

# PERUBAHAN SUHU, PH PULP DAN PH KEPING BIJI SERTA AKTIVITAS POLIFENOL OKSIDASE (PPO) PADA FERMENTASI BIJI KAKAO MULIA (*Theobroma Cocoa L.*)

CHANGES IN TEMPERATURE, PH OF PULP, PH OF COTYLEDON AND POLYPHENOL OXYDASE (PPO) ACTIVITY DURING FERMENTATION OF COCOA EDEL (*Theobroma Cocoa L.*)

Siti Hartanti<sup>1</sup>, Novi Sulistyani<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Studies were carried out on Kedaton Estate PTPN XII at Jember – East Java to indicate the changes of temperature of cocoa beans, pH of pulp, pH of cotyledon and polyphenol oxydase activity during fermentation process. The results showed that the temperature of heap beans rose from 25°C up to 40°C for 40 hours and reached 50°C after 60 hours of fermentation. The pH of pulp increased gradually from 4.07 to 5.07, but in contrast with the pH of cotyledon decreased from 6.69 to 4.55. While polyphenol oxydase decreased from 61,968 unit/mg protein to 4,220 unit/mg protein during 60 hours fermentation.

**Keywords:** Cocoa beans, fermentation, temperature, pH, polyphenol oxydase activity.

## PENDAHULUAN

Pada pengolahan biji kakao tahapan fermentasi memegang peranan penting karena menentukan munculnya precursor flavor, hilangnya rasa sepat dan astringensi. Biji kakao dikelilingi oleh pulp (lendir) yang tumbuh bersama-sama biji. Pulp terdiri dari sel parenkim seperti spon yang kaya akan gula (10-13%), pentosan (2-3%), asam sitrat (1-2%) dan garam (8-10%). Selama fermentasi pulp yang mengandung gula-gula sederhana dirombak menjadi etanol oleh sel-sel khamir pada kondisi anaerob, dan timbul panas. Timbulnya panas tersebut terlihat oleh kenaikan suhu dari 28,5 °C menjadi 37°C untuk tumpukan biji yang tidak diaduk dan biji yang diaduk suhu mencapai 45 °C selama fermentasi 48 jam (Said *et al.*, 1981). Pulp kakao bertindak selaku substrat untuk pertumbuhan mikroorganisme yang dirombak menjadi cairan.

Said *et al.*, (1981) menyatakan fermentasi biji dalam kotak tanpa pengadukan pH biji turun dari 5,5 menjadi 4,7 dan apabila diulang fermentasi biji dilakukan pengadukan pH turun dari 6,5 menjadi 4,7 selama fermentasi 48 jam. Sedang Rohan (1963) menyatakan bahwa pH pulp meningkat dari 3,6 menjadi 4,5 selama fermentasi 54 jam (2,5 hari) dan menjadi 6,5 selama fermentasi 148 jam (7 hari). Diketahui pula bahwa masuknya udara ke tumpukan biji diikuti masuknya bakteri asam asetat yang merubah etanol menjadi asam asetat. Bersamaan itu akan terjadi penetrasi asam kedalam biji yang menyebabkan perubahan keasaman dan kematian biji.

