

Chimica et Natura Acta

p-ISSN: 2355-0864 e-ISSN: 2541-2574

Homepage: <http://jurnal.unpad.ac.id/jcena>

Pengaruh Fermentasi Biji Kakao dengan Menggunakan *Kluyveromyces sp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter xylinum*, Enzim Papain dan Bromelain serta Sistein Terhadap Prekursor Cita Rasa serta Kandungan Nutrisi dan Polifenolnya

Linda Yuniar, Saadah Diana Rachman, R. Ukun M.S. Soedjanaatmadja*

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21, Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363

*Penulis korespondensi: ukun@unpad.ac.idDOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n3.20859>

Abstrak: Indonesia merupakan produsen kakao terbesar kedua di dunia. Kualitas biji kakao yang diekspor oleh Indonesia kurang baik karena tidak difermentasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk meningkatkan nilai nutrisi, kandungan polifenol serta prekursor cita rasa biji kakao melalui proses fermentasi dengan penambahan campuran mikroorganisme *Kluyveromyces sp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter xylinum*, enzim papain dan bromelain serta inhibitor sistein. Adapun variasi fermentasi yang dilakukan adalah (A) biji kakao tidak difermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* pada hari ke-0 dan *L. plantarum* pada hari ke-1, *A. xylinum* pada hari ke-2, (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* pada hari ke-0 dan *L. plantarum* pada hari ke-1, *A. xylinum* pada hari ke-2 dan campuran enzim eksogen pada hari ke-3, dan (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* pada hari ke-0 dan *L. plantarum* pada hari ke-1, *A. xylinum* pada hari ke-2 serta campuran enzim eksogen dan inhibitor sistein pada hari ke-3. Fermentasi dihentikan pada hari ke-5 kemudian biji kakao dianalisis kadar protein dengan metode Kjeldahl, kadar lemak dengan metode Sokletasi, kadar air dengan metode pengeringan, kadar abu dengan metode gravimetri, asam amino bebas dengan metode kromatografi kertas, kadar karbohidrat dengan metode *by difference*, pH dengan alat pH meter, dan polifenol dengan metode Folin Ciocalteu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan *Kluyveromyces sp.*, *L. plantarum*, *A. xylinum*, campuran enzim bromelain, papain dan sistein dapat mempengaruhi kandungan nutrisi biji kakao hasil fermentasi. Kadar protein perlakuan A (biji kakao tanpa fermentasi) adalah 10,39% sedangkan pada perlakuan D terjadi peningkatan sampai 16,67%. Kadar lemak pada perlakuan A 50,50% dan pada perlakuan B 52,24%. Proses fermentasi pun menurunkan kadar karbohidratnya, dimana pada perlakuan A 29,11% sedangkan perlakuan E 23,03%. Perlakuan D dan E menunjukkan kadar nutrisi yang paling baik, ditunjukkan dengan adanya peningkatan kandungan asam amino bebas hidrofobiknya yang merupakan prekursor cita rasa. Proses fermentasi menaikkan pH hingga 6-7, dimana nilai ini telah memenuhi standar fermentasi yang baik yaitu >5,00, sehingga biji kakao hasil penelitian ini memiliki kualitas yang baik. Proses fermentasi menurunkan kadar polifenol totalnya, dimana pada perlakuan A 7,15% sedangkan perlakuan B 2,41%. Penambahan inhibitor sistein (pada perlakuan E-4; E-5) dapat mempertahankan kadar polifenol totalnya yaitu 6,11 dan 5,45% dengan penurunan 14-23%. Kandungan katekin perlakuan E-4 sebesar 5,75%.

Kata kunci: fermentasi, kakao, *Kluyveromyces sp.*, *L. plantarum*, *A. xylinum*

Abstract: Indonesia is the second largest producer of cocoa in the world. The quality of the cocoa beans exported by Indonesia less well because it is not fermented. The purpose of this research is to improve the nutritional value, the content of polyphenols as well as cocoa flavor precursors through fermentation with addition of a mixture of microorganisms *Kluyveromyces sp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter xylinum*, the enzyme papain and bromelain as well as inhibitor of cysteine. As for the variation of the fermentation were done as the follows: Treatment A; unfermented cocoa beans, Treatment B; natural fermentation, Treatment C; fermentation by *Kluyveromyces sp.* on 0th day and *L. plantarum* on 1st day, *A. xylinum* on 2nd day, Treatment D; fermentation by *Kluyveromyces sp.* on 0th day and *L. plantarum* on 1st day, *A. xylinum* on 2nd day and exogenous enzyme mixture on 3rd day, and Treatment E; fermentation by *Kluyveromyces sp.* on 0th day and *L. plantarum* on 1st day, *A. xylinum* on 2nd day, exogenous enzyme mixture and cysteine inhibitor on 3rd day. Fermentation was stopped on 5th day. Then the protein content in cocoa beans was determined by Kjeldahl method, fat content by Soxhletation method, moisture content by drying methods, ash content by gravimetric method, free amino acids by paper chromatography method, carbohydrate by difference method, the value of pH using a pH meter

and polyphenols content by Folin Ciocalteu method, respectively. The results showed that the addition of *Kluyveromyces sp.*, *L. plantarum*, *A. xylinum*, a mixture of the enzyme bromelain, papain and cysteine could affect the nutrient content of fermented cocoa beans. Protein content of the Treatment A (unfermented cocoa beans) was 10.39%, while the Treatment D was increased to 16.67%. Fat content of the Treatment A was 50.50% and the Treatment B was 52.24%. The fermentation process also decreases of the carbohydrates content, which 29.11% on the Treatment A, and 23.03% on the Treatment E. The Treatments D and E had the best nutrients content, which indicated by more of hydrophobic amino acids content as the compound of the flavor precursors. The fermentation process increases the pH to 6-7, where these values have a good fermentation standard i.e. > 5.00, so the beans research has a good quality. The fermentation process also could reduce of the total polyphenols content, it was 7.15 on the treatment A, and 2.41 on the Treatment B. The addition of cysteine inhibitor could maintain the total polyphenol content they were 6.11% (on the Treatment E-4) and 5.45% (on the Treatment E-5), respectively, with decreasing of 14-23%. Catechin content of E-4 treatment was 5.75%.

