

MOTTO

Barang siapa menempuh suatu jalan untuk mencari ilmu pengetahuan, maka Allah akan memudahkan padanya jalan menuju

sorga

(Hadist riwayat muslim)

Sebuah pohon besar bermula dari sebuah biji yang sangat kecil, perjalanan sejauh seribu mil bermula dari satu langkah kecil.

(Lao-tse)

Dia yang menapak dengan lembut, akan menempuh jarak lebih jauh.

(pepatah cina)

Di dalam keberanian terdapat kejeniusan, kekuatan dan keajaiban.

(Goetche)

Tidak ada yang berarti bagi orang yang berkata tidak ada yang berarti.

(Lin Yutang)

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, hanya karena kuasa-Nya karya ini menjadi nyata. Ku persembahkan karya ini kepada :

- ♥ Kedua orang tuaku, **Ibu Nining dan Bapak Didik**, yang senantiasa memberiku cinta, dukungan, semangat, dan doa. *I Love U so much.*
- ♥ Adikku tersayang **Melani** , *Who Always Stand By Me*, thank U so much.
- ♥ **Eyang Soemargo dan keluarga besar Soemargo**, yang selalu memberi nasehat dan semangat dalam langkahku.
- ♥ Teman seperjuangan **Bu Wiwied, Nining dan Andri**, terimakasih atas kebersamaan, dukungan, semangat. "*Jangan menyerah*", akan slalu kuingat.
- ♥ Temanku yang sangat luar biasa **Dadang dan Helmy**, yang membuat hari-hariku kian berwarna. *Thanks 4 everything.*
- ♥ **Dody** ,trim's usilnya dan juga kejutan manisnya. *Keep smile Okay.*
- ♥ **Feni, Kikis , Rakit, Ari** . *Hi guys you're my inspiration.*
- ♥ **Almamater** yang kubanggakan.

Dosen Pembimbing :

Ir. Siti Hartanti, MS. (DPU)

Ir. Achmad Subagio, MAgr., Ph.D (DPA I)

Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgr Sc (DPA II)

HALAMAN PENGESAHAN

Diterima oleh :

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN UNIVERSITAS JEMBER

Sebagai Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi)

Diperahankan pada :

Hari : Jumat

Tanggal : 8 November 2002

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember.

Tim Penguji :

Ketua



Ir. Siti Hartanti, MS

130 350 763

Anggota I



Ir. Achmad Subagio, MAgr., Ph.D

131 975 306

Anggota II



Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgr.Sc

131 131 021

Mengesahkan

Dekan



Ir. Siti Hartanti, MS

130 350 763

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) yang berjudul **Perubahan Aktivitas Enzim Polifenol Oksidase Pada Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Selama Fermentasi** dapat diselesaikan.

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.

Penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu tersusunnya Skripsi ini terutama kepada yang terhormat :

1. Ibu Ir. Siti Hartanti, MS., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember sekaligus Dosen Pembimbing Utama yang telah membimbing dan membantu secara moril dan materiil sampai terselesaikannya Skripsi ini.
2. Bapak Ir. Susijahadi, MS., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
3. Bapak Ir. Achmad Subagio, MAgr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota I yang telah memberikan petunjuk dan membimbing selama penelitian dan penulisan Skripsi ini.
4. Bapak Dr. Ir. Bambang Sugiharto MAgr Sc., selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah memberikan bimbingan dan saran yang berguna dalam penyempurnaan penyusunan Skripsi ini.
5. Ibu Ir. Djumarti, selaku dosen wali yang telah memberikan petunjuk dan bimbingan selama ini.
6. Staf Laboratorium Biologi Molekuler
7. Administratur PT Perkebunan Nusantara XII Kebun Renteng Jember.
8. Staf dan karyawan PT Perkebunan Nusantara XII Kebun Kedaton Jember.
9. Rekan – rekan di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember.

Disadari tulisan ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis menerima kritik dan saran yang bersifat membangun.

Akhirul kalam penulis berharap semoga Skripsi ini dapat menambah wawasan penulis dan bermanfaat bagi pembaca.

Jember, November 2002

Penulis

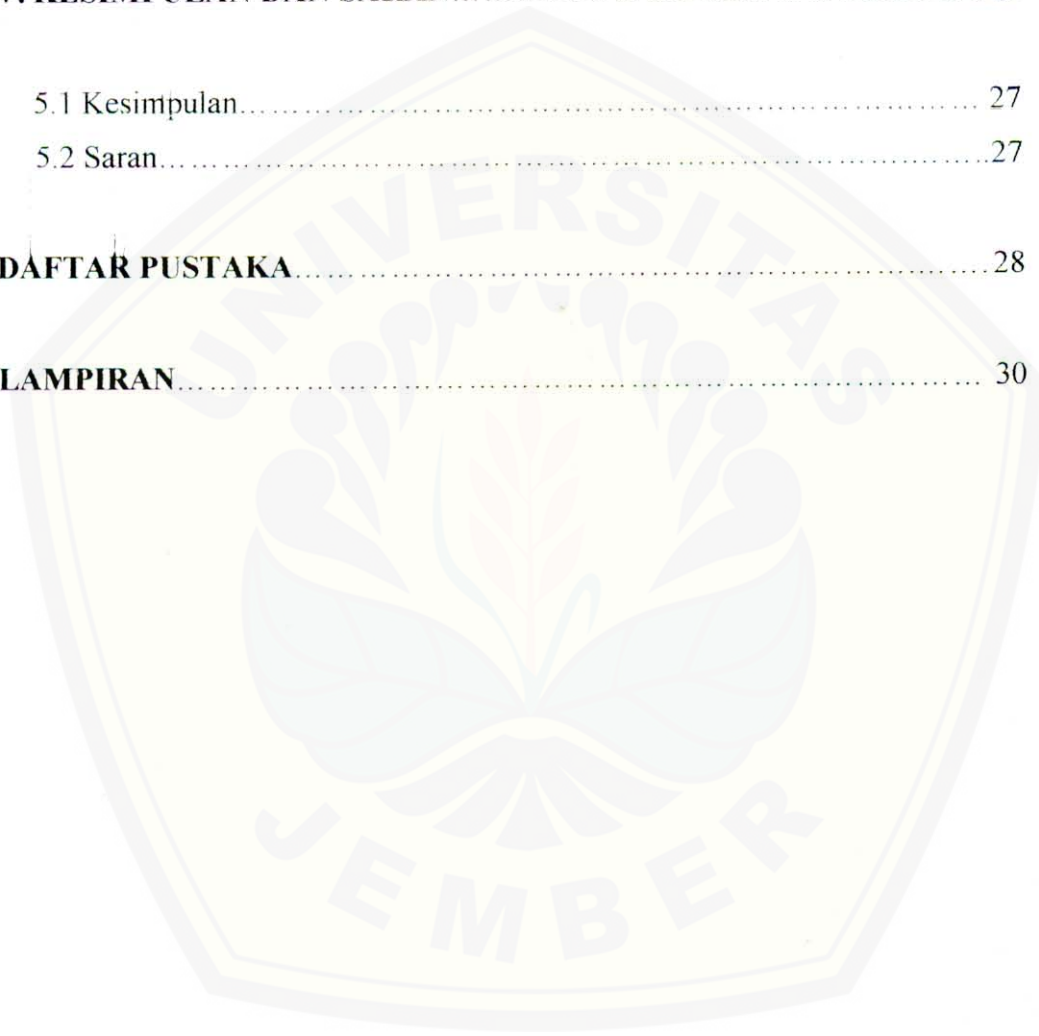


DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
MOTTO	ii
PERSEMBAHAN	iii
DOSEN PEMBIMBING	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DARTAR GAMBAR	xii
RINGKASAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan.....	2
1.3 Batasan Permasalahan.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	2
1.5 Kegunaan Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Klasifikasi Tanaman Kakao.....	4
2.2 Komposisi Buah Kakao.....	4
2.2.1 Komposisi Kimia Pulp.....	5
2.2.2 Komposisi Kimia Biji.....	5
2.3 Fermentasi.....	6
2.4 Perubahan Yang Terjadi Selama Fermentasi.....	7
2.4.1 Perubahan di dalam Pulp.....	7

2.4.2 Perubahan di dalam Keping Biji.....	9
2.5 Polifenol.....	11
2.6 Polifenol oksidase.....	11
2.7 Penentuan V_{maks} dan K_m	13
III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN.....	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2 Bahan dan Alat.....	15
3.2.1 Bahan.....	15
3.2.2 Alat.....	15
3.3 Metode Penelitian.....	15
3.3.1 Persiapan Sampel.....	15
3.3.2 Kontrol Fermentasi.....	16
3.3.2.1 Penentuan pH Pulp.....	16
3.3.2.2 Penentuan pH Keping Biji.....	16
3.3.3 Ekstraksi dan Presipitasi.....	16
3.3.4 Pengukuran Aktivitas Enzim.....	18
3.3.5 Penentuan Karakterisasi Enzim PPO.....	18
3.3.5.1 Kinetika Enzim PPO.....	18
3.3.5.2 Penentuan pH Optimal.....	18
3.3.5.3 Penentuan Suhu Optimal.....	18
3.3.6 Penentuan Aktivitas Enzim PPO Selama Fermentasi.....	19
3.3.7 Penentuan Protein.....	19
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
4.1 Kontrol Fermentasi.....	20
4.1.1 Suhu Fermentasi.....	20
4.1.2 pH Pulp.....	21
4.1.3 Keping Biji.....	22

4.2 Karakterisasi Enzim PPO.....	22
4.3 Aktivitas Enzim PPO Selama Fermentasi.....	23
4.4 Pengaruh Suhu Fermentasi Terhadap Aktivitas Enzim.....	24
4.5 Pengaruh pH Keping Biji Terhadap Aktivitas Enzim.....	25
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	27
5.1 Kesimpulan.....	27
5.2 Saran.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	30



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia pulp	5
2. Komposisi kimia biji kakao sebelum fermentasi	6



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Diagram Perubahan Yang Terjadi Pada Masa Biji Kakao Selama Fermentasi	7
2. Reaksi Tipe Kresolase dan Katekolase	12
3. Diagram Alir Ekstraksi dan Presipitasi Enzim PPO dari Keping Biji Kakao	17
4. Hubungan Antara Lama Fermentasi Dengan Suhu	20
5. Hubungan Antara Lama Fermentasi Dengan pH Pulp	21
6. Hubungan Antara Lama Fermentasi Dengan pH Keping Biji	22
7. Hubungan Lama Fermentasi Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim PPO	23
8. Pengaruh Suhu Fermentasi Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim PPO	24
9. Hubungan pH Keping Biji Terhadap Aktivitas Spesifik Enzim PPO	25

RINGKASAN

Novi Sulistyani (971710101089) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian “ **Perubahan Aktivitas Enzim Polifenol Oksidase Pada Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Selama Fermentasi**”, dibawah bimbingan Ibu Ir. Siti Hartanti, MS. sebagai DPU dan Bapak Ir. Achmad Subagio, MAgr, Ph.D sebagai DPA I, Bapak Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgr.Sc. sebagai DPA II.

