

PENGARUH INHIBITOR SISTEIN PADA FERMENTASI BIJI KAKAO TERHADAP KANDUNGAN POLIFENOL

The Effect of Cysteine Inhibitors on Cocoa Seed Fermentation on The Content of Polyphenol

Dewi Nurhayati^{1*}, Yuliansyah Sundara Mulia¹, Amadda Fadhila Azhiima²

^{1*} Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bandung,
dewinurhayati66.dn@gmail.com

² Fakultas Kedokteran Universitas Pasundan Bandung

ABSTRACT

Indonesia is one of the largest cocoa exporting countries in the world. However, the quality of cocoa beans exported by Indonesia is still very low. Fermentation is the core of the cocoa bean processing process because it can improve the taste of cocoa. Cocoa has long been identified as a food rich in polyphenols which are antioxidants, so its presence in cocoa is very good for human health. However, the fermentation process will result in a decrease in the levels of polyphenols in cocoa beans due to the presence of polyphenol oxidase enzymes that oxidize polyphenols. The purpose of this study was to determine the effect of adding cysteine on the cocoa bean fermentation process. This study was designed in a completely randomized design with three treatments and three repetitions. Treatments: (1) without fermentation, (2) natural fermentation, (3) fermentation with the addition of a cysteine inhibitor on day 3. The fermented cocoa beans were dried, then analyzed for total polyphenol content using the Ciocalteu method. The conclusion is that the addition of cysteine in the cocoa bean fermentation process can maintain the polyphenol content in cocoa beans.

Keywords: Fermentation, cocoa beans, polyphenols

ABSTRAK

Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor kakao terbesar di dunia. Namun, kualitas biji kakao yang diekspor oleh Indonesia masih sangat rendah. Fermentasi merupakan inti dari proses pengolahan biji kakao karena dapat meningkatkan cita rasa kakao. Kakao telah lama diidentifikasi sebagai makanan kaya polifenol yang merupakan antioksidan yang dapat membantu mencegah inflamasi, penyakit cardiovascular dan dapat mengurangi resiko penyakit kanker, sehingga keberadaannya di dalam kakao sangat baik bagi kesehatan manusia. Tetapi dengan dilakukannya proses fermentasi akan mengakibatkan menurunnya kadar polifenol dalam biji kakao akibat adanya enzim polifenol oksidase yang mengoksidasi polifenol. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan sistein pada proses fermentasi biji kakao. Penelitian ini dirancang dengan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan tiga kali pengulangan. Perlakuan : (1) tanpa fermentasi, (2) fermentasi alami, (3) fermentasi dengan penambahan inhibitor sistein pada hari ke-3. Biji kakao hasil fermentasi dikeringkan, kemudian dianalisis kadar polifenol total dengan metode Ciocalteu. Simpulan yang diperoleh penambahan sistein pada proses fermentasi biji kakao dapat mempertahankan kadar polifenol dalam biji kakao.

Kata kunci : Fermentasi, biji kakao, polifenol

PENDAHULUAN

Coklat dihasilkan dari biji buah kakao yang telah mengalami serangkaian proses pengolahan sehingga bentuk dan aromanya seperti yang terdapat di pasaran. Riset menemukan indikasi bahwa beberapa komponen yang terkandung dalam kakao dapat membantu mencegah penyakit *cardiovascular* dan dapat mengurangi resiko kanker, salah satunya senyawa polifenol.¹

Biji kakao merupakan salah satu komoditi perdagangan yang mempunyai peluang untuk dikembangkan dalam rangka usaha meningkatkan devisa negara serta penghasilan petani kakao. Produksi biji kakao Indonesia secara signifikan terus meningkat, namun mutu yang dihasilkan sangat rendah dan beragam, antara lain kurang terfermentasi, tidak cukup kering, ukuran biji tidak seragam, kadar kulit tinggi, keasaman tinggi, cita rasa sangat beragam dan tidak konsisten. Hal tersebut tercermin dari harga biji kakao Indonesia yang relatif rendah. Namun disisi lain kakao Indonesia juga mempunyai keunggulan yaitu mengandung lemak coklat dan dapat menghasilkan bubuk kakao dengan mutu yang baik.²

Tahapan terpenting pada pengolahan biji kakao adalah proses fermentasi dan pengeringan. Fermentasi biji kakao bertujuan untuk menghancurkan *pulp* dan mengusahakan kondisi untuk terjadinya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji untuk pembentukan prekursor cita rasa kakao dan warna coklat, tiga kategori dasar yang terlibat yaitu pembentukan gula, asam amino/peptida dan sianidin oleh aktivitas enzim-enzim endogen selama fermentasi biji kakao.^{3,4}

