

**PENGARUH WAKTU PENYANGRAIAN TERHADAP PROFIL SENYAWA
AROMA VOLATIL, KANDUNGAN ASAM AMINO DAN GULA PEREDUKSI
PADA BIJI KAKAO HASIL FERMENTASI**

Effect of Roasting Time on Volatile Aroma Compounds Profile, Amino Acids
and Reducing Sugars Contents in Fermented Cocoa Beans

NADIRAH B. ANDI PALLAWA



PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

**PENGARUH WAKTU PENYANGRAIAN TERHADAP PROFIL
SENYAWA AROMA VOLATIL, KANDUNGAN ASAM AMINO DAN
GULA PEREDUKSI PADA BIJI KAKAO HASIL FERMENTASI**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu dan Teknologi Pangan

Disusun dan Diajukan Oleh

NADIRAH B. ANDI PALLAWA

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

PENGARUH WAKTU PENYANGRAIAN TERHADAP PROFIL
SENYAWA AROMA VOLATIL, KANDUNGAN ASAM AMINO DAN
GULA PEREDUKSI PADA BIJI KAKAO HASIL FERMENTASI

Disusun dan diajukan oleh

NADIRAH B. ANDI PALLAWA

Nomor Pokok G032191001

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada tanggal 13 Januari 2022

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,

Prof. Dr. Ir. Salengke, M.Sc
Ketua

Dr. Pirman, M.Si
Anggota

Ketua Program Studi
Ilmu dan Teknologi Pangan

Dr. Adriansyah Syarifuddin, S.TP., M.Si
NIP. 19770527 200312 1 001



Bekas Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Baharuddin
NIP. 19601224 198601 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : NADIRAH B. ANDI PALLAWA
Nomor Mahasiswa : G032191001
Program studi : Ilmu dan Teknologi Pangan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar 13 Januari 2022

Yang menyatakan



NADIRAH B. ANDI PALLAWA

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat *Allah Subhahanahu wa Taala*, atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dan penulisan karya tulis ilmiah (tesis) dengan judul "Pengaruh Waktu Penyangraian Terhadap Profil Senyawa Aroma Volatil, Kandungan Asam Amino Dan Gula Pereduksi Pada Biji Kakao Hasil Fermentasi" dapat terlaksana dan terselesaikan berkat dukungan dari berbagai pihak.

Perkenankan penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaian tulisan ini, kepada :

1. Rektor universitas hasanuddin dan dekan program sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin serta Ketua Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan. Bapak **Prof. Dr. Ir. Salengke, M.Sc**, dan bapak **Dr. Pirman, M.Si** selaku dosen pembimbing yang selalu mengarahkan penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penyelesaian karya tulis ilmiah. Tim penguji, **Prof. Dr. Ir. Meta Mahendradatta, Dr. Adiansyah Syarifuddin, STP., M.Si., Dr. Februadi Bastian, STP. M.Si** atas segala sumbangsihnya kepada penulis. **Staf pengajar ilmu dan teknologi pangan** yang telah membekali dengan ilmu pengetahuan serta pengalaman pada penulis. **Dinas perindustrian dan perdagangan Provinsi Sulawesi Tengah** yang telah memberikan dukungan finansial hingga terlaksananya penelitian ini.

2. Ayahanda **Dr. Andi Baso Andi Pallawa, Dip.TEFL., M.Pd**, Ibunda **Bunaya** dan **opu Bintang**, terima kasih atas doanya selama ini. **My support system**, kakakku **Nurrahma**, adik-adikku **opu Wawe, opu Ning, Amir, puang Anti** dan **puang Piti**. *Jazakumullahu Khairan* untuk semua dukungannya **"you are the real siblings"**. Teruntuk keluarga kecilku, terima kasih untuk Kak Tia (**Abanya Maryam**) atas pelajaran hidup yang telah mengubah paradigma berpikirku. Anak-anakku **Maryam** dan **Yusuf** yang selalu menjadi *my booster live I love you kids*
3. Teman-teman program magister serta adik-adik strata 1 Ilmu dan Teknologi Pangan universitas Hasanuddin, terima kasih Atas sambutannya. Kalian adalah **pelangi** untuk hariku
4. Adikku **Izzah Irawati Mampawa**, *jazakallahu khair* untuk supportnya sepanjang masa. Semoga Allah selalu memberikan kesehatan untukmu. *The last* teruntuk Adikku **Dek Iwa** semoga Allah mempertemukan kita dalam keadaan yang terbaik, terima kasih untuk pelajaran hidup yang mungkin tidak kamu sadari

Penulis memohon maaf atas segala kekurangan yang terdapat dalam karya tulis ilmiah ini. Semoga dapat memberikan banyak manfaat bagi kita semua. Amin Ya Rabbal Alamin

Makassar, 13 Januari 2022

Nadirah B. Andi Pallawa

ABSTRAK

NADIRAH B. ANDI PALLAWA. *Pengaruh Waktu Penyangraian Terhadap Profil Senyawa Aroma Volatil, Kandungan Asam Amino Dan Gula Pereduksi Pada Biji Kakao Hasil Fermentasi* (dibimbing oleh Salengke dan Pirman)

Penyangraian merupakan salah satu tahapan penting di dalam pengolahan biji kakao yang secara signifikan berkontribusi terhadap pengembangan aroma. Beberapa faktor dapat mempengaruhi pengembangan aromanya dan salah satu diantaranya adalah lama waktu penyangraian yang digunakan. Waktu yang dibutuhkan selama penyangraian, memungkinkan banyak reaksi kimia terjadi pada biji, dan salah satu yang penting adalah reaksi kimia antara asam amino dan gula pereduksi yang dapat mempengaruhi kualitas aroma biji kakao. Dalam konteks tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki bagaimana waktu penyangraian mempengaruhi profil senyawa aroma volatil, kandungan asam amino bebas dan total gula pereduksi dalam biji kakao fermentasi, serta untuk mendapatkan waktu penyangraian yang optimum

Biji kakao fermentasi kering disangrai pada empat waktu penyangraian (mulai dari 0 menit, 10, 14, dan 18 menit). Penentuan profil senyawa aroma dikerjakan menggunakan headspace mikroekstraksi fase padat (HS - SPME) diikuti kromatografi gas-spektrometri Massa (GC - MS). Asam amino dan gula pereduksi masing-masing diidentifikasi menggunakan kromatografi UFLC - LCMS dan spektrofotomer UV VIS.

Hasil yang diperoleh mengindikasikan bahwa waktu penyangraian memberikan pengaruh pada profil komposisi dan konsentrasi dari senyawa volatile yang teridentifikasi dalam biji kakao fermentasi yang disangrai. Lama waktu penyangraian tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar asam amino namun sebaliknya memberikan pengaruh nyata terhadap kadar gula pereduksi dalam biji kakao fermentasi. Penyangraian pada menit ke 14 dipilih sebagai penyangraian optimum berdasarkan jumlah senyawa serta persentasi nilai rasio are puncak paling tinggi dari senyawa aroma kunci cokelat yang terdapat dalam biji yang disangrai.

ABSTRACT

NADIRAH B. ANDI PALLAWA. *Effect of Roasting Time on Volatile Aroma Compounds Profile, Amino Acids and Reducing Sugars Contents in Fermented Cocoa Beans* (supervised by Salengke and Pirman)

Roasting is an important process in cocoa beans processing that significantly contribute to aroma development. Several factors can affect flavor profile development and one of them is roasting time. During roasting, many chemical reactions occur in the beans, and one of the essential reaction is the reaction between amino acids and reducing sugars that can affect the quality and intensity of aroma. In that context, this study aimed at investigating the effect of roasting time on volatile aroma compounds profile, free amino acid content, and total reducing sugar in roasted fermented cocoa beans as well as to obtain optimal roasting time

Dried fermented cocoa beans were roasted at four roasting times (ranging from 0 minutes, 10, 14, and 18 minutes). Determination of aroma compound profiles was done using solid phase micro extraction headspace (HS - SPME) followed by gas chromatography-Mass spectrometry (GC - MS). Amino acids and reducing sugars were identified using UFLC - LCMS chromatography and UV VIS spectrophotometer respectively

The results indicated that roasting time effect the composition and concentration of volatile compounds identified in roasted fermented cocoa beans. The roasting time did not effect amino acid content. On the other hand, it significantly decrease total reducing sugar. Roasting at the 14th minute was selected as the optimum roasting, based on percentage value of the highest peak area ratio of chocolate key aroma compounds in roasted cocoa bean

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan dan Kegunaan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Biji Kakao	6
B. Komposisi Kimia Biji Kakao	7
C. Fermentasi Biji Kakao	11
D. Penyangraian	15
E. Citarasa biji kakao	16
F. Reaksi Maillard	18
G. Ekstraksi	23
H. Instrumen Analisa	25
I. Kerangka Berpikir	31
I. Hipotesis	34

BAB III METODOLOGI PENELITIAN	35
A. Waktu dan Tempat	35
B. Alat dan Bahan	35
C. Metode Penelitian	36
D. Parameter pengamatan	39
F. Analisa Data	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	44
A. Analisa komponen senyawa volatile	44
B. Analisa Asam Amino	71
C. Analisa Gula Pereduksi	78
BAB PENUTUP	83
A. Kesimpulan	83
B. Saran	83
DAFTAR PUSTAKA	84
LAMPIRAN	96