Keywords: fermentation, cocoa, *Kluyveromyces sp.*, *L. plantarum*, *A. xylinum*

PENDAHULUAN

Indonesia berperan penting sebagai produsen kakao mentah yang tingkat produksinya terus meningkat dalam beberapa tahun terakhir, pada tahun 1995-2000 mengalami peningkatan sebesar 11,18%, pada 2000-2005 sebesar 1,95%, dan 2005-2010 sebesar 3,31%. Indonesia merupakan negara kedua terbesar yang memproduksi biji kakao setelah negara Cote d'Ivoire tetapi kualitas kakao dari Indonesia menjadi komoditas ekspor kesepuluh di dunia, hal ini karena tingkat keasaman yang tinggi, aromanya kurang tajam, dan kualitas yang naik turun. Kualitas kakao Indonesia memiliki mutu yang rendah dalam pasar dunia sehingga dijual dengan harga yang murah (FAO 2010; Ritterbusch *et al.* 1998).

Alasan dilakukan fermentasi kakao adalah untuk menginduksi transformasi biokimia pada biji yang akan menghasilkan pembentuk warna, aroma, dan prekursor rasa dari cokelat. Tanpa adanya fermentasi, biji kakao kebanyakannya pahit dan *astringent* serta tidak meningkatkan rasa. Karakteristik dan kuatnya aroma cokelat dipengaruhi oleh genetik dari berbagai jenis kakao, selama proses fermentasi dihasilkan dan meningkatkan potensi aroma tersebut (Thompson *et al.* 2001).

Mikroorganisme bertanggung jawab dalam fermentasi kakao secara spontan dan peranan fisiologisnya selama proses berlangsung. Fermentasi dengan ragi *Kluyveromyces sp.* telah dilakukan oleh Leal *et al.* (2008), dalam penelitiannya menggunakan *K. marxianus* yang memiliki aktivitas pektinolitik yang bertambah menyebabkan pengeluaran cairan (*sweating*) dari massa fermentasi lebih awal, mengembangkan kualitas produk akhir yang sangat bagus. Bakteri asam laktat dipilih setelah pengamatan produksi asam laktat pada pH asam memerlukan oksigen dan tahan terhadap suhu. Jenis *Lactobacillus* yang dipilih adalah *Lactobacillus plantarum*, salah satu bakteri asam laktat yang mendominasi pada proses fermentasi. Pada penelitian Samah *et al.* (1993) bakteri *Acetobacter xylinum* digunakan sebagai inokulum tunggal menghasilkan biji kakao dengan pH tinggi dan asam asetat yang lebih tinggi (Schwan & Wheals 2004; Camu *et al.* 2008).

Ada beberapa faktor lingkungan seperti pH, suhu, dan kelembaban terhadap fermentasi yang mempengaruhi reaksi enzimatik biji kakao. Masing-masing enzim mempunyai pH optimum dimana enzim paling aktif dan dengan rentang yang telah ditentukan, reaksi enzimatik berjalan cepat ketika suhu dinaikan. Perubahan signifikan pada pH, suhu, dan kelembaban terjadi selama fermentasi kakao dan proses pengeringan (Thompson *et al.* 2001).

Suhu fermentasi yang dihasilkan dari kondisi yang diberikan berpengaruh terhadap reaksi atau aktivitas mikroorganisme dan enzim. Mikroorganisme dan enzim menunjukkan tingkat sensitivitas yang tinggi melihat pada aktivitas maksimum yang terjadi pada rentang suhu 20- 50°C, selain tergantung pada nilai pH, suhu fermentasi juga memerankan peran utama (Ritterbusch *et al.* 1998).

Hidrolisis protein menggunakan protease eksogen pada kakao dilakukan untuk memastikan terbentuknya prekursor cita rasa dan mempengaruhi rasa kakao. Enzim protease sering dimanfaatkan karena memiliki ciri yang baik secara kinetik dan struktural. Enzim protease yang umum digunakan adalah enzim papain yang berasal dari getah pepaya dan enzim bromelain yang berasal dari bonggol nanas. Enzim protease ini akan memecah protein menjadi asam amino dan peptida yang merupakan salah satu prekursor cita rasa kakao (Brito *et al.* 2004; Thompson *et al.* 2001).

Biji kakao dan produk derivatnya kaya akan antioksidan seperti katekin, epikatekin, dan prosiyanidin yang termasuk senyawa polifenol yang ditemukan juga pada anggur, sayuran, dan teh. Polifenol berperan sebagai prekursor pembentuk rasa pada kakao dan cokelat. Selama fermentasi dan pengeringan, perubahan kimia yang kompleks pada polifenol berakibat pada rasa dan warna cokelat serta konsentrasinya menurun secara cepat. Beberapa inhibitor kimia telah diuji kemampuannya dalam menghambat reaksi enzimatik polifenol oksidase, antara lain seperti asam askorbat dan sistein. Senyawa-senyawa ini dapat berinteraksi langsung dengan enzim polifenol oksidase, kompleks enzim-substrat polifenol, atau produk dari reaksi yang

dihasilkan. Dalam penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Mardiah (1996), sistein mempunyai daya inhibisi lebih tinggi yaitu 83,5% dibanding asam askorbat yang mempunyai daya inhibisi 63,0% (Afoakwa *et al.* 2008; Richard *et al.* 1992; Sapers & Miller 1995).