Polifenol oksidase (PPO) adalah salah satu enzim penting dalam fermentasi biji kakao. PPO merupakan enzim yang mengkatalisa oksidasi dari monohidroksi fenol dan o-dihidroksi fenol membentuk o-quinon, yang selanjutnya bereaksi dengan amino kompleks dan protein menghasilkan molekul berpolimer tinggi dan disebut melanin dan melano-protein yang merupakan produk dari pencoklatan enzimatis. Selain berperan pada pembentukan warna coklat yang khas, PPO juga berperan dalam pembentukan flavor dengan reduksi pada *bitterness* dan *astringency* yang dihasilkan dari proses polimerisasi polifenol dan protein.

Untuk mendapatkan enzim PPO dari biji kakao maka dilakukan ekstraksi keping biji kakao sebanyak 5 gr dengan kondisi suhu dibawah 4°C. Metode ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode Fritz *et al.* (1986) dengan sedikit modifikasi. Ekstraksi menggunakan mortal stumper serta dengan penambahan nitrogen cair. Setelah halus ditambahkan PVP dan buffer ekstraksi yang mengandung campuran Tris HCl, EDTA, mercaptoethanol, DIECA dan PMSF. Sampel disentrifuse selama 20 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan sebagai ekstrak kasar. Ekstrak kasar kemudian dipresipitasi dengan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 –80 %. Pelet yang dihasilkan ditambah Tris HCl pH 7,3 selanjutnya dilakukan filtrasi (desalting) dengan menggunakan gel sephadex G-25, yang sebelumnya diequilibrasi dengan 20 mM Tris HCl pH 7,3. Campuran uji mengandung 0,05 mL 0,005 M CuSO_4 ; 2 mL 0,5 M KH_2PO_4 pH 5,4; 0,5 mL 10 mM pirokatekol. Campuran dimasukkan dalam

spektrofotometer kemudian 0,01 mL enzim ditambahkan dan aktivitas enzim diamati. Untuk mendapatkan nilai V_{maks} dan K_m dilakukan pengujian pada berbagai konsentrasi pirokatekol, penentuan pH optimum dilakukan pengujian dengan variasi pH KH_2PO_4 , penentuan suhu optimum dilakukan pemanasan larutan uji pada range 25-100° C. Penentuan nilai K_m dan V_{maks} dengan metode Lineweaver-Burk dengan substrat pirokatekol menunjukkan nilai K_m 23,92 mM dan V_{maks} 1000 unit. Aktivitas optimum pada pH 5,4 dan suhu 45°C.

Selama fermentasi enzim PPO mengalami penurunan aktivitas. Setelah fermentasi selama 6 jam aktivitas enzim PPO turun sebesar 3,8 % kemudian aktivitas terus turun secara bertahap dan pada akhir fermentasi yaitu fermentasi selama 60 jam aktivitas turun hingga 87 %. Penurunan aktivitas tersebut karena degradasi dan denaturasi protein. Difusi asam asetat ke dalam keping biji dan peningkatan suhu selama fermentasi menyebabkan keping biji mati sehingga enzim proteolitik menjadi aktif dalam mengurai protein menjadi asam amino dan peptida. Asam dan suhu yang tinggi menyebabkan denaturasi protein.

Terdapat hubungan yang erat antara aktivitas spesifik enzim dengan lama fermentasi, suhu fermentasi dan pH keping biji. Masing – masing ditunjukkan dengan nilai R^2 sebesar 0,9449; 0,9542 dan 0,9601.



1.1 Latar Belakang

Harga kakao dunia semakin baik sejak 1975, agar supaya produk kakao meningkat maka areal perkebunan kakao di Indonesia semakin diperluas. Hal tersebut diperhatikan oleh Departemen Pertanian sehingga kakao menjadi proyek nasional sejak Repelita III, IV dan V. Dengan demikian perkembangan areal kakao tiap tahun meningkat dengan cepat.

Ekspor kakao Indonesia dalam bentuk biji dan olahan, yang setiap tahun mengalami peningkatan. Pada tahun 1990 sebesar 54,5 % dalam bentuk biji sedangkan 81,3 % dalam bentuk olahan. Namun jumlahnya relatif kecil yaitu 104.470 ton untuk ekspor biji dan 15.255 ton dalam bentuk olahan.

Kendala kakao Indonesia adalah produksi yang tinggi namun mutu yang kurang baik, terutama dari kakao rakyat. Hal ini disebabkan oleh proses fermentasi yang tidak benar (Susanto, 1994).

Titik berat dalam pengolahan biji kakao terletak pada proses fermentasi. Pada proses ini terjadi pembentukan calon cita rasa, pengurangan rasa pahit dan perbaikan kenampakan fisik kakao yang meliputi warna dan konsistensi keping biji kakao. Kegagalan dalam proses fermentasi tidak dapat diperbaiki dengan proses-proses pengolahan lebih lanjut dan dapat diartikan sebagai kegagalan total dalam proses pengolahan biji kakao (Wahyudi, 1998).

Perubahan biokimia yang terjadi bergantung pada lama fermentasi yang dialami oleh biji. Lama fermentasi beragam mulai dari dua sampai delapan hari, bergantung kepada tipe biji kakao dan kebiasaan setempat. Waktu fermentasi yang optimum akan diperoleh senyawa calon aroma yang maksimum. Biji kakao yang kurang waktu fermentasinya atau lebih waktu fermentasinya akan menghasilkan coklat yang mutu citarasanya lebih rendah daripada coklat yang berasal dari biji yang cukup waktu fermentasinya (Rohan, 1963).

Salah satu enzim penting dalam fermentasi kakao adalah polifenol oksidase karena enzim ini berperan dalam pembentukan warna coklat dan pembentukan flavor. Menurut Wong *et al.*, (1990) polifenol oksidase pada kakao

merupakan enzim yang mengkatalisa oksidasi dari monohidroksi fenol dan o-dihidroksi fenol membentuk o-quinon, yang selanjutnya bereaksi dengan amino kompleks dan protein menghasilkan molekul berpolimir tinggi dan disebut melanin dan melano-protein yang merupakan produk dari pencoklatan enzimatis. Polifenol oksidase adalah enzim yang berperan untuk pertumbuhan precursor flavor mulai dari fase fermentasi oksidatif sampai fase pengeringan. Dikatakan pula bahwa diantara perubahan yang mempengaruhi flavor adalah reduksi pada *bitterness* dan *astringency* yang dihasilkan dari proses polimerisasi yaitu interaksi dari polifenol dan protein (Forsyth dan Quesnel 1963 dalam Wong *et al.*, 1990).

Berdasarkan uraian diatas maka diperlukan suatu penelitian mengenai Perubahan Aktivitas Enzim Polifenol Oksidase Pada Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Selama Fermentasi.

1.2 Permasalahan

Dari uraian diatas maka permasalahan yang akan diteliti adalah sejauh mana perubahan aktivitas enzim polifenol oksidase selama fermentasi.

1.3 Batasan Permasalahan

Penelitian dibatasi pada biji kakao jenis edel yang difermentasi selama periode 0 sampai 60 jam.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui perubahan suhu selama fermentasi.
2. Mengetahui perubahan pH pulp dan pH keping biji selama fermentasi.
3. Mengetahui sifat-sifat enzim polifenol oksidase dari biji kakao yaitu meliputi pH optimal, suhu optimal, serta kinetika enzim (V_{maks} dan K_m).
4. Mengetahui perubahan aktivitas enzim polifenol oksidase selama fermentasi.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang sifat-sifat enzim polifenol oksidase serta perubahan aktivitas enzim polifenol oksidase pada biji kakao selama fermentasi.





II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Tanaman Kakao

Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L) termasuk famili Sterculiaceae. Tanaman ini berasal dari hutan tropis di daerah Amerika Selatan yang kemudian tanaman ini diusahakan penanamannya oleh orang-orang Indian Astex.

Sesungguhnya terdapat banyak jenis tanaman kakao, namun jenis yang paling banyak ditanam untuk produksi kakao besar-besaran menurut Sunanto (1992) hanya tiga jenis, yaitu:

- a. Jenis *Criolo*, yang terdiri dari *Criolo* Amerika Tengah dan *Criolo* Amerika Selatan. Jenis ini menghasilkan biji kakao yang mutunya sangat baik dan dikenal sebagai kakao mulia (*fine flavour cocoa*, *choiced cocoa* atau *edel cocoa*). Buahnya berwarna merah atau hijau, kulitnya tipis berbintil-bintil kasar atau lunak. Biji buahnya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada waktu basah.
- b. Jenis *Forastero*, banyak diusahakan di berbagai negara produsen kakao dan menghasilkan biji kakao yang mutunya rendah atau *bulk cocoa* atau dikenal juga sebagai *ordinary cocoa*. Buahnya berwarna hijau, kulitnya tebal, biji buahnya tipis atau genjang dan kotiledon berwarna ungu pada waktu basah.
- c. *Trinitaro*, merupakan campuran atau hibrida jenis *Criolo* dengan jenis *Forastero* secara alami, sehingga kakao jenis ini sangat heterogen, kakao *Trinitaro* menghasilkan biji yang termasuk *fine flavour cocoa* dan ada yang termasuk *bulk cocoa*. Buahnya berwarna hijau atau merah dan bentuknya bermacam-macam. Biji buahnya juga bermacam-macam dengan cotyledon (keping biji) berwarna ungu muda sampai ungu tua waktu basah.

