

PERUBAHAN KANDUNGAN ANTIOKSIDAN, POLIFENOL DAN PROFIL PROTEIN SELAMA PRA-PERKECAMBAHA PADA BIJI KAKAO

Changes of Antioxidants, Polyphenols and Protein Profiles of Cocoa Beans During Pre-Germination

Kiki Ulfaniah, Tri Handoyo*, Zahratus Sakdiyah

Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37 Kampus Tegal Boto, Jember 68121

*E-mail: trihandoyo.faperta@unej.ac.id

ABSTRACT

Cocoa proven as food source that rich in bioactive compounds, especially polyphenols that have a role as an antioxidant because it can stop the free radical reactions. As the change in lifestyle of the people and the development of technology, various ways have been made to improve the nutrition quality of the cocoa beans with pre-germination methods. This research aimed to study the effect of pre-germination methods that change the content of antioxidants, polyphenols and protein profiles of cocoa beans. The research was conducted in the Laboratory of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Jember, held from January 28 until April 30, 2013. Methodology research used Sulawesi cocoa beans type 1 beans without skin and with the seed coat, which is done with a completely randomized design (CRD) in the old pre-germination 0, 1, 2, 3, 4, 5 days and repeated 4 times. The results showed that pre-germination methods provide a very real effect on the polyphenol content and antioxidant cocoa beans without without and the seed coat. The highest antioxidant content of cocoa beans without the skin of 0.47 $\mu\text{g}/\text{mg}$ at the old pre-germination for 3 days and cocoa beans with the seed coat by 0.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in the old pre-germination 5 days. Polyphenol content of cocoa beans without skin and with the best seed coat that is in the control treatment had the highest content of 2.67 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for cocoa beans without skin and 2.46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for cocoa beans with the seed coat.

Keywords: *Cocoa; Polyphenols; Antioxidants; Free Radicals; Pre-Germination*

ABSTRAK

Kakao terbukti sebagai sumber makanan kaya senyawa bioaktif terutama polifenol yang mempunyai kasiat sebagai antioksidan karena mampu menghentikan reaksi radikal bebas. Seiring perubahan pola hidup masyarakat dan berkembangnya teknologi, berbagai cara telah dilakukan untuk meningkatkan kualitas nutrisi pada biji kakao dengan metode pra-perkecambahan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode pra-perkecambahan terhadap perubahan kandungan antioksidan, polifenol dan profil protein biji kakao. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, dilaksanakan mulai tanggal 28 Januari sampai 30 April 2013. Metode penelitian menggunakan biji kakao jenis Sulawesi 1 tanpa kulit dan dengan kulit biji, yang dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada lama pra-perkecambahan 0, 1, 2, 3, 4, 5 hari dan diulang sebanyak 4 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode pra-perkecambahan memberikan pengaruh sangat nyata terhadap kandungan polifenol dan antioksidan biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit biji. Kandungan antioksidan tertinggi untuk biji kakao tanpa kulit biji sebesar 0,47 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pada lama pra-perkecambahan 3 hari dan untuk biji kakao dengan kulit biji sebesar 0,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pada lama pra-perkecambahan 5 hari. Kandungan polifenol biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit biji terbaik yaitu pada perlakuan kontrol memiliki kandungan tertinggi sebesar 2,67 $\mu\text{g}/\text{mg}$ untuk biji kakao tanpa kulit dan 2,46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ untuk biji kakao dengan kulit biji.

Kata kunci: *Kakao; Polifenol; Antioksidan; Radikal Bebas; Pra-Perkecambahan*

How to cite: Ulfaniah K, T Handoyo, Z Sakdiyah. 2014. Perubahan kandungan antioksidan, polifenol dan profil protein selama pra-perkecambaha pada biji kakao. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(3): 43-46.

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang cukup banyak dimanfaatkan dunia industri dan dapat diolah menjadi berbagai macam produk baru yang bernilai ekonomi tinggi. Produksi biji kakao Indonesia secara signifikan terus meningkat, tetapi mutu yang dihasilkan sangat rendah akibat beberapa faktor antara lain: (a) minimnya sarana pengolahan, (b) lemahnya pengawasan mutu, dan (c) penerapan teknologi pada seluruh tahapan proses pengolahan biji kakao rakyat tidak berorientasi pada mutu, misalnya biji kurang terfermentasi, kadar air tinggi. Namun, disisi lain kakao Indonesia juga mempunyai keunggulan yaitu mengandung lemak coklat yang tinggi dan tidak cepat meleleh (Misnawi *et al.*, 2004).