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Identifikasi senyawa volatil dan deskripsi odor senyawa dalam biji kakao fermentasi pada perlakuan penyangraian menggunakan HS-SPME/GC-MS.....	47
Tabel 2	Kandungan dan jenis asam amino yang diidentifikasi oleh kromatografi LC-MS/MS.....	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Struktur biji Kakao	6
Gambar 2	Mekanisme Pembentukan Senyawa Pirazin	21
Gambar 3	Skematik alat ekstraksi SPME (A; tampak luar dan B; tampak dalam)	24
Gambar 4	Langkah ekstraksi SPME (metode perendaman langsung) dan desorpsi termal dalam GC	25
Gambar 5	Diagram sistem kromatografi gas	27
Gambar 6	Tipe Kromatogram massa GCMS (hijau dan oranye), kromatogram ion total (TIC, merah) dan massa spectrum (biru)	28
Gambar 7	Diagram LC/MS	29
Gambar 8	Komponen Alat Spektrofotometer	31
Gambar 9	Skema Kerangka Berpikir.....	33
Gambar 10	Alur Kerja Penelitian.....	43
Gambar 11	Karakteristik Kromatogram senyawa volatil yang diperoleh menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa	45
Gambar 12	Total kandungan asam amino bebas, Total asam amino Hidrofilik, Total asam amino Hidrofobik	73
Gambar 13	Profil senyawa Asam amino gugus Hidrofilik dan gugus Hidrofobik	77
Gambar 14	Persentase kadar gula reduksi pada berbagai Jenis perlakuan waktu penyangraian	79

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Selama Proses Penyangraian.....	96
Lampiran 2	Keterangan Performa Alat GC-MS yang digunakan	97
Lampiran 3	Analisa Senyawa Volatil Biji Kakao Fermentasi pada perlakuan penyangraian 0 menit menggunakan metode ekstraksi HS-SPME/GC-MS	98
Lampiran 4	Analisa Senyawa Volatil Biji Kakao Fermentasi pada perlakuan penyangraian 10 menit menggunakan metode ekstraksi HS-SPME/GC-MS	99
Lampiran 5	Analisa Senyawa Volatil Biji Kakao Fermentasi pada perlakuan penyangraian 14 menit menggunakan metode ekstraksi HS-SPME/GC-MS	100
Lampiran 6	Analisa Senyawa Volatil Biji Kakao Fermentasi pada perlakuan penyangraian 18 menit menggunakan metode ekstraksi HS-SPME/GC-MS	101
Lampiran 7	Hasil uji kadar air biji kakao selama perlakuan penyangraian menggunakan metode oven	102
Lampiran 8	Hasil Konversi sampel biji kakao berdasarkan total padatan terlarut	103
Lampiran 9	Kurva standar asam amino	104
Lampiran 10	Hasil analisa asam amino pada sampel biji kakao berdasarkan total padatan.....	114
Lampiran 11	Data hasil perhitungan asam amino hidrofobik, asam amino hidrofilik dan total asam amino.....	120
Lampiran 12	Hasil pengujian gula reduksi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	121
Lampiran 13	Hasil Uji Anova pada sampel asam amino dan gula reduksi	124

Lampiran 14	Uji lanjut Tukey Test untuk Gula reduksi	126
Lampiran 15	Dokumentasi-dokumentasi selama penelitian	127
Lampiran 16	Dokumentasi Pengujian Senyawa Volatil Dengan Alat GCMS-QP 2010 Plus Shimadzu	129
Lampiran 17	Dokumentasi Pengujian Asam Amino dengan Alat UFLC-LCMS 2020, Shimadzu	132
Lampiran 18	Analisa Gula pereduksi	133
Lampiran 19	Profil Fermentasi biji kakao yang dilaksanakan oleh petani di kecamatan palolo.....	134

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Biji kakao merupakan bahan baku utama dalam pembuatan produk coklat dan turunannya (Dand, 2011). Citarasa coklat yang digemari oleh masyarakat dunia tidak terlepas dari kualitas biji kakao itu sendiri (UNDP, 2018). Aroma sebagai parameter penting dalam menentukan kualitas biji kakao (Barisic *et al.*, 2019) sangat dipengaruhi oleh perlakuan pengolahan yang diberikan terutama perlakuan fermentasi dan penyangraian (Gibson & Newsham, 2018; Marseglia *et al.*, 2020). Fermentasi berperan untuk memunculkan senyawa-senyawa prekursor aroma (Bonvehi, 2005), sedangkan penyangraian akan memaksimalkan sejumlah reaksi non enzimatis kompleks dari senyawa-senyawa yang sebelumnya terbentuk saat proses fermentasi (Castro-Alayo *et al.*, 2019).

Penyangraian sendiri merupakan metode memanggang menggunakan panas kering, di mana udara panas dari alat penyangrai akan mengelilingi dan memasak biji secara merata di semua sisi (Berk, 2018), prosesnya melibatkan energi konduksi dari *roaster* ke biji serta energi konveksi dari biji ke lingkungan, dimana perpindahan energi tersebut menyebabkan perubahan-perubahan pada biji yang disangrai (Fabbri *et al.*, 2011), seperti berkurangnya kandungan

air pada biji, menguapnya senyawa asam yang bersifat volatile, pembentukan aroma khas, dan warna gelap pada biji kakao (Dand, 2011).

Suhu dan waktu penyangraian merupakan faktor penting dalam menentukan kualitas dari suatu penyangraian (Jaeger *et al.*, 2010; Mensah-brown & Afoakwa, 2013; Rocha, *et al.*, 2017). Suhu terkait dengan berbagai reaksi kimia yang terjadi di dalam biji (Adamski, 2012; Páramo *et al.*, 2010; Rojas S *et al.*, 2020) sedangkan waktu adalah lama proses yang dibutuhkan untuk terjadinya reaksi selama penyangraian (Zhodu *et al.*, 2016). Dari peneliti sebelumnya terdapat informasi yang beragam terkait kondisi optimum penyangraian biji kakao. Rocha *et al.*, (2017) menyebutkan kondisi optimum penyangraian biji kakao berada dalam rentang suhu antara 90 °C - 150 °C. Sebelumnya Zyzelewicz *et al.*, (2016) menyebutkan kondisi optimum penyangraian biji kakao berada dalam rentang suhu antara 130 °C - 150 °C dengan waktu antara 15 - 45 menit. Ramli *et al.*, (2006) juga menyebutkan kondisi optimum penyangraian biji kakao berada dalam rentang suhu 150 °C selama 30 menit. Terlepas dari hasil penelitian di atas, faktor-faktor lain saat melakukan penyangraian juga perlu dipertimbangkan untuk mendapatkan hasil penyangraian yang optimum (Krysiak, 2006; Mensah-brown & Afoakwa, 2013).

Pada saat penyangraian, banyak reaksi kimia yang terjadi sebagai akibat dari perlakuan panas yang diberikan, beberapa senyawa mengalami degradasi dan senyawa lainnya bereaksi membentuk senyawa baru (Hustiany,

2016). Asam Amino dan gula pereduksi merupakan senyawa penting yang dikenal keterlibatannya selama reaksi maillard berlangsung

Telah banyak riset yang melaporkan keterkaitan antara pembentukan aroma saat penyangraian dengan sejumlah reaksi yang terjadi di dalam reaksi Maillard. Bonvehi (2005), melaporkan bahwa senyawa pirazin berperan sebagai aroma kunci pada produk coklat yang disangrai. Menurut Jaeger *et al.*, (2010) kehadiran senyawa prekursor gula pereduksi dan protein akan menyebabkan reaksi maillard pada bahan pangan yang disangrai. Yang *et al.*, (2012), Andruszkiewicz *et al.*, (2019) dan Andruszkiewicz *et al.*, (2020) melaporkan bahwa sejumlah senyawa peptida dan asam amino pada reaksi maillard akan memberikan aroma spesifik pada biji kakao yang disangrai. Senyawa aroma yang teridentifikasi selama penyangraian biji kakao terutama berasal dari gugus pirazin, aldehida, eter, tiazol, fenol, keton, alkohol, furan dan ester. (Rocha *et.al.*, 2017).

Perhatian bidang ilmu pengetahuan terhadap senyawa asam amino dan gula pereduksi tidak lepas dari dampak reaksi kimianya terhadap pengembangan aroma pada biji kakao. Namun begitu sampai saat ini dari penelusuran pustaka, hasil penelitian yang menggunakan parameter variasi waktu penyangraian dalam mempengaruhi pengembangan aroma biji kakao terutama gula pereduksi (Mensah-brown & Afoakwa, 2013) dan asam amino (Orozco *et al.*, 2020) masih sangat sedikit, selebihnya lebih banyak membahas peran waktu selama proses fermentasi terhadap pembentukan kedua senyawa

tersebut. Masih sangat jarang publikasi yang menginformasikan mengenai pengaruh waktu penyangraian terhadap kandungan senyawa asam amino dan gula pereduksi selama proses penyangraian berlangsung.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini mencoba untuk mempelajari dan menentukan bagaimana pengaruh waktu penyangraian terhadap kandungan asam amino serta gula pereduksi dan kaitannya dengan pembentukan profil senyawa aroma selama penyangraian.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh waktu penyangraian biji kakao terhadap profil senyawa aroma volatil yang dihasilkan?
2. Apakah waktu penyangraian memberikan pengaruh terhadap kandungan asam amino dan gula pereduksi?
3. Perlakuan waktu penyangraian mana yang dapat memberikan hasil optimum terhadap aroma biji kakao fermentasi?

C. Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh waktu penyangraian biji kakao terhadap profil senyawa aroma volatile yang dihasilkan?

2. Mengetahui apakah waktu penyangraian memberikan pengaruh yang nyata terhadap kandungan asam amino dan gula pereduksi.
3. Menentukan lama waktu penyangraian optimum berdasarkan perlakuan yang diberikan

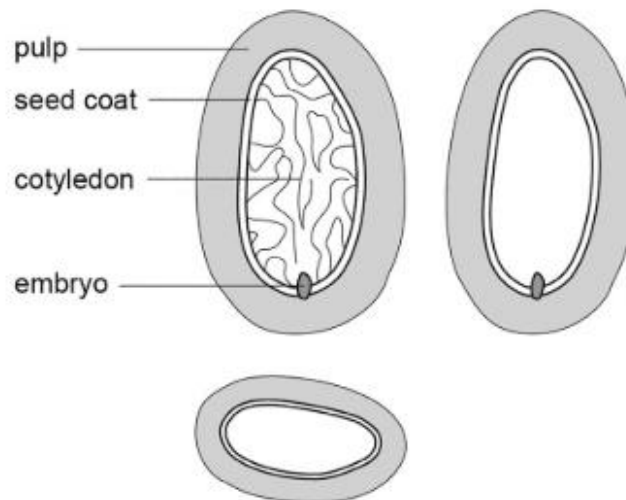
Kegunaan dari penelitian ini yaitu dapat menjadi referensi bagi masyarakat secara umum dan secara khusus bagi industri pengolahan kakao untuk melakukan proses penyangraian biji kakao dalam pembuatan coklat. Penelitian ini memberikan informasi mengenai lama waktu penyangraian optimum untuk menghasilkan profil aroma yang diinginkan sehingga dapat digunakan dalam melakukan pengembangan *flavour* di laboratorium maupun industri pangan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Biji Kakao

Biji kakao adalah bagian yang bernilai ekonomis dari pohon kakao yang mana digunakan sebagai bahan baku untuk produk berbasis kakao. Setiap biji kakao terdiri dari dua bagian yaitu kotiledon (nibs) dan embrio kecil, Semua terbungkus dalam kulit (Shell). Kotiledonnya mengandung dua jenis sel yaitu sel penyimpanan atau parenkim, yang memiliki vakuola lipid, globulis lemak, pati dan butiran protein kecil yang rapat di dalam sitoplasma, dan sel berpigmen yang terdiri dari vakuola besar, mengandung polifenol dan alkaloid methylxanthines (Caligiani *et al.*, 2015; Flanjak & Barisi, 2019).



Gambar 1 Struktur biji kakao (Mühlbauer & Müller, 2020)

B. Komposisi Kimia Biji Kakao

Lemak, biji kakao mengandung lemak kakao (cocoa butter) sekitar 50-58% (Caligiani *et al.*, 2015) dimana (97-98%) dari cocoa butter adalah triasilgliserol (TAGs) yang merupakan spesies molekuler hidrofobik yang dibentuk oleh esterifikasi dari tiga asam lemak (FA) dengan rantai utama gliserol. Triasilgliserol (TAGs) utama adalah 1,3 – distearoyl – 2 – oleyl – sn - glycerol (SOS), 1 – palmitoyl – 2 – oleoyl – 3 – stearoyl – sn - glycerol (POS) dan 1,3 – dipalmitoyl – 2 – oleyl - sn - glycerol (POP). Dua asam lemak jenuh dengan asam oleat di bagian tengah mencirikan pola khas distribusi asam lemak pada badan rantai Triasilgliserol (Sirbu *et al.*, 2018).

Tiga asam lemak tersebut terdiri dari asam palmitat (25%) dari total asam lemak, asam stearat (37%), asam oleat (34%), dan jumlah asam linoleat yang rendah sekitar (3%). Asam oleat terutama diesterifikasi pada posisi 2 dari gliserol. Lemak biji coklat akan padat pada suhu kamar dan meleleh pada suhu antara 30°C – 40°C tergantung pada bentuk polimorfiknya (Caligiani *et al.*, 2015)

Kandungan lemak kakao sangat bergantung pada asal dan jenis biji kakao itu sendiri. Lemak kakao yang lebih lembut memiliki kandungan 1-palmitoyl – 2 – 3 – dioleoyl - glycerol (POO) yang lebih tinggi dan 1 – stearoyl – 2 – 3 – dioleoyl - glycerol (SOO), sementara lemak kakao yang lebih keras memiliki kandungan asam lemak jenuh yang tinggi (Sirbu *et al.*, 2018).

Protein, konstituen kedua paling melimpah setelah lemak kakao adalah protein sekitar 10–15% dari berat kering biji kakao. Mengandung empat protein utama yaitu albumin, globulin, prolamin, dan glutelin. Albumin dan globulin adalah yang terbanyak dan memiliki peran penting baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Mengenai komposisi asam amino, biji kakao non-fermented mengandung kadar asam amino bebas yang rendah dengan rasio 1: 1 hidrofobik/asam-asam amino, sedangkan dalam biji kakao yang difermentasi rasio ini meningkat secara signifikan menjadi 3: 1 (Caligiani *et al.*, 2015).

Karbohidrat, biji kakao yang tidak difermentasi mengandung 2-4% karbohidrat dengan berat molekul rendah. Dimana turunannya, sebagian besar adalah sukrosa (90% dari total gula), glukosa, fruktosa, galaktosa, sorbosa, arabinosa, xylose, mannitol, dan inositol. Polisakarida terdiri dari pati (4-6%), pektin, selulosa (2-3%) dan lain-lain) juga hadir dalam biji kakao dengan proporsi sekitar 12%. Dinding sel biji kakao mengandung polisakarida (CWP) termasuk selulosa sekitar (28% CWP), polisakarida pektik (mengandung galaktosa sebagai gula rantai samping yang dominan sekitar (9% CWP) dan mengandung arabinosa sebagai gula rantai samping yang dominan (52% CWP), polisakarida hemiselulosa (xyloglucan (8% CWP), dan gallactoglucomannan (3% dari CWP). Dinding sel polisakarida pada biji kakao dilaporkan tidak mengalami perubahan pada saat fermentasi (Flanjak & Barisi, 2019).

Dalam biji kakao tanpa fermentasi, gula utama dalam pulp adalah glukosa (sekitar 50 mg / g, 76 mg / g) dan fruktosa (70 mg / g, 88 mg / g), sementara yang dalam biji adalah sukrosa dengan kadar rendah (17 mg / g, 16 mg / g), glukosa (0,5 mg / g, 3 mg / g) dan fruktosa (1 mg / g, 3,5 mg / g). Fruktosa dan glukosa yang terdapat pada pulp dimetabolisme selama fermentasi. Sedangkan untuk biji, pada saat fermentasi konsentrasi sukrosa awal turun di bawah 1 mg / g sedangkan kadar glukosa dan fruktosa awal yang rendah meningkat menjadi 3-5 mg / g (Ho *et al.*, 2015).

Pada biji kakao fermentasi, karbohidrat utama dalam biji kakao kering adalah pati (6%) dan selulosa (9%). Karbohidrat larut termasuk glukosa, fruktosa, sukrosa (0,08-1,5%), rafinosa, dan stachyose. Fraksi serat mengandung selulosa pentosa (1,5%), galaktan, dan polimer asam galakturonat yang terkonsentrasi di kulit kakao. Selama fermentasi sebagian sukrosa dihidrolisis, menjadi gula pereduksi yang merupakan prekursor pembentuk aroma (Caligiani *et al.*, 2015)

Asam-asam organik, asam sitrat terdapat dalam biji kakao tanpa fermentasi baik pada pulp ataupun bijinya dan diketahui memiliki konsentrasi tinggi sesaat setelah panen kemudian pada pulp mengalami penurunan setelah 24 jam fermentasi sedangkan pada biji mengalami peningkatan diakhir fermentasi. Asam sitrat pada biji kakao dimanfaatkan sebagian atau seluruhnya selama fermentasi untuk pertumbuhan ragi dan bakteri asam laktat (Ho *et al.*, 2015). Asam sitrat adalah asam organik yang tidak mudah menguap

dan konsentrasinya tetap cukup stabil dengan sedikit penurunan (John *et al.*, 2019)

Asam suksinat dan asam malat terdapat juga pada biji tanpa fermentasi baik pada pulp ataupun pada bijinya sementara asam oksalat hanya terdeteksi di dalam biji. Perubahan dalam konsentrasi asam suksinat, malat dan oksalat dalam pulp dan biji-biji terjadi sepanjang fermentasi. Konsentrasi asam suksinat pada pulp dan biji meningkat selama fermentasi sedangkan konsentrasi asam malat mengalami penurunan dalam pulpnya namun relative tidak berubah pada biji. Sejumlah kecil asam oksalat dalam biji mengalami penurunan selama fermentasi (Ho *et al.*, 2015).