2.2 Komposisi Buah Kakao

Biji kakao yang berasal dari tanaman *Theobroma cacao* L terdiri atas bagian kulit, plasenta, pulp dan biji. Kulit mempunyai sepuluh alur dan tebalnya 1-2 cm. Pada waktu muda, biji menempel pada kulit bagian dalam tetapi bila telah

masak biji akan terlepas dari kulit buah dan berbunyi bila diguncang (Siregar dkk, 1992).

Buah biji kakao yang masak mempunyai kulit yang tebal dan berisi 30 – 40 biji yang dikelilingi oleh pulp yang berlendir. Pulp yang melingkupi biji kakao sebagian besar terdiri atas air dan sebagian kecil gula (Nasution dkk, 1976)

2.2.1 Komposisi Kimia Pulp

Pulp pada biji kakao sebagian besar terdiri atas air dan sebagian kecil berupa gula yang merupakan media yang baik bagi pertumbuhan khamir. Disamping itu pulp juga mengandung protopektin, albumin, pati, beberapa asam amino non volatil, garam kalium, garam kalsium serta garam lainnya .

Tabel 1 : Komposisi kimia pulp

Komposisi	Prosentase
Air	84,5
Pentosan	2,7
Sukrosa	0,7
Glukosa , Fruktosa	10
Protein	0,6
Asam	0,7
Garam-garam anorganik	0,8

Sumber : Wood dan Lass (1985).

2.2.2 Komposisi Kimia Biji

Nasution *et al* (1976) mengemukakan bahwa biji kakao terdiri dua bagian utama. Bagian yang pertama adalah kulit biji yang persentasenya 10% sampai 14% dari berat kering biji. Sedangkan bagian yang kedua adalah keping biji (kotiledon) yang persentasenya 86% sampai 90% dari berat kering biji. Secara lengkap komposisi kimia biji kakao sebelum difermentasi dapat dilihat pada tabel 2 .

Tabel 2 : Komposisi kimia biji kakao sebelum difermentasi

Komposisi	Prosentase (%)
Kulit	9,63
Kecambah	0,77
Keping Biji	89,60
Lemak	53,05
Air	3,65
Nitrogen :	
Total N	2,28
Protein N	1,50
Amonia N	0,028
Teobromin	1,71
Kafein	0,085
Karbohidrat:	
Glukosa	0,30
Pati	6,10
Pektin	2,25
Serat	2,09
Selulosa	1,92
Pentosa	1,27
Gum	0,38
Tanin	7,54

Sumber : Nasution (1976)

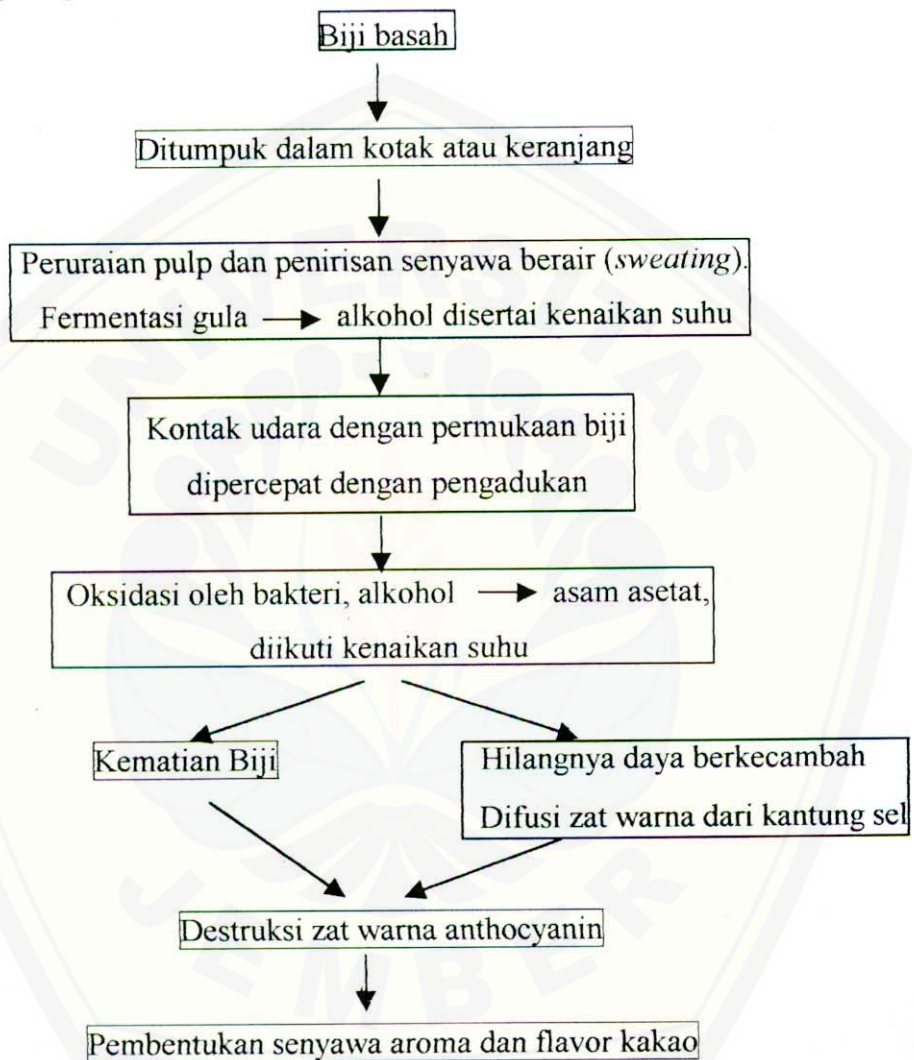
2.3 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perombakan senyawa organik yang dikatalisa oleh enzim. Proses fermentasi berlangsung di dalam suatu sistem biologi yang melibatkan reaksi hidrolisa, reaksi oksidasi reduksi, dan juga menghasilkan energi (Winarno, 1993).

Proses fermentasi biji kakao sebenarnya melibatkan dua macam proses, yaitu proses fermentasi eksternal dan interal. Pada fermentasi eksternal bertujuan untuk melepaskan pulp dari keping biji dan mematikan keping biji yaitu dengan pembentukan etanol dari gula yang terdapat pada pulp kemudian diikuti dengan pembentukan asam asetat dari etanol. Fermentasi internal bertujuan untuk mengadakan perubahan di dalam keping biji, yaitu perubahan warna, pembentukan aroma dan cita rasa keping biji kakao (Quesnel dan Lopez dalam Effendi, 1990).

2.4 Perubahan Yang Terjadi Selama Fermentasi

Menurut Rohan (1963), masa biji kakao yang diperam dalam kotak atau keranjang akan mengalami beberapa perubahan. Secara Skematis perubahan tersebut seperti pada Gambar 1 :



Gambar 1 Diagram Perubahan Yang Terjadi Pada Masa Biji Kakao Selama Fermentasi (Rohan, 1963).

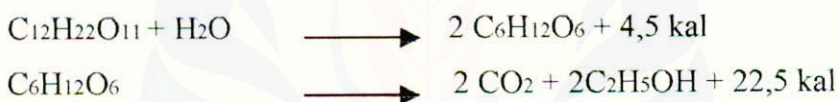
2.4.1 Perubahan di dalam Pulp

Pulp mengalami dua perubahan penting yang terjadi selama fermentasi. Pertama, merupakan perubahan glukosa menjadi alkohol. Hal ini membawa suksepsi pada yeast. Pada keadaan tersebut pulp hancur akibat dari enzim pektinase

oleh yeast. Dengan demikian glukosa yang pada awalnya 11 % berkurang menjadi 1-2 % selama 24-48 jam (Wood dan Lass, 1985). Tahap kedua adalah fermentasi asam asetat akibat aktifitas bakteri karena perisai biji kakao banyak mengandung alkohol (Chatt, 1953).

Pada fase awal fermentasi, khamir dalam kondisi anaerob secara aktif mengkonsumsi gula dan merubahnya menjadi alkohol. Nilai pH sebesar 2,5-4,5 dan suhu 25°C – 40°C adalah kondisi yang optimal bagi pertumbuhan khamir dan memacu aktifitasnya. Perubahan pH dan suhu yang terjadi selama fermentasi akan mempengaruhi kehidupan khamir. Pada saat kondisi lingkungan kurang cocok untuk pertumbuhan khamir maka pada masa fermentasi selanjutnya bakteri asam asetat mulai aktif yang akan mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat (Chatt, 1953).

Aktivitas yeast merubah gula yang terdapat pada pulp menjadi etanol dan CO₂ menghasilkan reaksi eksotermis sebagai berikut :

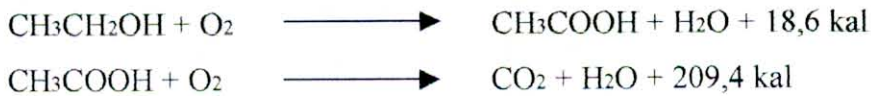


Perubahan ini menyebabkan suasana massa yang difermentasi lebih aerob dan diperoleh temperatur yang lebih tinggi. Disamping itu terjadi kenaikan pH pulp dari 3,6 menjadi 4,2 akibat disimilasi asam sitrat oleh yeast (Mansyur dkk, 1978).