Kematian biji menyebabkan beberapa enzim dalam proses fermentasi menjadi aktif. Enzim-enzim tersebut adalah protease, amino peptidase, karboksi peptidase, invertase, glikosidase dan polifenol oksidase (PPO) (Hansen *et al.*, 1998). Bekerjanya enzim PPO dibantu oleh oksigen dan ion Cu. Pada kebanyakan tanaman letak substrat (fenol) dan enzim PPO saling berdampingan, enzim terdapat pada plastida sedang fenol mayoritas berada dalam vakuola (Czaniski & Catesson, 1972; Vaughn & Duke 1981b; Vaughn & Duke 1984b). Selama fermentasi karena peningkatan suhu dan penetrasi asam menyebabkan membran organela mengalami kerusakan sehingga enzim PPO bertemu dan bereaksi dengan substrat (fenol) menghasilkan quinon, quinon berpolimerisasi dan bereaksi dengan protein membentuk melanoidin (*browning*) (Espin *et al.*, 1997). Untuk mengetahui aktivitas enzim PPO yang tersisa pada biji kakao, dilakukan ekstraksi dari jaringan tanaman, kenyataannya sangat sulit mendapatkannya karena letaknya yang berdampingan dengan substrat (Mathew & Papia, 1971). Untuk mencegah interaksi antara fenol dengan enzim PPO, digunakan aliran nitrogen cair (Balasingham & Ferdinand, 1970), atau dilakukan pada suhu -20 sampai -30°C. Selanjutnya ditambahkan PVP (polivinil pirolidon) atau PVPP (polivinil polipirolidon) yang berfungsi untuk memerangkap fenol selama separasi subseluler pada awal purifikasi enzim dari jaringan (Cash *et al.*, 1978). Menurut Lehninger (1975) masing-masing enzim mempunyai pH optimum yang berbeda. PH optimum PPO apel sebesar 5,7 dan PPO kulit langsep dicapai pada pH optimum 6,0 (Hartanti, 1998b). Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim menunjukkan semakin meningkat suhunya enzim akan semakin aktif. Aktivitas enzim PPO kentang mencapai maksimum pada suhu optimum 30 °C (Hartanti, 1998a) dan suhu optimum PPO kenit 30 °C (Hartanti & Syairozi, 2002). PPO yang diperoleh dari sumber yang berbeda mempunyai spesifitas substrat yang berbeda pula, seperti asam klorogenat dan asam kafeat adalah spesifitas substrat untuk PPO apel (Cillier *et al.*, 1990), asam klorogenat untuk PPO kentang (Hartanti, 1998a), piro-katekol untuk PPO kulit buah langsep (Hartanti *et al.*, 2000) dan sebagainya. Lee *et al.*, dalam Hansen (1998b) telah mempurifikasi secara parsial PPO biji kakao aktivitas o-difenol stabil pada suhu tinggi dan pH optimum 6,8. Penelitian lain menunjukkan bahwa 4-methyl-katekol sebagai substrat mempunyai pH optimum 5,4 dan suhu aktivitas antara 5 - 65 °C dan rusak pada suhu tinggi (Eskin, 1990).

<sup>1</sup> Staf Pengajar FTP-UNEJ;

<sup>2</sup> Alumnus FTP UNEJ

Penelitian bertujuan untuk mengetahui perubahan suhu, pH diluar dan didalam biji serta aktivitas enzim polifenol oksidase selama fermentasi biji kakao jenis Edel.

**METODE PENELITIAN**

**Bahan dan Alat**

Penelitian menggunakan buah kakao Edel yang diambil dari kotak fermentasi di Kebun Kedaton salah satu Kebun Renteng PTPN XII di Jember. Bahan kimia berupa: buffer Tris HCl; EDTA; Mercaptoetanol;; DIECA dan PMSF dibeli dari Merck. Pirocatechol, DEAE selulose, polivinil polipirolidon (PVPP) dibeli dari Sigma. Alat penelitian yang dipakai, stemper-mortar, spectrophotometer dengan recorder merek Hitachi, sentrifuge merek Sorvall dan peralatan gelas.

**Metode**

Masing-masing sample berupa biji kakao sebanyak 1 (satu) kg yang diikutkan pada proses fermentasi pabrik dengan menggunakan kotak fermentasi berkapasitas 1 (satu) ton. Setelah fermentasi berlangsung 19 jam isi kotak kemudian dipindahkan ke kotak II, setelah 21 jam isi kotak dipindahkan ke kotak III, biji berada di kotak III selama 24 jam. Sampel diambil setiap 2 jam sampai fermentasi selesai. Selama fermentasi diamati suhu dan pH. Sampel segera dibawa ke laboratorium untuk dipisahkan testa dari

kotiledon dan disimpan dalam tabung berisi nitrogen cair. Diagram alir ekstraksi PPO dari biji kakao dapat dilihat pada Gambar 1.

**Ekstraksi Enzim**

Ekstraksi enzim dilakukan dengan metode Fritz *et al.*, 1986 (di dalam Wong *et al.* 1990) yang dimodifikasi. Kotiledon kakao, dihaluskan dalam aliran gas nitrogen cair dengan memakai stamper dan mortar. Sampel ditambah 35 ml 40 mM buffer Tris HCl pH 7.3 ; 5 mM EDTA; 15 mM Mercaptoetanol; 2% PVP; 100 mM DIECA dan 1,74 mg PMSF/g biji yang setara dengan 100 µL PMSF dalam 100 mM/g biji. Sampel disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit suhu 4°C dan diuji supernatannya .