Asam-asam organik (1,2-1,6%) terutama terbentuk selama fermentasi biji kakao, dan yang paling terwakili adalah asam asetat (0,2-0,7%), asam sitrat (0,4-0,7%), dan asam oksalat (0,3-0,5%). Asam asetat sebagian hilang selama pemrosesan kakao, khususnya selama conching (Caligiani *et al.*, 2015)

Metabolit sekunder, theobromine dan kafein adalah alkaloid utama yang ditemukan dalam kakao. Theobromine (3,7 - dimethylxanthine) mewakili 1,2-2% dari biji kakao, di mana sebagian terikat pada tanin dalam sel kotiledon. Biji kakao juga banyak mengandung senyawa polifenol, biji kakao yang tidak difermentasi mengandung sekitar 120-180 g / kg senyawa polifenolik. Polifenol dalam biji kakao disimpan di dalam sel-sel pigmen dari kotiledon. Tergantung jumlah anthocyaninnya, sel-sel pigmennya mulai dari berwarna putih sampai ungu tua. Tiga kelompok polifenol dapat dibedakan menjadi: katekin atau

flavan 3 - ols (37%), anthocyanin (4%), dan proanthocyanidins(58%). Katekin utama adalah epicatechin yang mewakili hingga 35% kandungan polifenol. Dalam jumlah yang lebih kecil catechin ditemukan dalam bentuk gallocatechin dan epigallocatechin. Procyanidins dalam kakao terdiri dari oligomer dan polimer dari catechin dan epicatechin. Antosianin diidentifikasi dalam kakao termasuk cyaniding – 3 - galactoside dan cyaniding – 3 - arabinoside. Sejumlah kecil quercetin, quercetin glikosida, naringenin, luteolin, apigenin, clovamide, dan asam fenolik seperti asam caffeic, ferulic, gallic, dan p-coumaric juga ditemukan dalam produk kakao (Caligiani *et al.*, 2015).

C. Fermentasi Biji Kakao

Biji kakao segar rasanya sangat pekat dan tidak mengembangkan aroma coklat yang lezat dan khas, hal tersebut disebabkan karena biji tidak mengandung prekursor spesifik aroma. Fermentasi biji kakao penting dilakukan untuk menghilangkan pulp yang membungkus biji dan untuk mengembangkan komponen kimia prekursor pada biji kakao (Ho *et al.*, 2015). Fermentasi kakao menyebabkan sejumlah reaksi biokimia di dalam biji seperti terbentuknya prekursor aroma, perubahan warna, pengurangan rasa pahit, rasa pekat, dan peningkatan penampilan fisik kakao (Castro-Alayo *et al.*, 2019)

Proses fermentasi pada biji kakao mengungkapkan suksepsi berturut-turut dari tiga kelompok mikroorganismes yaitu, *yeast*, bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. *Yeast* memulai dengan mendegradasi pulp yang

mengelilingi biji, memanfaatkan gula, asam sitrat dengan bantuan oksigen. Enzim pektinase yang dikeluarkan oleh ragi membantu proses hidrolisis pektin. Pada gilirannya, hal tersebut menghasilkan lingkungan mikro anoksik, yang mendukung produksi etanol. Pada kondisi anoksik bakteri asam laktat mulai tumbuh subur sampai ketika biji dibalik oleh petani menyebabkan kondisi lingkungan kembali aerobik, menyebabkan kelangsungan hidup bakteri asam laktat agak pendek. Bakteri asam laktat mengkonsumsi karbohidrat (glukosa dan fruktosa), asam sitrat lalu menghasilkan asam laktat, asam asetat, dan mannitol (Illegheims *et al.*, 2016). Bakteri Asam Laktat menghasilkan asam laktat yang juga termasuk dalam asam organik tidak mudah menguap. Dengan kehadiran oksigen, bakteri penghasil asam asetat memanfaatkan etanol dan asam laktat yang tersedia untuk menghasilkan asam asetat yang mudah menguap dalam reaksi eksotermis (John *et al.*, 2019) dan mengoksidasi etanol dan asam laktat menjadi acetoin (Illegheims *et al.*, 2016)

Semua proses fermentasi ini hanya terjadi pada pulp dan bukan pada biji. Namun, pada tahap akhir, metabolit mikroba yang disekresikan berdifusi ke dalam kotiledon biji kakao dan dengan kenaikan suhu fermentasi menimbulkan perubahan struktural dan biokimiawi pada biji (John *et al.*, 2019) Asam asetat menembus ke dalam biji dan membuka beberapa sel yang memungkinkan tiga hal terjadi; (1) adalah flavor dari hasil fermentasi pulp itu sendiri, yang meresap ke dalam rongga biji, memberikan rasa manis, asam, aroma buah, dan aroma bunga tertentu; (2) enzim yang terdapat pada biji

mulai memecah protein dan sukrosa yang ada dalam jaringan biji menjadi (asam amino dan gula sederhana). Ini membantu menghasilkan lebih banyak molekul aromatik; (3) senyawa fenolik *astringent* bercampur dengan protein, oksigen, saling berinteraksi menyebabkan kurangnya zat *astringent* (Gibson & Newsham, 2018) dan kehilangan kandungan polifenol, kemudian dalam kombinasi akhirnya membentuk prekursor senyawa flavor esensial (John *et al.*, 2019).

Pada karbohidrat, sukrosa adalah komponen utama yang mengalami reaksi selama fermentasi. Gula dari pulp dikonversi menjadi asam, kemudian asam-asam ini bergerak ke dalam biji dan menurunkan pH biji, menyebabkan kerusakan pada sel penyimpanan yang terdapat dalam biji. Sukrosa dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa (gula pereduksi) oleh aktivitas enzim invertase (Flanjak & Barisi, 2019).

Protein adalah fraksi kakao yang mengalami modifikasi paling intensif selama fermentasi, reaksi mikrobiologis dan enzimatik menyebabkan kerusakan besar biji kakao. Selama fermentasi, peptida dan asam amino bebas meningkat sebaliknya konsentrasi protein total menurun dimana fraksi protein globulinlah yang paling banyak terdegradasi. Protein kakao terdegradasi menjadi peptide hidrofilik dan peptide hidrofobik serta asam amino melalui autolisis oleh dua enzim endogen, endoprotease aspartik dan karboksipeptidase. Peningkatan konsentrasi asam amino hidrofobik, seperti leusin, alanin, dan fenilalanin, dijelaskan oleh aktivitas carboxypeptidase yang

melepaskan asam amino hidrofobik tunggal dan enzim endoprotease aspartik, yang menghidrolisis protein khusus disisi asam amino hidrofobik. Kandungan asam amino bebas yang dicatat dalam biji fermentasi berkisar dari 500 hingga 1800 mg / 100 g, dengan prevalensi asam amino hidrofobik yang bertanggung jawab atas pembentukan aldehid Strecker dan pirazin, yang merupakan senyawa penting untuk aroma kakao (Caligiani *et al.*, 2015)

Terjadi perubahan pH selama fermentasi pada biji kakao, hal ini karena diproduksi asam-asam yang berasal dari hasil fermentasi gula, terutama asam asetat dan asam laktat. Asam tersebut menyebabkan penurunan pH sekitar 4,5-5,5, dan memungkinkan terjadinya reaksi enzimatik yang diperlukan pada saat fermentasi (Flanjak & Bariši, 2019).

Fermentasi adalah langkah pertama dan salah satu yang paling penting dalam pengembangan cokelat, prosesnya juga paling tidak terkendali dan tidak dapat diprediksi dikarenakan waktu dan hasilnya tergantung pada keterampilan petani ketika melakukan fermentasi yaitu apakah biji tidak difermentasi, lewat fermentasi, atau bahkan dalam beberapa kasus biji difermentasi sampai kondisinya berjamur. Tidak mengherankan bila terdapat kesenjangan besar dalam kualitas biji mentah. Hal tersebut menjadi tantangan terberat bagi pelaku industri untuk menemukan biji kakao yang difermentasi dengan kualitas baik untuk selanjutnya dilakukan proses penyangraian (Gibson & Newsham, 2018).

D. Penyangraian

Proses penyangraian dapat dibagi menjadi tiga fase: pengeringan, pengembangan rasa dan warna, dan pendinginan. Pada fase pengeringan, penguapan air dari sel-sel biologis biji membawa kadar air biji turun dari nilai sebelum penyangraian. Suhu biji naik dengan cepat, dan pembengkakan terjadi pada biji. Fase pengeringan umumnya merupakan fase terpanjang dari tahapan penyangraian. Setelah fase pengeringan, rasa dan warna mulai berkembang pada biji. Setelah suhu biji semakin tinggi reaksi eksotermik pada biji, seperti reaksi Maillard terjadi. Reaksi ini menghasilkan warna, rasa, dan aroma yang khas. Selain itu, karbon dioksida yang dihasilkan selama penyangraian menyebabkan biji membengkak lebih lanjut lalu biji mengeluarkan suara *crack* seperti biji yang meledak dari kulitnya (Fadai *et al.*, 2017).

Proses sangrai memunculkan flavor biji kakao dan memberikan warna pada produk akhir. Proses penyangraian melibatkan biji kakao baik dalam ukuran, kadar air atau kematangan biji saat dipanen atau difermentasi yang tidak seragam. Suhu, waktu dan jumlah uap air yang terlibat dalam proses penyangraian tidak hanya bergantung pada asal usul kakao tetapi juga pada jenis coklat atau produk yang dibutuhkan dari proses dan jenis alat penyangraian yang digunakan. Dalam penyangraian, sejumlah perubahan terjadi pada biji kakao seperti kehilangan air bersama dengan terlepasnya

beberapa asam volatil, menggelapkan warna biji dan, terlepasnya kulit dari nib (Dand, 2011).