Pemberian oksigen yang berlebihan selama fermentasi menyebabkan sel yeast akan melakukan respirasi secara aerob. Dalam keadaan demikian enzim yeast dapat memecah senyawa gula lebih sempurna, atau dihasilkan karbondioksida dan air serta dilepaskan energi (Winarno, 1992).

Fermentasi oleh yeast akan menyebabkan kenaikan temperatur, pH serta kandungan alkohol memberi kondisi yang cocok bagi pertumbuhan bakteri (Rohan, 1963). Bakteri asam asetat merupakan bakteri yang paling umum ditemukan selama proses fermentasi kakao dan beberapa peneliti juga menyebutkan terdapat bakteri asam laktat (Mansyur dkk, 1978).

Aroma utama dalam fermentasi kakao adalah asam asetat yang merupakan hasil oksidasi dari etanol . Pembentukan asam asetat oleh bakteri dan reaksi oksidasinya digambarkan oleh reaksi di bawah ini :



Pembentukan asam asetat merupakan faktor yang sangat penting dari proses kematian biji kakao. Asam asetat terbentuk sebesar 0,7 – 1,2 % setelah fermentasi selama 37 jam dan biji telah mati. Selain mematikan biji, asam asetat juga berpengaruh pada pembentukan aroma kakao.

2.4.2 Perubahan di dalam Keping Biji

Wood dan Lass (1985) menyatakan bahwa, pH keping biji selama fermentasi mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh asam asetat yang terbentuk di dalam pulp menembus melewati kulit biji menuju keping biji. Sedangkan Susijahadi dan Jinap (1998) menyatakan bahwa asam asetat yang terbentuk dari hasil oksidasi alkohol oleh bakteri asam asetat akan terdifusi ke dalam keping biji sehingga menjadi salah satu sebab matinya biji.

Selama fermentasi akan terbentuk gula pereduksi sebagai hasil hidrolisa enzimatis sukrosa sehingga fruktosa meningkat dengan cepat dibandingkan dengan kenaikan glukosa. Gula pereduksi ini merupakan senyawa penting di dalam reaksi amino karbonil dan gula reduksi lain selama penggorengan biji kakao (Seiki, 1973).

Total asam amino bebas merupakan salah satu komponen utama dari senyawa calon aroma, sehingga pembentukannya yang maksimal dapat dipakai sebagai pegangan dalam menentukan lama fermentasi yang tepat (Effendi dalam Alamsyah, 1991). Flavor atau aroma terutama timbul dari hasil reaksi maillard akibat degradasi asam amino dan gula (Lopez, 1972).

Kadar lemak biji kakao naik 2 % atau kadar komponen bukan lemak turun 2 % setelah 2 - 4 hari fermentasi. Selama pengolahan, kerusakan lemak terjadi melalui berbagai macam reaksi hidrolitik dan oksidatif di dalam biji kakao (Sulistyowati dan Soenaryo, 1988).

Chart (1963) dalam Alamsyah (1991) mengemukakan bahwa kandungan teobromin menurun selama fermentasi berlangsung. Penurunan ini terutama pada hari ketiga fermentasi. Pada tahap ini teobromin yang larut dalam cairan sel akan berdifusi ke kulit biji. Difusi akan berhenti bila kadar teobromin dalam biji telah seimbang dengan yang ada di dalam kulit biji. Adanya penurunan kadar teobromine maka rasa pahit yang ditimbulkan akan berkurang.

Kandungan protein pada keping biji akan mengalami penurunan karena fermentasi, yaitu oleh aktifitas enzim proteolitik protein dipecah menjadi asam amino dan peptida (Knapp, 1937).

Warna khas coklat dihasilkan dari berbagai calon warna yang terbentuk selama fermentasi ataupun pada saat penyangraian. Biji kakao mengandung polifenol yang terdiri dari antosianin, leukosantin, katekin dan polifenol kompleks. Selama fermentasi polifenol teroksidasi oleh enzim polifenol oksidase membentuk quinon dan diquinon. Katekin dan epikatekin selama fermentasi dan pengeringan keduanya dirombak dan menghasilkan warna coklat yang khas (Susanto, 1995).

Fermentasi merupakan tahap penting di dalam pengolahan biji kakao dan pembentukan prekursor aroma kakao. Biji kakao mengandung Vicillin Class Globulin (VCG) sekitar 45 % dari total protein yang terdiri atas sub unit polipeptida. Senyawa VCG ini merupakan prekursor flavor pada biji kakao. Kematian biji kakao menyebabkan sel kehilangan integritas dan mengalami vakuolasi, sehingga mempermudah enzim dan substrat bercampur untuk bereaksi membentuk prekursor flavor (Jinap, 1998). Menurut Effendi (1998) beberapa enzim yang berperan dalam reaksi pembentukan calon aroma adalah enzim invertase, endopeptidase, polifenol oksidase. Asam amino bebas, peptida dan gula reduksi merupakan komponen utama dari calon aroma. Senyawa aromatik dapat terbentuk dari reaksi heterosiklik antara atom-atom karbon dalam cincin aromatis dengan nitrogen. Sedangkan rasa sepat dan pahit pada kakao disebabkan oleh polifenol dan teobromin.

2.5 Polifenol

Fenol pada kakao terdiri dari : catechin (37%), anthocyanin (4%), leucoanthocyanin (58 %). Catechin yang utama adalah (-)-epicatechin, disamping (+)-epicatechin , (+)-gallocatechin dan (-)-epigallocatechin. Anthocyanin terdiri dari cyanidin-3-arabinoside dan cyanidin-3-galactoside. Leucoanthocyanin adalah komponen yang bila dipanaskan pada media asam akan menghasilkan anthocyanin dan catechin atau epicatechin secara bersama-sama (Belitz dan Grosch, 1999).

Menurut Roelofsen (1985) dalam Alamsyah (1991), selama fermentasi terjadi penurunan total polifenol. Penurunan ini disebabkan oleh terjadinya difusi senyawa polifenol ke luar biji. Pengurangan kandungan polifenol pada keping biji berhubungan dengan pembentukan flavor kakao (Rohan, 1963).

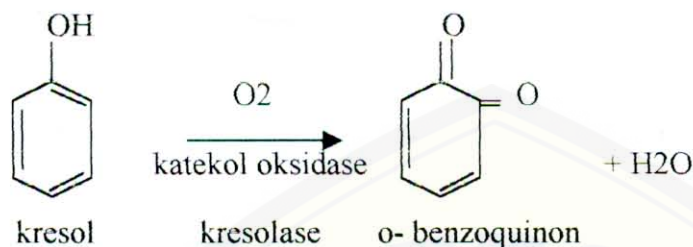
2.6 Polifenol Oksidase

Menurut Meyer (1978), katekol oksidase adalah enzim yang dapat menyebabkan reaksi pencoklatan. Komisi Enzim Internasional Union of Biochemistry (IUB) membagi polifenol oksidase dalam dua katagori yaitu lakase atau p-difenol oksigen oksidoreduktase (EC 1.10.3.2) dan katekol oksidase atau o-difenol oksigen oksidoreduktase (EC 1.10.3.1). Lakase mampu mengoksidase berbagai jenis substrat termasuk monofenol, trifenol dan asam askorbat sama baiknya seperti pada o- dan p- difenol, sebaliknya o-difenol oksigen oksidoreduktase tidak mampu mengoksidasi p-difenol.

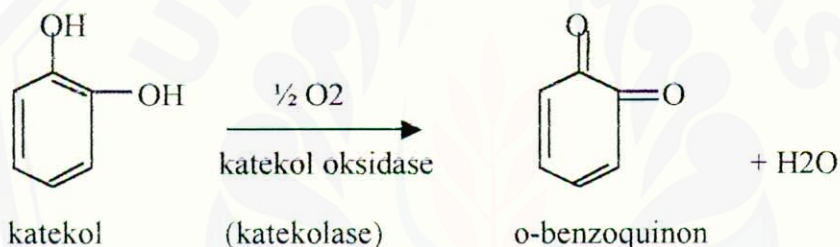
Polifenol oksidase merupakan enzim intraseluler yang berlokasi dekat dengan plastida dan senyawa fenol lebih banyak dalam vakuola. Apabila sel pecah maka plastida dan isi vakuola bercampur sehingga organisasi internal sel rusak. Akibatnya fenol teroksidasi secara enzimatik membentuk quinon yang berpolimerisasi dengan protein dan berperan pada pencoklatan enzimatik (Eskin, 1984).

PPO adalah enzim yang mengkatalisa dua macam reaksi :

- a. Penyisipan oksigen pada posisi orto pada gugus hidroksil yang ada, biasanya diikuti dengan oksidasi menjadi quinon (aktivitas kresolase).



- b. Oksidasi o-difenol menjadi quinon



Gambar 2. Reaksi Tipe Kresolase dan Katekolase (Apandi, 1984)

Menurut Wong *et al.*, (1990) polifenol oksidase pada kakao merupakan enzim yang mengkatalisa oksidasi dari monohidroksi fenol dan o-dihidroksi fenol membentuk o-quinon yang selanjutnya bereaksi dengan amino kompleks dan protein menghasilkan molekul berpolimer tinggi dan disebut melanin dan melanoprotein yang merupakan hasil dari reaksi pencoklatan enzimatis.

Polifenol oksidase adalah enzim yang berperan untuk pertumbuhan perkusor flavor mulai pada fase fermentasi oksidatif sampai pada fase pengeringan (Forsyth dan Quesnel 1963 dalam Wong *et al.*, 1990). Dikatakan pula bahwa diantara perubahan yang mempengaruhi flavor adalah reduksi pada *bitterness* dan *astringency* yang dihasilkan dari polimerisasi yaitu interaksi dari polifenol dan protein.