**Presipitasi PPO**

Presipitasi menggunakan 30% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kemudian disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm dan diambil supernatannya. Presipitasi selanjutnya menggunakan 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yang dihomogenkan dan disentrifuse kembali, pelet disimpan pada suhu 4°C. Untuk pengujian aktivitas enzim pelet dilarutkan dengan 20 mM Tris HCl pH 7,3. selanjutnya dilakukan filtrasi menggunakan gel Shepadek G-25 (volume 5 mL) yang telah diekuilibrasi dengan 25 mL buffer Tris HCl 20 mM pH 7,3.

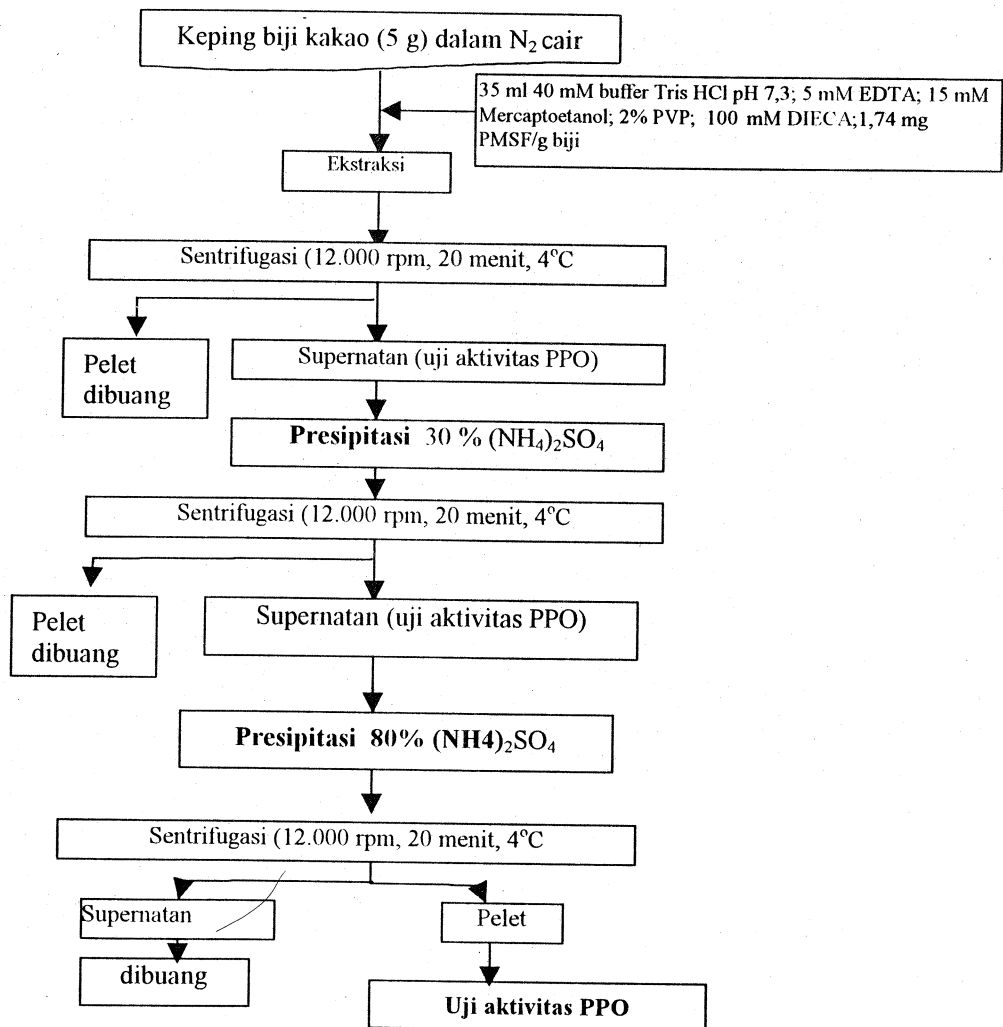


Fig. 1. Flow chart extraction of polyphenol oxydase from cocoa bean

### Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengujian aktivitas enzim menggunakan metode Spektrofotometri menurut Kim's (1987) yang dimodifikasi dari Mc. Cord dan Klara (1983) dalam Wong *et al.*, 1990. Campuran uji terdiri dari 2 mL 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 5,6 ditambah 0,5 mL 10 mM pirocatechol dan 50  $\mu\text{L}$  0,005 M  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  dan dibiarkan selama 5 menit. Supernatan diambil sebanyak 20  $\mu\text{L}$  dilakukan uji enzim menggunakan larutan penguji yang sudah dipersiapkan. Aktivitas enzim polifenol oksidase diukur dengan spektrofotometer pada absorbansi 400 nm dan dihitung dari kurve linier yang terbentuk. Satu unit aktivitas enzim dihitung berdasarkan pada PPO yang mengkatalisis reaksi oksidasi pirocatechol menjadi orto-quinon yang menyebabkan perubahan absorbansi pada 400 nm sebesar 0,01 permenit per mL enzim pada suhu 25 °C.

