijumpai pada biji kakao sangrai (Nuwiah, 2010).

2.7.2. Cita-rasa biji kakao

Cita-rasa khas kakao adalah rasa pahit dan rasa pahit tersebut dapat berasal dari senyawa alkaloid seperti theobromin dan kafein, komponen fenolik, pirazin dan

beberapa senyawa peptida dan asam amino bebas. Rasa pahit pada produk cokelat sering rancu dengan rasa sepat (*astringent*), karena sebagian orang kurang memahami perbedaan antara kedua cita-rasa tersebut. Apalagi tanin dan polifenol dalam biji kakao sebagai senyawa yang bertanggung jawab terhadap rasa sepat, dan juga memberikan sensasi rasa pahit. Rasa masam juga merupakan atribut penting dalam pembentukan cita rasa keseluruhan produk cokelat.

Misnawi *et al.* (2011) menyatakan bahwa kehadiran rasa masam dalam jumlah relatif sedikit akan memberikan keseimbangan cita-rasa cokelat, tetapi dalam jumlah yang besar dianggap sebagai cacat rasa. pH dan senyawa asam tertitrasi pada biji kakao yang baik pada kisaran 5,2 – 5,5 dan 788 µg/g. Asam laktat dan asam asetat merupakan komponen penyebab rasa asam pada cokelat. Konsentrasi asam tersebut dalam biji kakao sangat tinggi mencapai 1,5% dan asam aasetat tersebut memiliki titik uap yang relatif rendah (118 °C) dengan nilai threshold 54 mg/kg, serta memiliki rasa cuka yang tajam dan sebesar 95-98% yang merupakan asam volatil. Asam laktat adalah asam tidak mudah menguap dan hanya 10% dari jumlah asam laktat dapat menguap saat penyangraian biji kakao (Supriyanto *et al.*, 2007).

Selanjutnya menurut Supriyanto *et al.* (2007) bahwa rasa sepat, masam, bau jamur, bau tanah, hammy, bau asap, dan tengik adalah cacat rasa pada cokelat yang dapat muncul karena cara pengolahan yang salah. 2-Metitoksi-3-isopropilpirazin dan e-metil-isoborneol yang dihasilkan oleh jamur *Actinomyces sp* merupakan senyawa yang lazim ditemukan dalam biji kakao berjamur. Rasa tengik disebabkan oleh hasil hidrolisa dan oksidasi lemak cokelat dan hal ini lebih sering terjadi karena pertumbuhan jamur. Rasa manis adalah sifat rasa yang mempengaruhi cita

rasa coklat secara keseluruhan yang sangat menentukan derajat kesukaan konsumen. Beberapa asam amino seperti glisin dan alanin, serta peptida juga memberikan rasa manis pada biji kakao. Senyawa asam-asam amino dan gula dalam biji kakao sangat besar perannya dalam pembentukan senyawa cita-rasa coklat, terutama selama penyangraian biji kakao. Konsentrasi asam amino dan gula turun selama penyangraian dan hal ini sejalan dengan kenaikan pembentukan senyawa cita-rasa.

2.8. Landasan Teori

Petani kakao lazim memproduksi biji kakao kering dalam 2 jenis yaitu, biji kakao kering hasil fermentasi dan biji kakao kering tanpa fermentasi. Untuk mendapatkan flavor khas kakao dan memiliki mutu baik, maka biji kakao segar harus diolah dengan fermentasi. Hal ini memiliki alasan yang kuat karena dengan fermentasi terjadi diperoleh perubahan yang menguntungkan baik pada bagian pulp maupun keping biji. Perubahan yang berlangsung pada pulp selama fermentasi adalah gula *pulp* diubah menjadi alkohol oleh yeast dan memberikan dampak kerusakan sel testa (kulit biji) oleh enzim pektinase. Alkohol tersebut selanjutnya mengalami perubahan menjadi asam organik utamanya asam laktat dan asam asetat oleh mikrobia endogenous yaitu bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Dengan demikian asam yang terbentuk mengalami difusi kedalam keping biji, dan memberikan dampak terhadap aerasi media fermentasi yang makin besar (Schwan dan Wheals, 2004).

Moriera *et al*, (2013) menyatakan bahwa peran yeast hanya berlangsung selama 24 jam awal fermentasi dan selanjutnya peran yeast digantikan oleh peran

bakteri untuk mendegradasi alkohol menjadi asam laktat dan asam asetat. Makin sedikit jumlah gula dan kondisi lingkungan fermentasi yang makin asam, maka peran bakteri asam laktat mulai berkurang dan hilang, maka peran bakteri asam laktat secara alami digantikan oleh peran bakteri asam asetat. Asam asetat yang diproduksi oleh bakteri asam asetat tersebut mengalami difusi kedalam keping biji melalui sel testa yang telah mengalami kerusakan pada saat awal fermentasi, sehingga menyebabkan kematian biji kakao. Kondisi bagian luar biji tersebut memberikan kesempatan bagi enzim endogenous untuk menghidrolisa protein dan gula dalam keping biji yang diikuti oleh pembentukan berbagai senyawa prekursor seperti senyawa pembentuk flavor khas kakao yang khas yaitu senyawa pirazin.

Penelitian sebelumnya banyak mengkaji tentang mekanisme dan sistem pembentukan senyawa prekursor flavor melalui fermentasi alami dan fermentasi yang dikendalikan. Schwan dan Wheals, (2004) menyatakan bahwa mikrobial yang terlibat dalam fermentasi biji kakao sesungguhnya berasal dari kontaminan dilingkungan tempat kegiatan produksi biji kakao kering. Kontaminasi oleh mikrobial mulai terjadi saat pod buah kakao dibuka untuk tujuan pengeluaran biji kakao. *S. cerevisiae* adalah yeast yang banyak di jumpai pada media fermentasi biji kakao di Indonesia khususnya di Pulau Jawa. Selain itu *S. cerevisiae* memiliki berbagai kelebihan seperti lebih tahan terhadap perubahan suhu fermentasi, memiliki enzim endogenous (intraseluler) yang mampu mendegradasi dengan baik senyawa pektin dalam pulp biji kakao. Selanjutnya *L. lactis* merupakan bakteri asam laktat yang banyak ditemukan pada media fermentasi biji kakao yang merupakan mikrobial kontaminan juga. *L. lactis* memiliki sifat lebih tahan terhadap

kondisi asam dan perubahan suhu lingkungan, serta mampu menghasilkan asam laktat disamping asam asetat. Sedangkan *A. aceti* merupakan bakteri asam asetat yang banyak ditemui juga pada lingkungan fermentasi biji kakao dengan berbagai kelebihan seperti menghasilkan asam asetat dan tahan pada lingkungan dengan aerasi yang baik (Ardana dan Fleet, 2003).

Keberhasilan fermentasi biji kakao dicirikan oleh kenaikan populasi mikrobial dalam media fermentasi seperti kenaikan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* (Moriera *et al*, 2013). Kustyawati dan Setyani (2008) menyatakan bahwa penggunaan campuran inokulum mikrobial murni *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* dapat mempercepat laju fermentasi dan sekaligus kematian biji. Penggunaan inokulum mikrobial *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* telah meningkatkan laju kenaikan suhu fermentasi lebih cepat, sehingga memberikan dampak pada fermentasi yang berlangsung tidak sempurna. Bahkan penggunaan inokulum *L. plantarum* untuk fermentasi biji kakao dapat tumbuh cepat sehingga pembentukan dan difusi asam ke dalam biji kakao berlangsung lebih cepat yang mempercepat kematian biji kakao (Kresnowati *et al*, 2013). Kajian tentang biji kakao segar telah dilakukan, tetapi kajian tentang perbaikan mutu biji kakao kering hasil olahan sebagian besar petani belum banyak dilakukan oleh peneliti.

Semuel (2013) menyatakan bahwa perendaman biji kakao kering dapat memperbaiki nilai indeks fermentasi pasca dilakukan fermentasi seperti halnya pada fermentasi biji kakao segar. Menurut Heriyawan (2015) bahwa *pulp* biji kakao kering telah banyak kehilangan air pasca penjemuran, karena memang tujuan pengeringan adalah untuk pengeringan biji kakao pasca panen. Secara teori

perbaikan parameter mutu khususnya flavor dari biji kakao kering dapat dilakukan dengan berbagai langkah persiapan yang memadai seperti identifikasi komposisi *pulp* biji kakao kering untuk dapat dilakukan upaya perlakuan agar *pulp* biji kakao kering tersebut sama atau paling tidak mendekati komposisi *pulp* biji kakao segar. Dengan demikian perbaikan parameter mutu biji kakao kering jemur dapat dicapai melalui fermentasi sebagaimana lazim digunakan untuk fermentasi biji kakao segar.

Pulp biji kakao kering faktanya adalah dalam kondisi kering akibat pengeringan sehingga kurang cocok untuk pertumbuhan mikrobial baik yang berasal dari alam maupun bentuk inokulum. Oleh sebab itu agar fermentasi biji kakao kering dapat berlangsung baik maka sebelum difermentasi pada biji kakao kering dilakukan perendaman dalam air atau rehidrasi untuk mendapatkan kadar air *pulp* biji kakao kering mendekati kadar air *pulp* biji kakao segar. Selain itu untuk dapat mempercepat laju fermentasi perlu ditambah inokulum seperti *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* dengan harapan terjadi suksesi peran mikrobial sebagaimana yang berlangsung pada suksesi mikrobial pada fermentasi biji kakao segar.

Penggunaan inokulum mikrobial murni dimaksudkan agar mikrobial yang memiliki peran penting dalam fermentasi biji kakao kering mencapai jumlah yang memadai yaitu 10^8 cfu/g. Menurut Afoakwa *et al.* (2008) bahwa perubahan struktur dan komposisi dalam biji kakao dimulai saat terjadi kerusakan jaringan testa (kulit biji) oleh enzim pektinase yang memberi peluang terdifusinya asam asetat ke dalam massa keping biji yang menyebabkan kematian biji sebagaimana yang diharapkan dari pengolahan biji kakao. Perubahan komposisi biji kakao dimulai saat memasuki fase hidrolitik anaerob di awal fermentasi. Penyerapan air oleh biji kakao melalui

testa setelah kematian biji akan diikuti hidrolisis protein oleh enzim protease, sukrosa oleh enzim invertase dan antosianin oleh enzim glikosidase. Indogenous enzim tersebut mulai aktif mengkatalis reaksi antara gula dan protein untuk menghasilkan senyawa prekursor khas flavor (Afoakwa, 2010). Misnawi *et al.* (2002) menyatakan bahwa biji kakao non-fermentasi masih berpotensi memiliki enzim endogenous.

Berdasarkan berbagai uraian dan fakta seperti tersebut maka penelitian tentang proses fermentasi biji kakao kering menggunakan inokulum mikrobial mampu memperbaiki parameter mutu, warna keping biji sesuai standart SNI 01-2323-2002 dan menghasilkan aroma khas kakao pasca sangrai. Perbaikan parameter mutu biji kakao kering yang diharapkan adalah terbentuknya cita-rasa dan flavor khas kakao. Keberhasilan penelitian ini menggunakan beberapa pendekatan masalah melalui hipotesa yang akan diuji kebenarannya dengan percobaan penelitian yang dirancang secara baik dan luas.

2.9. Hipotesis

Proses fermentasi biji kakao diduga dapat memunculkan prekursor flavor yaitu meningkatnya konsentrasi asam amino hidrofofik, total polifenol menurun selama fermentasi. Prekursor flavor dapat timbul jika asam – asam organik terbentuk selama fermentasi dalam konsentrasi yang dapat mematikan biji dan menginsiasi proses enzimatik dalam keping biji.

Konsentrasi asam – asam organik diduga dapat terbentuk dengan adanya jumlah *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* tertinggi. Hipotesa penelitian adalah sebagai berikut :

1. Diduga fermentasi biji kakao kering dengan penambahan inokulum secara bertahap dihasilkan mutu biji kakao yang baik secara fisik.
2. Penambahan inokulum secara bertahap diduga dapat menghasilkan senyawa prekursor flavor yaitu total polifenol turun dan total asam amino hidrofobik naik.
3. Apabila biji kakao kering hasil fermentasi terdapat senyawa prekursor flavor setelah proses sangrai dapat dihasil senyawa volatil khas biji kakao dan disukai panelis.

2.10. Kerangka Penelitian

Berdasarkan landasan teori dan hipotesa yang diajukan maka skema kerangka penelitian disajikan Gambar 2.9 berikut :

Gambar 2.9. Skema kerangka penelitian

III. METODE PENELITIAN

3.1. Bahan Penelitian

Buah kakao jenis lindak (*bulk cacao*) diperoleh dari desa Bunder, Patuk, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan karakteristik yang dimiliki yaitu panjang buah ± 15 cm, diameter ± 8 cm, kulit buah masak optimal berwarna orange, jumlah biji tiap pod ± 35 keping biji. Buah kakao masak optimum yang digunakan untuk penelitian seperti disajikan pada Gambar 3.1.

Gambar 3.1. Buah kakao masak optimum yang digunakan untuk penelitian

Inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Aseton 80%, BSA (bovien serum albumin), buffer pospat, asam asetat, *trichloroacetat acid*, HCl, larutan buffer pH 4, pH 7 dan pH 9, hexan, larutan *Folin-Ciocalteu*, Na_2CO_3 .

Eluent A terdiri dari buffer asam asetat : 50 mM Natrium asetat : THF (2:96:2) pH 6,8 sebagai fase diam. Eluent B terdiri atas asam asetat 65% sebagai fase gerak.

Eluent A terdiri dari buffer asam asetat : 50 mM Natrium asetat : THF (2:96:2) pH 6,8 sebagai fase diam. Eluent B terdiri atas asam asetat 65% sebagai fase gerak. Kertas saring whatman nomer 1. Media tumbuh mikrobial *Peptone* (oxoid), *Glucose* (oxoid), *Yeast extract* (oxoid), MRS broth (Oxoid), agar (oxoid), NaCl, CaCO₃. Etanol 90%. Reagensia Nelson A dan Nelson B. Pb asetat. Semua bahan kimia yang digunakan untuk keperluan penelitian adalah katagori Pro Analisis (PA-Grade).

3.2. Alat Penelitian

Fermentasi biji kakao kering menggunakan botol reagen duran tutup biru ukuran 250 ml. Peralatan penting untuk keperluan analisis terdiri atas: Cutter tajam, Camera (Samsung, 16 Mpixel), Erlemeyer 250ml, Erlemeyer 500ml, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601 Tokyo, Japan), pH meter (Jenway model 370), pengaduk, 1 unit soxlet set, sonikator, labu ukur (pyrex), pipet tetes, gelas ukur, Mortar, magnetik stirer, penangas air, rotary evaporator, HPLC *reversed phase*, kolom Licrospher ® 100 RP 18 (5µm) 125 mm x 4mm dengan *gradient elution*, Fluoren Shomadzu RF-138 detektor, SPME viber DVB/CAR/PDMS serta seperangkat alat GC-MS (column : HP-INNOWax (30 m x 250 µm x 0.25 µm) instrument GC Agilent 7890 A dan MS Agilent 5975C). Tabung reaksi (pyrex), jarum ose (buatan lokal), quebec colony counter (QCC) (Dark field Quebec, American Optical), blue tip, petridis jenis pyrex, pipet tetes 1 ml, autoclave.

3.3. Tempat Penelitian

Pengeringan biji kakao segar di Laboratorium Rekayasa Pusat Studi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada, untuk penyiapan inokulum mikrobial dan fermentasi di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi

Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada dan pengeringan biji kakao segar. Penyangraian biji kakao dilakukan di Laboratorium Rekayasa, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada. Analisis asam amino dilakukan di Laboratorium Terpadu Institut Pertanian Bogor, Bogor dan analisis senyawa volatil biji kakao kering hasil sangrai dilakukan di laboratorium Balai Pengkajian dan Penelitian Pertanian Sukamandi, Subang.

3.4. Tahap Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 3 tahap. Tahapan pertama adalah identifikasi kadar air dan komponen lain dalam *pulp* biji kakao kering. Kadar air awal ini penting diuji untuk menentukan seberapa banyak air yang diperlukan untuk rehidrasi *pulp* agar mendekati kadar air biji kakao basah. Pemberian air pada biji kakao kering (rehidrasi) diharapkan dapat menghasilkan *pulp* biji kakao hasil rehidrasi yang cocok sebagai media untuk pertumbuhan mikrobial indogenus seperti yeast, bakteri asam laktat (BAL) dan bakteri asam asetat (BAA) sehingga proses perlakuan kontrol atau terkendali dapat berlangsung. Setelah rehidrasi biji kakao diperlakukan kontrol selama 120 jam dan keadaan keeping biji diamati secara visual.

Perbandingan jumlah air yang harus ditambahkan terhadap biji kakao kering untuk mencapai kadar air *pulp* minimal yang diperlukan untuk fermentasi akan dipilih untuk penelitian Tahap II. Pada Tahap ini akan dibandingkan tiga teknik fermentasi, namun ketiganya menggunakan total waktu fermentasi 120 jam (5x24 jam) dengan pengaturan suhu sebesar $35^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ pada awal 24 jam pertama, $45^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ pada awal 24 jam kedua, $55^{\circ} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ pada awal 24 jam ketiga dan

35° ± 0,1°C pada awal 48 jam terakhir. Teknik pertama, biji kakao rehidrasi yang terpilih dari Tahap I difermentasi secara spontan (tanpa inokulum) sebagai perlakuan kontrol. Teknik fermentasi kedua dengan penambahan inokulum yeast *S. Cerevisiae* (FNCC 3056), BAL *L. lactis* (FNC 0086) dan BAA *A. aceti* (FNCC0016) secara serentak pada awal 24 jam pertama. Perlakuan fermentasi ini untuk selanjutnya disebut penambahan inokulum mikrobial secara serentak (IA). Teknik fermentasi ketiga serupa dengan yang kedua, namun penambahan inokulum secara bertahap, penambahan inokulum yeast pada awal 24 jam pertama, BAL pada awal 24 jam kedua, BAA pada awal 24 jam ketiga. Perlakuan ketiga ini untuk selanjutnya disebut inokulasi mikrobial secara bertahap (IB). Keberhasilan fermentasi ditinjau dari perubahan suhu fermentasi, pH biji kakao, indeks fermentasi, warna keping biji kakao, kadar gula total dan kadar gula reduksi selama fermentasi.

Diagram alur tahap penelitian disertasi disajikan pada Gambar 3.2.

Gambar 3.2. Empat tahapan penelitian fermentasi terkendali biji kakao kering menggunakan inokulum mikrobial.

Terbentuknya prekursor flavour terjadi setelah kematian biji oleh suhu dan difusi asam asetat kedalam biji dan degradasi protein menjadi senyawa asam amino hidrofobik oleh enzim, serta oksidasi polifenol yang menghasilkan perubahan warna keping biji kakao hasil fermentasi. Oleh sebab itu pada penelitian Tahap II ini juga dilakukan evaluasi perubahan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, *A. aceti*, senyawa polifenol, konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat selama fermentasi, serta konsentrasi asam amino bebas yang dihasilkan. Pada penelitian Tahap III dilakukan evaluasi senyawa volatil yang terbentuk pada biji kakao terfermentasi yang disangrai. Selain itu juga dilakukan penilaian preferensi sensori menggunakan uji hedonik.

3.4.1. Penelitian Tahap I. Identifikasi potensi pulp biji kakao kering sebagai media fermentasi

Diagram alur penelitian tahap 1 disajikan dalam Gambar 3.3.

Gambar 3.3. Alur penelitian tahap 1. Identifikasi potensi pulp biji kakao kering sebagai media fermentasi

Biji kakao segar dikeringkan menggunakan pengering kabinet pada suhu $40 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ sampai kadar air menjadi tiga tingkat, yaitu $10 \pm 0,1\%$, $15 \pm 0,1\%$ dan $20 \pm 0,1\%$. Selanjutnya biji kakao kering direhidrasi dengan air dengan perbandingan volume air terhadap berat biji kakao sebesar 60:100 (v/b), 80:100 (v/b) dan 100:100 (v/b).

Pulp biji kakao kering hasil rehidrasi selanjutnya dianalisa kadar air (Lampiran 1.1.), kadar gula total dan kadar gula reduksi (Lampiran 1.2), pH (Lampiran 1.3) dan asam sitrat (Lampiran 1.11). Fermentasi yang menghasilkan keping biji kakao kering dengan persentase warna coklat tertinggi pada tahap ini digunakan sebagai acuan untuk melakukan tahap selanjutnya.

3.4.2. Penelitian tahap II. Variasi teknik fermentasi dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016).

Tahap tahap ini dilakukan perbandingan fermentasi terkendali dengan penambahan inokulum mikrobial dan pengaturan suhu inkubator dengan perlakuan kontrol. Biji kakao kering terhidrasi yang digunakan pada tahap ini adalah yang terpilih dari penelitian Tahap I. Biji kakao rehidrasi sebanyak 100 gram difermentasi selama 5x24 jam dengan tiga variasi perlakuan: a). tanpa penambahan inokulum disebut kontrol, b) dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) secara serentak pada awal fermentasi dengan populasi masing-masing sebanyak 10^8 cfu/g, dan c) dengan penambahan inokulum mikrobial secara bertahap sebagai berikut : *S. cerevisiae* (FNCC 3056) pada awal 24 jam pertama, *L. lactis* (FNC 0086) pada awal 24 jam kedua dan *A. aceti* (FNCC 0016) pada awal 24 jam

ketiga, masing masing dengan populasi sebanyak 10^8 cfu/g. Fermentasi dilakukan secara berurutan dengan suhu terkendali: $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam pertama, $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam kedua, $55 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam ketiga dan $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pada awal 24 jam keempat hingga jam ke 120. Total waktu fermentasi adalah 120 jam.

Pada penelitian Tahap II ini digunakan 2 unit inkubator, yang pertama diatur sedemikian rupa agar mencapai $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$ dan inkubator kedua diatur mencapai $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sebelum dipakai. Setiap kali akan dipakai, suhu inkubator dipersiapkan mencapai suhu terkendali seperti yang dikehendaki. Setelah mencapai lama waktu fermentasi yang ditetapkan, biji kakao dipindahkan dari inkubator yang satu ke yang lainnya dengan suhu yang sudah diatur untuk mencapai lama waktu yang ditetapkan. Demikian seterusnya hingga proses fermentasi total mencapai 120 jam.

Alur penelitian tahap 2 disajikan pada Gambar 3.4.

Gambar 3.4. Alur penilitian tahap 2. Variasi teknik fermentasi dan evaluasi hasil fermentasi tanpa penambahan inokulum dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* secara serentak diawal dan secara bertahap

Pengujian karakteristik hasil fermentasi meliputi kadar gula total dan kadar gula reduksi (Lampiran 1.2), pH biji (Lampiran 1.3), indeks fermentasi (Lampiran 1.4), warna keping biji (Lampiran 1.5). Prosedur pelaksanaan ketiga teknik fermentasi disajikan pada Lampiran 1.6, total polifenol (Lampiran 1.7) dan asam amino (Lampiran 1.8). Pengujian jumlah *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* menggunakan metode *pour plate count* (Kustyawati dan Setyani, 2008) (Lampiran 1.9), konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat (metode *High Performance Liquid Chromatography*) disajikan pada Lampiran 1.11 dan inokulum mikobia disiapkan dengan metode Ardana dan Fleets,(2003) yang dimodifikasi (Lampiran 1.12).

3.4.3. Penelitian Tahap III. Evaluasi profil senyawa volatil pasca sangrai

Biji kakao hasil fermentasi (penelitian Tahap II) dikeringkan dengan pengering kabinet sampai kadar air $7 \pm 0,1\%$. Biji kakao fermentasi yang kering disangrai dengan mengacu pada metoda Misnawi dan Ariza, (2011) yang telah dimodifikasi dengan suhu 140°C selama 5 menit sampai kadar air sekitar 2%. Biji kakao terfermentasi yang telah disangrai disebut nib. Setelah kulit dipisahkan, nib tanpa kulit dihaluskan sampai ukuran 80 mesh.

Setiap nib tanpa kulit dari ketiga cara fermentasi diambil sampel dan dimasukkan ke dalam botol berwarna yang berpenutup karet supaya senyawa volatil terkumpul untuk analisa. Nib tanpa kulit dari masing-masing hasil fermentasi juga diuji sensoris. Pengujian senyawa volatil menggunakan SPME (*Solid Phase Microextraction*) dan dilanjutkan dengan GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) mengacu metoda Misnawi dan Ariza,

(2011) seperti Lampiran 1.10. Uji sensoris ditujukan untuk mengetahui tingkat kesukaan dari 25 orang panelis

Diagram alur penelitian tahap ini disajikan pada Gambar 3.5.

Gambar 3.5. Alur penelitian tahap 3. Evaluasi senyawa volatil pasca sangrai biji kakao hasil fermentasi dan pengeringan

3.5. Rancangan Percobaan

Penelitian Tahap I sampai dengan III menggunakan rancangan percobaan acak lengkap, data yang didapat uji statistik menggunakan *one way anova* pada tingkat signifikansi 95% jika berbeda nyata dilanjutkan dengan uji lanjut LSD (*least Significant different*) menggunakan program SPSS 17.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Komposisi *pulp* biji kakao kering

Pada Tabel 4.1 disajikan kadar air *pulp* biji kakao terhidrasi dan kondisi keping biji setelah perlakuan kontrol selama 120 jam.

Tabel 4.1. Perubahan kadar air *pulp* biji kakao kering sebelum dan setelah rehidrasi yang difermentasi selama 120 jam.

Kadar air <i>pulp</i> (% , bk) 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

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

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.

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).

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.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa komposisi *pulp* biji kakao kering sebelum perendaman telah terjadi penurunan gula total, gula reduksi dan penurunan kadar air. Penurunan gula total dan gula reduksi karena telah terjadi perombakan gula oleh mikrobia 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. 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 $\pm 3,8\%$. Komposisi *pulp* biji kakao segar, komposisi *pulp* biji kakao kering sebelum perendaman dan komposisi *pulp* biji kakao kering setelah perendaman disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. 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 (% , bb)	80,5	15,2	78,5
Gula total (% , bk)	10,2	9,3	7,5
Gula reduksi (% , bk)	5,5	4,2	3,8
Asam organik (% , bk)	2,1	1,2	0,95
pH	4,7	4,5	4,3

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 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 diferementasi.

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. 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). Populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang terdapat pada *pulp* biji kakao segar dan *pulp* biji kakao kering tersaji pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3. 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 subtrat. Gula total dan gula reduksi *pulp* biji kakao kering masih memenuhi untuk digunakan sebagai subtrat 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.