Villeneuve *et al.* (1985) menyatakan bahwa aktivitas enzim polifenol oksidase menurun selama proses fermentasi. Lee *et al* (1991) dalam Hansen (1998) telah mempurifikasi parsial PPO dari biji kakao, untuk aktivitas o-difenol stabil pada suhu tinggi dan pH optimum 6,8. Penelitian lain diperoleh 4-metil katekol sebagai substrat mempunyai pH optimum 5,4. PPO aktif pada suhu 5°C sampai 65°C dengan suhu optimal 40°C, tetapi akan rusak pada kondisi suhu 85 C atau lebih tinggi (Eskin, 1990).

2.7 Penentuan V_{maks} dan K_m

Nilai V_{maks} dan K_m (Konstanta Michaelis Menten) dapat ditentukan dengan mengadakan percobaan penentuan kecepatan reaksi (V) pada berbagai konsentrasi substrat.

$$\text{Dari rumus } V = V_{maks} \frac{[S]}{[S] + [K_m]}$$

Bila diambil kebalikannya, maka rumus tersebut menjadi

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]}$$

Bila $1/V = Y$ dan $1/[S] = X$ sehingga rumus diatas dapat ditulis sebagai $Y = a + bX$, untuk

$$1/V_{maks} = a \quad K_m/V_{maks} = b$$

Sehingga bila kita plotkan $1/V$ sebagai ordinat dan $1/S$ sebagai absis akan diperoleh suatu garis lurus yang akan memotong ordinat pada $1/V_{maks}$ dan absis pada $-1/K_m$ dengan gradien (slope) $(\text{tg } \alpha) = K_m/V_{maks}$. Dengan demikian harga $1/V_{maks}$ diketahui dan nilai V_{maks} didapat. Demikian juga nilai $1/K_m$ diketahui dan K_m akan dapat didapat juga. Harga K_m suatu enzim tergantung dari jenis substrat dan juga keadaan lingkungan seperti suhu dan kekuatan ion. K_m merupakan konsentrasi substrat yang separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yaitu bila kecepatan reaksi telah mencapai $\frac{1}{2} V_{maks}$ (Winarno, 1995). Arslan *et al* (1998) melaporkan bahwa polifenol oksidase dari Malatya aprikot memiliki afinitas tertinggi terhadap katekol ($K_m = 6,6 \text{ mM}$) diikuti dengan L-dopa

($K_m = 12,5$) dan asam galat ($K_m = 20 \text{ mM}$). Besar kecilnya afinitas antara enzim dan substrat dapat dilihat dari nilai K_m , makin besar nilai K_m berarti afinitas makin rendah dan begitu pula sebaliknya.





III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juni 2002. Penelitian dilakukan di Kebun Kedaton bagian dari PTP Nusantara XII Kebun Renteng, Jember, Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekuler, Universitas Jember.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan dasar yang digunakan adalah biji kakao jenis edel yang diperoleh dari Kebun Kedaton bagian dari PTP Nusantara XII Kebun Renteng di Jember.

Bahan kimia yang digunakan antara lain adalah EDTA, PVP, Tris HCl, β -Mercaptoethanol, pirokatekol, PMSF, Buffer Phosphat, CuSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan Bovine Serum Albumin (BSA) yang diperoleh dari perusahaan kimia Sigma St. Louis, Mo. (USA) dan E-Merck (Germany). Digunakan pula Nitrogen cair.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, tabung reaksi, beaker glass, mikro pipet, timbangan listrik merk Ohaus, sentrifuse, termometer, pH meter, spektrofotometer dan recorder merk Hitachi.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Fermentasi biji kakao dilakukan di Kebun Kedaton. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan kotak fermentasi berkapasitas satu ton dengan ukuran 2 x 1 meter dengan tinggi 0,8 meter. Sisi kotak terdapat lubang tempat keluarnya cairan pulp dengan diameter lubang 1 cm. Tiap lubang berjarak 9 cm dari lubang yang lain. Fermentasi dilakukan selama 60 jam, setiap 6 jam sampel diambil. Sebelum sampel diambil dilakukan pengukuran suhu tumpukan biji kakao menggunakan termometer air raksa pada bagian atas, tengah, bawah kotak fermentasi. Dengan demikian perkembangan suhu fermentasi masa biji kakao dapat diketahui. Sampel

dimasukkan ke dalam tas es suhu $\pm 4,^{\circ}\text{C}$ dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengamatan selanjutnya.

3.3.2 Kontrol Fermentasi

Kontrol fermentasi bertujuan untuk mengetahui kesempurnaan proses fermentasi, meliputi :

3.3.2.1 Penentuan pH Pulp (Metode AOAC, 1994)

Pulp sebanyak 5 gr dihaluskan menggunakan mortar kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml, selanjutnya ditambahkan aquades 45 ml dengan suhu (70°C - 80°C). Larutan dihomogenkan dengan homogenizer selama 20 detik, kemudian disaring. Filtrat diukur pH-nya dengan menggunakan pH-meter yang sudah dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 4 dan pH 7.

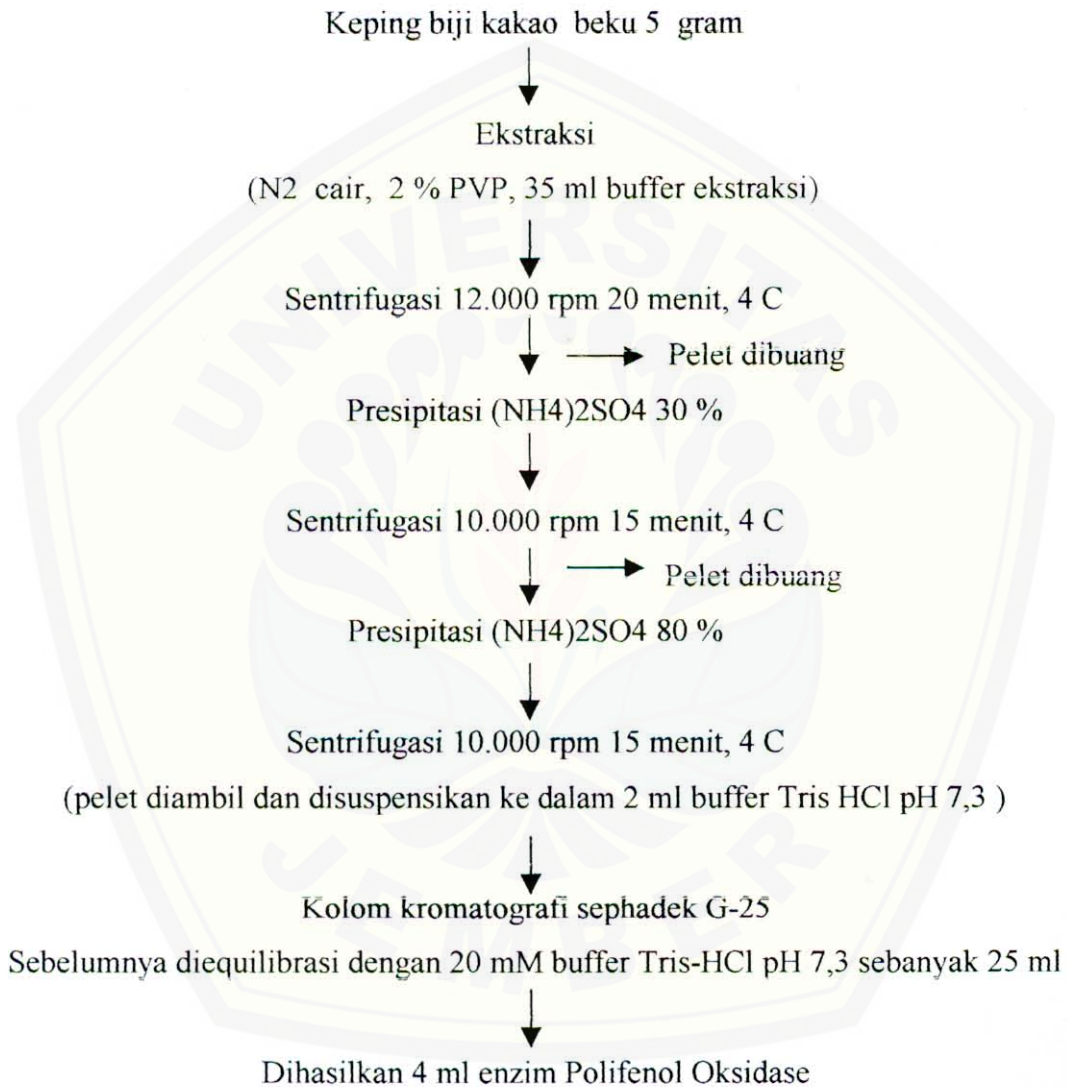
3.3.2.2 Penentuan pH Keping Biji

Keping biji sebanyak 5 gr dihaluskan menggunakan mortar, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml, selanjutnya ditambahkan aquades 45 ml dengan suhu (70°C - 80°C). Larutan dihomogenkan dengan homogenizer selama 20 detik, kemudian disaring. Filtrat diukur pH-nya dengan menggunakan pH- meter yang sudah dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 4 dan pH 7.

3.3.3 Ekstraksi dan Presipitasi

Keping biji kakao sebanyak 5 gram diekstrak dengan kondisi suhu dibawah 4°C . Metode ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode Fritz *et al.* (1986) dengan sedikit modifikasi. Ekstraksi menggunakan mortal stumper serta dengan penambahan nitrogen cair. Setelah halus ditambahkan 0,1 gram PVP dan 35 ml buffer ekstraksi yang mengandung campuran 40 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 15 mM mercaptoethanol, 100 mM DIECA dan 1,74 mg/g biji. Sampel disentrifuse selama 20 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C . Supernatan dipisahkan sebagai ekstrak kasar.

Ekstrak kasar kemudian dipresipitasi dengan menggunakan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 –80 %. Pelet yang dihasilkan ditambah dengan 2 ml 20 mM Tris HCl pH 7,3 selanjutnya dilakukan filtrasi (desalting) dengan menggunakan gel sephadex G-25, yang sebelumnya diequilibras dengan 20 mM Tris HCl pH 7,3 sebanyak 25 ml.