Meningkatnya intensitas perlakuan panas menyebabkan karakter biji kakao berkembang luar biasa apalagi dengan komposisinya yang unik, memungkinkan banyak reaksi kimia rumit terjadi, dan paling menonjol adalah reaksi Maillard yang dimulai dengan transformasi reaksi asam amino atau peptida dengan gula. Reaksi tersebut dapat dimulai bahkan pada suhu kamar, namun menjadi dominan pada suhu di atas 100 °C. Reaksi ini memberikan efek besar pada sifat organoleptik makanan karena menghasilkan banyak aroma yang mudah menguap dan juga sebagai polimer pembentuk warna (Andruszkiewicz *et al.*, 2020), serta mengurangi keasaman pada biji kakao dengan menguapnya senyawa asam volatile (Rocha *et al.*, 2017)

Menyangrai adalah proses penting untuk pengembangan flavour kakao. Kepahitan dan *astringency* berkurang dan citarasa kakao yang diinginkan berkembang. Pemilihan waktu dan suhu pemanggangan yang tepat memungkinkan kondisi fitokimia dapat dipertahankan tanpa mengurangi citarasa dari biji kakao (Lemarcq *et al.*, 2020).

E. Citarasa biji kakao

Flavor adalah sensasi yang sangat kompleks, terutama terdiri dari aroma dan rasa, kemudian dilengkapi dengan respons sentuhan dan suhu. Namun, ciri yang terpenting dari *flavor* adalah aroma. Pentingnya persepsi

bau terhadap *flavor* menjadi sangat jelas ketika seseorang terkena flu dan hanya dapat merasakan karakteristik *flavor* dengan respons rasa, sentuhan, dan suhu. Karena pentingnya aroma untuk memberi persepsi *flavor* sebagian besar penelitian analitis *flavor* berfokus pada konstituen yang mudah menguap atau bau makanan (Heath, 1999).

Pengembangan aroma kakao adalah hasil dari berbagai proses teknologi dan metabolisme. Fermentasi dan penyangraian adalah langkah penting di dalam pengembangan aroma biji kakao. Senyawa yang muncul selama penyangraian adalah alkohol, eter, furan, pirazin, tiazol, asam, ester, imina, amina, dan pirrole. Meskipun demikian, golongan senyawa paling penting adalah pirazin dan strecker aldehida. Senyawa pirazin (2 - methylpyrazine, 2,5 - dimethylpyrazine, 2,3,5 - trimethylpyrazine and 2,3,5,6 - tetrapyrazine) merupakan produk reaksi millard yang terbentuk selama penyangraian biji kakao fermentasi. Selama penyangraian, konsentrasi pirazin semakin meningkat (tergantung waktu dan suhu perlakuan), sehingga semakin meningkatkan pirazin tersubstitusi. Senyawa khusus yang dikenal sebagai *cocoa/nutty* adalah: 2,3 - dimethylpyrazine, trimethylpyrazine, tetramethylpyrazine, 3 (atau 2), 5 - dimethyl - 2 (atau 3) - ethylpyrazine, 3,5 (atau 6) - diethyl - 2 - methylpyrazine. tiga aldehida Strecker hadir dengan kuat yaitu rasa coklat: 2 - ethylpropanal, 2 - methylbutanal, dan 3 - methylbutanal (Marseglia *et al.*, 2020).

F. Reaksi Maillard

Sebagian besar studi tentang reaksi Maillard pada makanan membahas tentang komponen aroma yang mudah menguap dan sebaliknya hanya sedikit laporan terkait pada rasa (Lane & Nursten, 1983). Reaksi Maillard antara gula pereduksi dan asam amino adalah reaksi umum dalam makanan yang terjadi akibat proses termal yang menyebabkan pembentukan citarasa dan warna coklat dari beberapa makanan yang dimasak, sekaligus juga kehilangan asam amino esensial yang ikut serta terlibat dalam reaksi sebagai pembentukan produk reaksi. Faktor utama yang mempengaruhi tingkat reaksi Maillard adalah suhu dan waktu dimana faktor tersebut sangat bergantung pada kondisi saat proses berlangsung meliputi pH, aktivitas air dan ketersediaan reaktan yang didasarkan pada karakteristik produk (Jaeger *et al.*, 2010)

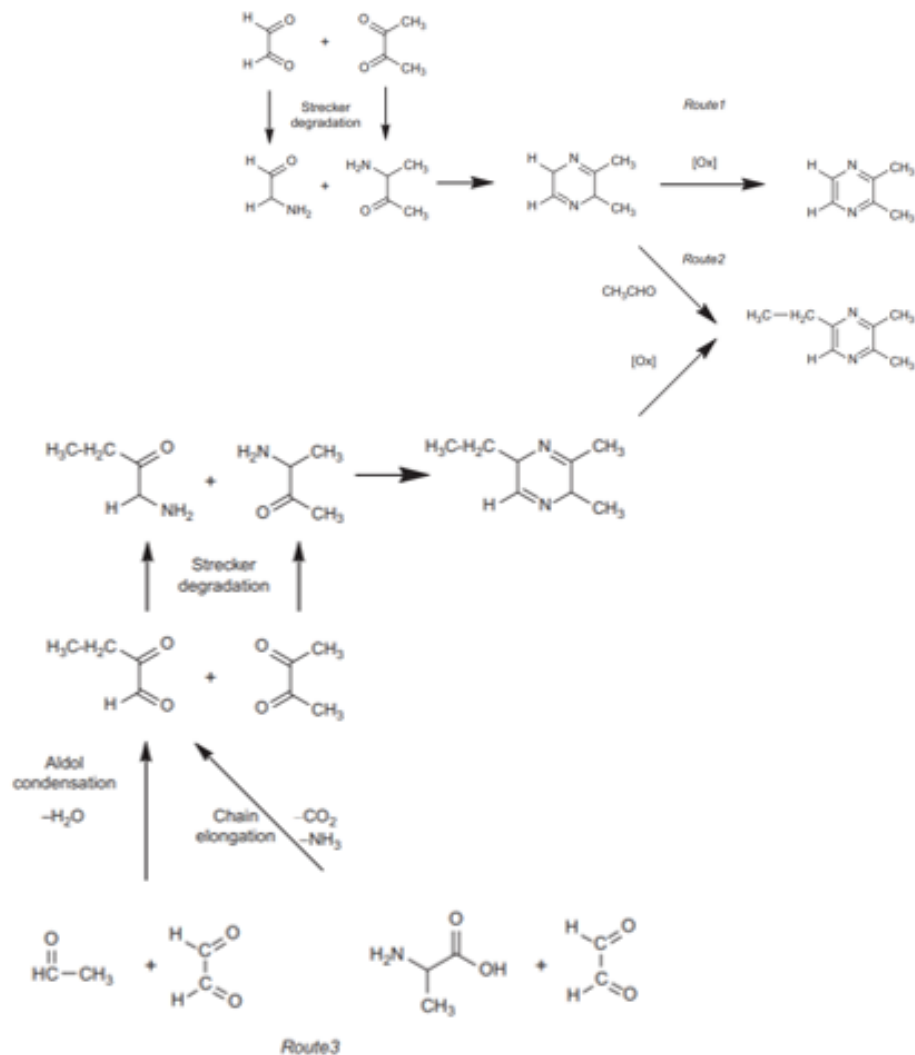
Pada reaksi Maillard, ketika gula pereduksi dipanaskan bersama dengan amina, beberapa reaksi terjadi dan menghasilkan banyak senyawa yang terbentuk dengan cepat pada suhu tinggi dan aktivitas air yang rendah, diantaranya menghasilkan pigmen coklat serta citarasa yang diinginkan dan tidak diinginkan seperti yang terjadi selama menggoreng, menyangrai dan memanggang (BeMiller, 2019c). Produk-produk reaksi Maillard kadang-kadang merupakan produk antara dan atau juga produk akhir dari proses reaksi Maillard (Arihara *et al.*, 2019).

Reaksi Maillard disusun dengan beberapa tahapan, dimulai dengan tahap reaksi melibatkan pembentukan dasar Basa Schiff antara amino bebas dan kelompok karbonil (reaksi amino-karbonil), lalu diikuti oleh penataan ulang pangkalan Schiff ke senyawa Amadori. Tahap menengah dimulai dari senyawa Amadori kemudian bereaksi lebih lanjut oleh beberapa jalur, seperti enolisasi, dehidrasi, kondensasi aldol, dan degradasi strecker, untuk menghasilkan banyak senyawa (Arihara *et al.*, 2019; Parker, 2015b)

Degradasi Strecker adalah reaksi paralel yang terjadi dalam reaksi Maillard. Reaksi ini menghasilkan senyawa volatil, seperti aldehida strecker, pyrrolin, dan pirazin yang sangat penting dalam menentukan profil citarasa dari makanan yang dipanaskan (Arihara *et al.*, 2019).