Selama fermentasi dan pengeringan, perubahan kimia yang kompleks pada polifenol berakibat pada rasa dan warna cokelat. Polifenol banyak terdapat pada sel penyimpanan yang tidak mengandung enzim kemudian berdifusi dari sel penyimpanan untuk mengalami polimerisasi, oksidasi, dan interaksi dengan protein. Polifenol merupakan gugus mayor komponen kakao, kira-kira 10-20% (berat kering) kotiledon dan menyebabkan rasa *astrigent* pada biji kakao. Katekin memiliki jumlah 33-42% dari seluruh polifenol, 92%nya adalah (-)-epikatekin sedangkan 8% katekin lainnya yaitu (+)-katekin, (+)-gallocatekin, dan (-)-epigallocatekin. Lebih dari 50% total polifenol adalah leukosianidin dan kompleks tanin, sedangkan antosianin berperan hanya 5%. Tanin berinteraksi dengan protein melalui proses pencokelatan. Penelitian Forsyth (1952) serta Griffith (1957) menunjukkan bahwa (-)-epikatekin dan leukosianidin merupakan substrat mayor polifenol oksidase biji kakao (Ziegler 2017; Kim & Keeney 1983).

Agen yang paling banyak digunakan untuk mengontrol proses pencokelatan adalah agen *sulfiting*. Adanya efek terhadap kesehatan, beberapa penelitian menentukan agen anti pencokelatan yang bukan senyawa sulfat seperti agen pereduksi (asam askorbat, glutathion, L-sistein), inhibitor enzim (asam karboksilat aromatik, resorsinol tersubstitusi, anion), agen khelat (fosfat, EDTA, asam organik, asam sitrat, asam fosforat), agen pengompleks (siklodekstrin), dan enzim (Pongsakul *et al.* 2006).

L-sistein merupakan inhibitor pencokelatan yang paling efektif yang diikuti oleh kalium metabisulfat, asam askorbat, dan asam sitrat. L-sistein bereaksi dengan kuinon dan atau secara langsung menghambat enzim. Ada dua pendapat mekanisme inhibisi pencokelatan oleh L-sistein: (1) inhibisi disebabkan dari pembentukan konjugat antara kuinon dan sistein, dan (2) sistein mungkin menghambat secara langsung enzim dengan bergabung secara irreversibel dengan tembaga pada sisi aktifnya. Pendapat yang menyatakan sistein mempengaruhi polifenol oksidase secara langsung mungkin benar karena gugus SH pada sistein mempunyai afinitas kuat untuk tembaga dan menggantikan ligan histidin pada sisi aktif enzim dan atau menghilangkan tembaga secara seluruhnya dari enzim yang menghasilkan struktur modifikasi sisi aktif enzim inaktif (Pongsakul *et al.* 2006; Ding *et al.* 2002).

BAHAN DAN METODE

Proses Fermentasi Biji Kakao

Sebanyak 500 g biji kakao dimasukkan ke dalam wadah fermentasi yaitu keranjang bambu yang telah

diberikan alas daun pisang yang telah disterilkan menggunakan autoklaf. Biji yang akan difermentasi ditambahkan inokulum *Kluyveromyces sp.* sebanyak $3-6 \times 10^8$ CFU/mL, *L. plantarum* sebanyak $3-6 \times 10^8$ CFU/mL, *A. xylinum* sebanyak $3-6 \times 10^8$ CFU/mL, sistein serta campuran enzim bromelain dan papain dengan perbandingan (1:1) sesuai dengan rancangan variasi perlakuan masing-masing 1000 UA/ mL/ 150 g. Selanjutnya keranjang bambu ditutup dan fermentasi dilakukan selama 120 jam. Suhu fermentasi diatur menggunakan inkubator yaitu pada suhu 37°C. Setiap 24 jam fermentasi, tumpukan biji kakao diaduk dan diukur nilai pH biji dan *pulp* dengan pH meter. Setelah 120 jam fermentasi dihentikan. Biji kakao dikeringkan di bawah sinar matahari selama beberapa hari. Pada penelitian ini dilakukan beberapa variasi perlakuan yaitu:

- tidak difermentasi
- fermentasi alami
- Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2)
- Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3)
- Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3)

Penentuan pH, Kadar Protein, Lemak, Karbohidrat, Air dan Abu Dari Biji Kakao

Penentuan pH biji kakao diukur dengan pH meter dimana biji kakao digiling dengan menggunakan blender. Sebanyak 0,3 g sampel yang sudah halus dimasukkan ke dalam gelas kimia, ditambahkan 50 mL akuades panas (70°C sampai 80°C), diaduk perlahan-lahan sampai terbentuk suspensi yang harus bebas dari gumpalan-gumpalan. Suspensi disaring dan filtratnya didinginkan sampai suhu kamar, lalu pH filtrat ditentukan pada suhu kamar. Nilai pH dinyatakan sesuai hasil pembacaan yang ditunjukkan oleh pH meter (SNI, 2008). Kadar protein ditentukan dengan metode Kjeldahl (Apriyantoro dkk, 1989), kadar lemak total dengan metode Sokletasi (Ketaren, 1996), kadar air dan kadar abu dengan metode gravimetri, sedangkan kadar karbohidrat ditentukan dengan metode *by difference*, yaitu dengan mengurangi total kadar seluruh komponen (100%) oleh total kadar protein, lemak, air, dan abu yang telah diperoleh. Kadar karbohidrat dihitung dengan persamaan (1) (Apriyantono dkk. 1989).