4.2. Variasi teknik fermentasi dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*

Suhu fermentasi merupakan suhu yang terjadi karena adanya aktivitas mikrobia selama fermentasi. Pengukuran suhu fermentasi dilakukan didalam tempat fermentasi, dalam perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan penambahan secara bertahap (IB). Pengukuran suhu fermentasi dilakukan untuk mengetahui fenomena perubahan suhu selama fermentasi dan pencapaian suhu tertinggi, dimana suhu tertinggi merupakan salah satu penyebab kematian biji.

Hasil analisis statistik dengan ANOVA satu arah menunjukkan bahwa ada pengaruh penambahan inokulum terhadap suhu fermentasi (Lampiran 2.10). Suhu fermentasi rata-rata menunjukkan perbedaan yang nyata. Suhu pada perlakuan kontrol, IA dan IB masing-masing sebesar 34,6, 36,6 dan 40,5°C.

Karakteristik produk nib dari ketiga cara fermentasi disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. 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

Hasil penelitian menunjukkan 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 4.1. Peningkatan suhu fermentasi diikuti peningkatan indeks fermentasi. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa variasi teknik fermentasi tidak berpengaruh terhadap indeks fermentasi.

Gambar 4.1. 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

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. 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 menunjukan bahwa setelah suhu fermentasi mencapai suhu kematian biji akan

tercapai indeks fermentasi ≥ 1 . 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 4.2.

Gambar 4.2. 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.

Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa perlakuan kontrol, IA dan IB menunjukkan rata – rata indeks fermentasi tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$). 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. Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa variasi teknik fermentasi berpengaruh pada perubahan warna slaty 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.

Hasil analisis Anova satu arah menunjukkan bahwa warna ungu kecoklatan keping biji kakao kering tidak dipengaruhi oleh variasi teknik fermentasi. Warna ungu kecoklatan keping biji kako kering antar perlakuan menunjukkan tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$). 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.

Hasil analisis statistik Anova satu arah menunjukkan bahwa variasi teknik fermentasi tidak berpengaruh pada persentase keping biji berwarna coklat. 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%. Persentase 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 4.3, 4.4 dan 4.5.

Gambar 4.3. 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 4.4. 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 4.5. Persentase 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.

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 4.6.

Gambar 4.6. Warna keping biji kakao kering pasca fermentasi

Hasil penelitian tahap ini yaitu 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 (Kusyawati dan Setyani, 2008). Oleh sebab itu diduga penambahan inokulum yeast dan bakteri asam asetat mampu mempercepat reaksi gula menjadi asam asetat sehingga mempercepat tercapainya suhu kematian biji (Nazaruddin *et al.*, 2006; Kusyawati dan Setyani, 2008; Widiyanto *et al.*, 2013).

Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa variasi teknik fermentasi tidak berpengaruh terhadap pH biji kakao kering. Perlakuan kontrol, IA

dan IB menunjukkan pH biji kakao kering tidak berbeda nyata seperti terlihat pada tabel 4.4. Selanjutnya pH biji kakao kering perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap naik berturut – turut menjadi 4,41, 4,30 dan 4,20 di 120 jam fermentasi seperti pada Gambar 4.7.

Gambar 4.7. 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.

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.

Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa rata – rata pH biji kakao kering perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 4,45; 4,28 dan 4,20. Perubahan pH biji kakao kering yang dihasilkan sesuai dengan yang diperoleh Kustyawati dan Setyani, 2008; Afoakwa *et al*, 2014 yang telah mempelajari perubahan pH nib selama fermentasi dengan perlakuan penambahan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti*.

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.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa gula total biji kakao kering seluruh perlakuan mengalami penurunan sampai 120 jam fermentasi seperti disajikan Gambar 4.8. Gula dalam biji kakao adalah sukrosa, fruktosa dan glukosa (Afoakwa, 2010) 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 (Biehl dan Ziegleder,2003; Afoakwa, 2010).

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 4.8. 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.

Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh variasi teknik fermentasi terhadap kadar gula total biji kakao kering seperti ditunjukkan tabel 4.4. 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%.

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 Ardana dan Fleet, (2003) populasi total gula diawal fermentasi adalah 19% menurun selama fermentasi sampai habis di 120 jam fermentasi.

Penurunan gula total biji kakao kering diikuti peningkatan gula reduksi. Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa variasi teknik fermentasi berpengaruh tidak beda nyata antar perlakuan. 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% selanjutnya tersaji pada Gambar 4.9. Hasil analisis statistik ANOVA juga menunjukkan bahwa rata – rata gula reduksi biji kakao seluruh perlakuan tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$). Perubahan gula reduksi yang dihasilkan sesuai dengan yang diperoleh Afoakwa *et al.* (2014) 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 β -galaktosidase, α -arbinosidase, dan α -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 4.9. 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.

Evaluasi proses fermentasi merupakan salah satu cara mengetahui keberhasilan proses fermentasi dengan beberapa paramater 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 kedalam biji serta menghasilkan suhu tinggi dan berakibat pada kematian biji kakao.

Berdasarkan penelitian Tahap II menunjukkan bahwa indeks fermentasi ≤ 1 terdapat pada perlakuan kontrol dan penambahan inokulum secara serentak (IA). 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.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 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). Pada perlakuan kontrol diawal 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%. 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%. 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%. Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa rata – rata populasi *S. cerevisiae* perlakuan kontrol, IA

dan IB berturut – turut yaitu 4,93, 5,86 dan 5,66 log (cfu/g) dan tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$). Hal ini dapat diduga bahwa pengendalian suhu lingkungan menjadi ideal untuk pertumbuhan *S. cerevisiae*.

Hasil analisis statistik evaluasi hasil fermentasi melalui perubahan kimia dan mikrobiologi dengan perlakuan kontrol, IA dan IB tersaji pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5. 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

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).

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 4.10.

Gambar 4.10. 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.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan kontrol berbeda nyata ($p \leq 0,05$) terhadap perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap. Perubahan populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* yang dihasilkan perlakuan kontrol sesuai dengan hasil penelitian Schwan dan Wheals, (2004) dan Afoakwa, (2010), 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 Ardana dan Fleet, (2003) yang telah mempelajari ekologi mikrobial pada fermentasi biji kakao di Indonesia.

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 Ganda *et al*, (2008) bahwa kondisi suhu dan pH optimum aktivitas enzim poligalaturonase (PG) akan terjadi depolimerisasi *pulp* biji kakao.

Hasil penelitian ini pada perlakuan penambahan inokulum *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNCC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) secara serentak diawal fermentasi menunjukkan bahwa populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis*, dan *A. aceti* diawal fermentasi berturut – turut yaitu 8,28, 8,58 dan 8,57 log (cfu/g).

Hubungan antara populasi *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* terhadap konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak tersaji pada Gambar 4.11. 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).

Gambar 4.11. 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.

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%.

Konsentrasi 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*.

Hasil analisis Anova satu arah menunjukan bahwa populasi *L. lactis* dan *A. aceti* pada perlakuan penambahan inokulum diawal berbeda nyata ($p \leq 0,05$) terhadap kontrol. 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 Widiyanto *et al*, (2013) yang mempelajari perbaikan proses fermentasi dengan penambahan tetes tebu dan penambahan yeast, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat.

Hasil penelitian ini 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). 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%. Pada 72 jam fermentasi ditunjukkan konsentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat berturut – turut yaitu 1,23, 3,83 dan 3,32%. 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 4.12.

Konsentrasi 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 mikrobial endogenus yang ada. Hasil analisis ANOVA satu arah menunjukkan bahwa populasi *S. cerevisiae*, *L.* pada perlakuan inokulum secara bertahap tidak berbeda nyata terhadap perlakuan kontrol

dan perlakuan penambahan inokulum secara serentak, sedangkan populasi *L. lactis*, populasi *A. aceti* berbeda nyata terhadap kontrol.

Gambar 4.12. 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.

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 konsentrasi 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 menaikkan kemampuan

depolimerisasi *pulp* biji kakao sejalan dengan hasil penelitian Ganda *et al*, (2008) yang melakukan optimasi kondisi depolimerisasi *pulp* biji kakao oleh enzim bahwa kondisi optimum untuk aktivitas enzim PG pada suhu 42,5°C dan pH 4,6. 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.

Hasil analisis ANOVA satu arah total polifenol menunjukkan bahwa perlakuan kontrol, IA dan IB tidak berbeda nyata antar perlakuan. Total polifenol perlakuan kontrol, IA dan IB di awal fermentasi menunjukkan berturut – turut yaitu 0,172; 0,178 dan 0,176 (mg asam galat/g). Total polifenol perlakuan kontrol, IA dan IB terus turun sampai akhir fermentasi berturut – turut menjadi 0,079, 0,07 dan 0,068 (mg asam galat/g biji).

Hubungan antara konsentrasi asam asetat terhadap perubahan polifenol selama fermentasi tersaji pada Gambar 4.13. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa seiring konsentrasi asam asetat naik maka total polifenol turun. 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%.

Pada 108 jam total polifenol perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap fermentasi menunjukkan nilai terendah berturut – turut yaitu 0,074; 0,073 dan 0,066 (mg asam galat/g). Penurunan total polifenol dan

peningkatan kosentrasi asam asetat yang dihasilkan sesuai dengan hasil penelitian yang diperoleh Kustyawati dan Setyani, (2008), yang telah mempelajari penambahan inokulum mikrobial *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada fermentasi biji kakao segar varietas lindak.

Gambar 4.13. Hubungan kosentrasi 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.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa IB mampu menghasilkan kosentrasi etanol, asam laktat dan asam asetat lebih banyak. Peningkatan kosentrasi asam asetat diikuti oleh penurunan total polifenol dalam biji kakao kering selama fermentasi. Jika ditinjau dari total polifenol yang rendah diawal fermentasi dapat diduga telah terjadi oksidasi polifenol oleh panas saat pengeringan (Bravo, 1988).

Penurunan total polifenol selama fermentasi dapat diduga disebabkan oleh oksidasi aktifitas enzimatis dan non enzimatis setelah kematian biji (Wollgast dan Anklam, 2000). Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil yang diperoleh Misnawi *et al*, (2002) 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 Ganda *et al*, (2008) 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 Misnawi dan Jinab (2003) yang telah mempelajari pengaruh polifenol terhadap pembentukan prekursor flavor biji kakao serta enzim polifenol oksidase sangat peka terhadap kondisi lingkungan fermentasi dan suhu pengeringan (Hansen *et al*, 1998).

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 0,65µg/g. Pada 72 jam

fermentasi turun menjadi berturut – turut 1,32; 0,69; 0,95; 1,18; 0,87; 1,47 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 4.6.

Tabel 4.6. 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
Hidrofobik				
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
Total	7,21	7,12	7,06	7,46
Asam				
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
Total	20,98	21,85	21,58	20,61

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

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 analisa statistik Tabel 4.5. menunjukkan bahwa senyawa

alanin dan tirosin dari perlakuan kontrol, IA dan IB tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$) antar perlakuan.

Ditinjau dari keberhasilan proses fermentasi perlakuan kontrol dapat diduga bahwa ada aktivitas mikrobial endogenous mendegradasi asam amino menjadi asam amino bebas hidrofofik. Asam amino hidrofofik biji kakao naik sejalan dengan lama fermentasi yang dikendalikan oleh aktivitas enzim aspartat protease dan karboksil peptidase. Hasil penelitian ini, senyawa alanin, tirosin, valin, phenilalanin, isoleusin, leusin dan methionin dari perlakuan penambahan inokulum secara serentak menunjukkan nilai diawal fermentasi berturut – turut yaitu 1,57, 0,85, 1,43, 1,02, 1,66 dan 0,72 $\mu\text{g/g}$. 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 $\mu\text{g/g}$, sedangkan valin dan leusin naik berturut – turut yaitu 1,07 dan 1,72 $\mu\text{g/g}$.

Hasil analisis asam amino perlakuan penambahan inokulum secara serentak menunjukkan bahwa total asam amino hidrofofik dan asam amino asam di akhir fermentasi berturut – turut yaitu 8,26 dan 21,41 $\mu\text{g/g}$, secara umum terjadi peningkatan pada asam amino hidrofofik tetapi terjadi penurunan pada asam amino asam seperti tersaji pada tabel 4.7. Hasil analisis ANOVA satu arah menunjukkan bahwa konsentrasi alanin perlakuan kontrol berbeda nyata terhadap perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap. Pada 96 jam fermentasi senyawa alanin dan isoleusin naik menjadi 1,66 dan 0,97 $\mu\text{g/g}$, sedangkan senyawa tirosin, valin, phenilalanin, leusin dan methionin turun menjadi berturut – turut yaitu 0,61, 0,99, 1,19, 1,60 dan 0,70 $\mu\text{g/g}$. Pada akhir

fermentasi senyawa alanin turun menjadi 1,61 µg/g hal ini diduga terjadi adanya terdegradasi lanjut.

Tabel 4.7. Kandungan asam amino bebas biji kakao hasil perlakuan panambahan inokulum secara serentak selama fermentasi berturut-turut 72, 96 dan 120 jam (µg/g)

	Lama fermentasi (jam)			
	0	72	96	120
Hidrofobik				
Alanin	1,57ab	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
Total	8,19	8,10	7,72	8,26
Asam				
Asam aspartat	3,81b	4,47b	4,53b	3,75a
Asam glutamat	15,86c	15,05b	15,03a	15,42b
Serin	1,39ab	1,25a	1,35ab	1,44b
Histidin	0,82ab	0,81a	0,78ab	0,80b
Total	21,88	21,58	21,69	21,41

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

Hasil analisis asam amino biji kakao kering perlakuan secara bertahap diakhir fermentasi menunjukkan bahwa total asam amino hidrofobik dan asam amino asam berturut – turut yaitu 8,72 dan 21,25 µg/g selengkapnya tersaji pada tabel 4.8. 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.

Tabel 4.8. Kandungan asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi berturut – turut 72, 96 dan 120 jam (µg/g)

	Lama fermentasi (jam)			
	0	72	96	120
Hidrofobik				
Alanin	1,59ab	1,55a	1,65a	1,60ab
Tirosin	0,89a	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
Total	7,65	8,58	8,22	8,72
Asam				
Asam aspartat	3,99b	4,35b	4,43b	3,83a
Asam glutamat	15,95c	15,11b	14,6a	15,14b
Serin	1,41a	1,28a	1,37ab	1,46b
Histidin	0,83ab	0,82a	0,79ab	0,82b
Total	22,18	21,56	21,05	21,25

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

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. 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.

Hasil analisis statistik ANOVA satu arah menunjukkan bahwa lama fermentasi tidak berpengaruh pada kandungan asam amino hidrofobik, kecuali senyawa alanin terdapat beda nyata ($p \leq 0,05$) antara awal fermentasi dengan yang lain.

Keberadaan asam amino bebas pada biji merupakan salah satu indikator keberhasilan fermentasi biji kakao. Khircoff *et al.* (1989b) Voigt *et al.* (1993), Dodo dan Furtek, (1994) dan Dodo *et al.* 1992, 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% (Bertazzo *et al.* 2011) akan terdegradasi menjadi asam amino bebas hidrofobik dan asam amino lainnya (Voigt *et al.* 1993).

Jika ditinjau dari peningkatan total asam amino pada perlakuan secara bertahap menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah total asam amino yang dihasilkan, dapat diduga dipolimerisasi pektin oleh enzim PG selama fermentasi menyebabkan kerusakan dinding sel. 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 (Ganda *et al.*, 2008). 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 (exo-peptidase) yang memutus gugus karboksil

pada residu asam amino hidrofobik setelah kematian biji (Thomson *et al.* 2000; Biehl *et al.*, 1996; Biehl dan Voigt, 1999; Ziegleder dan Biehl, 1988; Hansen *et al.*, 1998; Putranto, 2007; dan Pasau, 2013). 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 (Voigt *et al.*, 1994; Biehl *et al.*, 1993; Kirchoff *et al.*, 1989, Kirchoff *et al.*, 1989a; Ziegleder, 2009; Kosim dan Surya, 2010).

Proteolisis biji kakao selama inkubasi dan atau fermentasi konvensional akan dihasilkan peningkatan asam amino bebas hidrofobik jika dibandingkan dengan asam amino bebas asam. 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 Sabahanur *et al.*, (2015) 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 (Sulistiyowati, 1988). 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 (Spencer dan Hodge, 1992 ; Voigt *et al.*, 1993; dan Afoakwa , 2010). Biji kakao yang beraroma baik di hasilkan dari biji kakao dengan konsentrasi asam amino bebas dan gula reduksi yang tinggi (Misnawi *et al.*, 2005; dan Voigt *et al.* 1994a).

Penelitian tahap ini dihasilkan beberapa temuan yaitu perlakuan IB didapatkan konsentrasi asam asetat yang lebih tinggi dibanding perlakuan yang lain sehingga suhu fermentasi lebih tinggi dan kematian biji lebih cepat juga dihasilkan total asam amino hidrofobik yang lebih tinggi didukung oleh penelitian Kustyawati dan Setyani, (2008) bahwa konsentrasi asam asetat dan suhu fermentasi untuk kematian biji lebih cepat dicapai pada perlakuan penambahan *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* secara bertahap.

Semakin lama waktu fermentasi dapat dihasilkan total asam amino hidrofobik dan gula reduksi yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain hasil didukung oleh penelitian Sabahanur *et al.*, 2015 bahwa lama frementasi biji kakao akan menghasilkan asam amino yang lebih banyak seperti asam aspartat, asam glutamat, leusin , isoleusin , valin, histidin , serin, treonin dan lisin. Oleh sebab itu diduga penambahan *S. cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) dan pengendalian suhu lingkungan dapat dihasilkan biji kakao kering

terfermentasi dengan gula reduksi dan asam amino lebih banyak sehingga dihasilkan flavour khas biji kakao dapat terbentuk ketika biji disangrai.

4.3. Evaluasi profil senyawa volatil biji kakao pasca sangrai

4.3.1. Analisis senyawa volatil biji kakao kering

Evaluasi profil senyawa volatil biji kakao dapat dilakukan setelah biji melalui proses fermentasi dan penyangraian. 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.

Penelitian tahap II bahwa gula reduksi dan asam amino hidrofobik dalam biji kakao kering setelah proses fermentasi dihasilkan penambahan inokulum secara serentak dan penambahan inokulum secara bertahap mengalami kenaikan. Hasil penelitian tahap III menunjukkan bahwa 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.

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 Frauendorfer dan Schieberle, 2006; Puziahet al.,1998; Misnawi, 2003; Bonvehi,2005; Afoakwa *et al*, 2008, Backket , 2009 dan Yulius *et al*, 2014 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 dimetil 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.

Senyawa 2,5-dimetil-pirazin menghasilkan odor sebagai berikut *Nutty, peanut, musty, earthy, powdery, and slightly roasted with a cocoa powder nuance*. Adanya odor *earthy* pada senyawa ini membuat *off-flavour* dengan berkurangnya senyawa ini pada perlakuan inokulum secara bertahap lebih diinginkan *flavour* kakao nya.

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* ada pada perlakuan IA dan IB serta tidak terdapat pada perlakuan kontrol sehingga terdapat aroma khas karamel pada perlakuan IB. Senyawa 2 ethil-3,5, dimetil pirazin dihasilkan oleh perlakuan penamabahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 2,05 dan 2,13 ppb. Senyawa pirazin yang menimbulkan flavor yang diinginkan adalah 2,3 dimetil pirazin, 2,5-dimetil pirazin, 2,3,5, trimetil pirazin, dan 2,3,5,6, tetra methil pirazin tersaji pada Tabel 4.9.

Tabel 4.9. Profil senyawa volatil kelompok pirazin 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	
2,5-dimetil-pirazin	4,69a	1,48b	1,35b	<i>Nutty, peanut, musty, earthy, powdery, and slightly roasted with a cocoa powder 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 *: Anonim, (2014), Aprotosoae *et al*, (2016)

Kandungan senyawa 2 ethil 5 methyl 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*.

Menurut Afoakwa *et al*. (2009) 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. Hal ini tidak sama dengan penelitian James *et al.*, (1985) bahwa pada biji kakao setelah sangrai ditemukan 62 senyawa volatil kelompok pirazin.

Pada kakao, kandungan komponen polifenol, alkaloid, asam amino, peptida dan pirazin mempengaruhi timbulnya aroma dan rasa pahit dan sepat. Senyawa pirazin merupakan senyawa pembentuk aroma pada biji kakao yang terbentuk pasca penyangraian biji kakao pada suhu relatif tinggi (Sabahanur *et al.*, 2015). Senyawa volatil ke dua yang terpenting dalam perannya sebagai prekursor aroma adalah senyawa dari kelompok ester (Afoakwa *et al.*, 2009, Maarse 1991). Senyawa volatil kelompok ester merupakan komponen paling lazim sebagai pembentuk aroma buah-buahan, dan senyawa ester juga merupakan komponen yang berperan penting dalam pembentukan aroma biji kakao.

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok ester biji kakao perlakuan kontrol, inokulum diawal dan inokulum secara bertahap disajikan pada Tabel 4.10. 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 Yulius *et al.*, (2014) yang mempelajari senyawa volatil yang dihasilkan dari biji kakao yang

disangrai pada berbagai alat sangrai dan teridentifikasi senyawa volatil kelompok ester sebanyak 8 senyawa.

Tabel 4.10. 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-phenylethil heksanoat	-	3,83	3,90	<i>Sweet, honey, floral, waxy with woody and sweaty nuances.</i>
pentil tetradecil sulfurat	-	3,84	3,90	-
Ethil dekanoat	-	4,51	4,90	<i>Sweet, waxy, fruity, apple</i>
Ethil sinamat	-	0,54	0,60	<i>Sweet, balsamic, spice, cinnamic, fruity and powdery</i>
Ethil dodekanoat	-	4,93	5,04	<i>Sweet, waxy, soapy and rummy with a creamy, floral nuance</i>
2-ethylheksil oktanoat	-	2,39	2,53	<i>Odorless mild fatty</i>

Sumber *: Anonim, (2014), Aprotosoie et al, (2016)

Senyawa kelompok ester dalam bahan pangan umumnya memberikan karakteristik aroma seperti; *fruity*, *sweet*, dan *floral*. Curioni dan Bosset (2002) 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*. Tabel 4.10. menunjukkan bahwa etil phenilasetat adalah etil benzene asetat dengan odor (bau) *floral, honey, rosy with balsamic, dark chocolate and cocoa notes with anisic black licorice nuances* tidak dijumpai pada biji kakao hasil perlakuan kontrol, sedangkan konsentrasi tertinggi dimiliki oleh perlakuan penambahan inokulum secara bertahap.

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. 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 Doyle *et al.*, (2001) dan Frauendofer dan Schieberle, (2006); 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. 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 sesuai yang diperoleh Belitz *et al.*, (2004) ; Doyle *et al.*, (2001) dan Minnifie, (1982) 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 (disintesa dari leusin) relatif tinggi, sedangkan kakao jenis Arriba, Bahisa, Accra, Costa rican, Sanchez dan Tobasco memiliki kandungan aldehid relatif rendah.

Hasil penelitian ini tidak teridentifikasi senyawa Isovaleraldehid dan isobutiraldehid 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*. Alkohol juga bertanggung jawab atas terbentuknya bau *fruity, floral, caramel-like, sweet* dan *honey* (Afoakwa *et al.*,2009). Senyawa kelompok alkohol umumnya menghasilkan aroma *sweet, fruity, alcoholic, balsamic* dan *green* dan semuanya tergantung susunan molekulnya sesuai dengan yang peroleh Curioni dan Bosset (2002) yang mempelajari berbagai aroma dari berbagai tipe keju melalui *Gas Chromatography–Of lactometry*.

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok aldehid biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 4.11.

Tabel 4.11. 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	
Bensaldehid	118,82	128,25	129,30	<i>Almond, fruity, powdery, nutty</i>
Benzeneasetaldehid	146,84	210,66	215,36	<i>Honey, floral rose, powdery, fermented, chocolate with a slight earthy nuance</i>
Nonanal	57,19	92,50	93,60	<i>Waxy, aldehyde, citrus, with a fresh slightly green, lemon peel like nuance and cucumber fattines</i>
Beta –methil Sinnamaldehid	17,07	25,91	26,31	<i>Spicy cinnamon</i>
Furfural	-	2,99	3,07	<i>Sweet, brown, woody, breadly, caramellic, with a slight phenolic nuance.</i>
3-methil butanal	-	0,47	0,52	<i>Ethereal aldehydic, chocolate, peach, fatty</i>
3-methilthio propanal.	-	2,19	2,30	<i>Vegetable oil, creamy potato, potato skin and French fry, yeasty, breadly, cheese with savory</i>
1H-Pirole-2-karboksaldehid	-	0,87	0,92	<i>Musty, beefy, coffee</i>
Decanal	-	3,22	3,32	<i>Sweet, aldehydic, orange, waxy, citrus rind.</i>
4-Methil-2-phenil-2-pentenal	-	2,11	2,23	<i>Sweet, floral, honey, powdery and cocoa like with rosy nuance.</i>
E-14-Heksadekenal	-	0,07	0,08	-
Napthalene 1,2,3-trimethil-4- propenil-,(E)-	-	1,79	1,83	-
3,5-di-tert-Butil-4-hidroksibenzaldehid	-	1,90	1,98	-

Sumber *: Anonim, (2014), Aprotosoie *et al*, (2016)

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok alkohol biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 4.12.

Tabel 4.12. 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>
Phenylethil 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 undertones</i>
2- Heptanol	10,76	--	-	<i>Lemon, orange, copper</i>
Benzil Alkohol	-	22,49	23,50	<i>Sweet, floral, fruity with chemical nuance</i>
p-Menth-1en-4-ol	-	1,29	1,40	<i>Woody, metholic, citrus terpy, spicy</i>
2-phenoksi Ethanol,	-	8,09	8,50	<i>Flowry, fresh</i>
Asetilenik glicol		0,68	0,70	-

Sumber * : Anonim, (2014), Aprotosoai *et al*, (2016)

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.

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 dekanat berkontribusi pada pembentukan aroma *soapy*. 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 analisis profil senyawa volatil kelompok

asam biji kakao kering jamur hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 4.13.

Tabel 4.13. 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 vasetat		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 * : Anonim, (2014), Aprotosoai *et al*, (2016)

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.

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*.

Senyawa toluene terdeteksi pada biji kakao kering jamur 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 peppery herbal tropical*.

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.

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok hidrokarbon biji kakao kering jamur perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 4.14.

Tabel 4.14. Profil senyawa volatil kelompok hidrokarbon setelah sangrai biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Senyawa Volatil	Konsentrasi (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 herbal tropical</i>
Dodecan	26,68	32,25	33,20	<i>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-Syklotatetraen	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-cis-1,4-dimethyl	-	13,61	14,2	-
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	-	0,55	0,60	<i>Woody, spicy, pepper like</i>
[7.2.0]undec-4-ene	-	0,17	0,20	-
2-(p-Tolimethyl)-p-xilene	-	2,76	2,90	-
Diisopropilnaphthalene	-	0,4	0,5	-
1,1-Diphenilisobutilene	-	0,4	0,5	-

Sumber *: Anonim, (2014), Aprotosoie *et al*, (2016)

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.