**Perhitungan banyaknya enzim:** dari 5 gram biji diperoleh 4 mL enzim. Enzim yang digunakan dalam pengukuran aktivitas adalah 20  $\mu\text{L}$ , berarti dalam 20  $\mu\text{L}$  enzim ekuivalent dengan  $(20 \times 10^{-6} / 4 \times 10^{-3}) \times 5 \text{ gram} = 25 \times 10^{-3} \text{ gram}$  biji kakao. Dengan demikian dalam 1 gram biji kakao terdapat enzim sebanyak  $= 20 / 25 \times 10^{-3} = 8 \times 10^{-2} \mu\text{L}$

### Penentuan Protein Terlarut

Penentuan protein metode Bradford menggunakan standart Bovine Serum Albumin (BSA) dengan prosedur analisis sebagai berikut. Pembuatan reagen Bradford menggunakan CBB G-250 sebanyak 100 mgam dilarutkan dalam etanol 95% dan ditambah asam fosfat 85% kemudian ditera sampai volume 1 L. Sebanyak 0,015 mL sample protein ditambah 1 mL reagen Bradford dan divortek setelah 5 menit diamati pada  $\lambda$  595 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian "Perubahan Suhu, pH Pulp dan pH Keping Biji serta Aktivitas Polifenol Oksidase (PPO) Selama Fermentasi Biji Kakao Mulia (*Theobroma cocoa* L.)" seperti berikut.

### Perubahan Suhu Selama Fermentasi

Pengamatan suhu pulp selama fermentasi biji kakao di kotak fermentasi hasilnya seperti terlihat pada Gambar 2. Terlihat mula-mula suhu tumpukan biji kakao dari 25°C meningkat sampai menjadi 40°C pada jam ke-48 dan naik lagi sampai 50 °C pada jam ke-60 hal itu disebabkan oleh reaksi eksotermis yang terjadi pada perombakan gula pulp menjadi alkohol oleh khamir yang kemudian dilanjutkan dengan reaksi oksidasi menjadi asam asetat oleh bakteri. Hasil perlakuan menunjukkan fermentasi berlangsung cukup baik (jam ke-48) suhu mencapai 40°C, sesuai pernyataan Said *et al.* (1981) dan Rohan (1963)

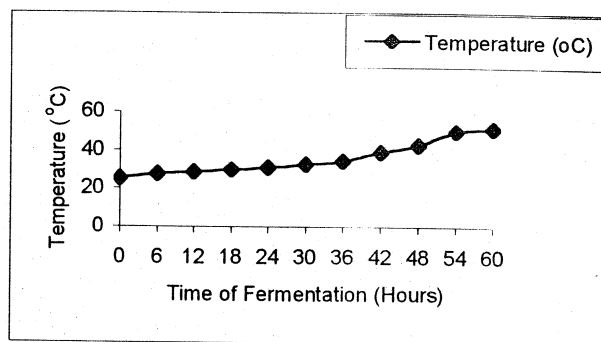


Fig. 2. Change of temperature cocoa bean during fermentation

### Perubahan pH Selama Fermentasi

Selama fermentasi pH pulp mengalami peningkatan, sedang pH keping biji mengalami penurunan seperti ditunjukkan Gambar 3. Terjadinya kenaikan pH pada pulp disertai penurunan pH keping biji disebabkan oleh pembentukan asam asetat oleh bakteri asam asetat dan selanjutnya terjadi penetrasi asam asetat tersebut kedalam keping biji sehingga meningkatkan keasaman keping biji kakao.