$$\text{Kadar karbohidrat} = 100\% - (\text{kadar air} + \text{kadar abu} + \text{kadar lemak} + \text{kadar protein}) \dots (1)$$

Penentuan Asam Amino Bebas Hasil Proses Proteolitik dengan Metode Kromatografi Kertas

Biji kakao yang sudah dikeringkan ditimbang sebanyak 0,5 g, dilarutkan dalam 10 mL buffer fosfat pH 7,0. Ekstrak kakao disaring dan diambil filtratnya. Asam amino standar ditimbang sebanyak 0,1 g, dilarutkan dalam 1 mL buffer fosfat pH 7,0. Filtrat

kakao dan larutan asam amino standar ditotolkan pada kertas kromatografi. Noda kakao dibandingkan dengan noda 20 asam amino standar. Sebagai fase gerak digunakan butanol, asam asetat dan air dengan perbandingan 4:1:1.

Penentuan Kadar Polifenol Total dengan Metode Folin Ciocalteu

Biji kakao kering yang telah difermentasi kemudian dihaluskan. Serbuk kakao sebanyak 5 g diekstraksi 3×24 jam dengan metanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian dievaporasi sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat dipartisi dengan *n*-heksana dan akuades kemudian ditambahkan hingga 10 mL sesuai dengan pelarut masing-masing.

Ekstrak polifenol dalam fraksi *n*-heksana dan fraksi air diambil sebanyak 0,1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan 1 mL etanol dan 0,5 mL reagen Folin Ciocalteu lalu dikocok dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan 1 mL natrium karbonat 5% lalu dikocok kembali. Tabung reaksi disimpan pada tempat gelap selama 60 menit lalu disentrifugasi.

Supernatan yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang 725 nm. Sebagai larutan standar digunakan katekin dengan variasi konsentrasi yaitu 0,01; 0,012; 0,014; 0,02% yang selanjutnya dilakukan prosedur seperti perlakuan di atas. Hasil yang diperoleh dengan menggunakan regresi linear dicari nilai *a* dan *b* dan di cari nilai *x* (konsentrasi sampel). Kemudian konsentrasi total sampel dihitung (Andarwulan *et al.* 1999).

Analisis monomerik polifenol kakao dengan RP-HPLC

Sampel yang menunjukkan total polifenol paling tinggi pada metode Folin-Ciocalteu. Selanjutnya dianalisis lebih lanjut dengan RP-HPLC. Sebanyak 50 mg sampel kakao bebas lemak (kakao yang telah disokletasi) ditambahkan 5 mL methanol dan dikocok dengan alat *vortex* selama 20-30 detik hingga homogen. Larutan kemudian dipindahkan ke dalam

tabung sentrifugasi dan didinginkan selama 15 menit pada suhu 0°C, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatant metanolik didekantasi. Ekstraksi diulang sebanyak tiga kali, dengan tahap pendinginan selanjutnya hanya 2 menit. Metanol dihilangkan dari ekstrak dengan *rotatory evaporator* pada suhu 40°C. Sampel pekat selanjutnya dilarutkan dengan 1,5 mL metanol, kemudian diinjeksikan ke dalam alat HPLC (Elwers *et al.* 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai pH dari Biji Kakao Sebelum dan Sesudah Fermentasi

Pada Tabel 1 pH *pulp* kakao pada hari ke-0 (sebelum fermentasi) cenderung asam sekitar 4,7-5,2, hal ini disebabkan adanya asam sitrat sebesar 2-2,5%. Pada awal fermentasi ragi akan tumbuh dan memiliki peranan penting salah satunya dalam pembentukan asam- asam organik seperti asam oksalat, fosforat, suksinat, malat dan asetat yang menyebabkan penurunan pH. Kenaikan pH pada hari ke-2 disebabkan oleh asam sitrat pada *pulp* digunakan oleh ragi dan diubah menjadi asam asetat dan karbondioksida selain itu pengadukan fermentasi setiap 24 jam sekali akan mengoptimalkan aerasi, meningkatkan pertumbuhan mikroba, dan mengurangi tingkat residu asam asetat dan laktat (Tagro *et al.*, 2010; Lehrian & Patterson, 1983; Baker *et al.*, 1994).

Pada hari ke-3 asam-asam organik yang telah dihasilkan pada *pulp* akan berdifusi ke dalam biji sehingga pH biji menurun. Difusi asam organik akan menyebabkan terjadinya kematian biji, perubahan ini akan menginduksi reaksi enzimatik yang akan menghasilkan prekursor cita rasa coklat.

Menurut Susanto, 1994, nilai pH biji kakao hasil fermentasi di atas 5 menunjukkan bahwa fermentasi berlangsung secara sempurna. Nilai pH biji kakao pada penelitian ini telah memenuhi standar sehingga biji kakao hasil penelitian ini telah memiliki kualitas yang bagus.

Tabel 1. Perubahan pH selama fermentasi biji kakao pada lima perlakuan. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3). Hari ke-0 sampai hari ke-2 adalah pH *pulp* dan hari ke-3 sampai hari ke-5 adalah pH biji.