Pirazin adalah kelompok senyawa volatil mengandung nitrogen heterosiklik yang berkontribusi terhadap aroma panggang pada roti, daging, dan citarasa *nutty* dalam produk makanan. Reaksi Maillard adalah cara penting untuk mensintesis reaksi senyawa pirazin (Yu *et al.*, 2021). Menurut Parker, (2015), pirazin terbentuk dari kondensasi karbonil-amina dari dua keton amino (dihasilkan selama degradasi strecker) untuk membentuk dihydropyrazine, yang berturut-turut mengalami oksidasi, hal ini diilustrasikan dalam gambar 2 rute 1, menunjukkan pembentukan 2,3 - dimethylpyrazine langsung dari glyoxal dan 2,3 - butanedione. Pirazine dengan substitusi yang lebih banyak, kemungkinan besar akan dihasilkan dari rute alternatif di mana salah satu substituen datang dari aldehida. Substituen metil dapat berasal dari

formaldehida melalui degradasi strecker glisin, substituen etil dari asetaldehida melalui degradasi strecker alanin atau sistein (atau dapat juga berasal dari lipid), serta isopropil, 2 - methylbutyl dan 3 - methylbutyl masing-masing kelompok berasal dari valin, isoleusin dan leusin. Pada kasus 2,3 - dimethyl 5 - ethylpyrazine, ada beberapa jalur yang mungkin dilewati. Kelompok etil dimungkinkan berasal dari asetaldehida dan prekursoranya adalah glyoxal dan 2,3 - butanedione, dalam hal ini, dihydropyrazine mengalami reaksi kondensasi dengan asetaldehida (diilustrasikan pada gambar 2, rute 2). Ini adalah rute non-oksidatif yang bisa sama-sama menyediakan salah satu kelompok metil melalui kondensasi formaldehida. Beberapa metil-substituen berasal dari penambahan glisin, di bawah degradasi Strecker dalam bentuk formaldehida, mengakibatkan peningkatan pembentukan pirazin tersubstitusi. Terdapat jalur untuk penggabungan asetaldehida ke dalam etilprazine, salah satunya adalah penggabungan asetaldehida ke dalam struktur dikarbonil sebelum pembentukan cincin pirazin (gambar 2, rute 3). Hal ini dapat dicapai melalui kondensasi aldol dengan asetaldehida, misalnya, glyoxal (gambar 2, kiri bawah) untuk menghasilkan 1,2 - butanedione. Senyawa 1,2 - butanedione dan 2,3 - butanedione kemudian dapat dilanjutkan melalui jalur oksidatif untuk membentuk pirazin yang sama. Kondensasi 1,2 - butanedione dengan molekul kedua dari asetaldehida dapat menyebabkan pembentukan 3,4 - hexanedione dan pembentukan 2,3 - dietilpyrazines.



Gambar 2 Mekanisme Pembentukan Senyawa Pirazin (Parker, 2015b).

Selanjutnya, perpanjangan rantai substituen dapat dicapai langsung dari interaksi alanin (atau asam amino lainnya seperti valin, leusin atau isoleusin) dengan glioxal (gambar 2, kanan bawah). Dalam beberapa kondisi, kerangka karbon yang merupakan bagian dari glisin, dapat ditemukan di cincin pirazin. Dalam campuran dikarbonil / asam amino, ada banyak permutasi dan

kombinasi kondensasi karbonil - amina yang dapat menyebabkan pembentukan pirol dan pirazin. Misalnya dikarbonil dapat mengalami degradasi Strecker, namun di sisi lain dikarbonil dapat juga membentuk basa Schiff ganda dengan glisin yang dapat berulang meninggalkan dua glisin berbasis karbon dalam cincin pyrazine.

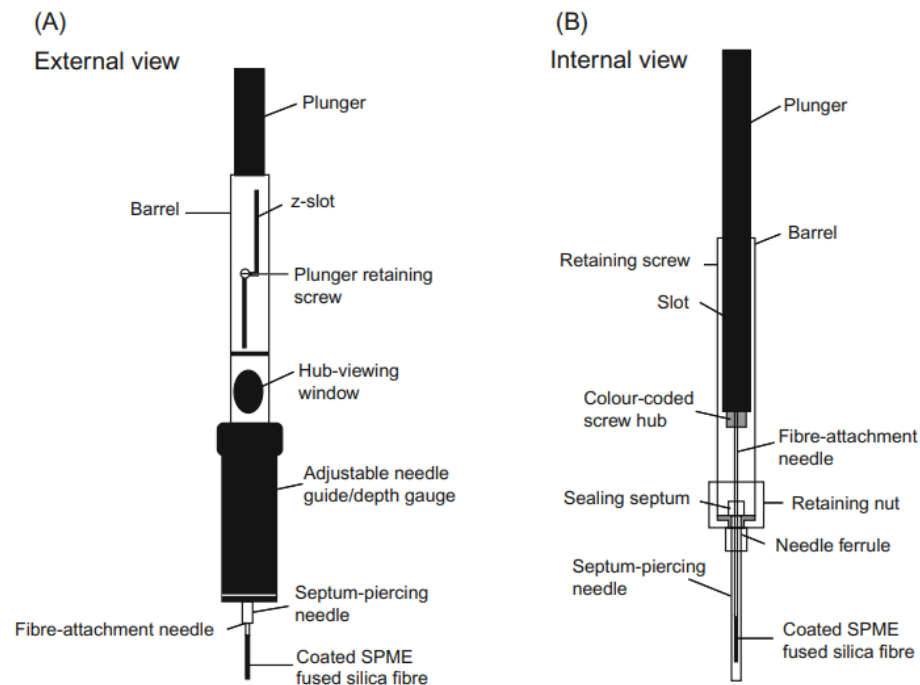
Gula pereduksi, adalah adalah gula yang memiliki gugus aldehid (aldosa) atau keton (ketosa) bebas yang memiliki kemampuan untuk mereduksi senyawa pengoksidasi. Reaksi redoks menyebabkan gugus karbonil pada gula berubah menjadi gugus karboksil, sebagai catatan ketosa tidak dapat teroksidasi secara langsung akan tetapi hanya dapat bereaksi dalam suasana basa dimana, gugus keton diubah menjadi aldehid dengan perpindahan tautomerik yang memindahkan gugus karbonil ke bagian akhir rantai (BeMiller, 2019a).

Asam amino dalam reaksi Maillard memiliki dua peran terpisah, yang pertama adalah mempromosikan langkah pertama dalam reaksi (kondensasi gula-amino), dimana setiap asam amino dapat berpartisipasi dan beberapa jauh lebih reaktif daripada yang lain. Peran kedua adalah asam amino tertentu sebagai prekursor untuk menghasilkan aroma spesifik melalui degradasi strecker (Parker, 2015b, 2015a).

G. Ekstraksi

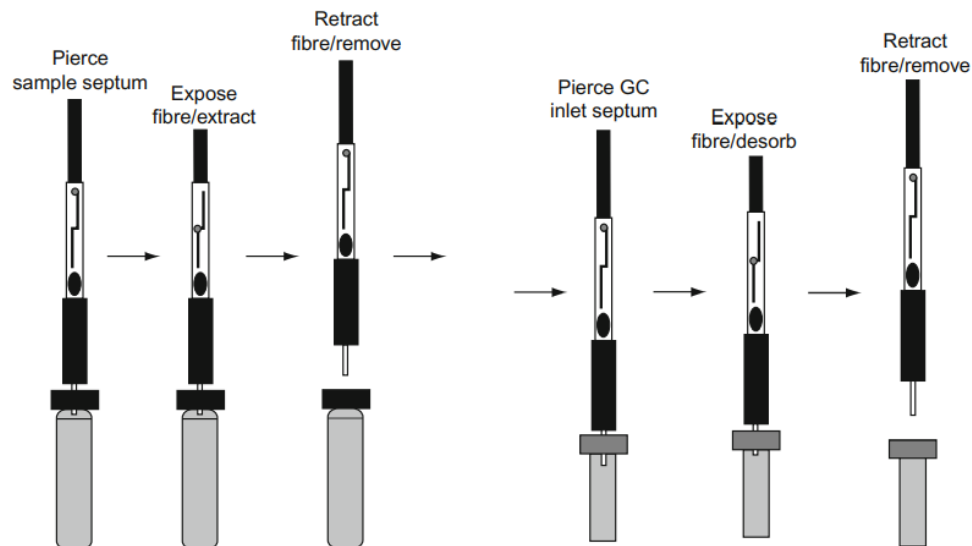
Mengidentifikasi komponen aroma volatil dalam produk alami sulit dilakukan mengingat bahwa senyawa aroma pada makanan terdistribusi ke seluruh matriks makanan sehingga menyulitkan isolasi senyawa aroma volatile. Selain karena konsentrasi senyawa aroma yang sangat rendah kehadiran gula, karbohidrat, lipid, protein, dan air sebagai unsur utama menyulitkan proses pemisahan. Konsentrasi senyawa aroma yang rendah dalam produk makanan memerlukan teknik isolasi yang tepat agar senyawa aroma mudah terpisah dari unsur utama yang terdapat dalam makanan (Heath, 1999).

Metode *Solid Phase Microextraction* (SPME) merupakan metode ekstraksi yang dapat digunakan secara luas pada berbagai analit seperti gas, cairan dan padatan. SPME bisa digunakan untuk ekstraksi langsung pada analit dengan membenamkan serat ke dalam jarum suntik atau dapat juga digunakan secara tidak langsung untuk menganalisis komposisi sampel cair dan padat dengan mengekstraksi analit dari *headspace* di atasnya (HS-SPME). Perangkat SPME terbuat dari serat silika yang dilapisi dengan lapisan tipis (5-100 nm) dari sorbent polimer yang sesuai atau cairan tak bergerak. Sesudah ekstraksi, serat ditempatkan di dalam instrumen pengukuran (GC, HPLC atau CE), kemudian analit diserap dari serat ekstraksi untuk selanjutnya dianalisa (Spietelun *et al.*, 2010).