Fermentasi biji kakao berpengaruh terhadap kadar polifenol. Selama proses fermentasi akan terjadi penguraian senyawa-senyawa polifenol oleh enzim polifenol oksidase. Hal ini

akan mengakibatkan konsentrasi polifenol di dalam biji kakao akan menurun setelah proses fermentasi, padahal keberadaan polifenol di dalam biji kakao sangat baik bagi kesehatan manusia. Fermentasi biji kakao berpengaruh terhadap kadar polifenol. Biji kakao yang difermentasi selama 1 hari, 2 hari, 3 hari sampai 6 hari menunjukkan bahwa kandungan polifenol biji kakao yang difermentasi turun dari 16,11% pada hari ke-0 sampai 6,01% pada hari ke-6. Kapasitas antioksidan juga turun dari 96% pada hari ke-1 fermentasi sampai dengan 79% pada hari ke-6 fermentasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, polifenol adalah fitokimia utama yang bertanggung jawab untuk kapasitas antioksidan dalam biji kakao.^{5,6} Selama fermentasi dan pengeringan rasa sepat dan pahit menurun karena berkurangnya konsentrasi polifenol.⁷

Untuk mempertahankan kadar polifenol selama proses fermentasi dengan menambahkan inhibitor yang dapat digunakan untuk menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase, yaitu sistein dan asam askorbat.⁸

Sistein (disingkat Cys atau C) adalah asam α -amino dengan rumus kimia $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$, merupakan asam amino non-esensial. Rantai samping pada sistein adalah tiol, bersifat polar dan biasanya diklasifikasikan sebagai asam amino hidrofilik. Rantai samping tiol sering berpartisipasi dalam reaksi enzimatik, sebagai nukleofil. Tiol rentan terhadap oksidasi untuk memberikan derivat disulfida dari sistein, yang berperan penting pada pembentukan struktur protein.⁹

Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan sistein pada proses fermentasi biji kakao terhadap kadar polifenol

METODE

Rancangan penelitian adalah eksperimen dengan tiga perlakuan dan tiga kali pengulangan, data diolah menggunakan anava.

Alat & alat yang digunakan dalam penelitian, keranjang dan daun pisang untuk fermentasi biji kakao, incubator, neraca analitis, oven, peralatan gelas, sentrifuge, waterbath, evaporator, spektrofotometer *ultraviolet-visible* (*uv-vis*). Bahan-bahan kimia yang digunakan akuades, sistein, asam galat, asam asetat glasial, aseton, pereaksi Folin Ciocalteu, natrium karbonat.

Persiapan sampel biji kakao sebelum difermentasi harus diperam terlebih dahulu selama 7 hari setelah panen agar kematangan buah kakao seragam. Setelah masa pemeraman, buah kakao dipecahkan dengan menggunakan kayu bulat lalu dipisahkan antara kulit buah kakao dengan biji kakao.^{10,1} Biji kakao sebanyak 500 g dimasukkan ke dalam wadah fermentasi yaitu keranjang bambu yang telah diberikan alas daun pisang. keranjang bambu ditutup dan fermentasi dilakukan selama 120 jam. Pada jam ke 24, 48, 72, dan 96 dilakukan pengadukan biji kakao. Fermentasi dilakukan dalam tiga perlakuan yaitu: (1) tanpa fermentasi, (2) fermentasi alami, (3) fermentasi alami dengan sistein. Pada hari ke-0 disimpan pada suhu kamar, pada hari ke-1 diinkubasi pada suhu 30°C, pada hari ke-2 diinkubasi pada suhu 40°C, pada hari ke-3 dan ke-4 diinkubasi pada suhu 50°C. Setelah 120 jam fermentasi dihentikan, lalu biji kakao dikeringkan dibawah sinar matahari selama 4-5 hari.

Total polifenol ditentukan dengan prosedur Folin-Ciocalteu.¹¹ Untuk analisis total polifenol, sebanyak 0,5 g sampel diekstraksi tiga kali dengan campuran pelarut aseton dan air (perbandingan pertama 80+20, selanjutnya 60+40 v/v). pada tiap-tiap ekstraksi, sampel disentrifugasi pada suhu kamar dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifugasi, sampel ditempatkan dalam *ultrasonic*

bath selama 2 menit. ketiga supernatan disatukan dalam gelas kimia yang berisi 2,5 mL asam asetat glasial. Aseton dihilangkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C. Residu yang diperoleh dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi 2,5 mL asam asetat glasial.¹²

Ekstrak kasar senyawa fenolik dilarutkan dengan asam asetat 2,5%. Sebanyak 1 mL larutan ini dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan larutan natrium karbonat 20%, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga tanda batas. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 70°C, setelah didinginkan pada suhu kamar, absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 730 nm.¹²