Sampel	Hari ke-					
	0	1	2	3	4	5
A	4,802	-	-	-	-	-
B	5,244	3,452	4,792	6,163	5,952	7,117
C	4,783	3,602	4,299	6,220	6,533	6,876
D	4,817	4,239	5,183	5,448	6,288	6,517
E	4,797	3,769	4,247	5,834	6,241	6,764

Kadar Protein Biji Kakao Sebelum dan Sesudah Fermentasi

Pada Tabel 2, menunjukkan bahwa biji kakao hasil fermentasi memiliki kadar protein yang lebih tinggi daripada biji kakao tanpa fermentasi. Hal ini membuktikan bahwa fermentasi mampu meningkatkan kadar protein dalam biji kakao karena selama fermentasi mikroorganisme menghasilkan berbagai macam enzim dalam biji kakao. Enzim merupakan suatu protein, sehingga adanya enzim akan menaikkan kadar protein. Pada proses fermentasi juga terjadi sintesis biomolekul protein yang dapat menaikkan kadar protein. Jadi mikroba eksogen dapat berkontribusi untuk peningkatan kadar protein di dalam biji kakao. Kadar protein hasil fermentasi dari perlakuan D dan E lebih tinggi daripada perlakuan A, B dan C, hal ini disebabkan penambahan enzim protease eksogen.

Tabel 2. Kadar protein biji kakao pada lima perlakuan hari ke-4 dan ke-5. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3).

Perlakuan	Kadar Protein %	
	Hari ke-4	Hari ke-5
A	10,39	10,39
B	12,09	12,03
C	10,75	13,60
D	16,67	15,70
E	14,41	13,56

Kadar Lemak Total Biji Kakao Sebelum dan Sesudah Fermentasi

Kandungan lemak tidak berubah selama fermentasi dan pengeringan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Roelofsen (1958); Forsyth & Quesnel (1963), dan Lehrian & Patterson (1983). Pada penelitian ini terjadi kenaikan lemak pada perlakuan fermentasi yang ditunjukkan pada Tabel 3, hal ini dapat disebabkan karena pada proses fermentasi mikroba akan menguraikan gula pada biji kakao menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa yang dihasilkan ini akan mengalami glikolisis yang menghasilkan asetil KoA. Asetil KoA ini akan masuk ke dalam siklus asam sitrat sehingga dihasilkan energi. Di sisi lain, jika kebutuhan energi sudah mencukupi, asetil KoA dapat mengalami lipogenesis menjadi asam lemak dan selanjutnya akan bereaksi dengan gliserol dan membentuk trigliserida.

Pada perlakuan E hari ke-4 ke hari ke-5 serta perlakuan A dengan perlakuan D terjadi penurunan lemak, hal ini mungkin disebabkan pada perlakuan tersebut biosintesis protein lebih dominan dibandingkan biosintesis lemak. Selain itu, dimungkinkan pula karena enzim-enzim yang diekspresikan oleh mikroorganisme yang ada selama proses fermentasi adalah enzim-enzim yang bersifat mendegradasi lemak.

Tabel 3. Kadar lemak biji kakao pada lima perlakuan hari ke-4 dan ke-5. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3).

Perlakuan	Kadar Lemak %	
	Hari ke-4	Hari ke-5
A	50,50	50,50
B	49,71	52,24
C	50,86	51,84
D	48,13	49,38
E	51,77	50,13

Kadar Karbohidrat dengan Metode *by difference*

Kadar karbohidrat biji kakao dianalisis dengan menggunakan metode *by difference* yaitu dengan cara mengurangkan 100% dengan kadar abu, kadar protein, kadar lemak dan kadar air dari tiap sampel yang telah diketahui sebelumnya.

Tabel 4. Kadar karbohidrat biji kakao pada lima perlakuan hari ke-4 dan ke-5. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3).

Perlakuan	Kadar Karbohidrat %	
	Hari ke-4	Hari ke-5
A	29,12	29,12
B	27,96	25,62
C	28,00	23,90
D	24,83	25,38
E	23,03	25,46

Kondisi *pulp* buah kakao yang banyak mengandung gula merupakan kondisi yang baik untuk pertumbuhan ragi. Salah satu peranan utama ragi selama fermentasi adalah mengonversi sukrosa, glukosa dan fruktosa menjadi alkohol. Hal tersebut yang menyebabkan penurunan kadar karbohidrat selama fermentasi.

Pada Tabel 4 menunjukkan adanya kenaikan kadar karbohidrat pada perlakuan D dan E hari ke-4 ke hari ke-5, hal ini disebabkan adanya aktivitas enzim glikosidase yang mengubah antosianin menjadi sianidin dan gula.

Hubungan Kadar Protein, Lemak dan Karbohidrat

Dalam jalur metabolisme tiap-tiap nutrisi dapat dibentuk dari metabolisme nutrisi lainnya. Asam amino tertentu (serin, glisin, aspartat, glutamat, dan prolin) dapat disintesis dari karbohidrat atau lemak dan sebaliknya, namun kebanyakan asam amino dapat bertindak sebagai prekursor sintesis untuk karbohidrat atau lemak.

Untuk mengetahui hubungan karbohidrat, protein dan lemak pada penelitian ini telah ditunjukkan dengan jelas pada perlakuan C-5 dan E-4 pada Gambar 3. Pada perlakuan C-5 dan E-4 terjadi penurunan kadar karbohidrat yang sangat signifikan.

Pada perlakuan E, metabolisme karbohidrat cenderung membentuk asetil KoA sebagai prekursor lemak, sehingga perlakuan E memiliki kadar lemak yang tinggi dibandingkan perlakuan A.