Gambar 3. Diagram Alir Ekstraksi dan Presipitasi Enzim PPO dari Keping Biji Kakao.

3.3.4 Pengukuran Aktivitas Enzim

Pengujian aktivitas enzim menggunakan metode spektrofotometri, berdasarkan Kim (1987) yang dimodifikasi dari Mc. Cord dan Kilara (1983). Campuran uji mengandung 0,05 mL 0,005 M CuSO_4 ; 2 mL 0,5 M KH_2PO_4 pH 5,4; 0,5 mL 10 mM pirokatekol. Campuran dimasukkan dalam spektrofotometer kemudian 0,01 mL enzim ditambahkan dan aktivitas enzim diamati.

Satu unit aktivitas enzim adalah sejumlah enzim yang menyebabkan perubahan absorbansi pada 400 nm sebesar 0,001 per menit per ml enzim pada suhu 25° C (Coseteng dan Lee, 1987). Dalam analisa aktivitas enzim PPO digunakan enzim sebesar 0,01mL dan suhu ruang.

3.3.5 Penentuan Karakterisasi Enzim Polifenol Oksidase (PPO)

Untuk menentukan karakterisasi enzim PPO digunakan enzim dari ekstraksi biji kakao tanpa fermentasi. Karakterisasi tersebut meliputi :

3.3.5.1 Penentuan Kinetika Enzim PPO

Konstanta Michaelis- Menten (K_m) dan kecepatan maksimum (V_{maks}) ditentukan dengan pirokatekol (2 – 18 mM) dengan memplotkan data $1/[S]$ vs $1/V$ sesuai dengan metode Lineweaver-Burk (Stryer, 1975 dalam Winarno, 1995).

3.3.5.2 Penentuan pH Optimal

Pengujian sesuai metode pada butir 3.3.5. Penentuan pH KH_2PO_4 dengan menggunakan variasi KH_2PO_4 pH 5,0 – 6,6. Aktivitas enzim berdasar perubahan absorbansi selama 5 menit.

3.3.5.3 Penentuan Suhu Optimal

Untuk mengetahui suhu optimal, campuran uji yang terdiri dari 0,05 ml 0,005 M CuSO_4 ; 2 ml 0,5 M KH_2PO_4 pH 5,4; 0,5 ml 10 mM pirokatekol dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dipanaskan pada range suhu 25°C – 100 °C selama 5 menit kemudian ditambahkan 0,01 mL enzim dan diamati aktivitasnya.

3.3.6 Penentuan Aktivitas Enzim PPO Selama Fermentasi

Campuran uji mengandung 0,05 mL 0,005 M CuSO_4 ; 2 mL 0,5 M KH_2PO_4 pH 5,4; 0,5 mL 10 mM pirokatekol. Campuran dimasukkan dalam spektrofotometer kemudian 0,01 mL enzim ditambahkan, dicatat perubahan absorbansinya selama 5 menit dan dihitung aktivitasnya.

3.3.7 Penentuan Protein

Penentuan protein menggunakan metode Bradford dengan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar (Bio-Rad, 1984). Pembuatan reagen bradford CBB G-250 sebanyak 100 mg dilarutkan dalam etanol 95 % dan ditambahkan asam fosfat 85 %. Setelah larut ditambahkan aquades sampai volume 1 L. Sampel protein 0,015 ml ditambah 0,985 ml reagen bradford dan divortek, kemudian dibiarkan 5 menit dan diamati pada 595 nm.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut :

- 1 Suhu fermentasi meningkat selama fermentasi.
- 2 pH pulp meningkat selama fermentasi dan pH keping biji menurun selama fermentasi .
- 3 Karakterisasi PPO dari biji kakao didapatkan nilai Km dengan pirokatekol adalah 23,92 mM dan V mak 1000 unit. Aktivitas maksimum pada suhu 45 °C dan pH 5,4.
- 4 Enzim PPO dari biji kakao mengalami penurunan aktivitas selama proses fermentasi. Aktivitas enzim PPO turun sebesar 3,8 % setelah fermentasi selama 6 jam. Setelah fermentasi selama 24 jam biji mati sehingga terjadi penurunan aktivitas enzim besar yaitu 32 %.. Pada akhir fermentasi yaitu setelah 60 jam, aktivitasnya turun hingga 87 %.
- 5 Terdapat hubungan yang erat antara aktivitas dengan lama fermentasi, suhu fermentasi, pH keping biji. Hal ini berdasar pada nilai R² masing – masing yaitu 0,9449 ; 0,9542 ; 0,9601.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas enzim PPO pada biji kakao dengan menggunakan substrat selain pirokatekol seperti (-)- epikatekin atau (+)-katekin. Hal ini untuk menambah informasi tentang kekhususan substrat terhadap enzim PPO pada biji kakao .



DARTAR PUSTAKA

- Alamsyah, T.S., 1991, **Peranan Fermentasi dalam Pengolahan Biji Kakao Kering**, Warta Balai Penelitian Perkebunan Jember No 2.
- Arslan O, Arzu Temur dan Israfil Tazlu, 1998, **Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot (*Prunus armeniaca L.*)**, J. Agric. Food Chem, 46, 1239-1241.
- Apandi, M., 1984, **Teknologi Buah dan Sayur**, Alumnus Bandung, Bandung.
- Coseteng M.Y dan C.Y. Lee, 1987, **Changes in Apple Polyphenol Oxidase and Polyphenol Concentration in Relation to Degree of Browning**, J. Food Sci., 52, 985-989.
- Belitz and Grosch, 1999, **Food Chemistry**. Second Edition, New York.
- Chatt, E.M., 1953, **Cocoa Cultivation, Processing and Analysis**, The British Food Manufacturing Industry, London.
- Effendi, 1990, **Pedoman Pengolahan Biji Kakao**, Pusat Penelitian Perkebunan Bogor, Bogor.
- Eskin, N.A.M., 1990, **Biochemistry of Food**, Academic Press, New York.
- Hansen, C.E., Olmo M and Burri C, 1998, **Enzyme Activities in Cocoa Bean During Fermentation**, J. Sci. Food Agric., 77 : 273-281.
- Knapp, 1937, **Cocoa Fermentation**, Jhon Bale Sons and Curnow, London.
- Mansyur, Z dan Sunaryo, 1978, **Pengolahan Coklat pada Perkebunan Besar**, Balai Penelitian Perkebunan Bogor, Bogor.
- Nasution, Z.W., Ciptadi dan B.S Laksmi, 1976, **Pengolahan Coklat**, Departemen Fatemeta-IPB, Bogor.
- Rohan, T.A., 1963, **Processing of Raw Cocoa for the Market**, FAO, Rome.
- Sulistyowati, 1986, **Beberapa Faktor Mutu Biji Kakao**, Warta BPP Jember, No. 5
- Sunanto, H., 1992, **Coklat : Budidaya, Pengolahan dan Aspek Ekonomisnya**, Kanisius, Yogyakarta.

Susanto, F.X., 1994, **Tanaman Kakao, Budidaya dan Pengolahan Hasil**, Kansius, Yogyakarta.

Susijahadi dan S Jinap, 1998, **Isolation of Yeast Having Potensial in alcohol Fermentation from fermented Coccoz Beans**, Proc Malaysian Science and Teknology Congress, Kuala Terengano Darul Iman, Malaysia.

Wahyudi, T., Hastori dan B. Djatmiko, 1987, **Pengaruh Ragi dan Enzim Pektolitik Terhadap Proses Fermentasi dan Mutu Biji Kakao**, Pelita Perkebunan, 2 (4), 159-165.

Winarno F.G., 1992, **Kimia Pangan dan Gizi**, Gramedia, Jakarta.

Winarno F.G., 1992, **Pangan, Gizi, Teknologi dan Konsumen**, Gramedia, Jakarta.

Winarno F.G., 1995, **Enzim Pangan**, Gramedia, Jakarta.

Wood, G.A.R and Lass R.A., 1985, **Cocoa : Tropical Agricultural Series**, Longman, London.

Wong, M.K., Dimick, P.S., Hammerstedt, R.Y., 1990, **Extraction and High Performance Liquid Chromatographic Enrichment of Polyphenol Oxidase from *Theobroma cacao* Seeds**, J. Food Sci., 55 : 1108-1111

Lampiran 1. Perubahan suhu selama fermentasi

Lama fermentasi (jam)	Suhu °C			
	Atas	Tengah	Bawah	Rata-rata
0	25	25	25	25
6	29	27	26	27,33
12	30	28	27	28,33
18	31	29	29	29,66
24	32	30	30	30,66
30	34	32	31	32,33
36	35	34	33	34
42	42	38	36	38,66
48	45	42	40	42,33
54	50	50	49	49,66
60	52	51	50	51

Lampiran 2. pH pulp dan keping biji *)

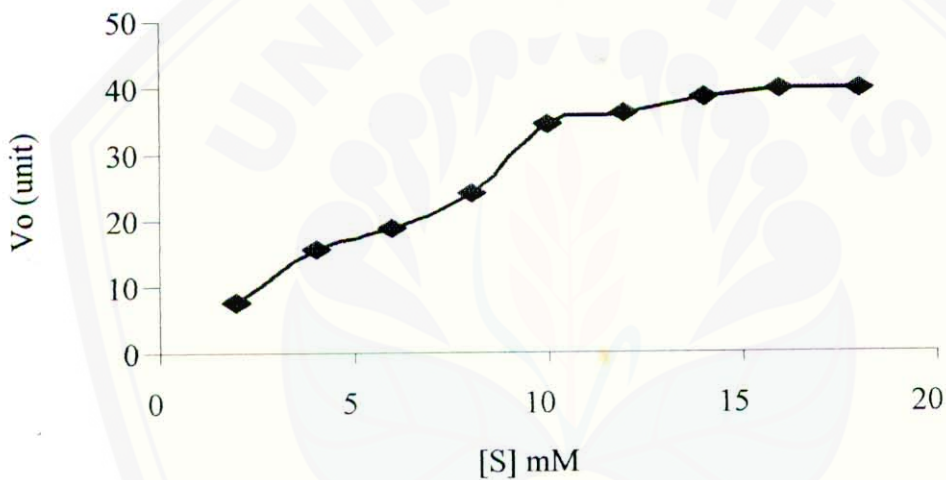
Lama Fermentasi (jam)	pH pulp	pH keping biji
0	4.07	6.69
6	4.14	6.56
12	4.24	6.39
18	4.39	6.18
24	4.46	5.76
30	4.57	5.59
36	4.68	5.31
42	4.76	5.12
48	4.86	4.89
54	4.92	4.67
60	5.07	4.55