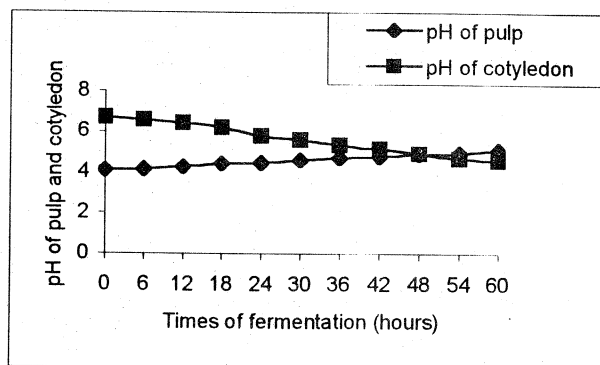


Fig. 3. PH of pulp and cotyledon cocoa beans during fermentation

PH pulp pada akhir fermentasi (jam ke 60) sebesar 5,07 menunjukkan bahwa fermentasi berlangsung cukup sempurna (Rohan, 1963). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pH keping (didalam biji) mengalami penurunan dari 6,69 menjadi 4,55; sedang pulp (diluar biji) terjadi kenaikan pH dari 4,07 menjadi 5,07 peristiwa tersebut terjadi selama fermentasi berlangsung 60 jam, hal itu sesuai pernyataan Said *et al.*, (1981) dan Rohan (1963).

### Karakteristik Enzim PPO Biji Kakao

Karakteristik enzim PPO kakao ditunjukkan oleh  $K_m$ ,  $V_{maks}$ , suhu optimum dan pH optimum. Ekstrak enzim PPO dari biji kakao belum difermentasi diuji dengan menggunakan substrat piro-katechol hasilnya dibuat grafik  $1/V_0$  versus  $1/S$  sebagai Gambar 4. Dari Gambar 4. terlihat bahwa garis  $y = 0.8039x + 0.0114$  memotong sumbu y pada  $0.0114 \text{ Unit}^{-1} = 1/V_{maks}$  dan memotong sumbu x =  $-1/K_m = -0.04 \text{ mM}^{-1}$ . PPO biji kakao Edel mempunyai nilai  $V_{maks} = (1/0.0114) \text{ Unit} = 87 \text{ Unit}$  dan  $K_m = (1/0.04) \text{ mM} = 25 \text{ mM}$ , berdasarkan besarnya nilai  $K_m$  tersebut lebih besar bila dibandingkan dengan PPO buah malatya apricot dengan nilai  $K_m$  sebesar 6,6 mM, berarti afinitas pirokatekol terhadap enzim PPO kakao rendah (Arsenal *et al.*, 1998).

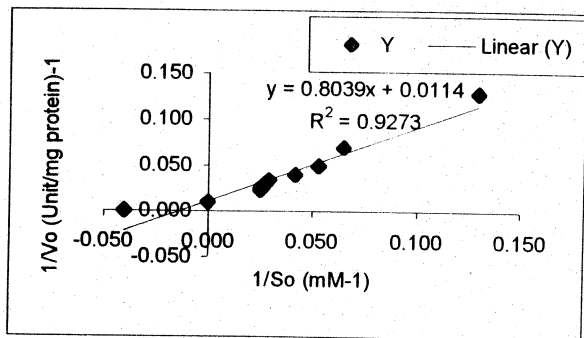


Fig. 4. Corellation between  $1/V_o$  (1/velocity) ( $\text{Unit}^{-1}$ ) with  $1/S_o$  ( $\text{mM}^{-1}$ )

Dari hasil pengamatan aktivitas PPO kakao jenis Edel menunjukkan suhu optimum PPO sebesar  $45^\circ\text{C}$ . dan pH optimum sebesar 5,4 sesuai dengan hasil penelitian Reeves dalam Hansen *et al.*, (1998) yang menggunakan substrat 4-methyl-katekhhol.

#### Aktivitas PPO Selama Fermentasi

Hasil pengamatan aktivitas PPO selama fermentasi dapat dilihat pada Gambar 5.