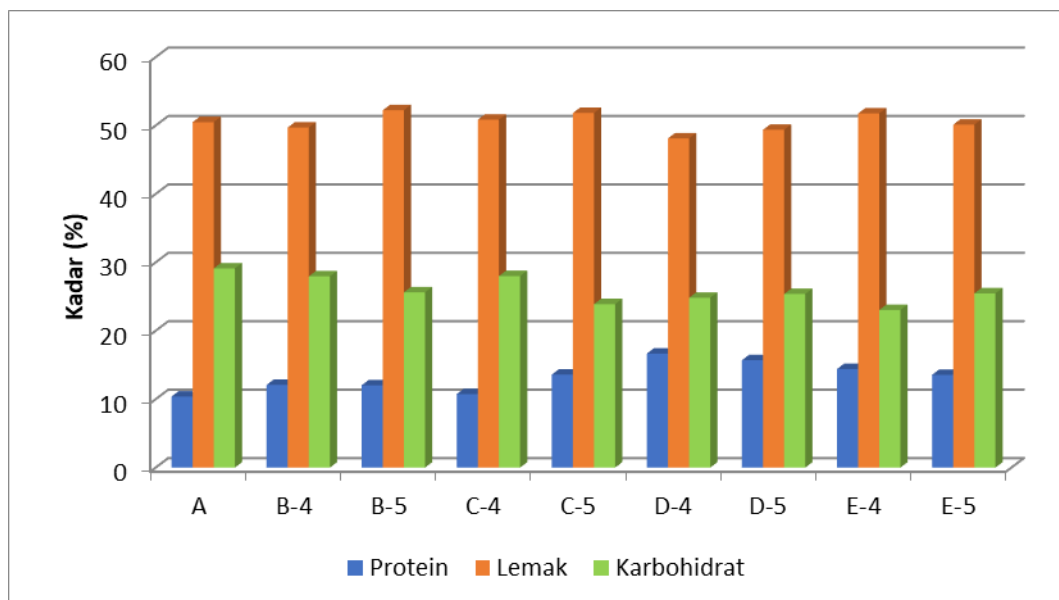
Pada perlakuan C-5, metabolisme karbohidrat cenderung membentuk asam-asam amino penyusun protein, sehingga perlakuan C-5 memiliki kadar

protein yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan B, dimana keduanya merupakan fermentasi yang tidak ditambah enzim eksogen. Seiring dengan penurunan kadar karbohidrat akan diimbangi dengan kenaikan kadar protein dan lemak. Hal ini membuktikan jalur metabolisme antara karbohidrat, protein dan lemak memiliki hubungan yang sangat erat.

Asam Amino Bebas Hasil Proses Proteolitik dengan Metode Kromatografi Kertas

Biji kakao dari lima variasi perlakuan yang diteliti dianalisis asam amino bebasnya menggunakan metode kromatografi kertas dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 5. Asam amino bebas dan oligopeptida dikenal sebagai kunci prekursor dalam aroma kakao yang terbentuk selama pemanggangan jadi perlu diketahui kandungan asam amino yang terdapat dalam setiap sampel biji kakao yang diteliti. Asam amino terbentuk karena adanya protein yang dihidrolisis oleh enzim protease, baik enzim endogen maupun enzim yang ditambahkan dari luar atau enzim eksogen.

Pada metode ini digunakan fase gerak butanol: asam asetat: air (4:1:1) dengan tujuan untuk memisahkan asam amino non-polar (glisin, valin, leusin, isoleusin, metionin, fenilalanin, prolin, alanin, triptopan) dan asam amino polar (asparagin, glutamin, serin, threonin, lisin, arginin, histidin, sistein, tirosin, asam aspartat, asam glutamat). Ninhidrin disemprotkan pada kromatogram hasil kromatografi kertas dengan tujuan agar ninhidrin dapat bereaksi dengan asam amino bebas membentuk zat warna ungu kecuali warna kuning untuk prolin



Gambar 3. Kurva hubungan antara kadar protein, lemak dan karbohidrat pada biji kakao pada lima perlakuan hari ke-4 dan ke-5. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3).

Tabel 5. Kandungan asam amino bebas pada biji kakao pada lima perlakuan hari ke-4 dan ke-5. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3).

Perlakuan	Hari ke-	
	4	5
A	Ser, Lys, Arg, Gly, Ala, Met	Ser, Lys, Arg, Gly, Ala, Met
B	Ser, Lys, Arg, Gly, Ala, Met	Ser, Lys, Arg, Gly, Ala, Met
C	Ser, Lys, Arg, Gly, Ala, Met	Ser, Lys, Arg, Gly, Ala, Met
D	Cys, His, Asp, Thr, Tyr, Trp, Val, Ile, Leu, Phe	Cys, His, Asp, Thr, Tyr, Trp, Val, Ile, Leu, Phe
E	Cys, Lys, His, Asp, Thr, Trp, Val, Ile, Leu, Phe	Cys, Lys, His, Asp, Thr, Trp, Val, Ile, Leu, Phe

sehingga asam amino bebas ini dapat dilihat dan dianalisis. Pada perlakuan D dan E yang diberi penambahan enzim eksogen memberikan kandungan asam amino yang lebih banyak macamnya, artinya enzim protease eksogen akan mengoptimalkan proses hidrolisis protein pada biji menjadi asam amino bebas.

Pada perlakuan D dan E yang diberi penambahan enzim eksogen memberikan kandungan asam amino juga menghasilkan beberapa asam amino bebas yang hidrofobik, yang merupakan prekursor cita rasa kakao. Dengan demikian perlakuan D dan E memungkinkan untuk menghasilkan produk biji kakao hasil fermentasi yang paling baik.

Kadar Polifenol Total dengan Metode Folin Ciocalteu

Kadar polifenol menurun secara signifikan selama fermentasi dan pengeringan. Antosianin (jenis flavonoid) dihidrolisis secara cepat menjadi sianidin dan gula oleh enzim glukosidase. Enzim polifenol oksidase mengubah jenis lain flavonoid, flavanol (utamanya terdiri dari (-) epikatekin) menjadi kuinon. Protein dan kompleks peptida dengan senyawa polifenol memberikan warna cokelat atau kolerasi cokelat/ungu yang tipikal pada biji kakao terfermentasi terkeringkan. Gugus penting lainnya merupakan prekursor reaksi Maillard. Ini dibentuk dari protein penyimpanan dan sukrosa. Sukrosa diubah oleh invertase menjadi gula pereduksi. Protein penyimpanan dihidrolisis oleh enzim peptidase menjadi oligopeptida dan asam amino. Prekursor rasa kakao dilibatkan dalam raksi Maillard selama pemanggangan biji kakao untuk membentuk senyawa rasa kakao.