Ket : *) rata-rata dari 3 ulangan

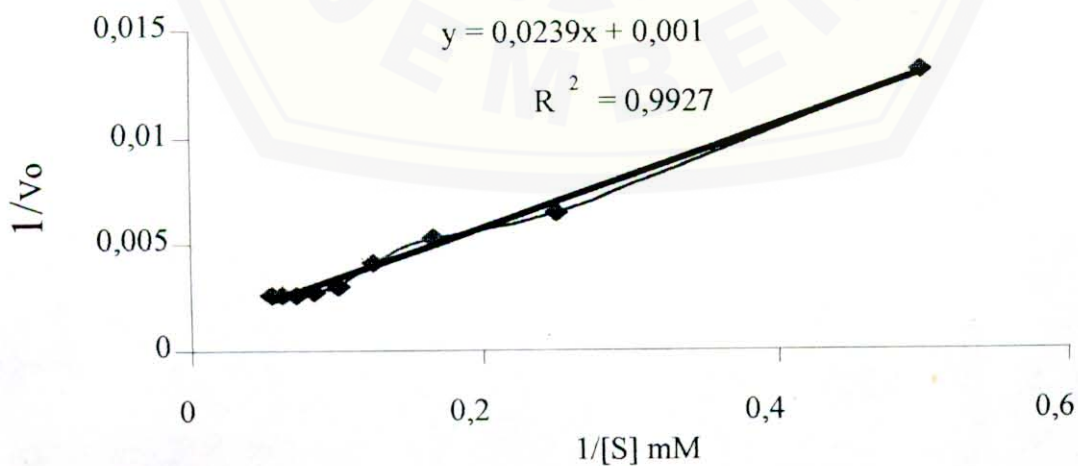
Lampiran 3. Kinetika Enzim PPO

Tabel Aktivitas enzim PPO berdasarkan berbagai konsentrasi pyrokatekol

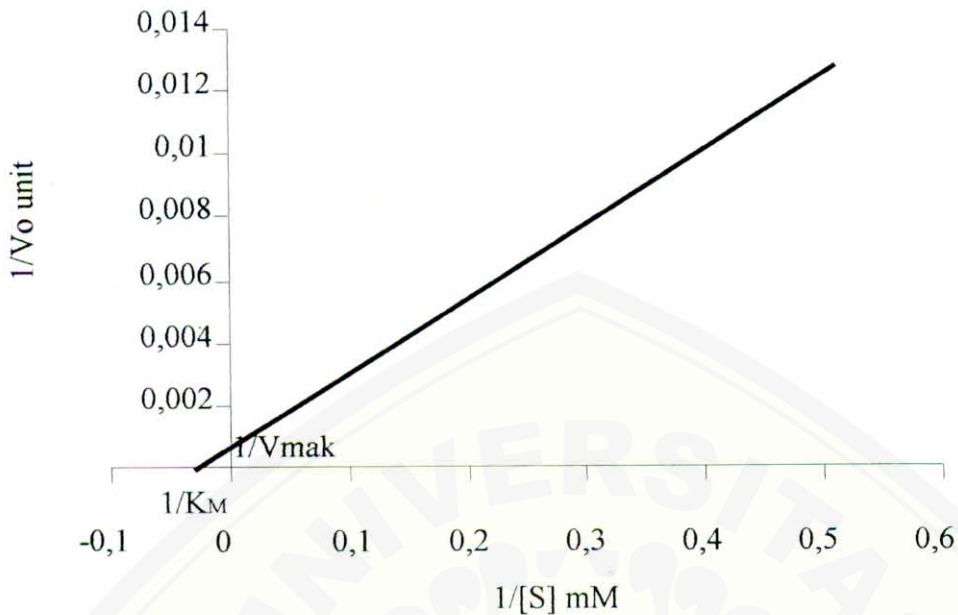
[Pyrokatekol]	Aktivitas (Vo)	1/S	1/Vo
2	7,142856	0,5	0,013
4	15,4285713	0,25	0,00648
6	18,8571427	0,1666	0,0053
8	23,9999998	0,125	0,00417
10	34,28571	0,1	0,00292
12	35,9999997	0,0833	0,00278
14	38,57143	0,0714	0,00259
16	39,42857	0,0625	0,00254
18	39,42857	0,0555	0,00254



Gambar Hubungan [S] dan Vo



Gambar Hubungan 1/[S] dan 1/Vo



Gambar Plot data Lineweaver – Burk dari Enzim PPO Terhadap Substrat Pirokatekol

Penentuan Vmaks dan Km

$$Y = 0,0239 X + 0,001$$

$$Y = a + bX$$

$$Y = 0,001 + 0,0238 X$$

$$1/V_{mak} = a$$

$$K_m / V_{maks} = b$$

- Penentuan Vmaks

Perpotongan sumbu Y → $X = 0$

$$Y = 0,001 + (0,0239 \cdot 0)$$

$$Y = 0,001$$

$$1/V_{maks} = Y \rightarrow 1/V_{maks} = 0,001$$

$$V_{maks} = 1000 \text{ unit}$$

- Penentuan Km

Perpotongan sumbu X $\rightarrow Y = 0$

$$0 = 0,001 + 0,0239X$$

$$X = 0,0418$$

$$1/Km = 0,0418$$

$$Km = 23,92$$

$$Km/Vmaks = b$$

$$23,92/1000 = 0,0239$$

1 unit aktivitas ialah sejumlah enzim yang menyebabkan perubahan absorbansi pada 400 nm sebesar 0,001 per menit per ml enzim. Enzim yang digunakan 0,01 mL

- **Penentuan Km dan Vmaks menggunakan metode grafik**

$$1 \text{ unit} = \frac{\Delta \text{ Absorbansi} \times 0,02}{\text{waktu} \times 0,001}$$

1 kotak mewakili absorbansi sebesar 0,02 karena itu dikali 0,02. (Horisontal = absorbansi)

Waktunya 7/6 menit karena 3 kotak = 7/6 menit. (Vertikal = waktu)

- **Penentuan aktivitas menggunakan Δ Absorbansi**

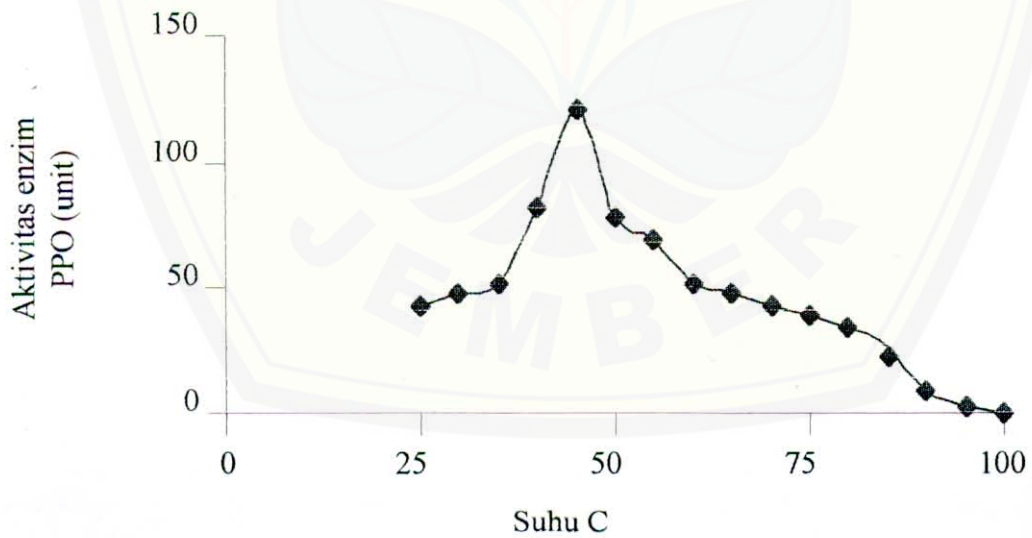
$$1 \text{ unit} = \frac{\Delta \text{ Absorbansi}}{\text{waktu} \times 0,001}$$

Waktu yang digunakan 5 menit

Lampiran 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim

Tabel. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim PPO

Suhu	Aktivitas enzim (unit)
25	43,1034
30	47,4138
35	51,7241
40	81,8966
45	120,6894
50	77,5862
55	68,9655
60	51,7241
65	47,4138
70	43,1034
75	38,7931
80	34,4828
85	25,8621
90	8,6207
95	2,1507
100	0