HASIL

Biji kakao yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari buah kakao yang baru dipanen diperam selama 7 hari. Pemeraman bertujuan untuk menyeragamkan kematangan buah kakao. Proses selanjutnya adalah pemecahan buah kakao dengan menggunakan pemukul kayu atau memukulkan buah satu dengan buah lainnya, yang bertujuan untuk memisahkan antara kulit dengan biji buah kakao. Biji kakao harus terhindar dari kontak langsung dengan benda-benda logam karena dapat menyebabkan warna biji kakao menjadi berwarna kelabu.¹³



Gambar 1. Biji Kakao yang siap difermentasi

Proses fermentasi yang dilakukan di dalam penelitian ini dilakukan secara alami dan dengan penambahan inhibitor sistein.



Gambar 2. Hasil Fermentasi & Pengeringan Biji Kakao : A. non fermentasi; B. fermentasi alami; C. fermentasi alami dengan sistein.

Pemeriksaan kadar polifenol

Hasil pemeriksaan kadar polifenol dari biji kakao dapat dilihat pada table 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Kadar Polifenol

No	Perlakuan	Kadar Polifenol (%)
1	A	11,0
2	B	7,8
3	C	8,9

Keterangan : A. non fermentasi; B. fermentasi alami; C. fermentasi alami dengan sistein.

Kadar polifenol yang diperoleh dari hasil fermentasi yang dilakukan dengan tiga perlakuan berkisar pada kadar 7,8% - 11,0%, tertinggi ditunjukkan pada perlakuan A (non fermentasi) sebesar 11,0 % dan yang terendah pada perlakuan B (fermentasi alami) sebesar 7,8%.

PEMBAHASAN

Fermentasi merupakan tahapan terpenting pada pengolahan biji kakao, yang akan menghasilkan prekursor cita rasa dari perpaduan gula pereduksi, asam amino dan polifenol. Biji kakao yang tidak difermentasi tidak akan memiliki senyawa prekursor tersebut sehingga cita rasa, warna dan mutu bijinya sangat rendah.¹⁴

Fermentasi ini adalah suatu proses perubahan biokimia oleh aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, dimana secara alami mikroorganisme ini datang dari lingkungan sekitar ketika buah kakao dibuka, *pulp* akan terkontaminasi dengan varietas dari banyak mikroorganisme dan selanjutnya terjadi proses fermentasi secara alami.¹³

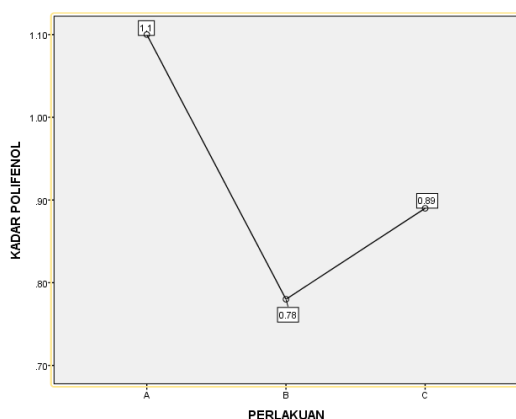
Dalam proses fermentasi pada penelitian ini dilakukan penambahan inhibitor eksogen sistein yang merupakan senyawa asam amino yang sangat bersifat reaktif dimana di dalam sistein tersebut terdapat sebuah gugus tiol (-SH). Sistein dapat menghambat aktivitas enzim polifenol oksidase melalui dua cara yaitu melakukan aksi terhadap produk reaksi dan melakukan aksi terhadap enzim.^{8,15}

Setelah dilakukan proses fermentasi, selanjutnya dilakukan proses pengeringan, yang bertujuan untuk menurunkan kadar air dalam biji sampai pada kondisi kadar air dalam biji tidak dapat menurunkan kualitas biji dan biji tidak ditumbuhi cendawan. Pengeringan dapat dilakukan dengan menjemur di bawah sinar matahari atau secara buatan dengan menggunakan mesin pengering atau kombinasi keduanya. Pengeringan dengan sinar matahari dibutuhkan waktu 2 sampai 3 hari, tergantung kondisi cuaca, sampai kadar air biji menjadi 6 sampai 8%.^{1,16,17}