Tridecan yang diidentifikasi dari hasil biji kakao kering jamur 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.

Pengendalian proses sangrai yang kurang baik dapat menyebabkan pasta coklat 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.

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*.

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. Senyawa tersebut memberi kontribusi karakteristik khas bau *misty, nutty-like with couman nuance*. Teridentifikasi senyawa volatil 3,4,-hidro-8-hidroksi-3-

metil, dari biji kakao kering hasil perlakuan kontrol sebesar 1,04 ppb tetapi senyawa tersebut belum diketahui perannya dalam memunculkan bau.

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok keton biji kakao kering jamur perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 4.15.

Tabel 4.15. 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-metil	1,32	-	-	Musty animal
3,4-dihidro-8hidroksi-3-metil, 1H-2-Benzopiran-1-on	1,04	-	-	-
2-Heptanon	-	3,12	3,35	Cheese, fruity, ketonik, green banana with a creamy nuance
1-(1H-pirol-2-il)-Ethanon	-	8,91	9,05	Musty, nutty-like with a couman nuance
2-Nonanon	-	49,12	49,25	Fruity, sweet, waxy, soapy, cheese, green herbaceous, coconut like
3,5-di-ter-butil-4-hidroksi- propiophenon	-	1,10	1,35	-

Sumber * : Anonim, (2014), Aprotosoie *et al*, (2016)

Hasil analisis profil senyawa volatil kelompok lain dalam biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap disajikan pada Tabel 4.16. Hasil penelitian ini menunjukkan beberapa senyawa volatil yang teridentifikasi kelompok senyawa furan, benzen, benzoid hidrokarbon, fenol, furfural, sesquiterpenes, turunan aldehyd, methylxanthine dan phenylpropanoid.

Tabel 4.16. Profil senyawa volatil kelompok lainnya 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	
Kelompok Furan				
Furoneol		3.65	3,75	Sweet, slightly burnt brown caramelic, cotton candy with a savory nuance.
Cis-linalool Oksida		13.35	13,78	
Kelompok benzen				
Benzonitrile	4,49	3.45	3.05	Sweet almond Pungent, floral, slightly naphta like with a fecal and animatic musty character
Indole	0,51	0,95	1,05	
Kelompok benzoid hidrokarbon				
Beta-Mirsene	-	18,92	19,35	Herbaceous, woody with a rosy celery and carrot nuance
Kelompok turunan fenol				
Butilated Hidroksitoluene	-	1.38	1,89	Mild-phenolic campho
Phenol, 2-(1,1-dimethilethl)-4-(1-methilpropil)	-	1,90	2,15	-
Mellein	-	1,50	1,75	-
Eugenol	-	5,75	5,85	Sweet, spicy, clove like, woody with phenolic savory ham and bacon notes and cinnamon and allspice nuance
Kelompok sesquiterpenes				
Cadalene	-	5,38	5,65	-
Kelompok turunan aldehid				
3,5-di-tert-Butil-4-hidrkosibaketophenon		1,09	1,15	-
Kelompok methilsanthine				
Caffein	-	0,019	0,03	odorless
Isobutil phtalate	-	10,24	10,95	Faint odor

Sumber *: Anonim, (2014), Aprotosoie *et al*, (2016)

Senyawa diatas memberikan aroma karakteristik (khas) seperti *carnation* (bunga anyelir), 4-hidroksi-2,5- dimetil-3(2H)-furanon (furaneol) yang

merupakan senyawa penting pembentuk aroma kakao, hasil ini didukung hasil penelitian sebelumnya yang diperoleh Maarse, (1991) dan Frauendofer dan Schieberle (2006) yang mengidentifikasi phenol, 2-methoksi-4-2- propenil (Eugenol), 4-hidroksi- 2,5-dimethyl-3(2H)-furanon yang mempelajari senyawa fenol yang telah berhasil diidentifikasi pada produk olahan kakao.

Senyawa (furanol) 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

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 (Ziegler, 1991).

Hasil penelitian tahap ini ditunjukkan bahwa total senyawa volatil terbanyak diidentifikasi pada perlakuan penambahan inokulum secara bertahap dapat diduga bahwa memiliki total asam amino hidrofofik dan gula reduksi tertinggi dibandingkan perlakuan yang lain sehingga saat penyangraian yang terbentuk terbentuk senyawa volatil lebih banyak.

Hasil peneltiani ini menunjukan bahwa jenis kelompok, jenis dan total kandungan senyawa volatil biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentakdan secara bertahap disaji pada Tabel 4.17

Tabel 4.17. Golongan, jenis, kelompok, jumlah dan total kosentrasi 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

4.3.2. Uji sensori biji kakao kering pasca sangrai

4.3.2.1. Uji rasa masam, rasa pahit, rasa sepat dan aroma

Uji sensori bertujuan untuk mengetahui kesukaan tingkat konsumen terhadap bubuk biji kakao kering pasca sangrai. Hasil penelitian ini menunjukan bahwa perlakuan penambahan inokulum berpengaruh terhadap hasil aroma dan sensori biji kakao kering fermentasi dan pasca sangrai. Hasil penelitian ini menunjukan evaluasi sensoris terhadap rasa masam, pahit, dan sepat biji kakao dan uji ranking bagi tingkat kesukaan panelis ditampilkan pada Tabel 4.18.

Hasil analisis ANOVA satu arah menunjukkan bahwa rata – rata rasa asam, rasa pahit dan rasa sepat pada perlakuan IB berdeda nyata terhadap perlakuan kontrol hal ini dapat diduga bahwa pH biji kakao kering hasil fermentasi perlakuan IB tinggi. Hasil penelitian ni menunjukkan bahwa senyawa volatil kelompok asam yang terdeteksi, terutama asam asetat.

Kandungan senyawa alkohol dari biji kakao perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan penambahan secara bertahap fermentasi sebesar berturut-turut 2,48; 1,68 dan 1,40 ppb, hasil ini sesuai dengan yang diperoleh Camala dan Aston, (1993) yang mempelajari pengaruh asam organik pada biji kakao hasil fermentasi terhadap aroma coklat yang dihasilkan. Rasa masam biji kakao banyak dipengaruhi oleh kandungan asam organik biji kakao pasca fermentasi, dan kandungann asam organik sebesar 38 - 60% akan memberikan sensasi rasa masam.

Tabel 4.18. Hasil uji rasa masam, rasa pahit, rasa sepat dan aroma setelah sangrai biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap

Perlakuan	Rasa masam	Rasa pahit	Rasa sepat	Aroma
Kontrol	3,28 ± 0,1 ^b	4,20 ± 0,2 ^b	4,32 ± 0,1 ^b	3,32 ± 0,1 ^a
Inokulum secara serentak	3,08 ± 0,1 ^{ab}	3,08 ± 0,1 ^{ab}	3,56 ± 0,1 ^a	3,64 ± 0,1 ^a
Inokulum secara bertahap	2,50 ± 0,1 ^a	2,40 ± 0,1 ^a	2,02 ± 0,1 ^a	4,58 ± 0,2 ^b

Keterangan : skor uji rasa : 1. Tidak berasa 2. Sangat lemah, 3. Lemah, 4. Agak lemah
Huruf berbeda dibelakang angka baris sama menunjukkan beda nyata
 $p \leq 0,05$
Hasil rata-rata 2 ulangan dengan 3 ulangan analisis

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa volatil kelompok asam pada perlakuan kontrol sebanyak 2 senyawa, kandungan senyawa asam asetat yaitu 2,48

ppb adalah relatif besar dapat diduga rasa masam karena kandungan asam asetat. Adanya rasa asam dalam jumlah relatif sedikit telah menyumbang keseimbangan cita-rasa olahan cokelat, tetapi dalam populasi besar, maka rasa masam dianggap sebagai cacat rasa (Jinab *et al*, 1995).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rasa pahit bubuk biji kakao sangrai utamanya disebabkan oleh kafein, *theobromin*, dan beberapa *2,5-diketopiperazin*, senyawa polifenol, beberapa asam amino, peptida, pirazin dan senyawa alkaloid lain Bonvehi dan Coll, 1997; Stark *et al*. 2006 dan Afoakwa *et al.*, 2008. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua perlakuan percobaan mempunyai populasi senyawa kelompok pirazin 8, total senyawa pirazin perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut yaitu 55,88; 49,75 dan 48,70 ppb sehingga dapat diduga bahwa penyebab munculnya rasa pahit ditimbulkan oleh theobromin dan kafein yang berreaksi membentuk diketopirazin pada saat proses roasting. Rasa pahit disebabkan oleh kandungan theobromin dan antosianin pada kakao.

Hal ini sejalan dengan Tabel 4.15 tentang hasil uji sensori bahwa skor perlakuan kontrol sebesar 4 (agak lemah), perlakuan penambahan inokulum secara serentak dengan skor 3 (lemah) dan secara bertahap dengan skor 2 (sangat lemah) sesuai dengan hasil yang diperoleh Yusianto *et al.*, 1997 mempelajari tentang mutu dan pola cita rasa pada berbagai kakao lindak. Biji kakao yang tidak terfermentasikan dengan baik akan memiliki kandungan theobromin dan antosianin yang tinggi. Rasa sepat biji kakao kurang diminati atau disukai konsumen sebab sedikit mengganggu saraf lidah yang seolah-olah menyengat dan menimbulkan rasa kering dapat

diduga karena keberadaan senyawa polifenol yang berlebihan pada olahan coklat yang dapat berinteraksi dengan protein kaya prolin dalam air liur dan mengendap (Bonvehi dan Coll, 1997). Rasa sepat yang menonjol merupakan ciri utama coklat biji tanpa fermentasi atau fermentasi tidak sempurna hal inimerupakan cacat rasa dari produk coklat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa skor sensori panelis dari masing – masing perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap berturut – turut adalah skala 4 (agak lemah), 3 (lemah) , dan 2 (sangat lemah). Uji sensori terhadap tingkat rasa masam, rasa pahit, rasa sepat serta aroma menunjukkan bahwa biji kakao perlakuan secara bertahap mempunyai skala 2 (sangat lemah) sehingga dapat disimpulkan bahwa biji kakao hasil perlakuan tersebut adalah yang paling baik.

Rasa sepat dapat disebabkan oleh kandungan antosianin pada biji kakao. Antosianin sebagian terurai selama proses fermentasi berlangsung karena masuknya asam pada keping biji (Yusianto *et al.*, 1997).

4.3.2.2. Tingkat kesukaan panelis

Uji tingkat kesukaan panelis bertujuan untuk mengetahui berapa besar panelis menyukai bubuk biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap. Hal ini juga didukung oleh Tabel 4.15 bahwa perlakuan penambahan inokulum secara serentak dan secara bertahap memiliki 80 jenis senyawa volatil, tetapi kandungan senyawa volatil penyebab rasa pahit, rasa masam dan rasa sepat lebih banyak dijumpai pada perlakuan penambahan inokulum secara serentak fermentasi. Berdasarkan analisis indeks warna, warna biji (cut test), asam amino bebas hidrofobik, uji rasa masam, rasa sepat dan rasa pahit menunjukkan biji

kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap mempunyai mutu lebih baik dibanding biji kakao hasil kontrol dan penambahan inokulum secara serentak. Hasil tersebut membuktikan telah terjadi perbaikan mutu biji kakao kering. Hal penelitian tahap ini menunjukkan bahwa uji rasa masam, rasa pahit, rasa sepat dan aroma seluruhnya menunjukkan skor penerimaan yang baik pada perlakuan IB.

Hasil penelitian tahap I, II dan III menunjukkan bahwa komposisi *pulp* biji kakao kering merupakan substrat fermentasi. Penambahan *S. Cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* diawal fermentasi baik secara campuran atau sendiri – sendiri dihasilkan peningkatan etanol, asam laktat, asam asetat, indeks fermentasi, gula reduksi dan persen keping biji berwarna fermented (coklat). Gula total, pH biji dan total polifenol menurun selama fermentasi. Semua perlakuan fermentasi menghasilkan asam amino bebas hidrofobik yaitu Alanin, Tirosin, Valin, Phenilalanin, Methionin, Isoluesin, dan Leusin. Total asam amino bebas hidrofobik tertinggi di perlakuan penambahan inokulum secara bertahap. Senyawa volatil aldehid, asam, alkohol dan ester yang terbentuk berturut – turut adalah 3-metil butanal, benzaldehid, asam asetat, 3-metil asambutanoik, benzil alkohol dan etil benzoat. dihasilkan adalah 3-metilbutanal, benzaldehid. Senyawa 2,3 dimetil pirazin, 2,3,5,trimetil pirazin dan 2,3,5,6 tetrametil pirazin tertinggi dimiliki biji kakao kering dari perlakuan IB. Didasari semua hasil ditahap sebelumnya maka bubuk biji kakao kering yang diterima dan disukai panelis adalah bubuk biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. 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* (10^{12} cfu/g), *L. lactis* (10^{12} cfu/g) dan *A. aceti* (10^{12} 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 methil butanal, 3 metil butanoat, benzil alkohol dan etil benzoat.
4. Perlakuan penambahan inokulum secara bertahap dapat menurunkan kandungan polifenol. Panelis dapat menerima biji kakao hasil perlakuan

penambahan inokulum secara bertahap selama fermentasi meskipun sedikit masam.

5.2. Saran

Aktivitas enzim dalam proses fermentasi biji kakao kering sebaiknya dipelajari lebih lanjut dalam pengaruhnya untuk pembentukan senyawa volatil. Konsentrasi penambahan inokulum mikrobial secara tepat perlu dikaji lebih lanjut guna keberhasilan proses fermentasi. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang fermentasi terkendali skala lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Aculey, P. C., Snitkjaer, P., Owusu, M., Bassompierre, M., Takrama, J. S., Nørgaard, L., Petersen, M. A. dan Nielsen, D. S. 2010. Ghanaian cocoa bean fermentation characterized by spectroscopic and chromatographic methods and chemometrics. *Journal of Food Science* 75(6): 300–307.
- Afoakwa, E.O. A. Paterson, Fowler, M dan Ryan, A., 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical reviews in Food science and nutrition*. 48(9):840–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18788009> [Accessed September 23, 2014].
- Afoakwa, E.O. A., Paterson, A., Flower, M dan Ryan, A., 2009. Matrixs Effect on Favour Volatiles Release in Dark Chocolates Varying in Particels size distribution and fat content using GC-Mass Spectrometry and GC-Olfactometry. *Food Chemistry* 113:2008-2015.
- Afoakwa, E.O., 2010. *Chocolate Science and Technology*, Wiley-Blackwell, United Kingdom.
- Afoakwa, E.O., Kongor, J. E., Takrama, J. dan Budu, A. S., 2014. Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Internasional Food Research Journal* 20(4): 1843-1853
- Anonim. 2008. Standart Nasional Biji Kakao, SNI 2323-2008. *Badan Standart Nasional*
- Anonim. 2013^a. Produksi perkebunan besar menurut jenis tanaman, Indonesia. <http://www.bps.go.id>. Diakses tanggal 29/03/2014.
- Anonim, 2013^b. Potensi produksi kakao di Indonesia. <http://kiosmesin.blogspot.com/2013>. Diakses tanggal 28/03/2014
- Anonim, 2014. The Good Scents Company : Organoleptic Properties. Diakses dari <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1004992.html> pada tanggal 20 Maret 2016
- Aprotosoiaie A. C., Luca S.V., dan Miron A., 2016. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: 73-91

- Ardhana, M. dan Fleet, G., 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2):87–99. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503000813> [Accessed December 9, 2014].
- Baxter, J. H., 1995. Free amino Acid stability in reducing sugar system, *Journal Food Science.*, 2(60): 405-408
- Beckett S.T., 2009. *Industrial Chocolate Manufacture and use. 4th*, Wiley-Blackwell, United Kingdom
- Belitz H.D., Grosch, W., dan Schieberle. 2004. *Food Chemistry*. Birkhauser.
- Bertazzo, A., Comai, S., Brunato, I., Zancato, M. dan Costa, C. V. L. 2011. The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in Theobroma cacao beans. *Food Chemistry* 124: 93–96
- Biehl B., dan Voigt J. 1996. Biochemistry of chocolate flavour precursors. *International Cocoa Conference*, Salvador De Bahia, Brazil.
- Biehl, B. dan Voigt, J. 1999. Biochemistry of cocoa flavour precursors. In: *Proceedings of the 12th International Cocoa Research Conference, Salvador, Brazil*, 1996. Lagos, Nigeria: Cocoa producers Alliance, pp. 929–938.
- Biehl, B., Heinrichs, J., Voigt, G., Bytof, G. dan Serrano, P. 1996. Nature of proteases and their action on storage proteins in cocoa seeds during germination as compared with fermentation. In: *12th Cocoa Research Conference, Salvador. Lagos, Nigeria: Cocoa Producers Alliance*, pp. 18–23.
- Biehl, B. dan Ziegler, G. 2003. Cocoa: chemistry of processing. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Second Edition. pp. 1436–1448.
- Bonvehí, S.J., dan Coll, V.F. 1997. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chemistry*, 60(3):365-370
- Bravo, L. 1998 Polyphenols : Chemistry, Dietary sources, metabolism and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56(11):317-333
- Camala .S.H., dan Aston J.W., 1993. The effect of the organic acid in cocoa on the flavour of chocolate. *Journal Science Food Agriculture* **61**:65-71
- Campos, R. J., Escalona-Buendía, H. B., Ramos, E.H.B., Avila, C.S.M., Flores, O.I. J.E., dan Cervantes, L.E., 2012. Effect of fermentation time and drying

- temperature on volatile compounds in cocoa. *Food Chemistry*, 132(1):277–288.
- Campos, R. J., Escalona-Buendia, H.B, Avila, O.I., Cervantes, L.E dan Jamramillo-Flores, M.E. 2011. Dynamic of Volatile and Non Volatile compound in cocoa (*theobroma cacao* L) during Fermentation and Drying Proses Using Principal Component Alaysis. *Food Research International*. 44: 250-258
- Camu, N., Gonzalez, A., De Winter, T., . Schoor.A. V, De Bruyne, K., Vandamme, P., Takrama. J. S. , Addo, S. K., dan Vuystl, Luc De., 2008. 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. *Applied and environmental microbiology*, 74(1):86–98.
- Carr, J.G., Davies, P.A., dan Dugan, J. 1981. International cocoa research conference Proceeding douala cameroon. pp. 573-576
- Clapperton, J.F. 1994 A riview of research to indentify the origins of cocoa flavour characteristics. *Cocoa Growe's Bull* 48 : 7 - 16
- Cortes, T.R.; Olvera,V.R., Jimenes, G.R., dan Lepe .M. R., 2012. Isol at ion and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology Research*. 6:339-347.
- Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., dan Collin, S., 2002. Use of Gas Chromatogravy-Of lactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate: comparation of samples before and after conching. *Jounal Agriculture Food Chemistry*. 50:2385-2391
- Curioni P.M.G dan Bosset J.O. 2002. Key Odorant in Various Cheese Types as Determined by Gas Chromatography –Of lactometry. *International Dairy Journal*. 12: 959-984.
- Dodo, H. W. dan Furtek, D. B. 1994. Cloning andsequencing of a gene encoding a 21kDa trypsin inhibitor from *Theobroma cacao* L. *Cafe Cocoa*. 38: 113–117.
- Dodo, H. W., Fritz, P. J. dan Furtek, D. B. 1992. A cocoa 21 kilo Dalton seed protein has trypsin inhibitory activity. *Café Cacao Téa*. 36: 279–284.
- Dougan, J. 1980. Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia (part2): Methods for the analysis of cocoa pulp and cotelydon. Long Asthon Research Station, Bristol.

- Doyle M., Beuchat L.R., dan Montville T.J. 2001. *Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers*. 2nd Edition. Washington DC : ASM Press.
- Drysdale, G.S. dan Fleet. G.H., 1988. Acetic acid bacteria in wine making: a review. *American. Journal Enol.Vitic.* 39: 143-154.
- Fenema, O. R., 1996. Food Chemistry. University of Wisconsin. Madison. 3th edition. Pargamon Press. New York.
- Forsyth, W.G.C. dan Quesnel, V.C., 1963. Mechanisms of cocoa curing. *Adv. Enzymol.* 25: 457–492.
- Frauendofer, F. dan Scieberle, P. 2006 Identification of the key Aroma Compound in Cocoa Powder Based on Molecular Sensory Correlations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:5521-5529.
- Ganda Putra, G.P., Harjiono, Susanto, T., Kumalaningsih, S., dan Aulanni'am, 2008. Optimasi kondisi depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim poligalakturonase endojinus. *Jurnal Teknik Industri*. 9(1): 124-34.
- Ganda Putra, G.P., Wartini N.M., dan Dewi Anggreni, A.A.M., 2010. Karakterisasi enzim polifenol oksidase biji kakao (*Theobroma cocoa Linn*). *Agritech*. 30(3) : 152-157.
- Ganeswari, I., Khairul Bariah, S., Amizi, M.A dan Sim, K.Y. 2015. Effects of different fermentation approaches on the microbiological and physicochemical changes during cocoa bean fermentation. *International Food Research Journal*. 22(1): 70-76
- Gauthier , B., Guiraud , J., Vincent, J.C., Porvais, J.P., dan Galzy, P. 1977 Comments on yeast flora from traditional fermentation of cocoa in the Ivory Coast *Rev Ferment Ind Aliment*. 32:160 – 163 .
- Granvogl, Bugan, M. S., dan Schieberle, P. 2006. Formation of Amines and Aldehydes from Parent Amino Acid during Thermal processing of Cocoa and Model System; New Insight into pathways of the strecker reaktion. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 54(5): 1730-1739
- Hansen, C. E., del Olmo, M., dan 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. Cetakan pertama. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Hashim, P., Jinap, S., Muhammad, S. K.S dan Ali, A. 1998^a. Changes in free amino acid, peptida-N, Sugar dan Pirazine concentration during cocoa fermentatation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78 : 535-542
- Hashim, P., Jinap, S., Muhammad, S. K.S dan Ali, A. 1998^b. Epect of Mass and Turning Time on Free Amino Acid, Sugar and PyrazinePeptide-N, Concentration during Cocoa Fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78:543-550
- Heriyawan, A. 2015. Perbaikan proses fermentasi biji kakao kering jemur dengan penambahan kanji yang tepat, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada
- Holm, C.S., Aston J.W. dan Douglas K. 1993. The effects of the organic acids in cocoa on the flavour of chocolate. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 61: 65-71.
- Hoskin, J.C. dan Dimick, P.S., 1994. Chemistry of flavour development in chocolate. In: *Industrial Chocolate Manufacture and Use* (edited by S.T. Beckett), 2nd edn. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Ikrawan, Y., Chaiseri, S. dan Vungdeethum, O., 1997. Effect of Fermentation Time on Pyrazine Concentration of Thai Forsero Beans. *Kasesart Journal (Natural Science)*. 31 : 479 - 487
- Jalil, A. M. M. dan Ismail, A., 2008. *Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health?* *Molecules*, 13(9):2190–2219. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/13/9/2190/> [Accessed November 28, 2014].
- James T. Carlinl, Ken N. Lee, Oliver A.L. H, Lucy S.H, Chi Tang Ho dan Stephen S.C.,1985. Comparison of acidic and basic volatile compounds of cocoa butters from roasted and unroasted cocoa Beans. *Journal American Oil Chemical Sosiacty*. 63(8): 1031-1035
- Jespersen, L., Nielsen, D.S., Hønholt, S., dan Jakobsen, M. 2005 Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res*. 5:441 – 453.
- Jinap, S., Thien, J dan Yap, T.N., 1994. Effect of Drying on Acidity and Volatile Fatty Acids Content of Cocoa Benas. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 65:67-75.
- Jinap, S., Dimick, P.S., dan Hollender, R. 1995. Flavour evaluation of Chocolate formulated from cocoa beans from different countries. *Food Control*. 6(2):105-110.

- Jinap, S., I. Amin, dan B. Jamilah., 1997. Vicilin Class Globulins and their Degradation During Cocoa Fermentation. *Food Chemistry*. 59 : 1-5
- Kim, H. dan. Keeney P. G., 1983. Method of Analysis for (-)-Epicatechin in Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of food Science*. 48: 548-551
- Kirchhoff, P.M., Biehl, B., Ziegeler-Berghausen, H., Hammoor, M., dan Lieberei, M., 1989^a. Kinetics of the Formation of Free Amino Acids in Cocoa Seeds during Fermentation. *Food Chemistry*. 34:161-179.
- Kirchoff, P.M., Biehl, B., dan Crone, G., 1989^b. Peculiarity of the accumulation of Free amino Acid during cocoa fermentation. *Internasional Food Research Journal*. 17: 763-774.
- Kosim, M., dan Surya, R. P., 2010. *Pengaruh Suhu Pada Protease Dari Bacillus Subtilis*, Tesis Fakultas MIPA Intitut Teknologi Surabaya. Surabaya
- Krenowati P, M. T. A, Suryani, L dan Affifah, M., 2013. Improvement of Cocoa Beans Fermentation by LAB Starter Addition, *Journal of Medical and Bioengineering*. 2: 274-278.
- Kustyawati M.E., dan Setyani S., 2008. Pengaruh penambahan inokulum campuran terhadap perubahan kimia dan mikrobiologi selama fermentasi coklat. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 8: 73 - 84
- Lima, L. J. R., Kamphuis, H. J. Nout, R. J., dan Zwietering, M. H., 2011. Microbiota of cocoa powder with particular reference to aerobic thermoresistant sporeformers. *Food Microbiology*. 28:573–582.
- Lopez, A. S., Lehrian, D. W. dan Lehrian, L. V., 1978. Optimum temperature and pH of invertase of the seeds of *Theobroma cacao* L. *Revista Theobroma*. 8: 105–112.
- Lopez, S.S. dan. Dimick. P.S., 1995. Cocoa fermentation : Enzymes, Biomass, Food and Feed 2nd ed. Biotechnology, vol 9. Reed, G and T.W. Nagodawithana (ed). VHC Wenheim Germany.
- Maarse, H. 1991. Volatile Compounds in Foods and Beverages. Marcel Dekkerinc. New york Basel Hongkong.
- Mahajan, S., Goddik, L, dan Qian, M.C. 2004. Aroma Compounds in Sweet Whey Powder. *Journal Dairy Science*. 87:4057-4063.
- Martin, F. L. dan Ames, J. M., 2001, Formation of stecker Aldehydes and Pyrazines in fried potato, *Journal Agriculture Food Chem*. 49: 3885 - 3892.