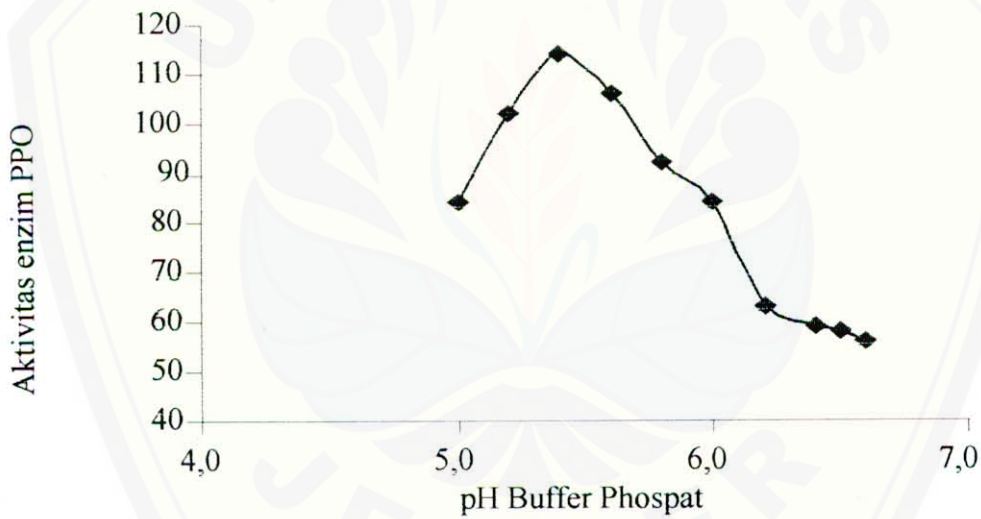


Gambar Hubungan Suhu Dengan Aktivitas Enzim PPO

Lampiran 5. Pengaruh pH buffer fospat terhadap aktivitas enzim PPO

Tabel Pengaruh pH buffer fospat terhadap aktivitas enzim PPO

pH	Aktivitas enzim (unit)
5	84
5,2	102
5,4	114
5,6	106
5,8	92
6	84
6,2	63
6,4	59
6,5	58
6,6	56

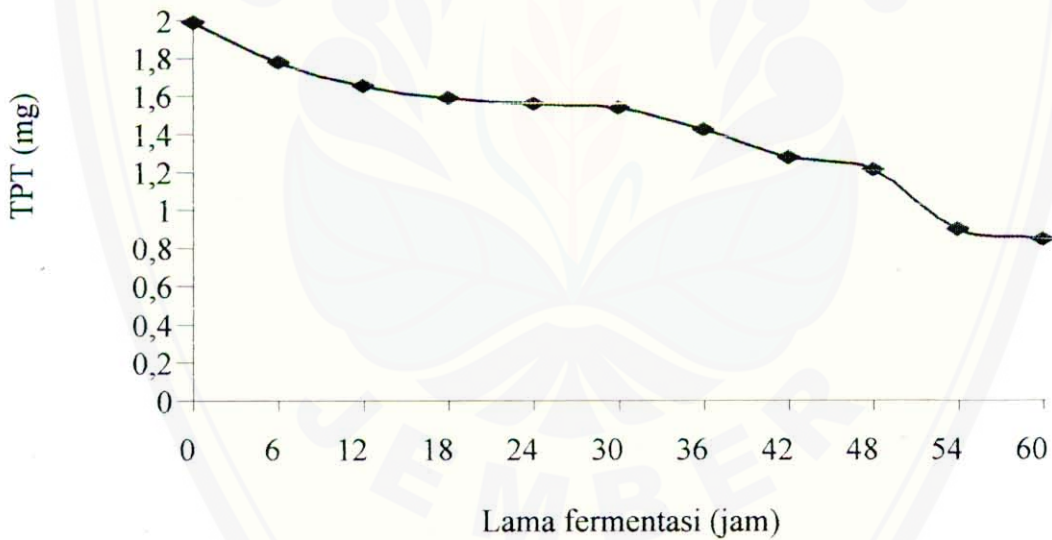


Gambar Hubungan pH Buffer Phospat Terhadap Aktivitas Enzim PPO

Lampiran 6. Total Protein Terlarut (TPT)

Tabel Total Protein Terlarut (TPT)

Lama fermentasi (jam)	(TPT)
0	1,9893
6	1,778
12	1,6546
18	1,5933
24	1,5533
30	1,5366
36	1,421
42	1,2773
48	1,2077
54	0,894
60	0,838



Gambar Hubungan Lama Fermentasi Dengan TPT

Lampiran 7. Aktivitas enzim PPO selama fermentasi

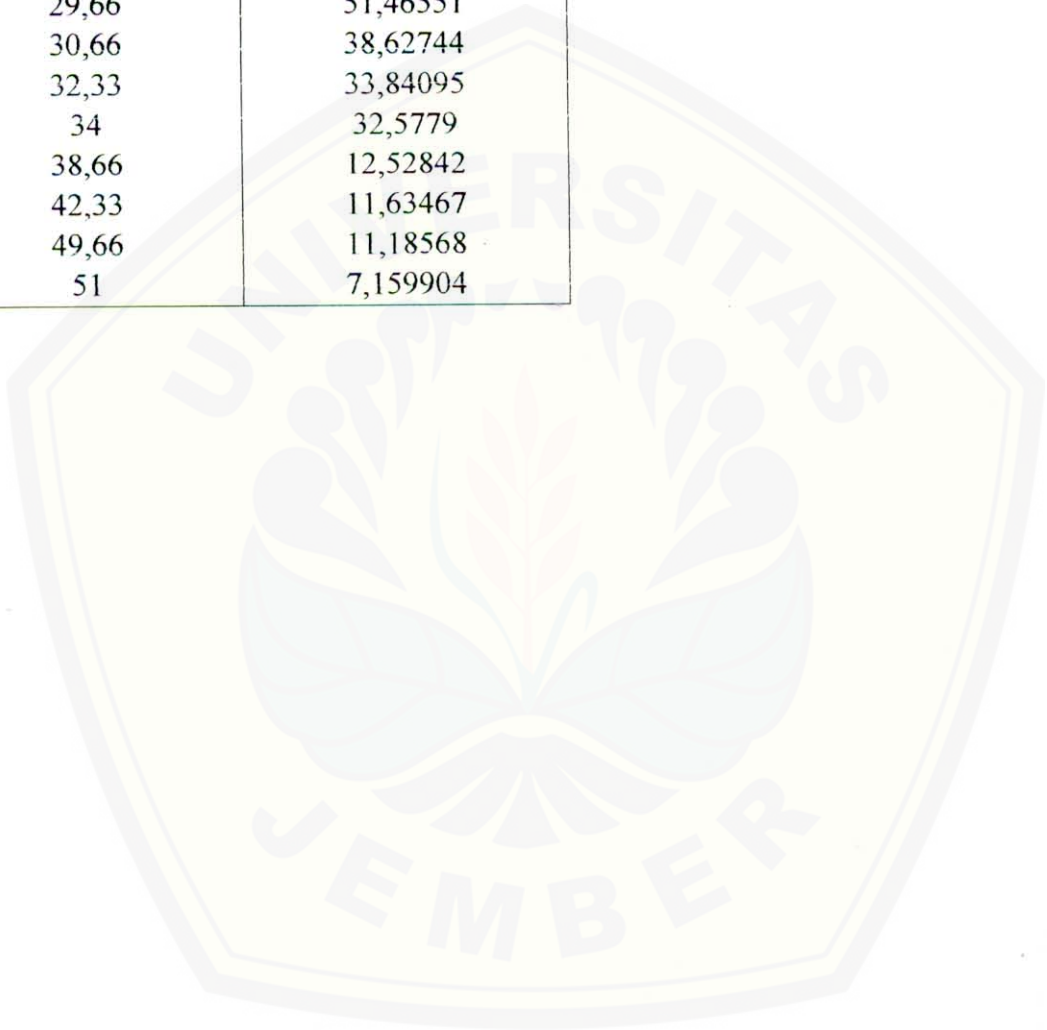
Lama fermentasi (Jam)	Aktivitas spesifik enzim (unit/mg protein)
0	57,30659
6	55,11811
12	54,39381
18	51,46551
24	38,62744
30	33,84095
36	32,5779
42	12,52842
48	11,63467
54	11,18568
60	7,159904

Lampiran 8. Pengaruh pH keping biji terhadap aktivitas enzim

PH Keping Biji	Aktivitas spesifik enzim (unit/mg protein)
6,69	57,30659
6,56	55,11811
6,39	54,39381
6,18	51,46551
5,76	38,62744
5,59	33,84095
5,31	32,5779
5,12	12,52842
4,89	11,63467
4,67	11,18568
4,55	7,159904

Lampiran 9. Pengaruh suhu fermentasi terhadap aktivitas enzim

Suhu C	Aktivitas spesifik enzim (unit/mg protein)
25	57,30659
27,33	55,11811
28,33	54,39381
29,66	51,46551
30,66	38,62744
32,33	33,84095
34	32,5779
38,66	12,52842
42,33	11,63467
49,66	11,18568
51	7,159904



Lampiran 7. Aktivitas enzim PPO selama fermentasi

Lama fermentasi (Jam)	Aktivitas enzim (unit)	Aktivitas spesifik enzim (unit/mg protein)
0	11400	57,30659
6	9800	55,11811
12	9000	54,39381
18	8200	51,46551
24	6000	38,62744
30	5200	33,84095
36	4600	32,5779
42	1600	12,52842
48	1400	11,63467
54	1000	11,18568
60	600	7,159904

Lampiran 8. Pengaruh pH keping biji terhadap aktivitas enzim

pH Keping Biji	Aktivitas enzim (unit)	Aktivitas spesifik enzim (unit/mg protein)
6,69	11400	57,30659
6,56	9800	55,11811
6,39	9000	54,39381
6,18	8200	51,46551
5,76	6000	38,62744
5,59	5200	33,84095
5,31	4600	32,5779
5,12	1600	12,52842
4,89	1400	11,63467
4,67	1000	11,18568
4,55	600	7,159904

Lampiran 9. Pengaruh suhu fermentasi terhadap aktivitas enzim

Suhu° C	Aktivitas enzim (unit)	Aktivitas spesifik enzim (unit/mg protein)
25	11400	57,30659
27,33	9800	55,11811
28,33	9000	54,39381
29,66	8200	51,46551
30,66	6000	38,62744
32,33	5200	33,84095
34	4600	32,5779
38,66	1600	12,52842
42,33	1400	11,63467
49,66	1000	11,18568
51	600	7,159904