Polifenol Total Biji Kakao

Berdasarkan Gambar 1. menunjukkan bahwa kadar polifenol biji kakao hasil fermentasi pada perlakuan B dan C, lebih rendah dibandingkan biji kakao tanpa fermentasi pada perlakuan A, karena pada saat proses fermentasi ada enzim polifenol oksidase yang mengoksidasi senyawa fenol menjadi kuinon dan kemudian dipolimerisasi menjadi pigmen melanin yang berwarna coklat sehingga kadar polifenol menurun. Perlakuan A yang

tidak mengalami fermentasi mempunyai kadar polifenol 1,1%, perlakuan B dan C adalah perlakuan yang mengalami fermentasi terjadi penurunan yaitu 0,78% & 0,89%, untuk perlakuan C lebih tinggi kadar polifenolnya dibandingkan perlakuan B karena pada perlakuan B terjadi proses fermentasi secara alami sedangkan perlakuan C terjadi proses fermentasi secara alami dan ada penambahan inhibitor sistein yang akan menghambat oksidasi polifenol oksidase pada saat proses fermentasi terjadi, sehingga kadar polifenol masih bisa dipertahankan tetap lebih tinggi dibandingkan dengan yang mengalami fermentasi.



Gambar 1. Kurva kadar polifenol total biji kakao pada tiga perlakuan. A. non fermentasi; B. fermentasi alami; C. fermentasi alami & inhibitor sistein

KESIMPULAN

Penambahan sistein pada proses fermentasi biji kakao dapat menghambat oksidasi polifenol oksidase terhadap polifenol sehingga dapat mempertahankan kadar polifenol dalam biji kakao

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktur Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah mengalokasikan

dana penelitian dalam DIPA Poltekkes Kemenkes Bandung.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Perindustrian. Gambaran Sekilas Industri Kakao. Kementerian Perindustrian. Jakarta. 2007
2. Suryani, D & Zulfebriansyah. Komoditas kakao: potret dan peluang pembiayaan. *Ecomic Review*. 2007. 210.
3. Schwan, R.F. & Wheals, A.E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. . 2004. **44**: 205-221
4. Thompson, S.S., Miller, K.B. & Lopez, A.S. Cocoa and coffee. In: Doyle, M.J., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, 2001.D.C. : 721-733.
5. Aikpokpodion, P.E. & Dongo, L.N. Effects of Fermentation Intensity On Polyphenols and Antioxidant Capacity of Cocoa beans. *Int. J. Sustain. Crop Prod*. 2010. **5**(4):66-70
6. Camu, N., Winter, T.D., Solomon, K.A., Takrama, J.S., Bernaert, H. & Vuyst, L.D. Fermentation of cocoa beans: influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J Sci Food Agric*. 2008.**88**: 2288–2297
7. Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., Nazamid, S. Changes in polyphenol ability to produce astringency during roasting of cocoa liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005.**85**: 917-924.
8. Mardiah, E. Mekanisme Inhibisi Enzim Polifenol Oksidase Pada Sari Buah Markisa Dengan Sistein Dan Asam Askorbat. *Jurnal Kimia Andalas*. 2011.J. Ris. Kim. Vol. 4, No. 2, Maret 2011
9. The Microbial World. The primary structure of proteins is the amino acid sequence. University of Wisconsin-Madison bacteriology Department. 2011.
10. BPTP Lampung. *Standar Prosedur Operasional Fermentasi Kakao*. 2006. www.primatani.litbang.deptan.go.id

11. Singleton, V.L., & Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965.**16**: 144-158
12. Elwers, S., Alexis, Z., Rohsius, C., & Lieberei, R. Differences between the content of phenolic compounds in Criollo, Forastero and Trinitario cocoa seed (*Theobroma cacao* L). *Eur Food Res Technol.* 2009. **229**: 937-948.
13. Fahroji, Penanganan Pascapanen Kakao Yang Baik : Pelatihan Pengolahan Kakao yang diselenggarakan oleh Dinas Perkebunan Kab. Indragiri Hilir, 24-26 November 2011. <https://riau.litbang.pertanian.go.id/ind/images/stories/PDF/pascapanen-kakao.pdf>
14. Sitti Ramlah, Karakteristik Mutu dan Citarasa Cokelat Kaya Polifenol (Characteristics of Quality and Flavor of Polyphenol-Rich Chocolate) Balai Besar Industri Hasil Perkebunan Jl. Prof.Dr.Abdurrahman Basalamah No.28 Makassar 90231.2016.
15. Gacche, R.N., Shete, M.A., Dhole, N.A. & Ghole. Reversible inhibitor of polifenol oksidase from apple using L-cysteine. *Indian jurnal of chemical biotechlogy.* 2006.**13**: 459-463.
16. Kealey, K.S., Snyder, R.M., Romanczyk, L.J., Geyer, H.M., Myers, M.E., Withcare, E.J., Hammerstone, J.F. & Schmitz, H.H. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses. *Patent Cooperation Treaty (PCT)* WO 98/09533, Mars Incorporated, USA. 2001.
17. Awua, P.K. Cocoa Processing and Chocolate Manufacture in Ghana. *David Jamieson and Associates Press Inc.* Essex, UK. 2002.