- Marliayana, S.D., 2002. Isolasi dan identifikasi komponen biji kakao (*Theobroma cacao lin*). Hasil fermentasi. *Biosmart*. 4 (1):11-16
- Minifie, B.W., 1982. *Chocolate, Cocoa, and Confectionery. Science and Technology, 2nd. Edition*. Avi Publishing Company. New York.
- Misnawi dan Ariza, B.T.S., 2011. Use of Gas Chromatography – Olfactometry in combination with Solid Phase Micro Extraction for cocoa liquor aroma analysis. *Internasional Food Research Journal*. 18:829–835.
- Misnawi dan Teguh, W. 2010. *Cocoa chemistry and technology*: Lambert Academic Publishing.
- Misnawi., Jinap, S., Nazamid, S., dan Jamilah, B., 2002. Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry*. 78(4):407–417. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814602001206>.
- Misnawi dan Jinap, S. 2003 Effect of Cocoa bean Polyphenols on sensory Properties and Their Changes during Fermentation. *Pelita Perkebunan*. 19(2): 90-103
- Misnawi., Jinap, S., Nazamid, S., dan Jamilah, B. 2003 Effect of Incubation and Polyphenol Oxidase Enrichment on Colour, Fermentation Indexs, Procyanidins and Astrigency of Unfermented and Partly fermented cocoa beans. *International Journal of Food Science nad Technology*. 38:285-295.
- Misnawi dan Jinap S. 2008. Citarasa, Tekstur dan Warna Cokelat (Bab dalam Buku). KAKAO, *Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*, Bab 16, 237-251 Penebar Swadaya, Jakarta
- Moreira, I.M.D.V., Miguel,M.G.C.P., Duarte, W.F., Ribeiro Dias, dan D.R., Schwan, R.F., 2013. Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao L.*) hybrids. *Food Research International*. 54(1):9–17.
- Mulato, Widyotomo, Misnawi, dan Suharyanto., 2008. *Petunjuk Teknis Produk Primer Dan Sekunder Kakao*. Jember. : Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia
- Nanik Suhartatik., 2014., Karakteristik fermentatif medium *deMann Rogosa Sharpe* (MRS) beras ketan hitam (*Oryza sativa* var. glutinosa) menggunakan *Pediococcus pentosaceus* N11.16. *Jurnal AGRITECH*. 34(3):384-390

- Nazaruddin, R., Seng, L.K., Hassan, O., dan 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.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S. dan Holzapfel, W. H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analyzed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 168–186.
- Noor-Soffalina, S.S., Jinap, S., Nazamid dan S. A. H. Nazimah., 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. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2008.01711.x> [Accessed December 9, 2014].
- Nuwiah A, 2010. Uji senyawa aroma khas coklat hasil roasting asam amino hidrofobik dan fruktosa dalam lemak kakao. *AGRIPLUS*. 20(1):88-98
- Osman, H., Nazaruddin, R., dan Lee, S.L., 2004. Extracts of cocoa (*Theobromacacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chemistry*. 86:41–45.
- Owusu, M. 2010. Influence of Raw Material and Processig on Aroma in Chocolate, Ph.D. Thesis. Faculty of Life Science, University of Copenhagen. Denmark.
- Passos, F.M.L., Lopez A.S., dan Silva. D.O., 1984. Aeration and its influence on the mikrobial sequence in cacao fermentation in Bahia, with emphasis on lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*. 49: 1470-1476.
- Pasau, C. 2013. Efektivitas penggunaan asam asetat pada pemeraman biji kakao segar sebagai analog fermentasi. *E-J.Agrotekbis*, 1(2): 113-120.
- Putranto, W. S. 2007. Aktivitas proteolitik *Lactobacillus acidophilus* dalam fermentasi susu sapi. *Jurnal Ilmu Ternak*. 7(1): 69-72.
- Pereira, G. V.M., Miguel, M.G.C.P., Ramos, C.L. dan Schwan, R. 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacteria strains to develop a defined starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 5395-5408.
- Rizzi, G.P dan Bunke, P.R., 1998. The use of Roasting Kinetics data to characterize Naturl and artificial Chocolate Aroma Precursoes. Elsevier Scientificc Publisng Company. New York.

- Rohan, T. A., dan Stewart, T. 1966. The Precursor of Chocolate Aroma: Changes in The Sugars During the Roasting of cocoa beans. *Journal Food Science*. 31: 206-209
- Rohan, T.A. 1963. Processing of Raw Cocoa for the Market. FAO Agricultural Studies.
- Rohan, T.A. dan Stewart, T. 1967. The Precursors of Chocolate Aroma: Production of Reducing Sugar Fermentation of Cocoa Beans. *Journal of Food Science*. 32:339-402
- Rohsius, C., Matissek, R dan Lieberei, R 2006. Free Amino Acid Amount in Raw Cocoa From Different Origins. *European Food Research and Technology*. 222 : 432-438.
- Sabahannur, St., Mursalim., Asrul L.O. dan Mariyati Bilang. (2015) Use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for the Analysis of Amino Acid of Sulawesi and Local Clone Cocoa Bean Fermentation, *Journal of Food Research*. 4(4):120-126
- Sanchez, J., Guiraud, J.P., and Gazy, P., 1984. A study of the polygalacturonase activity of several yeast strains isolated from cocoa . *Appl Microbiol Biotechnol*. 20: 262 – 267 .
- Samaržija, D., Antunac, N., dan Havranek, J.L. 2001. Taxonomy, physiology and growth *Lactobacillus lactis*; review. *Mljekarstvo*. 51(1):35-48
- Schwan, R.F. , Rose , A.H. , dan Board , R.G. , 1995. Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp . *J Appl Bacteriol Symp Supply*. **79**: 96–107.
- Schwan, R.F., 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4):1477–1483.
- Schwan, R.F. dan Wheals, A.E., 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in food science and nutrition*. 44(4):205–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15462126>.
- Semuel. F.K., 2013. *Pengaruh fermentasi biji kakao kering non fermentasi terhadap Indeks fermentasi*. Tesis, Fakultas Teknologi Pertanian UGM
- Senanayake, M., R.J. Errol, dan K.A. Buckle. 1996. Effect of different mixing intervals on the fermentation of cocoa beans. *Journal Science Food Agriculture*. 74: 42-48.

- Siregar, T. H.S., Riyadi, S dan Nuraeni, L., 1997. Budidaya, pengolahan dan pemasaran coklat. PT. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sivetz, M. dan Desrosier N.W. 1979. *Coffee Technology*. The AVI Publ. Inc., Connecticut.
- Soria, L A., N. H. P. Garcia, dan Farfan, J.A. 2005. Soluble Albumin and Biological Value of Protein in Cocoa (*Theobroma cocoa* L) beans as a Function of Roasting Time. *Journal of Food Science*. 70:294-298
- Spencer, M. A. dan Hodge, R., 1992. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*: Identification of the proteins as members of the vicilin class of storage proteins. *Planta*. 186:567–576.
- Stark, T., Bareuther, S dan Hofmann, T. 2006. Molecular Definition of the Taste of Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma cacao*) by Means of Quantitative Studies and Sensory Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 5530-5539.
- Stewart, G.G., Panchal, I. C.J., Russel, A.M. dan Sills, A.M., 1984. Biology of Ethanol Producing Microorganisms. In CRC Critical Reviews in *Biotechnology*. 1(3):161-181.
- Sudarmadji, S., Haryono, B dan Suhardi., 1997. *Prosedur analisa bahan pangan*, Liberty Press. yogyakarta.
- Sulistyowati., 1988. Keasaman Biji kakao dan masalahnya. *Pelita Perkebunan*. 3: 151-158.
- Sulistyowati., 1999 Uji cita rasa untuk pengujian mutu biji kakao. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao*. 15:324-332
- Sukha, D. A., Butler, D. R., Umaharan, P., dan Boulton, E. 2008. The use of an optimized organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*. 226(3),405-413.
- Supriyanto, Haryadi, Rahardjo. B., dan Warseno. D.W., 2007. Perubahan suhu, kadar air, warna, kadar polifenol, dan aktivitas oksidatif kakao selama penyangraian dengan energi gelombang mikro. *AGRITECH*. 27(1):176-182
- Suria, La., Garcia N. H. P., dan Farfan, J.A. 2005. soluble Albumin and Biological value of protein in cocoa nibs (*theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 54:5530-5539.

- Sukrino W., Mulato., dan Suharyanto E. 2006. Optimasi mesin sangrai tipe silender horizontal untuk penyangraian biji kakao. *Pelita Perkebunan*. 22(2):136-158
- Thomson, S.S., Miller K.B., dan Lopez A.S., 2000. Cocoa and coffe. in Food Microbiology and Fundamental and Frinters 4th. Doyle, P.M. Bechat, L. R.Montivile, T.J. Asm Press. Woshington DC.
- Vuyst., L. De., Lefeber, T., Papalexandratou,Z., dan Camu. N., 2010. *The functional Role of Latic Acid Bacteria in Book Biotechonolgy of Latic Acid Bacteria Novel Applicaton* F. Mozzi, R. R. Raya, & G. M. Vignolo, eds., Wiley Blackwell.
- Voigt, J., Biehl, B. dan Heinrichs, H., 1994a. 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. *Food Chemistry*. 49:173–180
- Voigt, J., Heinrichs, H., Voigt, G. dan Biehl, B., 1994b.Cocoa-specific aroma precursors are generated by proteolytic digestion of the vicilin like globulin of cocoa seeds. *Food Chemistry*. 50: 177–184.
- Voigt, J., Biehl, B. dan Kamaruddin, S. 1993. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry*. 47: 145–151.
- Wayman, M., dan Parekh, S.R., 1990. Biotechnology of biomass conversion. Open University Press., Milton Keynes.
- Wahyudi T., Panggabean R., dan Pujiyanto., 2009. Panduan lengkap kakao manajemen agribisnis dari hulu hingga hilir, Penebar Swadaya
- Widianto, D., Pramita, A. D., dan Wedhastri, S., 2013. Perbaikan proses fermentasi biji kakao kering dengan penambahan tetes tebu, khamir, dan bakteri asam, *Jurnal Tekno sains*. 3(1):1-80
- Wood,G.A.R. dan Lass, R.A., 2001. Cocoa. series 4th. Blackwell science. London.
- Wollgast, J., dan 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.
- Yusianto., Winarno, H., dan Wahyudi, T., 1997. Mutu dan pola cita rasa biji beberapa klon kakao lindak. *Pelita Perkebunan*.13:171—187.

- Yulius G., Supriyanto., dan Purnama, D., 2014. Pengaruh perendamn biji kakao kering dan bahan alat sangrai terhadap sifat fisik dan profil senyawa volatil kakao sangrai serta sifat sensoris cokelat batang yang dihasilkan. *AGRITECH*. 34(4):439-447
- Ziegleder, G., 2009. *Flavour development in cocoa and chocolate*. In book: *Industrial chocolate manufacture and use 4th ed*. S.T. Willey-Blackwell, United Kingdom.
- Ziegleder, G. dan Biehl, B., 1988. Analysis of cocoa flavour components and flavour precursors. In: *Analysis of Non Alcoholic Beverages, Methods of Plant Analysis*, vol. 8. (edited by H.F. Lickens and J.F. Jackson). Pp. 321–393. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
- Ziegleder, G., 1991. *Flavour Development of Cocoa*. 2nd Int. Congress on Cocoa and chocolate. ZDS Proceedings, Munich, Germany.

Lampiran 1. Prosedur Analisis Biji Kakao kering jemur

Lampiran 1. 1. Kadar air pulp atau kotelidon biji kakao kering jemur metoda gravimetri (Sudarmadji *et al.*, 1997)

Botol timbang kosong dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit, kemudian didinginkan dalam desikator. (a) Botol timbang berisi pulp atau kotelidon biji kakao kering jemur ditimbang dan dikeringkan segera keringkan dalam oven pada suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit, sampai sampel mencapai berat konstan. (b), selanjutnya botol dan sampel dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 105^{\circ}\text{C}$ selama 5 jam, dengan tutup terbuka. Setelah dipanaskan selama 5 jam botol timbang, berisi sampel didinginkan dalam desikator, kemudian setelah dingin ditimbang. Botol dan sampel dipanaskan kembali dan berulang sampai didapat berat konstan yaitu selisih berat antara penimbangan terakhir dengan penimbangan sebelumnya tidak lebih dari 0,0002g. (c). Persamaan untuk perhitungan kadar air adalah sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\% bb)} = \frac{b-c}{b-a} \times 100 \% \dots\dots\dots (1.1)$$

Data kadar air dinyatakan dalam bentuk % kadar air berat basah.

Lampiran 1. 2. Analisis kadar gula pulp dan kadar gula reduksi pulp metode Nelson-Somogy

Analisis gula dimulai dengan pembuatan kurva standart yaitu diimbang 10 mg glukosa anhidrat dan dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian buat larutan gula encer dengan kadar gula 0, 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/100ml. Selanjutnya masing-masing larutan standar dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml reagensia Nelson. Dan larutan standar gula dipanaskan dalam penangas air mendidih selama ± 20 menit dan setelah itu didinginkan sampai suhu tabung mencapai $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Setelah

dingin larutan gula ditambahkan 1ml arsenomolibdat dan digojog sampai larut kembali. Kemudian larutan standar gula ditambah 7 ml aquades dan digojog sampai homogen dan ditera OD (optical density) pada panjang gelombang 540 nm dan data yang diperoleh dibuat kurva standart yaitu hubungan antara konsentrasi gula dan OD nya.

Kurva standar tersebut digunakan untuk menghitung kadar gula reduksi sampel. Pulp biji kakao kering jemur dihancurkan dengan mortar sampai halus kemudian ditimbang sebanyak 2,5 g, dan ditambah aquades 100 ml selanjutnya diblender. Larutan sampel diencerkan sampai volume didapat 250 ml dan disaring dengan kain saring. Diambil 25 ml larutan sampel dan dimasukkan dalam labu takar 100 ml. Bila larutan sampel keruh, ditambah Pb asetat dalam larutan sampel sampai larutan sampel menjadi jernih dan selanjutnya ditambah Na-oksalat seperti penambahan Pb asetat. Kemudian sampel diencerkan dalam labu takar volume sampai tanda batas dan selanjutnya sampel disaring dengan kertas saring whatman no 1. Diambil 1 ml larutan sampel dan ditambah regensia Nelson, kemudian masing-masing tabung dipanaskan dalam penangas air mendidih selama ± 20 menit dan setelah itu didinginkan sampai suhu ± 25 °C. Setelah dingin sampel ditambah 1 ml arsenomolibdat dan digojog sampai semua endapan larut. Kemudian sampel ditambah 7 ml aquades dan digojog sampai homogen, selanjutnya ditera OD ditera untuk masing- masing larutan sampel, pada panjang gelombang 540 nm. Dengan prosedur yang sama dilakukan pengukuran OD larutan standar dan dibuat kurva standar untuk dasar penghitungan kadar gula sampel. membuat kurva standart yang menyatakan hubungan antara konsentrasi larutan standart dan OD nya.

Sebanyak 25 ml larutan sampel ditambah aquades hingga volume tepat 250 ml, selanjutnya ditambah 5 ml HCl 30% dan dipanaskan dalam penangas air pada suhu 67 – 70° C selama ± 10 menit, kemudian didinginkan sampai suhu ± 20 °C dan selanjutnya sampel dinetralkan dengan ditambah NaOH 45%, selanjutnya diambil 10 ml diencerkan sampai volume tepat 100 ml, kemudian larutan sampel tersebut diambil 1 ml dan ditambah reagensia Nelson, kemudian masing – masing tabung dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 20 menit dan setelah itu didinginkan sampai suhu 25 °C. Setelah dingin ditambah 1 ml arsenomolibdat dan digojog sampai semua endapan larut kembali. Kemudian sampel ditambah 7 ml aquades dan digojog sampai homogen, dan masing- masing larutan sampel ditera ODnya pada panjang gelombang 540 nm dan juga dibuat kurva standar dengan metoda yang sama seperti sampel. Larutan standart menyatakan hubungan antara konsentrasi gula total larutan sampel dan OD nya digunakan untuk dasar perhitungan kadar gula total sampel menggunakan persamaan larutan yang ditemukan dari kurva standar.

Lampiran 1.3. Analisis pH dan keasaman biji kakao mengacu metoda Nazaruddin *et al.*, (2006) dengan sedikit modifikasi

pH-meter disiapkan dengan melakukan kalibrasi yaitu pengaturan titik nol dan aliran listrik sesuai dengan buku petunjuk yang ada dan standarisasi dilakukan menggunakan larutan penyangga baku pH 4,0 dan pH 7,0. Contoh uji sebanyak 12-20 biji kakao kering dipisahkan kulit luarnya dan kemudian digiling dengan blender. Diambil bubuk biji kakao sebanyak ± 10 g kemudian dimasukkan dalam gelas piala, ditambah 90 ml air suling dan dipanaskan pada suhu 70°C - 80°C, diaduk perlahan sampai homogen kemudian disaring dan dinginkan filtrat sampai

suhu kamar (27 ± 2)°C, dan pH filtrat secepat mungkin ditentukan pada suhu tersebut. Angka pembacaan pH meter merupakan pH biji kakao kering jemur.

Lampiran 1.4. Analisis indeks fermentasi

Indeks fermentasi biji kakao kering jemur ditentukan dengan mengacu metode Misnawi *et al.* (2002). Sampel bubuk biji kakao hasil fermentasi ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian di ekstraksi dengan 50 ml larutan campuran metanol:HCl (97:3). Sampel dengan larutan kemudian dibiarkan homogen didalam lemari es pada suhu 8°C selama 18 jam. Filtrat disaring menggunakan kertas saring Whatmann No. 1. Absorbansi ditentukan dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 400 - 700 nm menggunakan lampu UV-Vis Shimadzu UV-1601 Spectrophotometer, Tokyo, Japan). Indeks fermentasi dihitung berdasarkan rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 460 nm dengan absorbansi 530 nm

$$\text{Indeks Fermentasi} = \frac{A \text{ pada } \lambda \text{ 460 nm}}{A \text{ pada } \lambda \text{ 530 nm}} \dots\dots\dots(1.2)$$

Lampiran 1.5. Analisis warna biji (cut test) metoda Mulato *et al.*, (2008) dengan sedikit modifikasi

Pengujian ini dilakukan dengan cara mengamati perubahan warna secara visual dan subyektif. Ambil sampel biji kakao kering jemur hasil fermentasi sebanyak 50 butir (pengambilan secara acak). Biji kakao dipotong membujur dengan pisau cutter dan biji terbelah diamati satu persatu untuk mengetahui kondisi biji kakao sebagai biji coklat, biji ungu kecoklatan dan biji slaty.

Informasi karakteristik biji hasil uji warna keping biji adalah:

1. Biji kakao tidak terfermentasi disebut biji slaty yang ditunjukkan oleh separuh atau lebih permukaan irisan keping biji berwarna keabu-abuan seperti sabak atau biru keabu-abuan dan memiliki tekstur padat dan pejal.
2. Biji under fermented adalah biji tidak terfermentasi dan memperlihatkan $\frac{3}{4}$ atau lebih permukaan irisan keping biji berwarna ungu memiliki tekstur padat dan pejal.
3. Biji terfermentasi adalah biji kakao yang seluruh keping bijinya berwarna coklat.

Cara menyatakan hasil uji warna biji kakao adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Biji Slaty} = \sum \frac{\text{belahan biji berwarna slaty}}{\text{belahan total biji kakao}} \times 100\% \dots\dots\dots (5.3)$$

$$\% \text{ Biji Ungu kecoklatan} = \sum \frac{\text{belahan biji berwarna ungu}}{\text{belahan total biji kakao}} \times 100\% \dots\dots\dots (5.4)$$

$$\% \text{ Biji coklat} = \sum \frac{\text{belahan biji berwarna coklat}}{\text{belahan total biji kakao}} \times 100\% \dots\dots\dots (5.5)$$

Lampiran 1. 6. Analisis suhu fermentasi selama fermentasi

Disiapkan 3 buah termometer batang yang diletakkan pada botol sampel masuk sampai kedalam tumpukan biji kakao kering jemur yang difermentasi. Suhu tumpukan biji kakao kering jemur diamati pada periode waktu fermentasi 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 dan 120 jam. Hasil pembacaan suhu merupakan suhu lingkungan fermentasi.

Lampiran 1.7. Analisis total polifenol biji kakao kering jemur hasil fermentasi dengan mengacu metoda (Noor-Soffalina *et al*, 2009) dengan sedikit modifikasi

Analisis total polifenol biji kakao dilakukan dalam 2 tahap yaitu perama penyiapan sampel dan kedua analisis total polifenol dengan metode yang terpilih:

1. Penyiapan sampel

Sepuluh g sampel biji kakao kering jemur hasil fermentasi sebelum dan sesudah berturut-turut 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 dan 120 jam fermentasi disangrai dan dihancurkan dengan mortar, kemudian dilakukan penghilangan lemaknya (defated) Diambil 500 mg bubuk kakao hasil defated selanjutnya dicampur dengan 80 ml aseton 80%. Campuran sampel dalam aseton disonikasi pada frekwensi 330 Hz selama ± 30 menit. Selama sonikasi, sampel selalu dijaga tetap dingin dengan menggunakan es batu pada wadah sampel pada sonikator. Campuran sampel kemudian disaring dengan penyaring vakum menggunakan kertas saring Whatmann No 1 agar didapatkan ekstrak jernih. Residu dibilas dengan aseton 80% hingga diperoleh volume supernatant sebanyak 100 ml.

2. Penentuan total polifenol

Penentuan total polifenol mengacu metode *Folin-Ciocalteu* dengan cara kerja sebagai berikut: 1 ml ekstrak dipipet dan dimasukkan dalam labu takar 10 ml, selanjutnya diencerkan aquades sampai volume tepat 10 ml. Ekstrak polifenol kemudian di reaksikan dengan 0,5 ml reagen *Folin-Ciocalteu* (1 bagian sampel : 1 bagian air) dan dibiarkan selama 2 - 3 menit. Setelah 2 - 3 menit sampel ditambah 1 ml natrium karbonat 15% (15 g natrium karbonat dilarutkan dengan aquades sampai volume tepat 100 ml), agar warna menjadi stabil pembentukan warna. Pembentukan warna biru pada sampel berlangsung sedikitnya sekitarnya 2 jam. Sampel kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 760 nm.

Total polifenol dinyatakan dalam mg asam galat equivalent/g sampel, dan dihitung berdasarkan persamaan kurva standar larutan asam galat dengan kisaran konsentrasi 1 - 100 mg/L (ppm). Kurva standart untuk total polifenol dibuat dengan metode *Folin-Ciocalteu* seperti halnya yang dilakukan untuk sampel.

Lampiran 1.8. Analisis asam amino mengacu metoda Ikrawan *et al.*(1997) dengan sedikit modifikasi

Analisis asam amino bebas melalui 3 tahap yaitu 1. penyiapan sampel, 2. derivatisasi asam amino, dan 3. penentuan asam amino dengan metode HPLC.

1. Penyiapan sampel

700 mg sampel serbuk biji kakao bebas lemak diekstraksi dengan 10 ml aseton 80% sebanyak 3 kali. Larutan sampel diaduk dengan magnetic stirrer di ruang dingin ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) selama 1 jam. Larutan sampel disentrifugasi selama 15 menit, dan supernatan disaring dengan kertas saring Whatmann No 1. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga volume susut dari 100 ml da volume dijadikan tepat ± 50 ml dengan aquades. Filtrat disimpan pada suhu $\pm 3^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi selama ± 5 menit. Supernatan sampel yang diperoleh digunakan untuk analisis asam amino bebas menggunakan metode HPLC.

2. Derivatisasi asam amino

Sebelum asam amino bebas ditentukan dengan metode HPLC, maka sampel sebanyak 25 μl sampel diderivatisasi dengan OPA (*Ortho Phalaldehid*) sebanyak 300 μl dan divortex selama 5 menit, selanjutnya sampel hasil derivatisasi asam amino digunakan untuk penentuan asam amino bebas.

3. Penentuan asam amino

Hasil derivatisasi asam amino bebas sebanyak 20 µL, dipisahkan dan dianalisis dengan *reversed phase* HPLC, menggunakan Licrospher® 100 RP 18 (5µm) 125 mm x 4mm dengan *gradient elution*. Eluent A sebagai fase stasioner terdiri atas buffer asam asetat:natrium asetat 50 mM : THF (2 bagian buffer asam asetat : 96 bagian natrium asetat : 2 THF) pada pH 6,8. Eluent B sebagai fase bergerak terdiri atas asam asetat 65%. Asam amino bebas dideteksi menggunakan detektor Flouren (Shomadzu RF-138) pada panjang gelombang 360-460 nm. Hasil pengukuran akumulasi asam amino pada panjang gelombang tersebut diatas dinyatakan sebagai total asam amino biji kakao kering jamur hasil fearmentasi.

Lampiran 1.9. Penentuan populasi mikroba menggunakan metode *pour plate* (Kustyawati dan Setyani, 2008)

Disiapkan blue tip 1 ml, 7 petridis, 7 tabug reaksi yang masing – maing berisi 9 ml larutan NaCl 0,85%, untuk media pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dibuat dari 7,5 g *Peptone* (oxoid), 20 g *Glucose* (oxoid), 4,5 g *Yeast extract* (oxoid) dan 10 g agar dilarutkan dalam 1 liter aquades, dan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, untuk media *Lactobacillus lactis* dibuat dari 52 g MRS broth (Oxoid), 10 g CaCO₃ (PA), 10 g agar (PA) dilarutkan dalam 1 liter aquades, dan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dan untuk media *Acetobacter aceti* dibuat dari 7,5 g *Peptone* (oxoid), 20 g *Glucose* (oxoid), 4,5 g *Yeast extract* (oxoid), 50 ml etanol (PA) 90%, 10 g agar (PA) dilarutkan dalam 1 liter aquades, dan disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Diambil 1 g sampel *pulp* biji kakao kering jamur

ditambahkan 9 ml larutan NaCl 0,85% selanjutnya dihomogenkan dengan *stomaker* selama 15 menit.

Diambil 1 ml cairan sampel dengan pipet ukur 1 ml kemudian dimasukkan dalam larutan pengencer pada tabung reaksi ke 1 selanjutnya, digojog dengan vortex agar homogen, setelah homogen diambil 1 ml dan larutan tabung reaksi 1 dimasukkan kedalam tabung reaksi ke 2 selanjutnya digojog dengan vortex. Langkah ini dilakukan sampai pada tabung reaksi ke 7. Pengenceran yang telah dilakukan sebanyak 10^7 , kemudian diambil 1 ml larutan dari tabung reaksi dimasukkan ke 3 sampai tabung reaksi ke 7 kedalam cawan petri kemudian dituang media agar yang sudah dingin sebanyak $\pm 10 - 15$ ml setiap cawan petri dan di goncang perlahan agar suspensi dalam tabung reaksi tercampur merata.