Salah satu cara untuk mencegah penurunan kandungan polifenol di dalam biji kakao ditambahkan inhibitor yang menghambat enzim polifenol oksidase pada saat fermentasi berlangsung. Pada penelitian kali ini digunakan inhibitor sistein. Sistein merupakan senyawa asam amino yang aman

bagi kesehatan dan dapat menghambat enzim polifenol oksidase dengan baik.

Pertama-tama dilakukan proses ekstraksi biji kakao dengan metode maserasi yang bertujuan untuk mendapatkan ekstrak dari biji kakao. Biji kakao kering yang telah dihaluskan dimaserasi dengan pelarut metanol selama 72 jam. Pelarut metanol digunakan karena metanol merupakan pelarut organik yang dapat melarutkan hampir semua zat-zat organik di dalam biji kakao. Metanol dapat melarutkan semua polifenol di dalam biji kakao. Selain itu, metanol juga bersifat mudah menguap sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak. Setelah itu ekstrak metanol tersebut diuapkan dengan menggunakan evaporator sehingga diperoleh ekstrak metanol pekat. Selanjutnya dilakukan partisi menggunakan pelarut n-heksan untuk melarutkan polifenol yang bersifat non-polar dan menggunakan akuades untuk melarutkan polifenol yang bersifat polar.

Ekstrak polifenol yang didapat kemudian dianalisis menggunakan metode Folin-Ciocalteu, dimana metode ini bekerja berdasarkan reduksi dari gugus hidroksi pada senyawa fenol. Adanya inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat pada larutan Folin Ciocalteu menjadi molibdenum yang berwarna biru (Agbor *et al.* 2005).

Tabel 6 menunjukkan perlakuan A memiliki kandungan polifenol paling tinggi, hal ini dikarenakan tidak terjadi proses fermentasi sehingga aktivitas enzim polifenol oksidase kurang optimum. Perlakuan B, C, dan D menunjukkan adanya penurunan kandungan polifenol hal tersebut karena keempat perlakuan tersebut mengalami proses fermentasi. Adanya penambahan mikroorganisme dan enzim eksogen akan memaksimalkan kerja mikroorganisme endogen dan menyebabkan terjadinya peningkatan enzim polifenol oksidase sehingga semakin banyak polifenol yang teroksidasi. Kandungan polifenol juga akan menurun seiring makin lamanya fermentasi karena semakin lama waktu fermentasi, maka akan semakin banyak

polifenol yang dioksidasi oleh enzim polifenol oksidase, hal ini dapat dilihat pada tabel kandungan polifenol pada fermentasi hari ke-4 lebih tinggi dibandingkan hari ke-5.

Tabel 6. Kadar polifenol total biji kakao pada lima perlakuan hari ke-4 dan ke-5. (A) tanpa fermentasi, (B) fermentasi alami, (C) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), (D) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2) serta campuran enzim papain dan bromelain (3), (E) fermentasi dengan *Kluyveromyces sp.* (0), *L. plantarum* (1), *A. xylinum* (2), campuran enzim papain dan bromelain (3) serta sistein (3).

Perlakuan	Total Polifenol (%)	
	Hari ke-4	Hari ke-5
A	7,15	7,15
B	3,21	2,14
C	3,4	2,57
D	3,1	2,06
E	6,11	5,45

Perlakuan E merupakan fermentasi dengan penambahan mikroorganisme dan enzim eksogen serta inhibitor sistein, penurunan kandungan polifenolnya tidak terlalu jauh dari perlakuan A yaitu sebesar 14,56% dan 23,82%.

Kandungan Katekin pada Biji Kakao

Pada penentuan kandungan katekin, dipilih sampel perlakuan E hari ke-4 karena memiliki total polifenol tinggi. Sampel kakao dihilangkan lemaknya dengan menggunakan *n*-heksan yang merupakan pelarut non-polar agar tidak mengganggu proses analisis. Selanjutnya biji kakao bebas lemak ini dilarutkan menggunakan metanol yang merupakan pelarut organik sehingga diharapkan bisa melarutkan katekin yang cenderung bersifat polar yang terkandung di dalam biji kakao. Sampel diuji kadar katekinnya menggunakan metode RP-HPLC karena fase diam yang berada di dalam kolom bersifat non polar dan sampel yang akan dianalisis adalah katekin yang cenderung bersifat polar. Hasil pengujian konsentrasi katekin dari sampel kakao E-4 yaitu sebesar 5,75% atau sebesar 94% dari polifenol total.

KESIMPULAN

Penambahan *Kluyveromyces sp.*, *L. plantarum*, *A. xylinum*, campuran enzim bromelain, papain dan sistein dapat mempengaruhi kandungan nutrisi biji kakao hasil fermentasi. Kadar protein perlakuan A (biji kakao tanpa fermentasi) adalah 10,39% sedangkan pada perlakuan D terjadi peningkatan sampai 16,67%. Kadar lemak pada perlakuan A 50,50% dan pada perlakuan B 52,24%. Proses

fermentasi pun menurunkan kadar karbohidratnya, dimana pada perlakuan A 29,11% sedangkan perlakuan E 23,03%. Perlakuan D dan E menunjukkan kadar nutrisi yang paling baik, ditunjukkan dengan adanya peningkatan kandungan asam amino bebas hidrofobiknya yang merupakan prekursor cita rasa. Proses fermentasi menaikkan pH hingga 6-7, dimana nilai ini telah memenuhi standar fermentasi yang baik yaitu >5,00, sehingga biji kakao hasil penelitian ini memiliki kualitas yang baik.