Gambar 3 Skematik alat ekstraksi SPME (A; tampak luar dan B; tampak dalam) (Shirey, 2012)

Metode Mikroekskopi fase padat (SPME) dikembangkan untuk memungkinkan ekstraksi senyawa volatil tanpa menggunakan pelarut apa pun, dimana senyawa volatil terikat pada serat silika yang dilapisi oleh polimer di area *headspace* sampel. Ekstraksi sudah dapat dilakukan dalam suhu kamar, namun, penggunaan suhu dengan panas sedang dianggap lebih baik karena dapat meningkatkan volatilitas. Senyawa volatile yang terperangkap pada serat kemudian dilepaskan dalam sistem GC selama injeksi melalui mekanisme desorption (Jati & Budi, 2011)



Gambar 1 Langkah ekstraksi SPME (metode perendaman langsung) dan desorpsi termal dalam GC (Shirey, 2012)

Berdasarkan penggunaan jenis seratnya, SPME terdiri dari serat polar, non-polar dan bipolar. Serat polar dapat dilapisi oleh polyacrylate (PA) atau carbowax-divinylbenzene (CW-DVB) Serat nonpolar dapat dibangun dari polydimethyl silox-ane (PDMS). Sementara serat bipolar adalah kombinasi antara polimer polar dan nonpolar. Serat bipolar dapat menangkap spektrum senyawa yang lebih besar dan dapat dikembangkan dari bahan polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) atau Carboxen-PDMS (Jati & Budi Tunjung Sari, 2011)

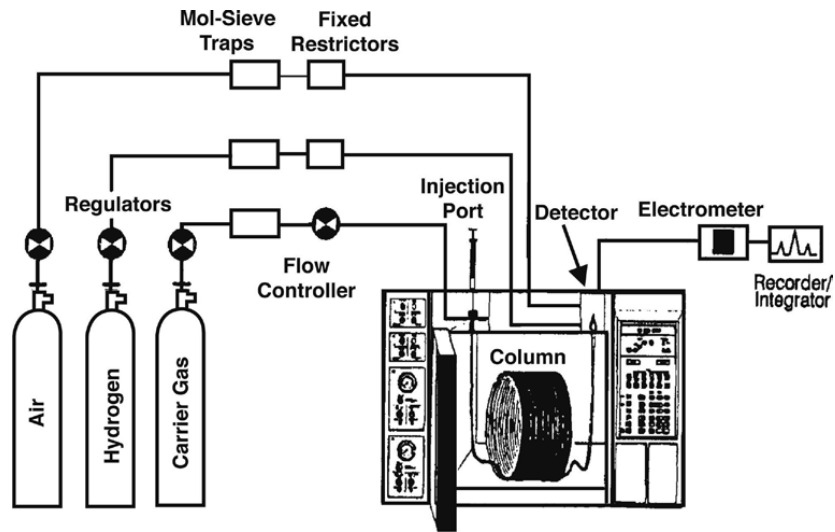
H. Instrumen Analisa

1. Gas kromatografi massa spektroskopi (GC-MS)

Terminologi umum kromatografi adalah istilah umum yang diterapkan pada berbagai macam teknik pemisahan berdasarkan pembagian atau distribusi sampel (zat terlarut) antara fase bergerak berupa gas atau fluida superkritis dengan fase diam berupa cairan atau biasanya padat. Sifat interaksi antara molekul tiap fase berbeda sehingga memungkinkan terjadi pemisahan berbagai jenis molekul (Ismail & Nielsen, 2010).

Kromatografi gas (GC) adalah salah satu teknik pemisahan tercepat dan paling berguna. Kromatografi gas mengharuskan sampel diubah dalam keadaan uap dan diangkut oleh gas pembawa melalui kolom yang dikemas dengan fasa cair yang dilapisi pada penyangga padat (GLC) atau hanya adsorben padat tanpa lapisan fase cair (GSC) (Shugar & Ballinger, 1996). Gas kromatografi (GC) digunakan untuk memisahkan komponen volatil yang stabil secara termal dari suatu campuran dimana bahan volatil dipisahkan berdasarkan beberapa sifat, antara lain titik didih, ukuran molekul, dan polaritas (Qian *et al.*, 2010).

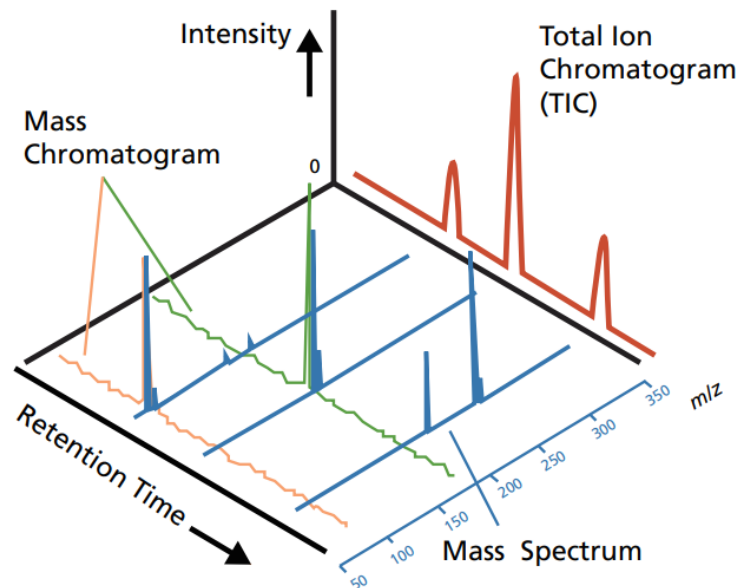
Tipikal kromatografi gas terdiri dari: suplai gas pembawa, port injeksi sampel, kolom, oven kolom, detektor, dan sistem perekam / integrator. Diagram blok di bawah menunjukkan komponen GC utama yaitu:



Gambar 2 Diagram sistem kromatografi gas (Peterson & Reineccius, 2017)

Spektrometri massa (MS) adalah teknik deteksi yang sangat sensitif yang membentuk, memisahkan dan mendeteksi ion dalam fase gas. Ketika digabungkan dengan GC, spektrometri massa segera mengionisasi senyawa *eluted* gas, memisahkan ion dalam ruang hampa berdasarkan rasio massa - ke-muatan (m/z) dan akhirnya mengukur intensitas setiap ion. Intensitas ini dicatat untuk menghasilkan serangkaian spektrum massa yang menampilkan intensitas ion relatif terhadap m/z . Hasil akhir gcms adalah kromatogram massa. *Total Ion Current Chromatogram* (TIC) adalah kromatogram yang dibuat dengan menyimpulkan intensitas semua massa puncak spektral milik scan MS yang sama. Detektor MS dapat menghitung kuantitas menggunakan intensitas puncak atau daerah puncak dan mengidentifikasi senyawa menggunakan waktu retensi dari kromatogram. Data seperti waktu retensi, berat molekul dan spektrum massa yang diperoleh dari GC-MS dapat diambil

dan digunakan untuk pencarian perpustakaan spektral. Dengan perangkat lunak tambahan, GCMS dapat menghitung massa yang akurat dan memperkirakan komposisi molekul. Metode ini dikenal sebagai analisis kualitatif (Shimadzu, 2020)

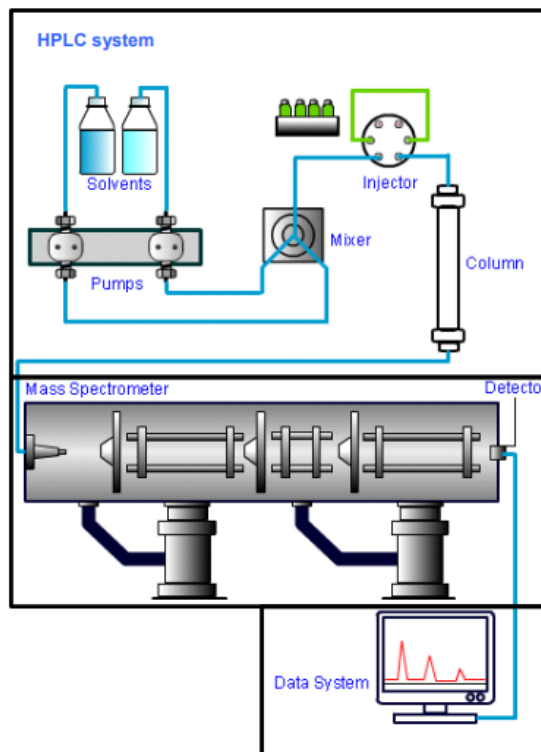


Gambar 3 Tipe Kromatogram massa GCMS (hijau dan oranye), kromatogram ion total (TIC, merah) dan massa spectrum (biru) (Shimadzu, 2020)

2. Liquid Kromatografi Massa Spectroscopy (LC-MS)

Kromatografi Cair / Spektrometri Massa (LC / MS) dengan cepat menjadi alat yang disukai dikarenakan teknik analisis yang kuat, menggabungkan daya pisah kromatografi cair dengan daya deteksi spektrometri massa. LC/MS secara signifikan memperluas efektivitas penggunaan analitis Spektrometri massa ke sejumlah senyawa organik yang jauh lebih besar, cocok untuk analisis senyawa polar, ionik, senyawa tidak

tahan panas dan senyawa tidak menguap. Dianggap lebih efisien dibandingkan dengan GC/MS karena LC/MS menghilangkan kebutuhan akan bahan kimia serta waktu yang digunakan untuk persiapan sampel pada analisa menggunakan GC/MS. Data LC / MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu (Anonim, 1998).