Selanjutnya cawan petri yang berisi sampel diinkubasi pada suhu $\pm 35^\circ\text{C}$ selama 3 hari kemudian, Jumlah koloni mikrobial yang terbentuk dihitung. Penghitungan jumlah koloni menggunakan *quebec colony counter* (QCC). Diusahakan pertumbuhan sel pada media berkisar antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri. Hasil penghitungan jumlah koloni *S. cerevisiae*, *L. lactis* dan *A. aceti* pada cawan petri dinyatakan dalam log CFU /g *pulp*.

Lampiran 1.10. Analisis senyawa volatil metode Misnawi dan Ariza (2011)

Prosedur analisis senyawa volatil mengacu metode Misnawi dan Ariza (2011) yaitu diawali dengan penyangraian biji kakao kering jemur hasil fermentasi sebanyak 10 g. Pasca sangrai keping biji dipisahkan kulitnya, kemudian keping biji diekstraksi menggunakan SPME (Solid Phase Microextraction).

SPME yang digunakan adalah jenis bipolar DVB/PDMS (*divenyl benzene/polymethylsioxane*). Metode ekstraksi yang digunakan adalah *headspace* sebagai berikut: sampel lemak kakao ditempatkan dalam *vial* berukuran 22 ml. Sebanyak 3 ml selanjutnya sampel diekstraksi pada suhu 60°C selama 30 menit sambil terus dilakukan pengadukan menggunakan *magnetik stirer*.

Sampel diidentifikasi dan senyawa volatil lemak kakao dianalisa menggunakan gas chromatografi (GC) dengan kolom berisi Agilent 7890A dilengkapi dengan *Mass Spectrometer Detector* (MS Agilent 5975 C (Three Axis, USA)). Kondisi GC untuk injeksi pada suhu 260 °C, dengan suhu awal kolom 60°C dan selanjutnya dinaikan dengan gradient 5°C / menit sampai mencapai 220 °C., selanjutnya suu dalam kolom ditahan selama 5 menit dan dialiri gas helium sebagai fase bergerak pada kecepatan 1 ml/menit.

Lampiran 1. 11. Konsentrasi asam sitrat, ethanol, asam laktat, dan asam asetat pada *pulp* dan biji kakao selama fermentasi (Kresnowati *et. al*, 2013) dengan sedikit modifikasi

1. Sampel biji kakao (10 g) manual dipisahkan dari pulp, biji kakao dihaluskan.
2. Pulp atau biji kakao yang diperoleh diekstraksi menggunakan aquades dengan perbandingan volume (1:1 v/v), kemudian digojog dengan shaker pada suhu 25-26 ° C selama 24 jam dengan kecepatan rotasi 120 rpm,.
3. Sampel dihomogenkan dengan vortek selama 4 menit, kemudian di sentrifugasi pada suhu 28 ° C selama 15 menit dengan kecepatan rotasi 14.000 rpm.

4. Supernatan di analisis menggunakan HPLC dengan kolom Aminex HPX-87H dan RID detektor, dan sebagai fase bergerak digunakan 5 mM H₂SO₄ dengan kecepatan aliran sebesar 0,6 mL/menit.

Lampiran 1.12. Peremajaan inokulum dan penyiapan inokulum (Ardana dan Fleets, (2003) dengan sedikit modifikasi

Pembiakan inokulum *S. Cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016), dilakukan pada media agar miring. Media agar miring untuk *S.cerevisiae* (FNCC 3056) dibuat dari *Peptone* (oxoid) 0,75 g, *Glucose* (oxoid) 2 g, *Yeast extract* (oxoid) 0,45 g dan agar (oxoid) 1 g dilarutkan dengan 100 ml aquades dalam labu ukur 150ml, kemudian disterilisasi dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya masukan media agar kedalam 10 tabung reaksi letak tabung reaksi pada posisi miring dan letakkan disuhu ruang, setelah media dingin baru digunakan untuk pertumbuhan *S. Cerevisiae* (FNCC 3056). Setelah media agar miring keras, media tersebut siap digunakan. Selanjutnya ambil 1 jarum ose *S. Cerevisiae* (FNCC 3056) terus digoreskan pada agar miring. Kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 3 hari. Selanjutnya inokulum dapat digunakan untuk pembuatan starter dan *S. Cerevisiae* (FNCC 3056) dalam media agar miring disimpan dalam almari pendingin.

Menyiapkan media agar miring untuk *L. lactis* (FNC 0086) terdiri dari MRS broth (Oxoid) 5,2 g, CaCO₃ (PA) 1 g dan agar (oxoid) 1 g dilarutkan dengan aquades 100 ml dalam labu ukur 150 ml, kemudian disterilisasi dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya masukan media agar kedalam 10 tabung reaksi letak tabung reaksi pada posisi miring dan letakkan disuhu ruang, setelah media dingin baru digunakan untuk pertumbuhan *L. lactis* (FNC 0086). Selanjutnya

ambil 1 jarum ose *L. lactis* (FNC 0086) terus digoreskan pada agar miring. Kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 3 hari. Selanjutnya inokulum dapat digunakan untuk pembuatan media starter dan *L. lactis* (FNC 0086) dalam media agar miring disimpan dalam almari pendingin.

Membuat media agar miring untuk *A. aceti* (FNCC 0016) terdiri dari *Peptone* (oxoid) 0,75 g, *Glucose* (oxoid) 2 g, *Yeast extract* (Oxoid) 0,45 g, etanol (PA) 90% 5 ml dan agar 1 g dilarutkan dengan aquades 100 ml dalam labu ukur 150 ml, kemudian disterilisasi dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya masukan media agar kedalam 10 tabung reaksi letak tabung reaksi pada posisi miring dan letakkan disuhu ruang, setelah media dingin baru digunakan untuk pertumbuhan *A. aceti* (FNCC 0016). Selanjutnya ambil 1 jarum ose *A. aceti* (FNCC 0016) terus digoreskan pada agar miring. Kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 37°C selama 3 hari. Selanjutnya inokulum dapat digunakan untuk pembuatan media starter dan *A. aceti* (FNCC 0016) dalam media agar miring disimpan dalam almari pendingin.

Selanjutnya membuat starter *S. Cerevisiae* (FNCC 3056), *L. lactis* (FNC 0086) dan *A. aceti* (FNCC 0016) pada media cair. Menyiapkan media cair untuk *S.cerevisiae* (FNCC 3056) terdiri *Peptone* (oxoid) 7,5 g/L, *Glucose* (oxoid) 20 g/L, *Yeast extract* (oxoid) 4,5 g/L, kemudian disterilisasi dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit. Menyiapkan media cair untuk *L. lactis* (FNC 0086) terdiri dari MRS broth (Oxoid) 52 g/L, CaCO₃ (PA) 10 g/L, kemudian disterilisasi dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit. Membuat media cair untuk *A. aceti* (FNCC 0016) terdiri dari *Peptone* (oxoid) 7,5 g/L, *Glucose* (oxoid) 20 g/L, *Yeast extract*

(Oxoid) 4,5 g/L, etanol (PA) 90% 50 ml/L L kemudian disterilisasi dengan autoclave suhu 121°C selama 15 menit. Ambil 1 jarum ose *S. Cerevisiae* (FNCC 3056), kemudian masukkan kedalam media cair selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Ambil 1 jarum ose *L. lactis* kemudian masukkan kedalam media cair selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Ambil 1 jarum ose *A. aceti* kemudian masukkan kedalam media cair selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Penghitungan populasi dilakukan dengan pengenceran sampai 10^8 , jika diketahui masih terdapt koloni pada pengenceran 10^8 maka diasumsikan populasi mikrobial sebanyak 10^8 CFU/g. selanjutnya starter dimasukan kedalam tempat fermentasi sebanyak 2ml untuk 100 g biji kakao kering atau 2 % (v/b) dari biji kakao kering. Kemudian inokulum mikrobial dimasukan kedalam botol fermentasi sesuai dengan perlakuan fermentasi.

Lampiran 1. 13. Form kuisioner uji cita-rasa

Nama Panelis :
 Tanggal Uji :
 Jenis kelamin/usia : Email :
 No.Hp :

Anda diberikan 4 sampel biji kakao. Anda diminta untuk melakukan uji deskriptif, dan uji kesukaan terhadap sifat biji kakao yang meliputi cita-rasa (asam/*acidity*, pahit/*bitterness*, sepat/*astringent*) dan aroma biji kakao sangrai.

INSTRUKSI

1. Sebelum melakukan tes, terlebih dahulu berkumur dengan air hangat yang telah disediakan
2. Lakukan pencicipan sampel satu per satu dari kiri ke kanan dalam setiap 4 sampel
3. Diambil 1 g sampel dan diletakkan dalam mulut. Kemudian biarkan selama ± 20 detik. Profil cita-rasa biji kakao tampak pada saat itu **Saat pergantian uji sampel, panelis diharuskan berkumur dengan air hangat dan menetralkannya dengan biskuit yang telah disediakan.**
4. Profil cita-rasa kemudian ditentukan dengan cara memberi skor dengan skala 1 s.d 7 sesuai dengan intensitas atribut sensoris yang anda rasakan.

Tabel 12.1. Nilai (Skor) cita rasa aroma, asam, pahit dan sepat biji kakao pasca sangrai

Skor aroma	Rasa Biji Kakao kering		
	Skor asam/ <i>Acidity</i>	Skor pahit/ <i>bitterness</i>	Skor sepat/ <i>astringent</i>
1. Amat sangat	1. Amat sangat	1. Amat sangat	1. Amat sangat lemah
2. Sangat lemah	2. Sangat lemah	2. Sangat lemah	2. Sangat lemah
3. Lemah	3. Lemah	3. Lemah	3. Lemah
4. Agak kuat	4. Agak kuat	4. Agak kuat	4. Agak kuat
5. Kuat	5. Kuat	5. Kuat	5. Kuat
6. Sangat kuat	6. Sangat kuat	6. Sangat kuat	6. Sangat kuat
7. Amat sangat kuat	7. Amat sangat kuat	7. Amat sangat kuat	7. Amat sangat kuat

Tabel 12.2. Atribut mutu aroma, asam, pahit, dan sepat biji kakao pasca sangrai

Atribut mutu	Kode sampel			
	678	888	789	897
Aroma				
Asam/ <i>acidity</i>				
Pahit/ <i>bitterness</i>				
Sepat/ <i>astringent</i>				

Komentar :

.....

Uji Kesukaan

Tiap seorang panelis semi terlatih diberikan 4 sampel biji kakao. Anda diminta untuk uji kesukaan terhadap sifat biji kakao pasca sangrai

Instruksi : Urutkan semua sampel berdasarkan tingkat kesukaan anda menggunakan peringkat angka. Pada satu sampel uji tidak diperbolehkan ada peringkat yang sama.

Tabel 12.3. Skor uji kesukaan biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, IA dan IBpasca sangrai

Atribut tingkat kesukaan	Kode sampel			
	678	888	789	897
1..Paling disukai				
2. Disukai				
3. Tidak disukai				
4. Paling tidak disukai				

Komentar

.....

Catatan :

678 : bubuk biji kakao hasil fermentasi biji kakao segar

888 : bubuk biji kakao hasil perlakuan kontrol

789 : bubukbiji kakao hasil penmbahan inokulum secara serentak

879 : bubuk biji kakao hasil perlakuan penambahana inokulum secara bertahap
catatan ini tidak diberitahukan kepada panelis.

Lampiran 2. Hasil analisis asam amino, senyawa volatil dan uji statistik parametr mutu biji kakao kering pasca sangrai

Lampiran 2.1. Hasil analisis asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan kontrol

Gambar 2.1. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan kontrol diawal fermentasi.

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,05	62,79	6,25	Asam aspartat
2	3,50	74,85	6,14	Asam glutamat
3	4,21	12,99	0,69	
4	9,45	30,47	1,14	Serin
5	10,97	4,38	0,19	Histidin
6	13,01	30,69	1,35	Glisin
7	13,77	23,75	1,19	
8	15,36	26,08	1,18	Arginin
9	17,24	30,52	1,49	Alanin
10	18,63	43,41	0,27	
11	19,27	12,49	0,74	Tirosin
12	25,89	5,13	0,34	Methionin
13	26,57	35,99	1,72	Valin
14	28,48	20,15	1,29	Phenilalanin
15	29,60	20,59	1,39	Isoleusin
16	30,38	32,19	2,17	Leusin
17	34,67	6,99	0,63	Lisin

Gambar 2.2. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan kontrol setelah 72 jam fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi Mm	Nama Asam amino
1	2,04	68,79	6,45	Asam aspartat
2	3,50	70,87	6,13	Asam glutamat
3	4,21	12,79	0,69	
4	9,45	27,47	1,14	Serin
5	10,97	4,28	0,19	Histidin
6	13,01	32,69	1,35	Glisin
7	13,77	26,74	1,19	
8	15,35	25,07	1,18	Arginin
9	17,23	29,52	1,49	Alanin
10	18,63	4,47	0,27	
11	19,26	10,49	0,74	Tirosin
12	25,89	5,03	0,34	Methionin
13	26,56	38,99	1,72	Valin
14	28,47	19,35	1,29	Phenilalanin
15	29,59	19,59	1,39	Isoleusin
16	30,38	32,89	2,17	Leusin
17	34,67	7,09	0,65	Lisin

Gambar 2.3. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan kontrol setelah 96 jam fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,08	69,74	6,43	Asam aspartat
2	3,54	68,87	6,15	Asam glutamat
3	4,25	12,62	0,69	
4	9,42	29,41	1,18	Serin
5	10,90	4,09	0,19	Histidin
6	13,00	30,69	1,35	Glisin
7	13,77	2,68	1,18	
8	15,35	20,07	1,15	Arginin
9	17,26	31,65	1,49	Alanin
10	18,64	4,45	0,27	
11	19,26	9,49	0,74	Tirosin
12	25,89	4,88	0,32	Methionin
13	26,56	36,99	1,72	Valin
14	28,47	17,38	1,29	Phenilalanin
15	29,59	19,58	1,39	Isoleusin
16	30,38	30,78	2,17	Leusin
17	34,67	6,98	0,65	Lisin

Gambar 2.4. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering jamur perlakuan kontrol setelah 120 jam fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,04	60,19	6,46	Asam aspartad
2	3,50	70,87	6,07	Asam glutamat
3	4,21	12,38	0,68	
4	9,45	31,47	1,36	Serin
5	10,97	4,27	0,20	Histidin
6	13,01	32,58	1,40	Glisin
7	13,77	26,75	1,20	
8	15,35	24,17	1,24	Arginin
9	17,23	30,65	1,57	Alanin
10	18,63	4,48	0,29	
11	19,26	9,67	0,76	Tirosin
12	25,89	5,05	0,36	Methionin
13	26,56	38,77	1,74	Valin
14	28,47	19,98	1,30	Phenilalanin
15	29,59	20,01	1,42	Isoleusin
16	30,38	33,68	2,28	Leusin
17	34,67	7,17	0,65	Lisin

Lampiran 2.2. Hasil analisis asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak fermentasi

Gambar 2.5. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak fermentasi diawal fermentasi

*** Laporan Puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi Mm	Nama asam amino
1	2,04	59,88	6,24	Asam aaspartat
2	3,51	74,46	6,13	Asam glutamat
3	4,21	12,95	0,68	
4	9,47	29,98	1,14	Serin
5	10,90	4,27	0,18	Histidin
6	13,01	30,59	1,34	Glisin
7	13,67	23,65	1,17	
8	15,30	26,05	1,15	Arginin
9	17,28	30,05	1,58	Alanin
10	18,70	4,41	0,29	
11	19,26	11,97	0,75	Tirosin
12	25,88	4,89	0,34	Methionin
13	26,50	32,87	1,70	Valin
14	28,46	18,97	1,28	Phenilalanin
15	29,60	19,57	1,30	Ileusin
16	30,09	28,99	2,15	Leusin
17	34,64	6,77	0,61	Lisin

Gambar 2.6. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak setelah 72 jam fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama asam amino
1	2,08	70,87	6,25	Asam aspartat
2	3,54	73,48	6,16	Asam glutamat
3	4,25	12,79	0,69	
4	9,42	26,97	1,13	Serin
5	10,90	4,19	0,18	Histidin
6	13,01	31,59	1,35	Glisin
7	13,77	24,57	1,18	
8	15,35	24,05	1,18	Arginin
9	17,23	29,05	1,49	Alanin
10	18,63	4,53	0,27	
11	19,26	10,97	0,74	Tirosin
12	25,89	4,77	0,34	Methionin
13	26,56	35,89	1,72	Valin
14	28,47	17,99	1,29	Phenilalanin
15	29,59	18,77	1,39	Isoleusin
16	30,38	29,93	2,17	Leusin
17	34,67	6,97	0,65	Lisin

Gambar 2.7. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak setelah 96 jam fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama asam amino
1	2,04	71,87	6,55	Asam aspartat
2	3,50	70,55	6,03	Asam glutamat
3	4,21	12,87	0,68	
4	9,45	28,97	1,15	Serin
5	10,97	3,99	0,19	Histidin
6	13,01	29,59	1,45	Glisin
7	13,77	26,67	1,28	
8	15,35	19,03	1,19	Arginin
9	17,23	32,02	1,50	Alanin
10	18,63	4,47	0,28	
11	19,26	8,98	0,79	Tirosin
12	25,89	4,59	0,37	Methionin
13	26,56	33,89	1,80	Valin
14	28,47	15,87	1,30	Phenilalanin
15	29,59	18,77	1,40	Isoleusin
16	30,38	27,99	2,20	Leusin
17	34,67	6,78	0,63	Lisin

Gambar 2.8. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak setelah 120 jam fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,04	58,97	6,62	Asam aspartat
2	3,50	72,65	6,18	Asam glutamat
3	4,21	12,38	0,69	
4	9,45	30,97	1,16	Serin
5	10,97	4,15	0,18	Histidin
6	13,01	31,69	1,45	Glisin
7	13,77	26,75	1,25	
8	15,35	23,03	1,35	Arginin
9	17,23	30,72	1,58	Alanin
10	18,63	4,57	0,35	
11	19,26	9,19	0,79	Tirosin
12	25,89	4,79	0,38	Methionin
13	26,56	35,77	1,75	Valin
14	28,47	17,87	1,35	Phenilalanin
15	29,59	20,75	1,48	Isoleusin
16	30,38	31,97	2,28	Leusin
17	34,67	6,99	0,65	Lisin

Lampiran 2.3. Hasil analisis asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap

Gambar 2.9. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap diawal fermentasi

*** Laporan puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi Mm	Nama Asam amino
1	2,05	49,90	6,23	Asam aspartat
2	3,51	73,87	6,12	Asam glutamat
3	4,01	12,89	0,69	
4	9,48	26,79	1,13	Serin
5	10,97	3,97	0,17	Histidin
6	13,08	27,08	1,33	Glisin
7	13,75	23,66	1,15	
8	15,30	20,34	1,17	Arginin
9	17,05	25,76	1,56	Alanin
10	18,65	4,35	0,28	
11	19,07	10,99	0,73	Tirosin
12	25,86	3,70	0,38	Methionin
13	26,50	29,99	1,74	Valin
14	28,38	16,73	1,29	Phenilalanin
15	29,56	17,84	1,37	Ileusin
16	30,40	24,73	2,37	Leusin
17	34,67	6,49	0,64	Lisin

Gambar 2.10. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap setelah 72 jam fermentasi

*** Laporan Puncak ***

No. puncak	Waktu (menit)	Luas mm^2	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,04	72,907	6,25	Asam aspartat
2	3,50	71,876	6,13	Asam glutamat
3	4,21	12,782	0,69	
4	9,45	25,790	1,13	Serin
5	10,97	3,877	0,18	Histidin
6	13,01	29,085	1,35	Glisin
7	13,77	23,856	1,18	
8	15,35	19,342	1,18	Arginin
9	17,23	24,761	1,49	Alanin
10	18,63	4,465	0,29	
11	19,26	9,991	0,74	Tirosin
12	25,89	3,609	0,35	Methionin
13	26,56	32,993	1,80	Valin
14	28,47	15,732	1,39	Phenilalanin
15	29,59	16,845	1,48	Isoleusin
16	30,38	25,731	2,17	Leusin
17	34,67	6,597	0,63	Lisin

Gambar 2.11. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap setelah 96 fermentasi

*** Laporan Puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,05	73,91	6,58	Asam aspartat
2	3,50	69,87	6,09	Asam glutamat
3	4,21	12,28	6,79	
4	9,45	27,79	1,15	Serin
5	10,97	3,67	0,19	Histidin
6	13,01	27,08	1,41	Glisin
7	13,77	26,74	1,25	
8	15,35	17,34	1,24	Arginin
9	17,23	33,76	1,57	Alanin
10	18,63	4,47	0,28	
11	19,26	8,99	0,74	Tirosin
12	25,89	3,41	0,34	Methionin
13	26,56	30,97	1,73	Valin
14	28,47	13,75	1,29	Phenilalanin
15	29,59	15,85	1,41	Ileusin
16	30,38	23,71	2,18	Leusin
17	34,67	6,37	0,63	Lisin

Gambar 2.12. Kromatografi asam amino bebas biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap setelah 120 kam fermentasi

*** Laporan Puncak ***

No. Puncak	Waktu (menit)	Luas mm ²	Tinggi mm	Nama Asam amino
1	2,04	48,95	5,58	Asam aspartat
2	3,50	71,89	5,99	Asam glutamat
3	4,21	12,08	0,69	
4	9,45	29,89	1,08	Serin
5	10,97	3,89	0,18	Histidin
6	13,01	29,18	1,43	Glisin
7	13,77	26,59	1,19	
8	15,35	19,84	1,16	Arginin
9	17,23	31,87	1,68	Alanin
10	18,63	4,36	0,27	
11	19,26	9,18	0,75	Tirosin
12	25,89	3,65	0,39	Methionin
13	26,56	32,96	1,75	Valin
14	28,47	15,89	1,38	Phenilalanin
15	29,59	17,89	1,43	Isoleusin
16	30,38	25,78	2,20	Leusin
17	34,67	6,59	0,64	Lisin

Lampiran 2.4. Hasil analisis senyawa volatil biji kakao kering hasil perlakuan kontrol pasca sangrai

File : C:\msdchem\1\DATA\coklt\BSB\14121503.D
 Operator : [BSB5]
 Acquired : 14 DES 2015 13:34 using AcqMethod cocoa.M
 Instrument : GCMS
 Sample Name: TI
 Misc Info : extract at 60C 30mnt wth DVB/CAR/PDMS
 Vial Number: 1

Gambar 2.13. Kromatogram senyawa volatil pasca sangrai biji kakao kering hasil perlakuan kontrol

KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

LABORATORIUM FLAVOR

Jalan Raya 9 sukamandi, Subang (41256)

BALAI BESAR PENELITIAN TANAMAN PADI

Telepon : (0260) 520157

Faximile : (0260) 520158

Email : flavorlaboratory@yahoo.com

Sample	RT	Compound	CAS	Area	Conc (ppb)
II	3.4119	Acetic acid	64-19-7	288609	2.4775
	8.9604	1,3,5,7-Cyclooctatetraene	629-20-9	938096	8.0530
	9.2255	2-Heptanol	543-49-7	1253594	10.7614
	9.5407	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	123-32-0	546262	4.6894
	9.6859	Pyrazine, 2,3-dimethyl-	5910-89-4	152984	1.3133
	10.5319	Benzaldehyde	100-52-7	13841142	118.8185
	11.0419	Benzonitrile	100-47-0	523914	4.4975
	11.3583	Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	13360-64-0	79763	0.6847
	11.4298	Pyrazine, trimethyl-	14667-55-1	465341	3.9947
	12.0478	1-Methylene-2-vinylcyclopentane	6196-78-7	3624526	31.1145
	12.1978	Benzeneacetaldehyde	122-78-1	17104688	146.8342
	12.6683	1-Pentanol, 3-methyl-	589-35-5	903827	7.7589
	12.8407	Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	13360-65-1	136528	1.1720
	12.8424	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	15707-34-3	215335	1.8485
	12.9688	Pyrazine, tetramethyl-	1124-11-4	4881326	41.9035
	13.1742	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	78-70-6	4260788	36.5765
	13.2314	Nonanal	124-19-6	6662281	57.1920
	13.4581	Phenylethyl Alcohol	60-12-8	16601971	142.5187
	13.6476	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	7216-56-0	765669	6.5728
	14.1966	2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	17398-16-2	58778	0.5046
	14.7008	Octanoic acid, ethyl ester	106-32-1	1947051	16.7143
	14.7338	Dodecane	112-40-3	3108109	26.6814
	15.7964	Nonanoic acid	112-05-0	1027798	8.8231
	15.9251	Cinnamaldehyde, .beta.-methyl-	1196-67-4	1988584	17.0709
	16.2038	Tridecane	629-50-5	5498017	47.1974
	16.2622	Indole	120-72-9	59928	0.5144
	17.5674	Tetradecane	629-59-4	75029	0.6441
	18.5202	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, ethyl ester	103-36-6	63972	0.5492
	18.7422	Cyclohexanone, 4-methyl-	589-92-4	141354	1.2134
	19.6312	1H-2-Benzopyran-1-one, 3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-	17397-85-2	117030	1.0046

Lampiran 2.5. Hasil analisis senyawa volatil biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara serentak pasca sangrai

File :C:\msdchem\1\DATA\coklt\BSB\ 14121502.D
 Operator : [BSB4]
 Acquired : 14 DES 2015 12:25 using AcqMethod cocoa.M
 Instrument : GCMS
 Sample Name: 1A
 Misc Info : extract at 60C 30mnt wth DVB/CAR/PDMS
 Vial Number: 1

**KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN**

LABORATORIUM FLAVOR
Jalan Raya 9 sukamandi, Subang (41256)

BALAI BESAR PENELITIAN TANAMAN PADI
Telepon : (0260) 520157
Faximile : (0260) 520158
Email : flavorlaboratory@yahoo.com