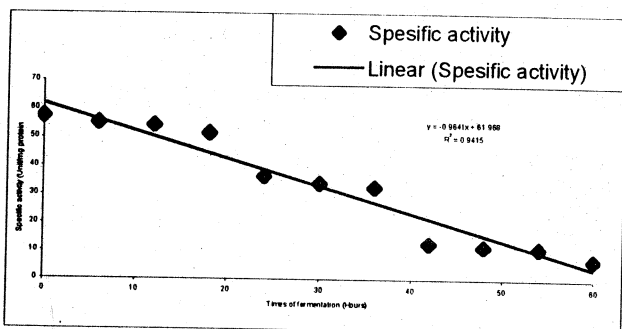


Fig. 5. Corellation between time of fermentation with PPO activity

Dari Gambar 5. terlihat aktivitas enzim mengalami penurunan dari 61,968 unit/mg protein menjadi 4,22 unit/mg protein pada fermentasi jam ke-60. Bila ditinjau dari kenaikan suhu dan penurunan pH keping biji maka aktivitas PPO seharusnya meningkat secara bertahap sampai mencapai maksimum baru terjadi penurunan aktivitas. Pengamatan menunjukkan hasil yang berbeda, hal itu kemungkinan disebabkan akibat kenaikan suhu dan penetrasi asam asetat ke dalam biji maka enzim PPO keluar dari plastida bertemu dengan substrat fenol, didukung masuknya udara ( $\text{O}_2$ ) maka terjadilah reaksi oksidasi membentuk quinon yang berpolimerisasi, selanjutnya berinteraksi dengan protein membentuk melanoidin (*browning*). Reaksi terjadi selama fermentasi karena didukung oleh kondisi lingkungan suhu dan pH. Tetapi karena suhu meningkat terus sampai  $50^\circ\text{C}$  menyebabkan protein enzim terkoagulasi, juga disebabkan oleh aktivitas enzim-enzim yang lain, dan pembentukan produk menghambat aktivitas enzim PPO sehingga setelah fermentasi berjalan 60 jam aktivitas PPO menjadi rendah.

#### KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian sebagai berikut: Selama fermentasi terjadi peningkatan suhu tumpukan biji dari  $25^\circ\text{C}$  sampai mencapai  $50^\circ\text{C}$ ; pH pulp mengalami kenaikan dari 4,07 meningkat sampai 5,07; pH keping biji menurun dari 6,69 menjadi 4,55; dan aktivitas polifenoloksidase (PPO) keping biji dari 61,968 unit/mg protein menurun 4,22 unit/mg protein selama waktu fermentasi 60 jam.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Balansingham, K and Ferdinand, 1970. *The purification and properties of a ribonuclease, O-diphenol oxydase from potatoes*. Biochem. 118, 15-23.
- Cash, J. R., S.G. Bhat, and R.L. Gowda, 1998. *Purification and characterization of polyphenol oxydase from new cultivar of Indian pineapple fruit*. Dept. Biochem. & nutrition, Institute of Mayshore, India.
- Czaniski, Y and A.M. Catesson, 1972. *Localization ultrastructurale d'activites polyphenol oxidasiques dans les chloroplasts de nicotiana glutinosa*. J. microscopie 15, 409-414.
- Hansen, C. E., Buni C. Margarita del Olmo, 1998. *Enzyme activities in cocoa beans during fermentation*, Journal Sci Food Agriculture (77) : Halaman 273 – 281.
- Hartanti, S., 1998a. *Isolasi poliphenol oksidase dari kentang*. Majalah Argopura ISSN 0126-141X. Vol (18) No. 3 dan 4 Tahun pp. 47-58 Badan Penerbit Universitas Jember.
- Hartanti, S., 1998b. *Karakteristik enzim poliphenol oksidase dari buah langsep (Lancium domesticum L.)*. Hasil Penelitian. Universitas Jember
- Hartanti, S., A. Damayanti, B. Sugiharto, 2000. *Karakterisasi poliphenol oksidase kulit buah langsung (Lancium domesticum) dengan berbagai substrat*. Seminar PATPI. Surabaya
- Hartanti, S., E. M. A. Syairozi, 2002. *Karakteristik fisiko kimia polifenol oksidase buah kenit*. Jurnal Teknologi Hasil Pertanian. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. FTP-UNEJ bekerja sama dengan Badan Penerbit Universitas Jember.
- Lehninger, A. L. , 1975. *Introduction To Biochemistry*. World Publishers, Inc.
- Mathew, A.G. and H.A. Papia, 1970. *Food Browning as a Polyphenol Reaction*. Adv. Res.. 1976-145.
- Rohan, T. A., 1963, *Processing of Raw for the Market*, Roma ; FAO of the United Nations.
- Said, M.B., M.P.G.S. Jayawardena. R.J. Samirakoddy and W.T. Parera, 1981. *Preconditioning of fresh cocoa beans prior to fermentation to improve qualiyy commercial approach* . Revista Theobroma 11 (3) 332-344.
- Vaughn, K. C. and C.O. Duke. 1981. *Tissue location on polyphenol oxydase in sorghum protoplasm*. Physiol. Plant 108,319-327
- Vaughn, K. C. and C.O. Duke 1984. *Tentoxin stops the processing of poliphenol oxydase into an active enzyme*. Physiol. Plant 60, 257-262.
- Wong M.K., P.S. Dimick, R.H. Hammerstedt, 1990. *Extraction and performance liquid chromatography enrichment of polyphenol oxydase from theobroma cacao seeds*. J. of Food Science 55, 1108-111