Gambar 4 Diagram LC/MS (Crawford Scientific, 2004).

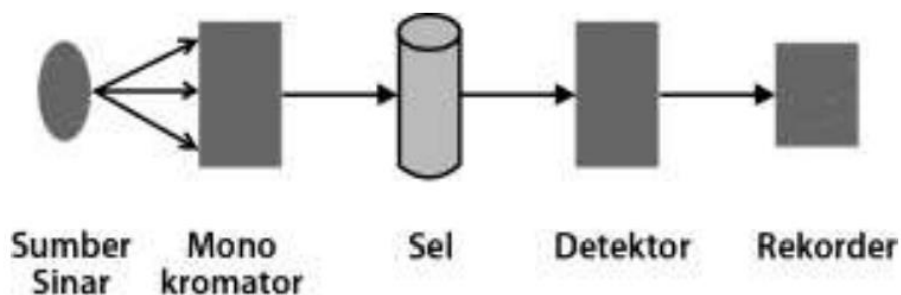
Terdapat beberapa tahapan Proses yang terpisah dalam analisis LC-MS, biasanya ini meliputi: (1) Pemisahan komponen sampel menggunakan kolom HPLC di mana analit dipisahkan secara berbeda antara fase gerak

(eluen) dan fase diam (dilapisi ke bahan pendukung dan dikemas ke dalam kolom). Mekanisme retensi dan pemisahan akan tergantung pada mode kromatografi tetapi mungkin melibatkan, interaksi hidrofobik, pertukaran ion, pasangan ion, lokalisasi permukaan, dan lain-lain. (2) Spesies sampel yang dipisahkan kemudian disemprotkan ke dalam sumber tekanan atmosfer (API) di mana mereka diubah menjadi ion dalam fase gas dan sebagian besar eluen dipompa untuk dibuang. (3) Penganalisis massa digunakan untuk mengurutkan ion menurut rasio massa terhadap muatannya. Jenis analisa yang paling populer termasuk *Quadrupole*, *Time of Flight*, *Ion Trap* dan *Magnetic Sector*. Penganalisis massa dapat digunakan untuk mengisolasi ion dengan massa spesifik terhadap rasio muatan atau untuk 'memindai' semua nilai m/z ion yang ada. Detektor digunakan untuk 'menghitung' ion yang muncul dari penganalisis massa, dan juga dapat memperkuat sinyal yang dihasilkan dari setiap ion. Jenis detektor yang banyak digunakan meliputi: pengganda elektron, dinoda, fotodioda, dan pelat multi saluran. Semua analisis dan deteksi massa dilakukan di bawah vakum tinggi yang dibuat menggunakan kombinasi pompa garis depan (roughing) dan turbo molekuler (Crawford, 2004)

3. Spektrofotometri Ultra Violet/Sinar Tampak (UV-VIS)

Spektrofotometer UV VIS adalah instrumen yang dirancang untuk mengukur absorbansi di wilayah UV VIS. Dimana intensitas cahaya yang melewati larutan sampel diukur dalam bentuk *kuvette* dan membandingkannya dengan intensitas cahaya sebelum melewati sampel (Zackiyah, 2016)

Metode identifikasi dan penentuan zat menggunakan spektrofotometri didasarkan pada adanya hubungan antara posisi dan intensitas pita penyerapan radiasi elektromagnetik, di satu sisi, dan struktur molekul di sisi lain. Hasil spektrum Elektronik didapatkan dari perubahan keadaan energi electron dalam molekul sebagai akibat penyerapan di wilayah UV-VIS, dimana perubahan tergantung pada probabilitas transisi elektronik antara keadaan energi molekul itu sendiri (Marczenko & Balcerzak, 2000).



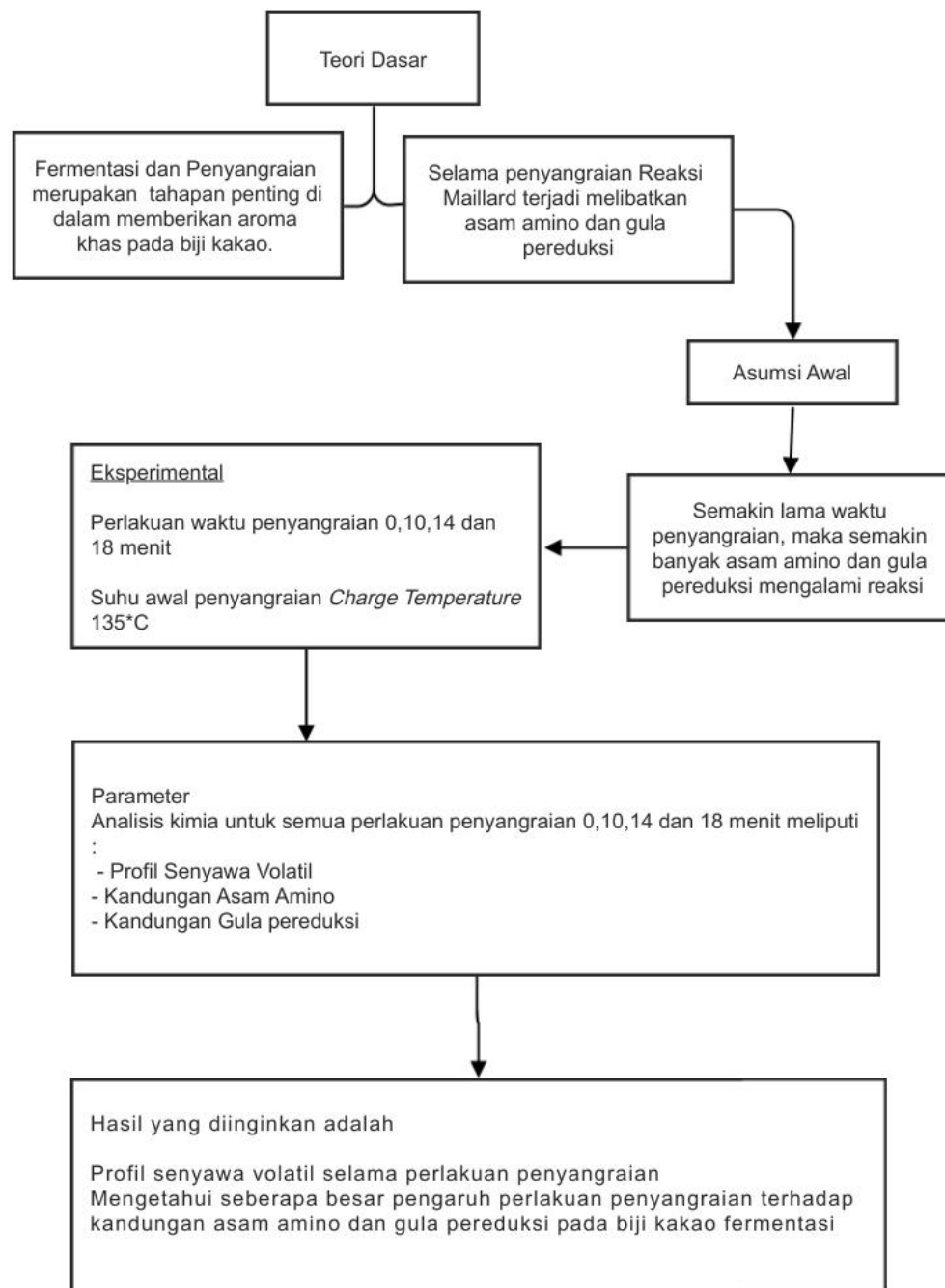
Gambar 5 Komponen Alat Spektrofotometer (Zackiyah, 2016)

I. Kerangka Berpikir

Biji kakao merupakan bahan utama dalam pembuatan coklat. Kualitas produk akhir coklat sangat dipengaruhi oleh kualitas biji kakao itu sendiri.

Kualitas biji kakao dapat diperoleh dengan memilih varitas biji kakao yang terbaik serta melakukan tahapan-tahapan pasca panen sebelum pengolahan biji kakao menjadi cokelat. Tahapan pasca panen biji kakao yang paling penting adalah fermentasi dan penyangraian. Kedua tahapan tersebut berkontribusi dalam memberikan aroma khas pada biji kakao. Selama penyangraian terdapat sejumlah waktu yang digunakan untuk menghasilkan kualitas biji kakao yang diinginkan. Waktu yang digunakan tersebut menyebabkan banyak reaksi kimia yang terjadi. Banyaknya reaksi yang terjadi mengindikasikan adanya senyawa yang terdegradasi dan atau berkurang sebagai akibat reaksi tersebut. Asam amino dan gula pereduksi sebagai komponen prekursor aroma dipastikan mengalami perubahan selama proses penyangraian berlangsung.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pada tahapan mana dalam penyangraian, aroma khas biji kakao terbentuk secara optimum, menganalisa seberapa besar pengaruh lama penyangraian terhadap kandungan asam amino dan gula reduksi pada biji kakao yang disangrai dan mengidentifikasi senyawa-senyawa volatile yang diduga berkontribusi besar terhadap pemberi aroma khas pada produk cokelat.



Gambar 6 : Skema Kerangka Berpikir

I. Hipotesis

H0 : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kandungan asam amino, dan gula pereduksi yang disangrai menggunakan 4 perlakuan waktu penyangraian

H1 : Terdapat perbedaan yang signifikan dari kandungan asam amino, dan gula pereduksi yang disangrai menggunakan 4 perlakuan waktu penyangraian