Hasil Komponen Volatil Coklat

Sample	RT	Compound	CAS	Area	Conc (ppb)
IA	3.4614	Acetic acid	64-19-7	232524	1.6832
	3.9927	Butanal, 3-methyl-	590-86-3	86014	0.6226
	5.6249	1,3,5-Cycloheptatriene	544-25-2	72921	0.5279
	5.8611	Toluene	108-88-3	149582	1.0828
	7.2849	Pyrazine, methyl-	109-08-0	64345	0.4658
	7.4833	Furfural	98-01-1	413855	2.9958
	8.6533	Butanoic acid, 3-methyl-	503-74-2	1120427	8.1105
	8.8422	Butanoic acid, 2-methyl-	116-53-0	1954477	14.1480
	8.978	2-Heptanone	110-43-0	428911	3.1048
	9.3198	Propanal, 3-(methylthio)-	3268-49-3	302577	2.1903
	9.5831	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	123-32-0	205206	1.4854
	10.5329	Benzaldehyde	100-52-7	17715932	128.2419
	11.0389	Benzonitrile	100-47-0	471759	3.4150
	11.1504	.beta.-Myrcene	123-35-3	2620909	18.9722
	11.3565	Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	13360-64-0	98808	0.7153
	11.4515	Pyrazine, trimethyl-	14667-55-1	702750	5.0871
	11.6174	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	1003-29-8	120506	0.8723
	12.0442	Benzyl Alcohol	100-51-6	3106904	22.4902
	12.2024	Benzeneacetaldehyde	122-78-1	29101551	210.6600
	12.4019	Decane, 3,7-dimethyl-	17312-54-8	2198271	15.9128
	12.6027	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	1072-83-9	1229628	8.9010
	12.6552	Furaneol	3658-77-3	500656	3.6241
	12.6581	1-Pentanol, 3-methyl-	589-35-5	1260111	9.1217
	12.6617	Cyclopropane, octyl-	1472-09-9	1880329	13.6113
	12.8465	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	15707-34-3	294709	2.1333
	12.8465	Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-	13925-07-0	294709	2.1333
	12.9734	Pyrazine, tetramethyl-	1124-11-4	5141857	37.2208
	13.0041	cis-Linalool Oxide	5989-33-3	1841026	13.3268
	13.0159	2-Nonanone	821-55-6	6788649	49.1416
	13.18	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	78-70-6	4999009	36.1868
	13.2343	Nonanal	124-19-6	12779131	92.5054
	13.4746	Phenylethyl Alcohol	60-12-8	28356064	205.2636
	13.6475	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	7216-56-0	253654	1.8361
	14.1434	Cyclooctane, 1,4-dimethyl-, cis-	13151-99-0	144916	1.0490
	14.2013	2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	17398-16-2	73702	0.5335
	14.3654	Benzoic acid, ethyl ester	93-89-0	376717	2.7270
	14.5153	p-Menth-1-en-4-ol	562-74-3	178162	1.2897
	14.7024	Octanoic acid, ethyl ester	106-32-1	2750101	19.9074
	14.7337	Dodecane	112-40-3	4455391	32.2516
	14.8518	Decanal	112-31-2	445135	3.2222
	15.147	Ethanol, 2-phenoxy-	122-99-6	1117920	8.0924
	15.4776	Benzeneacetic acid, ethyl ester	101-97-3	562546	4.0722
	15.6547	Hexanoic acid, 2-phenylethyl ester	6290-37-5	528732	3.8274
	15.8141	Tridecanoic acid	638-53-9	1224089	8.8609

KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

LABORATORIUM FLAVOR

Jalan Raya 9 sukamandi, Subang (41256)

BALAI BESAR PENELITIAN TANAMAN PADI

Telepon : (0260) 520157

Faximile : (0260) 520158

Email : flavorlaboratory@yahoo.com

Sample	RT	Compound	CAS	Area	Conc (ppb)
	15.9268	Cinnamaldehyde, .beta.-methyl-	1196-67-4	3578775	25.9060
	15.9971	Decane	124-18-5	41025	0.2970
	16.0856	1-Tridecene	2437-56-1	131804	0.9541
	16.2037	Tridecane	629-50-5	10150474	73.4771
	16.2597	Indole	120-72-9	135943	0.9841
	16.6995	Sulfurous acid, pentyl tetradecyl ester	1000309-14-7	82704	0.5987
	16.8589	Tetratriacontyl heptafluorobutyrate	1000351-84-1	55491	0.4017
	17.1069	Eugenol	97-53-0	756935	5.4793
	17.3253	4-Methyl-2-phenyl-2-pentenal	26643-91-4	292173	2.1150
	17.5083	Decanoic acid, ethyl ester	110-38-3	622616	4.5070
	17.5673	Tetradecane	629-59-4	124811	0.9035
	17.8153	Acetylenic glycol	126-86-3	94444	0.6837
	18.0455	4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	118-65-0	75857	0.5491
	18.5278	Cinnamic acid, ethyl ester	103-36-6	74248	0.5375
	19.114	Butylated Hydroxytoluene	128-37-0	176843	1.2801
	19.2203	E-14-Hexadecenal	330207-53-9	9490	0.0687
	19.356	Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methylpropyl)-	52184-13-1	263959	1.9107
	19.6288	Mellein	17397-85-2	209318	1.5152
	19.9818	Dodecanoic acid, ethyl ester	106-33-2	680967	4.9294
	20.0939	Diethyl Phthalate	84-66-2	140211	1.0150
	20.8968	2-(p-Tolylmethyl)-p-xylene	721-45-9	23346	0.1690
	21.1211	Cadalene	483-78-3	743377	5.3811
	21.2923	Octanoic acid, 2-ethylhexyl ester	63321-70-0	331291	2.3981
	21.4812	Naphthalene, 1,2,3-trimethyl-4-propenyl-, (E)-	26137-53-1	248413	1.7982
	21.617	2,6-Diisopropyl-naphthalene	24157-81-1	382619	2.7697
	21.9417	1,1-Diphenylisobutylene	781-33-9	55804	0.4040
	22.1896	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	1620-98-0	262662	1.9014
	22.3726	Ethyl heptadecanoate	1000336-65-9	89692	0.6493
	22.9216	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxyacetophenone	14035-33-7	149832	1.0846
	23.4411	Caffeine	58-08-2	1640	0.0119
	23.6418	Isobutyl phthalate	84-69-5	1415226	10.2445
	24.2204	3,5-Bis(tert.-butyl)-4-hydroxy-propiofenon	14035-34-8	150974	1.0929
	25.3007	n-Hexadecanoic acid	57-10-3	3740250	27.0749
	30.5251	cis-Vaccenic acid	506-17-2	1479957	10.7131
	30.7022	Oleic Acid	112-80-1	65310	0.4728
	31.4047	Octadecanoic acid	57-11-4	194289	1.4064

Lampiran 2.6. Hasil analisis senyawa volatil biji kakao kering hasil perlakuan penambahan inokulum secara bertahap pasca sangrai

File :C:\msdchem\1\DATA\coklt\BSB\ 14121502.D
 Operator : [BSB6]
 Acquired : 14 DES 2015 13:25 using AcqMethod cocoa.M
 Instrument : GCMS
 Sample Name: IB
 Misc Info : extract at 60C 30mnt wth DVB/CAR/PDMS
 Vial Number: 1

KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

LABORATORIUM FLAVOR
Jalan Raya 9 sukamandi, Subang (41256)

BALAI BESAR PENELITIAN TANAMAN PADI
Telepon : (0260) 520157
Faximile : (0260) 520158
Email : flavorlaboratory@yahoo.com

Hasil Komponen Volatil Coklat

Sample	RT	Compound	CAS	Area	Conc (ppb)
IB	3.4614	Acetic acid	64-19-7	232524	1.6832
	3.9927	Butanal, 3-methyl-	590-86-3	86014	0.6226
	5.6249	1,3,5-Cycloheptatriene	544-25-2	72921	0.5279
	5.8611	Toluene	108-88-3	149582	1.0828
	7.2849	Pyrazine, methyl-	109-08-0	64345	0.4658
	7.4833	Furfural	98-01-1	413855	2.9958
	8.6533	Butanoic acid, 3-methyl-	503-74-2	1120427	8.1105
	8.8422	Butanoic acid, 2-methyl-	116-53-0	1954477	14.1480
	8.978	2-Heptanone	110-43-0	428911	3.1048
	9.3198	Propanal, 3-(methylthio)-	3268-49-3	302577	2.1903
	9.5831	Pyrazine, 2,5-dimethyl-	123-32-0	205206	1.4854
	10.5329	Benzaldehyde	100-52-7	17715932	128.2419
	11.0389	Benzonitrile	100-47-0	471759	3.4150
	11.1504	.beta.-Myrcene	123-35-3	2620909	18.9722
	11.3565	Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	13360-64-0	98808	0.7153
	11.4515	Pyrazine, trimethyl-	14667-55-1	702750	5.0871
	11.6174	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	1003-29-8	120506	0.8723
	12.0442	Benzyl Alcohol	100-51-6	3106904	22.4902
	12.2024	Benzeneacetaldehyde	122-78-1	29101551	210.6600
	12.4019	Decane, 3,7-dimethyl-	17312-54-8	2198271	15.9128
	12.6027	Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-	1072-83-9	1229628	8.9010
	12.6552	Furaneol	3658-77-3	500656	3.6241
	12.6581	1-Pentanol, 3-methyl-	589-35-5	1260111	9.1217
	12.6617	Cyclopropane, octyl-	1472-09-9	1880329	13.6113
	12.8465	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine	15707-34-3	294709	2.1333
	12.8465	Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl-	13925-07-0	294709	2.1333
	12.9734	Pyrazine, tetramethyl-	1124-11-4	5141857	37.2208
	13.0041	cis-Linalool Oxide	5989-33-3	1841026	13.3268
	13.0159	2-Nonanone	821-55-6	6788649	49.1416
	13.18	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	78-70-6	4999009	36.1868
	13.2343	Nonanal	124-19-6	12779131	92.5054
	13.4746	Phenylethyl Alcohol	60-12-8	28356064	205.2636
	13.6475	2,4,6-Octatriene, 2,6-dimethyl-, (E,Z)-	7216-56-0	253654	1.8361
	14.1434	Cyclooctane, 1,4-dimethyl-, cis-	13151-99-0	144916	1.0490
	14.2013	2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine	17398-16-2	73702	0.5335
	14.3654	Benzoic acid, ethyl ester	93-89-0	376717	2.7270
	14.5153	p-Menth-1-en-4-ol	562-74-3	178162	1.2897
	14.7024	Octanoic acid, ethyl ester	106-32-1	2750101	19.9074
	14.7337	Dodecane	112-40-3	4455391	32.2516
	14.8518	Decanal	112-31-2	445135	3.2222
	15.147	Ethanol, 2-phenoxy-	122-99-6	1117920	8.0924
	15.4776	Benzeneacetic acid, ethyl ester	101-97-3	562546	4.0722
	15.6547	Hexanoic acid, 2-phenylethyl ester	6290-37-5	528732	3.8274
	15.8141	Tridecanoic acid	638-53-9	1224089	8.8609

KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

LABORATORIUM FLAVOR
Jalan Raya 9 sukamandi, Subang (41256)

BALAI BESAR PENELITIAN TANAMAN PADI
Telepon : (0260) 520157
Faximile : (0260) 520158
Email : flavorlaboratory@yahoo.com

Sample	RT	Compound	CAS	Area	Conc (ppb)
	15.9268	Cinnamaldehyde, .beta.-methyl-	1196-67-4	3578775	25.9060
	15.9971	Decane	124-18-5	41025	0.2970
	16.0856	1-Tridecene	2437-56-1	131804	0.9541
	16.2037	Tridecane	629-50-5	10150474	73.4771
	16.2597	Indole	120-72-9	135943	0.9841
	16.6995	Sulfurous acid, pentyl tetradecyl ester	1000309-14-7	82704	0.5987
	16.8589	Tetratriacontyl heptafluorobutyrate	1000351-84-1	55491	0.4017
	17.1069	Eugenol	97-53-0	756935	5.4793
	17.3253	4-Methyl-2-phenyl-2-pentenal	26643-91-4	292173	2.1150
	17.5083	Decanoic acid, ethyl ester	110-38-3	622616	4.5070
	17.5673	Tetradecane	629-59-4	124811	0.9035
	17.8153	Acetylenic glycol	126-86-3	94444	0.6837
	18.0455	4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	118-65-0	75857	0.5491
	18.5278	Cinnamic acid, ethyl ester	103-36-6	74248	0.5375
	19.114	Butylated Hydroxytoluene	128-37-0	176843	1.2801
	19.2203	E-14-Hexadecenal	330207-53-9	9490	0.0687
	19.356	Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methylpropyl)-	52184-13-1	263959	1.9107
	19.6288	Mellein	17397-85-2	209318	1.5152
	19.9818	Dodecanoic acid, ethyl ester	106-33-2	680967	4.9294
	20.0939	Diethyl Phthalate	84-66-2	140211	1.0150
	20.8968	2-(p-Tolylmethyl)-p-xylene	721-45-9	23346	0.1690
	21.1211	Cadalene	483-78-3	743377	5.3811
	21.2923	Octanoic acid, 2-ethylhexyl ester	63321-70-0	331291	2.3981
	21.4812	Naphthalene, 1,2,3-trimethyl-4-propenyl-, (E)-	26137-53-1	248413	1.7982
	21.617	2,6-Diisopropyl-naphthalene	24157-81-1	382619	2.7697
	21.9417	1,1-Diphenylisobutylene	781-33-9	55804	0.4040
	22.1896	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	1620-98-0	262662	1.9014
	22.3726	Ethyl heptadecanoate	1000336-65-9	89692	0.6493
	22.9216	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxyacetophenone	14035-33-7	149832	1.0846
	23.4411	Caffeine	58-08-2	1640	0.0119
	23.6418	Isobutyl phthalate	84-69-5	1415226	10.2445
	24.2204	3,5-Bis(tert.-butyl)-4-hydroxy-propiofenon	14035-34-8	150974	1.0929
	25.3007	n-Hexadecanoic acid	57-10-3	3740250	27.0749
	30.5251	cis-Vaccenic acid	506-17-2	1479957	10.7131
	30.7022	Oleic Acid	112-80-1	65310	0.4728
	31.4047	Octadecanoic acid	57-11-4	194289	1.4064

Lampiran 2.7. Suhu fermentasi biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (°C)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	28,00	30,00	30,00	35,00	36,00	38,00	37,00	37,00	35,00	35,00	35,00
	28,00	30,00	30,00	35,00	36,00	38,00	37,00	37,00	35,00	35,00	35,00
	29,00	31,00	31,00	36,00	36,00	39,00	38,00	38,00	36,00	36,00	36,00
Rata -rata	28,33	30,33	30,33	35,33	36,00	38,33	37,33	37,33	35,33	35,33	35,33
Inokulum di awal	29,00	33,00	33,00	34,00	38,00	42,00	40,00	40,00	38,00	38,00	35,00
	29,00	32,00	34,00	34,00	38,00	42,00	40,00	41,00	39,00	39,00	36,00
	30,00	33,00	33,00	35,00	38,00	42,00	40,00	41,00	39,00	38,00	35,00
Rata -rata	29,33	32,67	33,33	34,33	38,00	42,00	40,00	40,67	38,67	38,33	35,33
Inokulum bertahap	29,50	33,50	34,00	35,00	39,00	45,00	51,00	48,00	47,00	39,00	39,00
	30,00	34,00	34,00	35,00	39,00	44,00	50,00	49,00	48,00	39,00	40,00
	29,00	34,00	35,00	36,00	40,00	46,00	52,00	50,00	47,00	40,00	39,00
Rata -rata	29,50	33,83	34,33	35,33	39,33	45,00	51,00	49,00	47,33	39,33	39,33

Lampiran 2.8 . pH biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	5,67	5,48	4,21	4,01	3,99	3,98	4,21	4,37	4,39	4,40	4,41
	5,66	5,48	4,21	4,01	3,99	3,98	4,21	4,37	4,33	4,40	4,40
	5,67	5,45	4,22	4,02	3,98	3,99	4,20	4,30	4,30	4,41	4,42
Rata -rata	5,67	5,47	4,21	4,01	3,99	3,98	4,21	4,35	4,34	4,40	4,41
Inokulum di awal	5,66	5,45	4,15	4,01	3,75	3,55	3,89	4,01	4,10	4,25	4,30
	5,67	5,44	4,15	4,02	3,76	3,56	3,87	4,03	4,11	4,26	4,31
	5,68	5,45	4,16	4,01	3,75	3,57	3,88	4,01	4,10	4,25	4,30
Rata -rata	5,67	5,45	4,15	4,01	3,75	3,56	3,88	4,02	4,10	4,25	4,30
Inokulum bertahap	5,67	5,40	4,00	3,99	3,65	3,49	3,79	3,89	4,05	4,10	4,20
	5,68	5,41	4,01	3,99	3,66	3,51	3,78	3,87	4,06	4,12	4,24
	5,66	5,39	4,01	3,98	3,66	3,50	3,80	3,89	4,07	4,13	4,23
Rata -rata	5,67	5,40	4,01	3,99	3,66	3,50	3,79	3,88	4,06	4,12	4,22

Lampiran 2.9. Polifenol biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (mg asam galat/g biji)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
kontrol	0,171	0,168	0,167	0,164	0,157	0,148	0,102	0,088	0,084	0,074	0,079
	0,172	0,168	0,167	0,165	0,156	0,148	0,102	0,088	0,084	0,074	0,079
	0,172	0,169	0,168	0,166	0,157	0,147	0,103	0,089	0,085	0,075	0,078
Rata -rata	0,172	0,168	0,167	0,165	0,157	0,148	0,102	0,088	0,084	0,074	0,079
Inokulum di awal	0,178	0,170	0,166	0,160	0,153	0,145	0,099	0,085	0,079	0,073	0,070
	0,177	0,171	0,167	0,161	0,153	0,145	0,098	0,086	0,078	0,074	0,071
	0,179	0,172	0,166	0,162	0,154	0,154	0,099	0,087	0,077	0,073	0,700
Rata -rata	0,178	0,171	0,166	0,161	0,153	0,148	0,099	0,086	0,078	0,073	0,280
Inokulum bertahap	0,175	0,172	0,158	0,154	0,147	0,138	0,092	0,078	0,074	0,065	0,069
	0,177	0,171	0,158	0,155	0,145	0,137	0,093	0,077	0,075	0,066	0,068
	0,176	0,172	0,159	0,154	0,146	0,138	0,091	0,078	0,074	0,067	0,067
Rata -rata	0,176	0,172	0,158	0,154	0,146	0,138	0,092	0,078	0,074	0,066	0,068

Lampiran 2.10. Kadar gula total biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	8,550	8,050	7,460	7,280	4,410	4,240	3,320	3,220	3,160	3,110	3,050
	8,550	8,050	7,460	7,280	4,420	4,240	3,320	3,220	3,160	3,110	3,050
	8,560	8,051	7,450	7,290	4,410	4,250	3,310	3,210	3,162	3,120	3,040
Rata -rata	8,553	8,050	7,457	7,283	4,413	4,243	3,317	3,217	3,161	3,113	3,047
Inokulum di awal	8,440	7,930	7,300	4,430	4,090	3,370	3,290	3,130	2,950	2,880	2,870
	8,440	7,930	7,310	4,430	4,090	3,370	3,290	3,130	2,960	2,880	2,870
	8,450	7,940	7,300	4,440	4,090	3,380	3,300	3,140	2,960	2,890	2,860
Rata -rata	8,443	7,933	7,303	4,433	4,090	3,373	3,293	3,133	2,957	2,883	2,867
Inokulum bertahap	8,720	8,510	7,330	4,450	4,270	3,390	3,290	3,110	2,960	2,870	2,820
	8,720	8,510	7,330	4,450	4,280	3,390	3,290	3,110	2,960	2,870	2,820
	8,740	8,520	7,340	4,460	4,290	3,400	3,300	3,120	2,970	2,860	2,840
Rata -rata	8,727	8,513	7,333	4,453	4,280	3,393	3,293	3,113	2,963	2,867	2,827

Lampiran 2.11. Kadar gula reduksi biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	3,490	6,440	11,45	11,300	10,590	11,270	11,300	11,100	10,870	10,690	10,530
	3,490	6,450	11,450	11,300	10,580	11,27	11,320	11,120	10,870	10,690	10,530
	3,500	6,440	11,440	11,320	10,580	11,280	11,330	11,130	10,880	10,700	10,540
Rata -rata	3,493	6,443	11,445	11,307	10,583	11,275	11,317	11,117	10,873	10,693	10,533
Inokulum di awal	3,650	6,540	11,550	11,400	10,680	11,370	11,400	11,200	10,970	10,790	10,630
	3,650	6,540	11,550	11,420	10,680	11,380	11,440	11,220	10,970	10,790	10,630
	3,660	6,530	11,560	11,400	10,670	11,370	11,420	11,200	10,980	10,790	10,630
Rata -rata	3,653	6,537	11,553	11,407	10,677	11,373	11,420	11,207	10,973	10,790	10,630
Inokulum bertahap	3,630	6,500	11,550	11,350	10,630	11,320	11,350	11,150	10,920	10,740	10,580
	3,630	6,500	11,550	11,340	10,640	11,330	11,350	11,150	10,920	10,740	10,580
	3,640	6,530	11,540	11,350	10,630	11,320	11,360	11,160	10,930	10,750	10,570
Rata -rata	3,633	6,510	11,547	11,347	10,633	11,323	11,353	11,153	10,923	10,743	10,577

Lampiran 2.12 . Indeks fermentasi biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	0,309	0,345	0,353	0,400	0,430	0,450	0,700	0,850	0,880	0,880	0,880
	0,308	0,344	0,353	0,410	0,430	0,450	0,710	0,850	0,880	0,880	0,880
	0,307	0,346	0,354	0,420	0,440	0,460	0,720	0,860	0,870	0,890	0,900
Rata -rata	0,308	0,345	0,353	0,410	0,433	0,453	0,710	0,853	0,877	0,883	0,887
Inokulum di awal	0,320	0,390	0,450	0,550	0,600	0,700	0,850	0,930	0,980	0,990	0,990
	0,320	0,400	0,450	0,550	0,600	0,710	0,850	0,930	0,980	0,980	0,990
	0,330	0,390	0,460	0,560	0,610	0,720	0,860	0,940	0,970	0,990	1,000
Rata -rata	0,323	0,393	0,453	0,553	0,603	0,710	0,853	0,933	0,977	0,987	0,993
Inokulum bertahap	0,330	0,400	0,500	0,600	0,650	0,800	1,000	1,020	1,025	1,030	1,030
	0,330	0,400	0,500	0,610	0,650	0,810	1,000	1,010	1,030	1,030	1,030
	0,340	0,410	0,520	0,600	0,660	0,820	1,020	1,030	1,030	1,030	1,030
Rata -rata	0,333	0,403	0,507	0,603	0,653	0,810	1,007	1,020	1,028	1,030	1,030

Lampiran 2.13. Konsentrasi etanol biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	0,000	4,350	4,830	3,570	2,630	1,550	1,020	0,720	0,450	0,430	0,400
	0,000	4,360	4,840	3,560	2,630	1,550	1,020	0,720	0,450	0,430	0,400
	0,000	4,360	4,830	3,570	2,640	1,560	1,030	0,730	0,460	0,440	0,420
Rata -rata	0,000	4,357	4,833	3,567	2,633	1,553	1,023	0,723	0,453	0,433	0,407
Inokulum di awal	0,000	4,850	5,230	3,540	3,020	1,720	1,350	0,570	0,350	0,340	0,330
	0,000	4,850	5,240	3,540	3,030	1,720	1,360	0,570	0,360	0,340	0,330
	0,000	4,860	5,230	3,550	3,02	1,730	1,350	0,580	0,350	0,350	0,340
Rata -rata	0,000	4,853	5,233	3,543	3,025	1,723	1,353	0,573	0,353	0,343	0,333
Inokulum bertahap	0,000	5,050	5,530	3,940	2,830	1,570	1,230	0,450	0,290	0,270	0,220
	0,000	5,050	5,540	3,940	2,850	1,570	1,230	0,450	0,290	0,270	0,230
	0,000	5,060	5,550	3,950	2,840	1,580	1,240	0,460	0,300	0,280	0,220
Rata -rata	0,000	5,053	5,540	3,943	2,840	1,573	1,233	0,453	0,293	0,273	0,223

Lampiran 2.14. Kosentrasi asam laktat biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	0,000	1,850	1,810	2,840	3,450	4,420	4,030	3,540	3,050	2,050	2,050
	0,000	1,860	1,810	2,840	3,450	4,420	4,030	3,540	3,050	2,050	2,030
	0,000	1,850	1,820	2,850	3,440	4,430	4,040	3,550	3,060	2,060	2,040
Rata -rata	0,000	1,853	1,813	2,843	3,447	4,423	4,033	3,543	3,053	2,053	2,040
Inokulum di awal	0,000	1,350	1,430	2,830	3,450	4,530	3,640	3,420	2,930	1,850	1,830
	0,000	1,350	1,430	2,830	3,450	4,530	3,640	3,440	2,930	1,850	1,830
	0,000	1,340	1,440	2,840	3,470	4,550	3,650	3,430	2,920	1,830	1,820
Rata -rata	0,000	1,347	1,433	2,833	3,457	4,537	3,643	3,430	2,927	1,843	1,827
Inokulum bertahap	0,000	1,430	1,550	3,020	3,670	4,830	3,830	3,640	2,550	1,730	1,700
	0,000	1,430	1,550	3,020	3,670	4,850	3,830	3,640	2,550	1,730	1,710
	0,000	1,440	1,560	3,030	3,660	4,830	3,840	3,650	2,540	1,740	1,720
Rata -rata	0,000	1,433	1,553	3,023	3,667	4,837	3,833	3,643	2,547	1,733	1,710

Lampiran 2.15. Kosentrasi asam asetat biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	0,000	1,250	1,530	2,030	2,350	2,470	3,460	4,150	4,930	5,930	5,930
	0,000	1,25	1,53	2,03	2,35	2,47	3,46	4,15	4,93	5,93	5,94
	0,000	1,260	1,540	2,040	2,360	2,480	3,470	4,160	4,920	5,940	5,950
Rata -rata	0,000	1,253	1,533	2,033	2,353	2,473	3,463	4,153	4,927	5,933	5,940
Inokulum di awal	0,000	1,720	1,840	1,970	2,050	2,250	3,540	4,560	5,240	6,300	6,300
	0,000	1,720	1,830	1,970	2,050	2,250	3,540	4,560	5,240	6,300	6,300
	0,000	1,730	1,840	1,980	2,050	2,260	3,550	4,570	5,250	6,400	6,350
Rata -rata	0,000	1,723	1,837	1,973	2,050	2,253	3,543	4,563	5,243	6,333	6,317
Inokulum bertahap	0,000	1,650	1,700	1,830	2,360	2,430	3,320	4,750	6,030	6,800	6,820
	0,000	1,650	1,700	1,840	2,370	2,430	3,320	4,750	6,030	6,800	6,830
	0,000	1,670	1,720	1,830	2,380	2,440	3,330	4,760	6,040	6,900	6,840
Rata -rata	0,000	1,657	1,707	1,833	2,370	2,433	3,323	4,753	6,033	6,833	6,830

Lampiran 2.16. Populasi *S. cereviciae* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi

Data *S. cereviciae* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (cfu/g)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	$3,6 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^7$	$5,6 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,03 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$	$5,6 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$
	$3,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7$	$5,7 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$	$7,01 \times 10^3$	$5,5 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$
	$3,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,04 \times 10^4$	$7,02 \times 10^3$	$5,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
Inokulum di awal	$1,9 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,6 \times 10^{12}$	$7,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$7,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$
	$1,9 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^{12}$	$7,5 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$4,7 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
	$2,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^{12}$	$7,65 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
Inokulum bertahap	$4,6 \times 10^8$	$7,58 \times 10^8$	$3,6 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^8$	$3,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
	$4,7 \times 10^8$	$7,6 \times 10^8$	$3,5 \times 10^{12}$	$1,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$2,13 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
	$4,6 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$	$3,6 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$7,4 \times 10^3$	$3,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$

Data *S. cereviciae* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi

log (cfu/g)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	5,55	5,64	7,2	5,75	5,88	4,86	4,23	4,01	3,84	3,75	3,54
	5,57	5,66	7,27	5,76	5,88	4,87	4,25	4,02	3,85	3,74	3,53
	5,53	5,65	7,25	5,74	5,87	4,86	4,2	4,02	3,85	3,73	3,55
Rata -rata	5,55	5,65	7,24	5,75	5,88	4,86	4,23	4,02	3,85	3,74	3,54
Inokulum di awal	8,27	8,54	12,41	6,88	6,89	5,86	4,08	3,23	2,66	2,5	2,51
	8,27	8,53	12,43	6,87	6,89	5,86	4,11	3,2	2,67	2,51	2,5
	8,3	8,54	12,39	6,88	6,88	5,85	4,08	3,25	2,65	2,49	2,5
Rata -rata	8,28	8,54	12,41	6,88	6,89	5,86	4,09	3,23	2,66	2,50	2,50
Inokulum bertahap	8,66	8,87	12,55	8,2	6,55	4,2	3,88	2,59	2,27	2,32	2,23
	8,67	8,88	12,54	8,17	6,54	4,17	3,87	2,57	2,27	2,33	2,2
	8,66	8,89	12,55	8,2	6,53	4,19	3,86	2,59	2,25	2,34	2,23
Rata -rata	8,66	8,88	12,55	8,19	6,54	4,19	3,87	2,58	2,26	2,33	2,22

Lampiran 2.17. Populasi *L.lactis* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi

Data *L. lactis* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penmbahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (cfu/g)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	$4,6 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$5,6 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
	$4,56 \times 10^6$	$5,12 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$5,5 \times 10^7$	$4,6 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$7,2 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
	$4,66 \times 10^6$	$5,10 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$5,7 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$7,0 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
Inokulum di awal	$3,9 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$6,8 \times 10^{11}$	$4,3 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^9$	$1,7 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
	$3,7 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$5,6 \times 10^8$	$6,5 \times 10^{11}$	$4,2 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
	$4,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$5,4 \times 10^8$	$6,6 \times 10^{11}$	$4,1 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
Inokulum bertahap	$4,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$3,6 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^{11}$	$4,6 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^9$	$2,6 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
	$4,4 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^{12}$	$1,8 \times 10^{11}$	$4,4 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^9$	$2,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
	$4,5 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$1,8 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^{12}$	$1,9 \times 10^{11}$	$4,3 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^9$	$2,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$

Data *L. lactis* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi log (cfu/g)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	6,66	6,7	6,7	7,75	8,65	8,55	8,41	5,86	5,79	5,51	5,39
	6,65	6,71	6,72	7,74	8,66	8,56	8,44	5,85	5,79	5,53	5,36
	6,67	6,7	6,69	7,76	8,68	8,54	8,43	5,84	5,77	5,5	5,38
Rata -rata	6,66	6,70	6,70	7,75	8,66	8,55	8,43	5,85	5,78	5,51	5,38
Inokulum di awal	8,59	8,50	8,38	8,74	11,83	10,63	9,07	8,23	7,66	6,50	6,36
	8,56	8,53	8,39	8,75	11,81	10,62	9,14	8,17	7,67	6,51	6,39
	8,60	8,54	8,41	8,73	11,82	10,61	9,11	8,15	7,68	7,53	6,41
Rata -rata	8,58	8,52	8,39	8,74	11,82	10,62	9,11	8,18	7,67	6,85	6,39
Inokulum bertahap	6,63	6,66	8,23	8,20	12,55	11,20	10,66	9,59	7,41	6,34	6,25
	6,64	6,68	8,20	8,17	12,54	11,25	10,64	9,56	7,39	6,32	6,20
	6,65	6,67	8,25	8,14	12,51	11,27	10,63	9,54	7,36	6,30	6,23
Rata -rata	6,64	6,67	8,23	8,17	12,53	11,24	10,64	9,56	7,39	6,32	6,23

Lampiran 2.18. Populasi *A. aceti* biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi

Data *A. aceti* biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (cfu/g)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	$4,6 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
	$4,4 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$5,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
	$4,5 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$5,3 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$
Inokulum di awal	$3,9 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$6,8 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
	$3,8 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$6,6 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^7$	$4,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
	$3,7 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^7$	$4,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
Inokulum bertahap	$4,6 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	$3,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^8$	$4,4 \times 10^{10}$	$1,3 \times 10^{12}$	$3,9 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
	$4,7 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$3,5 \times 10^6$	$5,4 \times 10^8$	$4,5 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{12}$	$3,8 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
	$4,8 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$5,5 \times 10^8$	$4,6 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{12}$	$3,7 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$

Data *A. aceti* biji kakao hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi log (cfu/g)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	4,66	4,7	6,7	6,66	6,55	6,2	6,08	5,51	5,36	4,54	4,39
	4,64	4,69	6,71	6,65	6,53	6,11	6,11	5,53	5,34	4,53	4,41
	4,65	4,69	6,72	6,63	6,54	6,15	6,15	5,52	5,3	4,55	4,43
Rata -rata	4,65	4,69	6,71	6,65	6,54	6,15	6,11	5,52	5,33	4,54	4,41
Inokulum di awal	8,59	8,47	8,34	8,72	8,83	8,62	10,04	7,2	5,65	5,5	5,34
	8,57	8,5	8,41	8,75	8,81	8,63	10,11	7,17	5,64	5,51	5,36
	8,56	8,53	8,38	8,74	8,82	8,64	10,07	7,23	5,66	5,49	5,32
Rata -rata	8,57	8,50	8,38	8,74	8,82	8,63	10,07	7,20	5,65	5,50	5,34
Inokulum bertahap	4,65	4,68	5,53	6,55	8,72	10,64	12,11	11,59	10,04	9,34	9,25
	4,67	4,69	5,54	6,54	8,73	10,65	12,14	11,57	10,11	9,38	9,23
	4,68	4,67	5,52	6,53	8,74	10,66	12,14	11,56	10,18	9,32	9,17
Rata -rata	4,67	4,68	5,53	6,54	8,73	10,65	12,13	11,57	10,11	9,35	9,22

Lampiran 2.19. Persentase warna *slaty* keping biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	65,01	55,00	50,01	50,11	45,26	40,10	35,11	30,01	25,30	25,10	20,50
	65,02	55,10	50,05	50,13	45,27	40,15	35,15	30,02	25,31	25,20	20,55
	64,49	55,15	50,06	50,14	45,28	40,17	35,12	30,04	25,32	25,30	20,53
Rata -rata	64,84	55,08	50,04	50,13	45,27	40,14	35,13	30,02	25,31	25,20	20,53
Inokulum di awal	65,01	40,12	30,08	25,10	23,09	20,08	15,09	10,09	10,10	5,11	0,00
	65,10	40,15	30,09	25,15	23,10	20,10	15,10	10,10	10,15	5,15	0,00
	65,05	40,14	30,10	25,20	23,15	20,09	15,15	10,08	10,17	5,19	0,00
Rata -rata	65,05	40,14	30,09	25,15	23,11	20,09	15,11	10,09	10,14	5,15	0,00
Inokulum bertahap	65,01	35,09	30,07	25,08	20,12	15,11	5,07	0,00	0,00	0,00	0,00
	67,00	35,10	30,08	25,09	20,14	15,15	5,09	0,00	0,00	0,00	0,00
	63,00	35,15	30,09	25,10	20,15	15,16	5,08	0,00	0,00	0,00	0,00
Rata -rata	65,00	35,11	30,08	25,09	20,14	15,14	5,08	0,00	0,00	0,00	0,00

Lampiran 2.20. Persentase warna ungu keping biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	30,09	35,16	40,11	35,13	33,20	30,03	26,30	20,03	15,03	10,06	5,03
	30,10	35,18	40,15	35,16	33,25	30,03	26,40	20,04	15,04	10,05	5,04
	30,13	35,19	40,16	35,15	33,26	30,04	26,50	20,05	15,02	10,04	5,02
Rata -rata	30,11	35,18	40,14	35,15	33,24	30,03	26,40	20,04	15,03	10,05	5,03
Inokulum di awal	30,10	40,09	35,06	31,06	25,09	20,04	15,04	10,07	6,01	5,10	4,97
	30,15	40,10	35,07	31,07	25,08	20,05	15,03	10,08	6,02	5,15	4,98
	30,16	40,12	35,08	31,05	25,10	20,03	15,02	10,09	6,03	5,20	4,99
Rata -rata	30,14	40,10	35,07	31,06	25,09	20,04	15,03	10,08	6,02	5,15	4,98
Inokulum bertahap	30,09	40,07	25,10	30,09	23,40	15,13	10,12	9,43	5,06	3,06	3,01
	30,08	40,08	25,15	30,10	23,45	15,14	10,15	9,44	5,07	3,07	3,02
	30,10	40,09	25,20	30,15	23,50	15,15	10,14	9,45	5,08	3,08	3,03
Rata -rata	30,09	40,08	25,15	30,11	23,45	15,14	10,14	9,44	5,07	3,07	3,02

Lampiran 2.21. Persentase warna coklat keping biji kakao kering hasil perlakuan kontrol, penambahan inokulum secara serentak (IA) dan bertahap (IB) selama fermentasi (%)

Perlakuan	Lama fermentasi (jam)										
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Kontrol	5,01	10,02	10,03	15,01	25,01	30,02	35,01	50,01	60,01	65,02	70,01
	5,03	10,01	10,04	15,03	24,99	30,03	35,03	49,99	60,02	65,01	69,99
	5,02	10,03	10,02	15,04	25,02	30,04	34,99	50,02	60,03	65,00	70,02
Rata -rata	5,02	10,02	10,03	15,03	25,01	30,03	35,01	50,01	60,02	65,01	70,01
Inokulum di awal	5,02	20,03	45,01	45,20	52,01	65,02	75,03	80,02	85,03	90,03	95,03
	5,01	20,04	45,02	45,15	51,98	65,01	75,02	80,03	85,01	90,05	95,01
	5,04	20,05	44,99	45,25	52,02	65,03	75,04	80,10	85,04	90,02	95,04
Rata -rata	5,02	20,04	45,01	45,20	52,00	65,02	75,03	80,05	85,03	90,03	95,03
Inokulum bertahap	5,03	25,01	35,01	44,01	55,01	65,01	80,02	90,01	5,01	97,01	96,98
	5,01	25,02	34,98	44,04	55,02	65,04	80,01	89,97	5,07	96,99	97,01
	4,98	24,99	35,03	43,99	55,03	64,99	79,99	90,04	5,08	97,02	97,03
Rata -rata	5,01	25,01	35,01	44,01	55,02	65,01	80,01	90,01	5,05	97,01	97,01

Lampiran 2.22. Hasil analisis statistik pengaruh perlakuan kontrol, IA dan IB terhadap suhu, ph, konsentrasi etanol, asam laktat, asam asetat, polifenol, populasi *S.cereviciae*, *L.lactis*, *A. aceti*, indeks fermentasi, warna slaty, ungu kecoklatan dan coklat. kadar gula total dan kadar gula reduksi

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for		Minimum	Maximum
						Mean			
						Lower Bound	Upper Bound		
Suhu	Kontrol	11	34,67	0,34	0,01	32,42	36,91	28,33	38,33
	(IA)	11	36,66	0,94	0,18	34,01	39,31	29,33	41,67
	(IB)	11	40,45	0,06	0,13	35,70	45,19	29,33	51,33
	Total	33	37,26	0,46	0,95	35,32	39,20	28,33	51,33
pH	Kontrol	11	4,45	0,57	0,17	4,07	4,84	3,98	5,67
	(IA)	11	4,28	0,66	0,21	3,83	4,73	3,56	5,67
	(IB)	11	4,20	0,68	0,21	3,74	4,67	3,50	5,67
	Total	33	4,31	0,63	0,11	4,09	4,54	3,50	5,67
Asam laktat	Kontrol	11	2,64	0,25	0,37	1,80	3,48	,00	4,42
	(IA)	11	2,47	0,30	0,39	1,60	3,35	,00	4,54
	(IB)	11	2,54	0,40	0,42	1,60	3,48	,00	4,84
	Total	33	2,55	0,28	0,22	2,10	3,01	,00	4,84
Asam asetat	Kontrol	11	3,09	0,95	0,59	1,78	4,41	,00	5,94
	(IA)	11	3,25	0,08	0,63	1,85	4,66	,00	6,33
	(IB)	11	3,43	0,32	0,70	1,86	4,99	,00	6,83
	Total	33	3,26	0,06	0,35	2,52	3,99	,00	6,83

Lanjutan lampiran 2.22

Etanol	Kontrol	11	1,81	0,73	0,52	0,64	2,98	0,00	4,83
	(IA)	11	1,93	0,91	0,57	0,65	3,22	0,00	5,23
	(IB)	11	1,94	0,06	0,62	0,56	3,33	0,00	5,54
	Total	33	1,90	0,85	0,32	1,24	2,55	0,00	5,54
Indeks warna	Kontrol	11	0,58	0,24	0,07	0,42	0,75	0,31	0,88
	(IA)	11	0,70	0,25	0,07	0,53	0,87	0,32	0,99
	(IB)	11	0,76	0,27	0,08	0,57	0,94	0,33	1,03
	Total	33	0,69	0,26	0,04	0,59	0,77	0,31	1,03
Gulatotal	Kontrol	11	5,07	0,25	0,67	3,56	6,59	3,05	8,55
	(IA)	11	4,60	0,17	0,65	3,14	6,07	2,87	8,44
	(IB)	11	4,70	0,32	0,70	3,14	6,26	2,83	8,73
	Total	33	4,79	0,19	0,38	4,01	5,57	2,83	8,73
Gula reduksi	Kontrol	11	9,91	0,55	0,76	8,20	11,63	3,49	11,45
	(IA)	11	10,02	0,53	0,76	8,31	11,72	3,65	11,55
	(IB)	11	9,97	0,52	0,76	8,27	11,67	3,63	11,55
	Total	33	9,97	0,46	0,43	9,09	10,84	3,49	11,55
Poliphenol	Kontrol	11	0,12	0,04	0,01	0,09	0,15	0,07	0,17
	(IA)	11	0,14	0,06	0,02	0,10	0,18	0,07	0,28
	(IB)	11	0,12	0,04	0,01	0,09	0,15	0,07	0,18
	Total	33	0,13	0,05	0,01	0,11	0,14	0,07	0,28

<i>S.cereviciae</i>	Kontrol	11	4,93	0,17	0,35	4,15	5,72	3,54	7,24
	(IA)	11	5,80	0,17	0,95	3,66	7,93	2,50	12,41
	(IB)	11	5,66	0,51	0,05	3,30	8,02	2,22	12,55
	Total	33	5,46	0,75	0,47	4,49	6,44	2,22	12,55
<i>L.lactis</i>	Kontrol	11	6,90	0,24	0,37	6,06	7,74	5,38	8,66
	(IA)	11	8,62	0,54	0,46	7,58	9,66	6,39	11,82
	(IB)	11	8,51	0,18	0,65	7,04	9,97	6,23	12,53
	Total	33	8,01	0,83	0,31	7,36	8,66	5,38	12,53
<i>A.acetti</i>	Kontrol	11	5,57	0,90	0,27	4,96	6,17	4,41	6,71
	(IA)	11	7,76	0,59	0,48	6,69	8,83	5,34	10,07
	(IB)	11	8,47	0,70	0,81	6,65	10,28	4,67	12,13
	Total	33	7,26	0,21	0,38	6,48	8,05	4,41	12,13
Slaty	Kontrol	11	40,15	0,18	0,27	30,62	49,68	20,53	64,84
	(IA)	11	22,19	0,33	0,52	9,87	34,50	0,00	65,05
	(IB)	11	17,78	0,42	0,15	4,06	31,50	0,00	65,00
	Total	33	26,71	0,87	0,45	19,66	33,75	0,00	65,05
Ungukecoklata n	Kontrol	11	25,49	0,41	0,43	17,82	33,15	5,03	40,14
	(IA)	11	20,25	0,83	0,86	11,63	28,87	4,98	40,10
	(IB)	11	17,70	0,71	0,83	9,16	26,25	3,02	40,08
	Total	33	21,14	0,38	0,15	16,75	25,54	3,02	40,14

coklat	Kontrol	11	34,10	0,74	0,15	18,15	50,06	5,02	70,01
	(IA)	11	59,76	0,21	0,80	40,14	79,39	5,02	95,03
	(IB)	11	54,37	0,48	0,39	31,21	77,54	5,01	97,01
	Total	33	49,41	0,66	0,33	38,54	60,29	5,01	97,01

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Suhu	Between Groups	190,02	2	95,01	3,71	0,03
	Within Groups	766,04	30	25,53		
	Total	956,07	32			
pH	Between Groups	0,35	2	0,17	0,43	0,65
	Within Groups	12,50	30	0,47		
	Total	12,86	32			
Asam laktat	Between Groups	0,15	2	0,07	0,04	0,95
	Within Groups	52,56	30	1,75		
	Total	52,71	32			
Asam asetat	Between Groups	0,62	2	0,31	0,06	0,93
	Within Groups	136,17	30	4,53		
	Total	136,74	32			
Etanol	Between Groups	0,12	2	0,09	0,02	0,98
	Within Groups	109,51	30	3,65		
	Total	109,63	32			

Lanjutan tabel Anova

Indeks warna	Between Groups	0,17	2	0,08	1,26	0,29
	Within Groups	2,02	30	0,06		
	Total	2,20	32			
Gula total	Between Groups	1,35	2	0,67	0,13	0,87
	Within Groups	152,27	30	5,07		
	Total	153,63	32			
Gula reduksi	Between Groups	0,06	2	0,03	0,005	0,99
	Within Groups	193,62	30	6,45		
	Total	193,68	32			
Poliphenol	Between Groups	0,01	2	0,002	0,72	0,49
	Within Groups	0,07	30	0,002		
	Total	0,07	32			
<i>S.cerevicia</i>	Between Groups	4,74	2	2,37	0,29	0,74
	Within Groups	237,87	30	7,92		
	Total	242,62	32			
<i>L.lactis</i>	Between Groups	20,31	2	10,15	3,50	0,04
	Within Groups	86,95	30	2,89		
	Total	107,27	32			
<i>A.acetti</i>	Between Groups	50,23	2	25,11	7,06	0,003
	Within Groups	106,64	30	3,55		
	Total	156,87	32			

Lanjutan tabel Anova

Slaty	Between Groups	3088,63	2	1544,31	4,85	0,015
	Within Groups	9545,85	30	318,19		
	Total	12634,48	32			
Ungukecoklatan	Between Groups	346,68	2	173,34	1,13	0,334
	Within Groups	4564,88	30	152,16		
	Total	4911,57	32			
Coklat	Between Groups	4027,22	2	2013,61	2,31	0,11
	Within Groups	26064,34	30	868,81		
	Total	30091,56	32			

LSD Test (Post Hoc Test : Multi comparisons)

Dependent Variable				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
Suhu	LSD	kontrol	(IA)	-1,99	0,15	0,36	-6,39	2,40
			(IB)	-5,78	0,15	0,01	-10,18	-1,38
		(IA)	kontrol	1,99	0,15	0,36	-2,40	6,39
			(IB)	-3,78	0,15	0,08	-8,18	,612
		(IB)	kontrol	5,78	0,15	0,01	1,38	10,18
			(IA)	3,78	0,15	0,08	-0,61	8,18
pH	LSD	kontrol	(IA)	0,17	0,27	0,53	-0,38	0,73
			(IB)	0,24	0,27	0,37	-0,31	0,83
		(IA)	kontrol	-0,17	0,27	0,53	-0,73	0,38
			(IB)	0,07	0,27	0,78	-0,48	0,63
		(IB)	kontrol	-0,24	0,27	0,37	-0,81	0,31
			(IA)	-0,07	0,27	0,78	-0,63	0,48
Asam laktat	LSD	kontrol	(IA)	0,16	0,56	0,77	-0,98	1,31
			IB)	0,10	0,56	0,85	-1,05	1,25
		(IA)	kontrol	0,10	0,56	0,85	-1,05	1,25
			(IB)	-0,17	0,56	0,77	-1,31	0,98
		(IB)	kontrol	-0,06	0,56	0,91	-1,21	1,08
			(IA)	-0,10	0,56	0,85	-1,25	1,05

Lanjutan tabel LSD

Asam asetat	LSD	kontrol	(IA)	-0,16	0,90	0,86	-2,01	1,69
				-0,33	0,90	0,71	-2,19	1,51
			(IB)	0,16	0,90	0,86	-1,69	2,01
		(IA)	kontrol	-0,17	0,90	0,84	-2,03	1,67
			(IB)	0,33	0,90	0,71	-1,51	2,19
		(IB)	kontrol	0,17	0,90	0,84	-1,67	2,03
			(IA)	-0,16	0,90	0,86	-2,01	1,69
Etanol	LSD	kontrol	(IA)	-0,12	0,81	0,88	-1,78	1,54
			(IB)	-0,13	0,81	0,87	-1,79	1,53
		(IA)	kontrol	0,12	0,81	0,88	-1,54	1,78
			(IB)	-0,008	0,81	0,99	-1,67	1,65
		(IB)	kontrol	0,13	0,81	0,87	-1,53	1,79
			(IA)	0,008	0,81	0,99	-1,65	1,67
Indeks warna	LSD	kontrol	(IA)	-0,11	0,11	0,30	-0,34	0,11
			(IB)	-0,17	0,11	0,12	-0,39	0,05
		(IA)	kontrol	0,11	0,11	0,30	-0,11	0,34
			(IB)	-0,05	0,11	0,60	-0,28	0,16
		(IB)	kontrol	0,17	0,11	0,12	-0,05	0,39
			(IA)	0,05	0,11	0,60	-0,16	0,28

Gula total	LSD	kontrol	(IA)	0,46	0,96	0,62	-1,49	2,43
			(IB)	0,37	0,96	0,70	-1,58	2,33
		(IA)	kontrol	-0,46	0,96	0,62	-2,43	1,49
			(IB)	-0,09	0,96	0,92	-2,05	1,86
		(IB)	kontrol	-0,37	0,96	0,70	-2,33	1,58
			(IA)	0,09	0,96	0,92	-1,86	2,05
Gula reduksi	LSD	kontrol	(IA)	-0,10	0,08	0,92	-2,31	2,10
			(IB)	-0,05	0,08	0,95	-2,27	2,15
		(IA)	kontrol	0,10	0,08	0,92	-2,10	2,31
			(IB)	0,04	0,08	0,96	-2,16	2,25
		(IB)	kontrol	0,05	0,08	0,95	-2,15	2,27
			(IA)	-0,04	0,08	0,96	-2,25	2,16
Poliphenol	LSD	kontrol	(IA)	-0,01	0,02	0,42	-,060	0,02
			(IB)	0,01	0,02	0,72	-,035	0,05
		(IA)	kontrol	0,02	0,02	0,42	-,025	0,06
			(IB)	0,02	0,02	0,25	-,018	0,06
		(IB)	kontrol	-0,01	0,02	0,72	-,050	0,03
			(IA)	-0,02	0,02	0,25	-,067	0,02

<i>S.cerevicia</i>	LSD	kontrol	(IA)	-0,86	0,20	0,47	-3,31	1,58
			(IB)	-0,72	0,20	0,55	-3,17	1,72
		(IA)	kontrol	0,86	0,20	0,47	-1,58	3,31
			(IB)	0,14	0,20	0,90	-2,30	2,59
		(IB)	kontrol	0,72	0,20	0,55	-1,72	3,17
			(IA)	-0,14	0,20	0,90	-2,59	2,30
<i>L.lactis</i>	LSD	kontrol	(IA)	-1,71	0,72	0,02	-3,20	-0,23
			(IB)	-1,60	0,72	0,03	-3,08	-0,12
		(IA)	kontrol	1,71	0,72	0,02	0,23	3,20
			(IB)	0,11	0,72	0,87	-1,36	1,59
		(IB)	kontrol	1,60	0,72	0,03	0,12	3,08
			(IA)	-0,11	0,72	0,87	-1,59	1,36
<i>A.acetti</i>	LSD	kontrol	(IA)	-2,19	0,80	0,01	-3,83	-0,54
			(IB)	-2,89	0,80	0,001	-4,54	-1,25
		(IA)	kontrol	2,19	0,80	0,01	0,54	3,83
			(IB)	-0,70	0,80	0,38	-2,34	0,93
		(IB)	kontrol	2,89	0,80	0,001	1,25	4,54
			(IA)	0,70	0,80	0,38	-0,93	2,34

Slaty	LSD	kontrol	(IA)	17,96	0,60	0,02	2,42	33,49
			(IB)	22,36	0,60	0,00	6,83	37,90
		(IA)	kontrol	-17,96	0,60	0,02	-33,49	-2,42
			(IB)	4,40	0,60	0,56	-11,12	19,94
		(IB)	kontrol	-22,36	0,60	0,00	-37,90	-6,83
			(IA)	-4,40	0,60	0,56	-19,94	11,12
ungukecoklatan	LSD	kontrol	(IA)	5,24	0,25	0,32	-5,50	15,98
			(IB)	7,78	0,25	0,14	-2,95	18,52
		(IA)	kontrol	-5,24	0,25	0,32	-15,98	5,50
			(IB)	2,54	0,25	0,63	-8,19	13,28
		(IB)	kontrol	-7,78	0,25	0,14	-18,52	2,95
			(IA)	-2,54	0,25	0,63	-13,28	8,19
coklat	LSD	kontrol	(IA)	-25,66	0,56	0,05	-51,32	0,01
			(IB)	-20,26	0,56	0,11	-45,93	5,39
		(IA)	kontrol	25,66	0,56	0,05	-,008	51,32
			(IB)	5,39	0,56	0,67	-20,27	31,05
		(IB)	kontrol	20,26	0,56	0,11	-5,39	45,93
			(IA)	-5,39	0,56	0,67	-31,05	20,27

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 2.23. Hasil analisis statistik pengaruh perlakuan kontrol, IA dan IB terhadap asam amino hidrofobik

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Alanin	Kontrol	4	1,52	0,21	0,10	1,18	1,85	1,32	1,75
	IA	4	1,59	0,05	0,02	1,50	1,68	1,53	1,66
	IB	4	1,59	0,04	0,02	1,53	1,66	1,55	1,65
	Total	12	1,57	0,12	0,03	1,49	1,64	1,32	1,75
Valin	Kontrol	4	0,89	0,06	0,03	0,79	1,01	0,82	0,95
	IA	4	1,01	0,06	0,03	0,91	1,11	,094	1,07
	IB	4	1,15	0,06	0,03	1,04	1,255	1,08	1,22
	Total	12	1,02	0,12	0,03	0,94	1,09	0,82	1,22
Phenilalanin	Kontrol	4	1,16	0,09	0,04	1,01	1,31	1,03	1,26
	IA	4	1,33	0,09	0,04	1,18	1,47	1,20	1,42
	IB	4	1,43	0,10	0,05	1,26	1,60	1,31	1,53
	Total	12	1,30	0,14	0,04	1,21	1,40	1,03	1,53
Isoleusin	Kontrol	4	0,88	0,04	0,02	0,80	0,96	0,82	0,92
	IA	4	1,01	0,05	0,02	0,92	1,08	0,96	1,07
	IB	4	1,02	0,02	0,01	0,98	1,06	1,01	1,06
	Total	12	0,97	0,07	0,02	0,92	1,02	0,82	1,07

Lanjutan lampiran 2.23

Leusin	Kontrol	4	1,4268	,06073	,03037	1,3301	1,5234	1,35	1,48
	IA	4	1,7025	,09691	,04845	1,5483	1,8567	1,60	1,83
	IB	4	1,8750	,09334	,04667	1,7265	2,0235	1,76	1,99
	Total	12	1,6681	,20766	,05995	1,5361	1,8000	1,35	1,99
Tirosin	Kontrol	4	1,3185	,73010	,36505	,1567	2,4803	,69	2,24
	IA	4	,7132	,11651	,05826	,5278	,8987	,61	,85
	IB	4	,7308	,10348	,05174	,5661	,8954	,65	,88
	Total	12	,9208	,48817	,14092	,6107	1,2310	,61	2,24
Methionin	Kontrol	4	,6408	,01072	,00536	,6237	,6578	,63	,65
	IA	4	,7132	,00974	,00487	,6977	,7288	,70	,72
	IB	4	,7300	,00572	,00286	,7209	,7391	,72	,74
	Total	12	,6947	,04126	,01191	,6684	,7209	,63	,74

ANOVA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Alanin	Between Groups	,014	2	,007	,427	,665
	Within Groups	,148	9	,016		
	Total	,162	11			
Valin	Between Groups	,130	2	,065	16,184	,001
	Within Groups	,036	9	,004		
	Total	,166	11			
Phenilalanin	Between Groups	,148	2	,074	7,587	,012
	Within Groups	,088	9	,010		
	Total	,237	11			
Isoleusin	Between Groups	,047	2	,023	11,878	,003
	Within Groups	,018	9	,002		
	Total	,065	11			
Leusin	Between Groups	,409	2	,204	28,150	,000
	Within Groups	,065	9	,007		
	Total	,474	11			
Tirosin	Between Groups	,949	2	,475	2,555	,132
	Within Groups	1,672	9	,186		
	Total	2,621	11			
Methionin	Between Groups	,018	2	,009	111,360	,000
	Within Groups	,001	9	,000		
	Total	,019	11			

Lanjutan lampiran 2.23.