Kakao merupakan sumber makanan kaya senyawa-senyawa bioaktif, terutama polifenol, yang mempunyai khasiat sebagai antioksidan dan antimikroba. Biji kakao mempunyai potensi sebagai bahan antioksidan alami yang mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem immune dan efek kemopreventif untuk pencegahan penyakit jantung koroner dan kanker (Keen *et al.*, 2005; Otman *et al.*, 2007; Weisburge, 2001). Seiring perubahan pola hidup masyarakat dan berkembangnya teknologi, berbagai cara telah dilakukan untuk meningkatkan mutu kualitas produk pangan, salah satunya dengan menggunakan metode pra-perkecambahan yang

dapat diterapkan untuk meningkatkan atau memperbaiki nutrisi pada biji kakao (Hsu *et al.*, 2008; Miyake *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004).

Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memberikan informasi mengenai perubahan peningkatan kandungan antioksidan, polifenol dan perubahan pola profil protein selama pra-perkecambahan pada biji kakao. Jika biji kakao pra-perkecambahan terbukti mengalami perubahan peningkatan kandungan nutrisi, maka dapat menjadi solusi untuk meningkatkan nutrisi biji kakao sehingga dapat menurunkan senyawa yang memiliki dampak negatif bagi kesehatan.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Penelitian. Biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit biji dicekambahkan sesuai perlakuan dan dikeringkan menggunakan oven (40°C). Setelah kering biji kakao di gerus hingga menjadi bubuk dan diayak dengan menggunakan ayakan 90 mesh.

Penentuan Kandungan Antioksidan. Sebanyak 50 μl larutan sampel dan larutan standart vitamin C tambahkan dengan 500 μl DDPH 0,4 Mm, kemudian memasukkan 1,45 ml ethanol PA dan di vortek sampai homogen. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang

517 nm. Hasil pembacaan dibandingkan dengan standart Vitamin C 2 mg/ml.

Penentuan Kandungan Polifenol. Sebanyak 25 µl larutan sampel dan larutan standart tambahkan dengan 200 µl ethanol kemudian tambahkan 775 µl aquadest dan 1.250 µl larutan Folin Ciocalteu. Diamkan selama 50 menit, setelah itu masukkan 1 ml Na₂CO₃ dan di vortek sampai homogen. Kemudian di inkubasi selama 15 menit pada suhu 15°C dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Hasil pembacaan dibandingkan dengan standart asam galat 2 mg/ml.

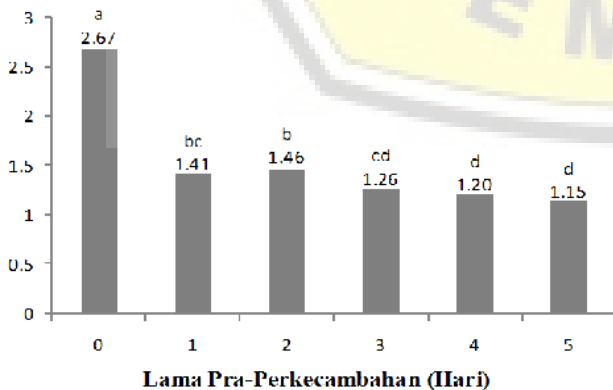
Penentuan Profil Protein dengan SDS-PAGE. Analisa profil protein dilakukan dengan metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrilamide Gel Elektroforesis) yang merupakan metode pemisah protein berdasarkan perbedaan berat molekulnya. Langkah pertama elektroforesis dimulai dengan memasang pencetak lempengan gel dan dirangkai dengan frame dari bio-Rad. Mencetak lower gel 12,5%. Bahan-bahan running gel 12,5% dicampur sampai homogen (acrylamide 4,15 ml, Lower Gel Buffer 2,50 ml, aquades 3,3 ml, TEMMED 10 µl, APS 10% 100 µl) kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam pencetak lempengan gel melalui dingdingnya agar tidak terbentuk gelembung, sampai kira-kira 1 cm dari atas. Selanjutnya dimasukkan aquades pada bagian atas untuk mengetahui terbentuknya gel. Apabila terbentuk gel, akan terlihat garis tipis diantara aquades dan lower gel.