Proses fermentasi menurunkan kadar polifenol totalnya, dimana pada perlakuan A 7,15% sedangkan perlakuan B 2,41%. Penambahan inhibitor sistein (pada perlakuan E-4; E-5) dapat mempertahankan kadar polifenol totalnya yaitu 6,11 dan 5,45% dengan penurunan 14-23%. Kadar katekin pada perlakuan E-4 yaitu sebesar 5,75%.

DAFTAR PUSTAKA

- Afoakwa, E.O. (2010). *Chocolate Science and Technology*. Wiley Blackwell. UK.
- Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowle, M. & Ryan, A. (2008). Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 48(9): 840-857.
- Agbor, G.A., Oben, J.E., Ngogang, J.Y., Xinxing, C. & Vinson, J.A. (2005). Antioxidant capacity of some herbs/ spices from Cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(17): 6819-6824.
- Andarwulan, N., Fardiaz, D., Wattimena, G.A. & Shetty, K. (1999). Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 47(8): 3158-3163.
- Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspitasari, N.L., Sedarnawati, & Budianto, S. (1989). *Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Baker, D.M., Tomlins, K.I. & Gay, C. (1994). Survey of Ghanaian cocoa farmer fermentation practices and their influence on cocoa flavour. *Food Chemistry*. 51(4): 425-431.
- Brito, E.S., Gracia, N.H.P., & Amancio, A.C. (2004). Use of a proteolytic enzyme in cocoa (*Theobroma cacao* L.) processing. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47(4): 553-558.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugge, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M. & De Vuyst, L. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6): 1809-1824.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. & Wang, C.Y. (2002). Inhibition of loquat enzymatic browning

- by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry*. 76(2): 213-218.
- Elwers, S., Zambrano, A., Rohsius, C. & Lieberei, R. (2009). Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L.). *European Food Research and Technology*. 229(6): 937-948.
- FAO. 2010. Food and Agricultural Commodities Production. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Forsyth, W.G.C. (1952). Cacao polyphenolic substances. 2. Changes during fermentation. *Biochemical Journal*. 51(4): 516.
- Forsyth, W.G.C. & Quesnel, V.C. (1963). The mechanism of cacao curing. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 25: 457–492.
- Griffiths, L.A. (1957). Detection of the substrate of enzymic browning in cacao by a post-chromatographic enzymatic technique. *Nature*. 180(4598): 1373.
- Ketaren, S. (1996). *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. UI-Press. Jakarta.
- Kim, H. & Keeney, P. (1983). Polyphenols–tannins in cocoa beans. 37th PMCA Production Conference, 26–28 April. Lancaster, PA. pp. 60–63.
- Leal Jr, G.A., Gomes, L.H., Efraim, P., de Almeida Tavares, F.C. & Figueira, A. (2008). Fermentation of cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds with a hybrid *Kluyveromyces marxianus* strain improved product quality attributes. *FEMS Yeast Research*. 8(5): 788-798.
- Lehrian, D.W. & Patterson, G.R. (1983). Cocoa fermentation. In *Biotechnology*, eds Rehm, H.J. & Reed, G. vol.5. pp. 529–575. Weinheim: Verlag Chemie.
- Mardiah, E., 1996. Penentuan aktivitas dan inhibisi enzim polifenol oksidase dari apel (*Pyrus malus* Linn.). *Jurnal Kimia Andalas*. 2(2): 16-18.
- Pongsakul, N., Leelasart, B. & Rakariyatham, N. (2006). Effect of L-cysteine, potassium metabisulfite, ascorbic acid and citric acid on inhibition of enzymatic browning in longan. *Chiang Mai Journal of Science*. 33(1): 137-141.
- Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M. & Nicolas, J.J. (1992). Cysteine as an inhibitor of enzymic browning. 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(11): 2108-2113.
- Ritterbusch, S., Muhlbauer, W., Mulato, S., & Scherer, R. (1998). Improving the quality of Indonesian cocoa by means of a new processing method. *Tagungsband Schokotechnik*.
- Reolofsen, P.A. (1958). Fermentation, drying and storage of cocoa beans. *Advances in Food Research*. 8: 225-296.
- Samah, O. A., Puteh, M. F., Selemat, J. & Alimon, H. (1993). Fermentation products in cocoa beans inoculated with *Acetobacter xylinum*. *ASEAN Food Journal*. 8: 22-25.
- Sapers, G.M. & Miller, R.L. (1995). Heated ascorbic/citric acid solution as browning inhibitor for pre-peeled potatoes. *Journal of Food Science*. 60(4): 762-766.
- Schwan, R.F. & Wheals, A.E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(4): 205-221.
- Standar Nasional Indonesia [SNI]. (2000). Biji Kakao [SNI 01-2323-2000]. Badan Standar Nasional.
- Standar Nasional Indonesia [SNI]. (2008). Biji Kakao [SNI 01-2323-2008]. Badan Standar Nasional.
- Guehi, T.S., Koffi, K.P.B. & Dabonne, S. (2010). Spontaneous cocoa bean heap fermentation: Influence of the duration and turning on the quality of raw cocoa. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 46: 118-123.
- Thompson, S., Miller, K. & López, A. (2001). *Cocoa & Coffee food microbiology: Fundamentals and frontiers*. 2nd edition. ASM. Washington, DC. pp. 724-728.
- Ziegleder, G. (2017). Flavour development in cocoa and chocolate. In Beckett, S.T. (ed). *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 4th ed. pp.169-191.