LSD Test (Post Hoc Test : Multi comparisons)

Multiple Comparisons								
Dependent Variable (I) Perlakuan (J) Perlakuan				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
Alanin LSD	Kontrol	IA	-0,07	0,09	0,45	-0,27	0,13	
		IB	-0,073	0,09	0,43	-0,27	0,13	
	IA	Kontrol	0,071	0,09	0,45	-0,13	0,27	
		IB	-0,002	0,09	0,98	-0,20	0,20	
	IA	Kontrol	0,073	0,09	0,43	-0,13	0,27	
		IB	0,002	0,09	0,98	-0,20	0,20	
Valin LSD	Kontrol	IA	-0,11	0,04	0,02	-0,21	-0,01	
		IB	-0,25	0,04	0,00	-0,35	-0,15	
	IA	Kontrol	0,11	0,04	0,02	0,01	0,21	
		IB	-0,13	0,04	0,01	-0,23	-0,03	
	IA	Kontrol	0,25	0,04	0,00	0,15	0,35	
		IA	0,13	0,04	0,01	0,03	0,23	

Phenilalanin	LSD	Kontrol	IA	-0,16	0,06	0,04	-0,32	-0,008
			IB	-0,27	0,06	0,004	-0,42	-0,11
		IA	Kontrol	0,16	0,06	0,04	0,009	0,32
			IB	-0,10	0,06	0,17	-0,26	0,055
		IB	Kontrol	0,27	0,06	0,004	0,11	0,42
			IA	0,10	0,06	0,17	-0,05	0,26
Isoleusin	LSD	Kontrol	IA	-0,12	0,03	0,004	-0,19	-0,049
			IB	-0,14	0,03	0,001	-0,21	-0,07
		IA	Kontrol	0,12	0,03	0,004	0,04	0,19
			IB	-0,02	0,03	0,52	-0,09	0,05
		IB	Kontrol	0,14	0,03	0,001	0,07	0,21
			IA	0,02	0,03	0,52	-0,05	0,09
Leusin	LSD	Kontrol	IA	-0,27	0,06	0,001	-0,41	-0,13
			IB	-0,44	0,06	0,000	-0,58	-0,31
		IA	Kontrol	0,27	0,06	0,001	0,13	0,41
			IB	-0,17	0,06	0,02	-0,30	-0,03
		IB	Kontrol	0,44	0,06	0,000	0,31	0,58
			IA	0,17	0,06	0,02	0,03	0,30

Tirosin	LSD	Kontrol	IA	0,60	0,30	0,07	-0,08	1,29
			IB	0,58	0,30	0,08	-0,10	1,27
		IA	Kontrol	-0,60	0,30	0,07	-1,29	0,08
			IB	-0,02	0,30	0,95	-0,70	0,67
		IB	Kontrol	-0,58	0,30	0,08	-1,27	0,10
			IA	0,02	0,30	0,95	-0,67	0,70
Methionin	LSD	Kontrol	IA	-0,07	0,006	0,00	-0,08	-0,05
			IB	-0,08	0,006	0,00	-0,10	-0,07
		IA	Kontrol	0,07	0,006	0,00	0,05	0,08
			IB	-0,01	0,006	0,02	-0,03	-0,002
		IB	Kontrol	0,08	0,006	0,00	0,07	0,10
			IA	0,01	0,006	0,02	0,002	0,03

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ASIAN JOURNAL OF DAIRY AND FOOD RESEARCH

Vol. 35, No. 2

NAAS Rating 3.88

June, 2016

CONTENTS

Page No.

DAIRY SCIENCE

High pressure processing technology in dairy processing: A review

V. Dhineshkumar, D. Ramasamy and M. Siddharth.....87

Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review

Alok Kumar Yadav, Jitendra Singh and Shiv Kumar Yadav.....96

Influence of Modified Atmosphere Packaging (MAP) on textural properties of Mozzarella cheese during refrigeration storage

Tanweer Alam, N.C Saha, Aastha Bhardwaj and G.K. Goyal.....103

FOOD SCIENCE

Physicochemical changes in GRAS coated and gamma radiated water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxburg) during ambient storage in different storage structures

Nazia Hussain, S.S. Shukla, Brijlata Dubey and MD. Aziz Ahmed.....111

Effect of pectin coating on colour and quality of dehydrated pineapple during storage

C.S. Saini and H.K. Sharma.....120

Effect of vegetables gums on proximate, functional, optical and sensory attributes of catfish nuggets during chilled storage

P.C. Sarkar, Upali Sahu, P.K. Binsi and Natasha Nayak.....130

Effect of autoclaving and cooling on resistant starch formation in rice starch

Lilia-Baby, K.T. Suman, S. Krishnan and V. Indira.....137

Effect of incorporation of *Paneer* whey on dough characteristics and organoleptic attributes of milk bread

Aditi Kakan, Sudhakar Changade and Santosh Chopde.....143

Nutritional status of university faculty as influenced by the nutrient intake

Ramandeep Kaur and Sonika Sharma.....149

Study of inhibition of browning of clarified banana juice

A.R. Tapre and R.K. Jain.....155

Study on effect of fermentation to the quality parameter of cocoa bean in Indonesia	
Mulono Apriyanto, Sutardi, Supriyanto and Eni Harmayani.....	160
Influence of storage temperatures on the protein content of french beans (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	
Ex, Manpreet Kaur, Satish Kumar Gupta, T.C. Mittal and S.R. Sharma.....	164
Quality assessment of mustard oil in deep fat frying	
Prakash Kumar Nayak, Uma Dash and Kalpana Rayaguru.....	168
Formulation of osmo- dehydrated cashew apple (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	
C. Mini and S.S. Archana.....	172
 Esteemed reviewers of this issue.....	 175
Author index of this issue.....	175
Key words index of this issue.....	176

ASIAN JOURNAL OF DAIRY AND FOOD RESEARCH

Editorial Board

Chief Editor

G.S. Rajorhia, Ex. Professor
National Dairy Research Institute., Karnal

Associate Chief Editor

Tanweer Alam, Joint Director,
Indian Instt. of Packaging, New Delhi.

Editor

M.P. Gupta, Ex. Professor & Head, Dairy Science,
Veterinary University, Mathura.

Associate Editor

Eram S. Rao, New Delhi.

Managing Editor

R. D. Goel,
A.R.C.C., Karnal.

Members

Harjinder Singh, New Zealand

Sushil Kumar, Gurgaon

D.C. Sen, Mohanpur

A.S. Bawa, Mysore

V.B. Singh, Udaipur

M.K. Salooja, Delhi

G.R. Patil, Karnal

Amarjit Kaur, Ludhiana

Kamal G. Nath, Bangalore

Aruna Palta, Raipur

D. Vijayalakshmi, Bangalore

V.R. Sinija, Thanjavur

Alok Jha, New Delhi

S.K. Kanawjia, Karnal

P.C. Sarkar, Ranchi

Jashbhai B. Prajapati, Anand

Dinesh Chandra Rai, Varanasi

D.B. Puranik, Kalaburagi

Narinder Singh, Ropar

A.G. Bhadania, Anand

K. Jayaraj Rao, Bangalore

H.K. Sharma, Longowal

N. Lakshmidhevi, Secunderabad

Correspondence Address :

Managing Editor

Agricultural Research Communication Centre

1130, Sadar, Karnal - 132 001, India

Phone : +91 9255540308, E-mail : contact@arccjournals.com; editor@arccjournals.com

Website : www.arccjournals.com

Study on effect of fermentation to the quality parameter of cocoa bean in Indonesia

Mulono Apriyanto*, Sutardi¹, Supriyanto¹ and Eni Harmayani¹

Department of Food Technology,
Indragiri of Islam University, Indragiri Hilir Riau, Indonesia
Received: 02-02-2016 Accepted: 03-03-2016

DOI: 10.18805/ajdfr.v35i2.10724

ABSTRACT

Most cocoa beans in Indonesia are traditionally produced by farmers using non fermented and sun drying method. The quality of cocoa beans produced by farmer in Yogyakarta may be improved by the fermentation method. However, it needs optimization for best fermentation process. The aims of the study was to improve quality of cocoa beans by fermentation of sun dried cocoa beans. The characteristic fermented cocoa beans was determined by measuring changes pH, acidity and fermentation indexes of cocoa beans during fermentation. This study used preconditioned cocoa beans to resemble obtain from the farmer. Preconditioning was done in order to get 15% moisture content of pulp at same level as moisture content of pulp from traditional process. Before fermentation, therefore sun dried cocoa beans was rehydrated to obtain a moisture content of pulp similar to fresh beans pulp, and then fermentation was conducted for 120 hours. Changes in acidity and fermentation indexes of cocoa beans during fermentation were measured. The fermentation process used 3 level treatment i.e. control (without inoculum), mixed culture of microbes added at the beginning fermentation. The result show all cocoa beans acidity increase during fermentation from 4,48% to 6,45% for control, 4,64% to 6,39% for addition of inoculum at beginning of fermentation and from 4,45% to 6,59% for addition of inoculum at the beginning and middle of fermentation and fermentation indexes of cocoa beans increase for all level of inoculum addition i.e. 0,31 to 0,88 for control, 0,32 to 0,99 for addition of inoculum at the beginning fermentation and 0,33 to 1,03 for addition of inoculum at the beginning and middle of fermentation. The study indicated that addition of mixed culture microbes in fermentation improved the quality of cocoa beans that characterized by pH, acidity and fermentation indexes of cocoa beans.

Key words : Acidity, Cocoa beans, Fermentation, Fermentation indexes, Mixed culture microbes, pH.

INTRODUCTION

Post-harvest handling of fresh cocoa beans is usually implemented in 2 methods. Firstly, the cocoa beans are fermented traditionally and dried by artificial drying. Second the cocoa beans are directly sun dried for several days without fermentation anymore. According to the Bureau of Statistics Data (Anonymous, 2013) that the dried cocoa production in 2013 reached 5.45 million tonnes and $\pm$ dry unfermented cocoa beans of $\pm$ 38.5000 tons. Dry unfermented cocoa beans consist of sun dried cocoa beans and dry half-fermented cocoa beans produce by cocoa farmer. Indonesian cocoa beans farmers produce $\pm$ as 93% of cocoa beans by simple method i.e. washing cocoa beans and it was directly dried by sun drying method without fermentation. While 7% of dry cocoa beans are produced by either the private company or national plantation company using fermentation method (Anonymous, 2013).

Fermented of cocoa beans is essentially a process to breakdown sugar compound in the pulp into organic acids such as citric acid and it was carried out by microbes (Camu, *et al.*, 2008, (Ardhana and Fleet, 2003). The produce organic acids during fermentation will induce enzymatic reactions

in the beans cotyledon, causing biochemical changes. Most of the are compound that give specific flavor, taste, and color of the cocoa beans (Biehl, *et al.*, 1985, Afoakwa, *et al.*, 2014). The fermentation process was carried out by using wood boxes for 5-7 days incubation and stirred reversally for every 2 days. The cocoa beans without fermentation will create bitter taste, astringency, and will not produce distinctive aroma of chocolate after roasting process (Schwan and Wheals, 2004).

Dry beans had lost most of the water content and several compound as substrate of microbes. The water content of cocoa beans during fermentation was utilized for enzymatic reactions in the beans cotyledon and also for microbial growth in cocoa beans pulp (Schwan and Wheals, 2004). Water will bring the enzyme to the substrate that is in the beans cotyledon, so that the hydrolysis and oxidation of the precursor of flavor, color, and aroma of the cocoa beans occurred. The water content of cocoa beans required in the fermentation of cocoa is more than 35%. Substrate in the fermentation of cocoa beans are sugar that is available in cocoa beans pulp and converted to organic acid such as citric acid. Organic acid will diffuse into the beans cotyledon

*Corresponding author's e-mail: mulonoapriyanto71@gmail.com. ¹Department of Food and Agriculture Product Technology, Faculty of Agriculture Technology, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.

and induces the enzymatic reactions to form precursor of flavor, aroma and color (Afoakwa et al., 2014). Soaking of un-fermented cocoa beans was done to rehydration of cocoa beans before fermentation. Research on fermented dry cocoa beans using unfermented cocoa bean was done successfully in the engineering lab PAU, UGM., The aimed study to determine changes in the chemical properties of fermented dry cocoa beans drying.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cocoa beans : Cocoa beans used were taken from ripe cocoa pods, which was a yellow or orange fruit that sounds hollow when tapped. Friuts without washing was cleaved to remove the beans cotyledon and dried in the cabinet dryer at 40 ° C, until the moisture content of the beans reached to $\pm 15\%$. Hundred (100) g of dry beans was soaked in 60 ml distilled water at room temperature for 5 days (120 hours). Soaked ccocoa beans were susequently fermented at room temperature for 5 days as well. Changes of total sugar, reducing sugar, pH, acidity, index of fermentation were determined and a succession of microbes during fermentation was also determined and it was compared to fermentated fresh cocoa beans.

Preparation of the pulp samples: The pulp was manually separated from the beans by rubbing the beans (with adhering pulp) between fingers and squeezing the pulp into clean sample bag.

Preliminary analysis: Preliminary analysis was conducted to determine the water content and reducing sugar of pulp and cocoa beans before and after drying. The water content of the cocoa beans is determined using thermogravimetric method, while reducing sugar content of the wet and dried pulp was analyzed by using Nelson-Somogy Method (Sudarmadji et al., 1997).

Fermented cocoa beans: First fermentation, 100 g of fresh cocoa beans was fermented at room temperature for 5 days. Second fermentation, 100 g un-fermented cocoa beans was soaked in 60 ml of distilled water before fermentation and then they were fermented at room temperature for 5 days.

Experimental design: The experimental design used for the study was Randomized Complete Block Design (RCBD). The variable factors were cocoa treatments (fresh and sun dried cocoa beans) and fermentation time (0; 3 and 6 days). The pH, non-volatile (titratable) acidity, reducing sugars, fermentation index and total microbes (total plate count) were studied. All statistical analysis were performed using SPSS 13.00 statistical package program (2002). The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). If there is signicant different between treatmets, therefore it was followed by Duncan Multiple Range Test (DMRT) using 0.05% significancy.

pH and non-volatile (titratable) acidity: pH and non-volatile (titratable) acidity of the pulp were determined using

the method as described by Nazaruddin *et al.* (2006) with slight modifications. Ten (10) g of the pulp was homogenized in 90 ml of hot distilled water, stirred manually for 30 s and filtered using Whatman filter paper No. 40 and cooled to 20–25°C. Twenty five (25) ml aliquot of the resulted filtrate was pipetted into a beaker glass and the pH was measured using a pH meter (Mettler Toledo MP 230), and calibrated with buffers at pH 4.01, 7.00 and 9.21. A further 10 ml aliquot was used to determine acidity by titration to an end point pH of 8.1 with 0.1 N NaOH solution and the values were reported as moles of sodium hydroxide (NaOH) per 100 g of sample.

Fermentation index determination: Fermentation index of cocoa beans were determined using the method as described by Misnawi *et al.* (2002). Five hundred (500) mg of defatted cocoa powder were weighed into a 125 ml conical flask containing a mixture of 50 ml of methanol:hydrochloric acid (97:3), the mixture was cooled at $8\pm 2^\circ\text{C}$ in a refrigerator for 16 –18 h. A clear extract was obtained by filtration through a Whatman filter paper No. 1. Fermentation index was calculated, based on the ratio of the absorbance at 460 nm to the absorbance at 530 nm.

RESULT S AND DISCUSSION

The pH of sun dried cocoa beans has been reported to range between 5 – 5.7 and pH of pulp between 6 – 6.2 (Figure 1). During the first two days of fermentation, the pH cocoa beans was recorded 5.7 ± 0.1 , and decreased to 3.8 ± 0.1 in 48 h fermentation, and at the end of fermentation was slight increased to 4.5 ± 0.2 . The beginning of fermentation, however, pH of pulp was 4.5 ± 0.1 , an slightly increased to 6 ± 0.1 during fermentation (Figure 1). Fermentation of cocoa beans caused significant ($p \leq 0.05$) increasessed the acidity levels of cocoa beans, and reached at maximum level after 48 fermentation. After which the titratable acidity decreased considerably until the end of fermentation period, and this was noted for all treatments (Figure 2). The interaction between fermentation time and prepared of cocoa beans (with and without fermentation) gave significant effect ($p \leq 0.05$) on acidity level of pulp. The fermentation index was close to 1 as

Fig 1: Changes in pH during cocoa beans fermentation.

Fig 2: Changes in titratable acidity of cocoa beans during fermentation

Fig 3: Change fermentation index cocoa bean during fermentation

indication for good fermentation. Comparison between dry cocoa beans obtained from treated cocoa beans and fermented fresh cocoa beans is showed in Figure 3. Fermentation index of sundried cocoa beans was 0.35 ± 0.1 , and increased to 1.35 ± 0.1 . While fermentation index of dry fresh cocoa beans was 0.31 ± 0.1 , slightly increased to 0.95 ± 0.1 after 120 h fermentation.

Changes in pH profile of cocoa beans: The acidity cocoa beans at the beginning of fermentation was moderate low (3 – 4). It was due to the content of citric acid, and it was preferable to growth of yeast. However, as fermentation on going, the dominant microbes was yeasts with good pectinolytic activity, and they degraded cocoa beans pulp to produce organic acids especially citric acid. Such citric acid will change fermentation condition that preferable to bacteria growth. This explained why the pH of pulp changed from 5.20.10 (after 48 h fermentation) to 5.6 ± 0.20 (after 72 h fermentation). While pH of cocoa beans decreased from 5.7 ± 0.1 to 3.8 ± 0.1 (after 24h fermentation) and slightly

increased to 4.5 ± 0.10 (after 72 h fermentation). Once the environment of fermentation became more aerobic, so that the lactic acid bacteria (LAB) would dominate fermentation process and converting the intermediate metabolites into lactic acids. At the latter stage of fermentation, acetic acid bacteria (AAB) oxidized the ethanol produced by yeasts and LAB into acetic acid and further more to carbon dioxide (CO_2) and water. Nevertheless, the acetic acid was highly volatile and seldom accumulated under aerobic condition. Unlike, the pH, the titratable acidity were more appropriate indicator to measure the total acid level in any fermentation process and usually both parameters are negatively correlated. According to Beckett, (2009), the synthesis of lactic acid was very common among lactic acid fermentation, especially cocoa beans fermentation that carried out under anaerobic condition. The temperature rose steadily from 27 to 40°C (fresh cocoa beans) and from 26 to 38°C (sundried cocoa beans), respectively after the cocoa fermentation.

The steady increase on the temperature may be associated to the release of heat from cocoa biomass during the fermentation process. Initially, the yeasts were dominant species that utilize the available fermentable substrate (such as sugar) before converting them into ethanol and further to acetic acid via microbial succession. The conversion of fermentable substrate into desired metabolite by-products was performed exothermically, and hence it assisted to the increase of temperature (Schwan and Wheals, 2004).

Changes in non-volatile (titratable) acidity of cocoa pulp: During fermentation of cocoa beans, microorganisms breakdown the sugars in the pulp resulting in the production of alcohols and organic acids such as acetic acid -which then diffuse into the beans. Production of organic acids in the pulp is important in cocoa beans fermentation as these acids diffuse into the beans and subsequently induce the important biochemical reactions leading to well fermented

cocoa beans. The acidity level was highest at 48 h of fermentation as most of the pulp sugars were probably degraded into alcohols and then oxidized to acetic acid by acetic acid bacteria within 48 h of fermentation. Ardhana and Fleet (2003) reported that highest concentration of acetic acid (10 mg/g sample) in cocoa pulp occurred at 72 h (3 days) of fermentation. Acidity levels decreased after 3 days fermentation, it was due to most of the acid produced have diffused into the beans. Again, as the pulp volume reduced, there was improvement in aeration in the fermentation of biomass (pulp) leading to the evaporation of volatile acids such as acetic acid.

This might be due to the fact that reduced pulp volume per beans, caused reduction of pulp sugar content and thus, increased micro-aeration within the pulp. The decreasing of sugar content in pulp as result of yeasts activity during fermentation and consequently produced alcohol and acetic acid in the pulp (Biehl *et al.*, 1985). This suggested that cocoa beans preconditioning could be effectively employed to reduce acidity levels in cocoa beans during fermentation.

Fermentation index: The figures 3 shows that until the end of fermentation, however fermentation index of fermented sundried beans was not met, it was presumably because the temperature of fermentation was not reached. It was due to total population of microbes was not satisfactory for encouragement of fermentation process.

CONCLUSION

The results of this study may be concluded that during drying of cocoa beans (covered by pulp) did not cause the microbe dead, so when cocoa beans were rehydrated the microbes were still survive. This evident may be seen in the succession of microbes that occurred with yeast (*S. cerevisiae*) population exchanged by LAB and followed by AAB during fermentation. The quality of sundried un-fermented cocoa beans compared with fresh fermented cocoa beans have in common. Fermentation index of sundried un-fermented cocoa beans was highest i.e. 0.95. From whole fermentation quality data it can be said that the quality of sundried cocoa beans may be improved through fermentation. The fermentation process of cocoa beans may be speed up by utilization of inoculum in order to improve the quality dry cocoa beans.

REFERENCES

- Afoakwa E. O., Kongor, J.E., Takrama and J. Badudu, A. S. (2014). Changes in nib acidification and biochemical composition during fermentation of pulp pre-conditioned cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Internasional Food Research Journal*, **20**: 1843–1853.
- Anonymus. (2013). Produksi Perkebunan Besar menurut Jenis Tanaman, Indonesia. from website <http://www.bps.go.id>. acces in Mei 2015
- Ardhana M.M. and dan Fleet, G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, **86**:87–99.
- Biehl, B., Brunner, E., Passern, D., Quesnelh, V. C. and dan Adomako, D. (1985). Acidification, proteolysis and flavour potential in fermenting cocoa beans, *Journal Food dan Science* **3**:583–598.
- Beckett S.T., (2009). *Industrial chocolate manufacture and use*. 4th, Wiley-Blackwell, United Kingdom
- Camu, N., Winter, T. De, Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H. and Vuyst, L. De. (2008). Fermentation of cocoa beans/ : influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88** : 2288–2297.
- Misnawi, Jinab, S., Nazamid, S. and Jamilah, B. (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry*, **78**: 407–417.
- 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**: 87–94.
- Schwan, R. F. and Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 205–221.
- Sudarmadji, S., Bambang and H dan Suhardi. (1997). *Prosedur analisa bahan pangan*, liberty pres. yogyakarta.

SURAT KETERANGAN

Nomor: 58/AGT/01/2016

Dengan ini Ketua Redaksi Jurnal Agritech menyatakan bahwa naskah berikut akan diterbitkan di Jurnal Agritech Volume 36 Nomor 4 pada bulan November 2016:

Judul : **Perbaikan Proses Fermentasi Biji Kakao Non Fermentasi dengan Penambahan Biakan Murni Murni *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus lactis* dan *Acetobacter aceti***

Penulis : **Mulono Apriyanto, Sutardi, Eni Harmayani, Supriyanto**

Demikian agar surat keterangan ini dapat dipergunakan sebagaimana semestinya.

Yogyakarta, 22 Januari 2016

Redaksi Agritech

Ketua,

Dr. Ir. Chusnul Hidayat