Mencetak *Upper* gel. Cara mencetak *Upper* gel sama seperti mencetak lower gel. Bahan-bahan *Upper* gel 5% dicampur hingga homogen (acrylamide 0,9 ml, *Upper* Gel Buffer 1,5 ml, aquades 3,6 ml, TEMED 10 µl, APS 10% 50 µl) kemudian campuran tersebut dimasukkan di atas lower gel yang telah mengeras hingga penuh. Comb dimasukkan untuk membuat sumur-sumur dalam buffer. Sampel dan marker yang telah dibuat, sebanyak 10 µl dimasukkan ke dalam lubang comb. Elektroforesis dijalankan dengan kecepatan 90 volt. Proses ini dihentikan setelah warna biru mencapai dasar gel ±3-4 jam. Proses staining dilakukan dengan menggunakan 10% methanol, 10% Acetic Acid, dan 0,1% CBB (coomassie brilliant blue) R-250. Lakukan pencucian dengan menggunakan aquades. Proses dilanjutkan dengan tahapan destaining yaitu menggunakan 10% methanol dan 10% Acetic Acid. Kemudian stop reaksi setelah semua pita proteinya terlihat, lakukan pencucian dengan menggunakan aquades. Analisa hasil perhitungan berat molekul dilakukan dengan *software image*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Kandungan Polifenol

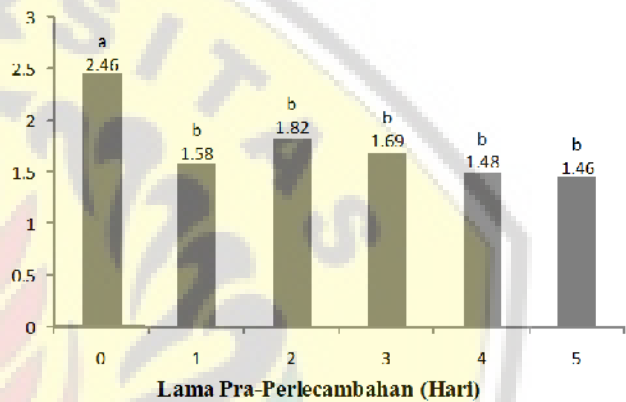
Perubahan metabolisme polifenol biji kakao tanpa kulit menunjukkan pola perubahan yang cenderung menurun (Gambar 1). Terjadi peningkatan pada lama pra-perkecambahan 2 hari sebesar 1,46 µg/mg. Hal ini menunjukkan bahwa pra-perkecambahan selama 2 hari belum terjadi aktifitas enzim pengoksidasi polifenol sehingga terus terjadi pembentukan senyawa-senyawa fenolik yang diharapkan dapat digunakan sebagai senyawa pelindung pada biji kakao selama proses pra-perkecambahan.



Gambar 1. Kandungan polifenol (µg/mg) biji kakao tanpa kulit biji selama pra-perkecambahan.

Berdasarkan hasil analisa menggunakan uji F, diperoleh bahwa pra-perkecambahan berbeda sangat nyata terhadap kandungan polifenol biji kakao tanpa kulit biji dengan nilai ($p > 0,01$) maka dilanjutkan dengan uji BNT. Hasil uji BNT menunjukkan pada biji kakao tanpa kulit biji lama pra-perkecambahan 4 hari berbeda tidak nyata dengan pra-perkecambahan 5 hari dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Kandungan polifenol biji kakao tanpa kulit tertinggi yaitu pada lama pra-perkecambahan 0 hari sebesar 2,67 µg/mg, sedangkan kandungan polifenol terendah pada lama pra-perkecambahan 5 hari sebesar 1,15 µg/mg.

Perubahan kandungan polifenol juga terjadi pada biji kakao dengan kulit biji dengan pola perubahan yang cenderung menurun (Gambar 2). Terjadi peningkatan pada lama pra-perkecambahan 2 hari sebesar 1,82 µg/mg. Hal ini menunjukkan bahwa aktifitas enzim pengoksidasi polifenol belum terjadi sehingga terjadi pembentukan senyawa-senyawa fenolik yang dapat digunakan sebagai senyawa pelindung pada biji kakao selama proses pra-perkecambahan. Pada lama pra-perkecambahan 3 hari, kandungan polifenol menurun sebesar 1,69 µg/mg dari perlakuan sebelumnya yang menunjukkan mulai aktifnya enzim pengoksidasi polifenol dan senyawa fenol mulai diubah menjadi lignin yang bersama dengan selulosa dan polisakarida lainnya sebagai bahan penguat dinding sel. Penurunan kandungan polifenol terus terjadi sampai pada lama pra-perkecambahan 5 hari.



Gambar 2. Kandungan polifenol (µg/mg) biji kakao dengan kulit biji selama pra-perkecambahan.

Hasil uji F menunjukkan bahwa perlakuan pra-perkecambahan berbeda sangat nyata ($p > 0,01$) terhadap kandungan polifenol kakao dengan kulit biji. Hasil uji BNT menunjukkan perlakuan lama pra-perkecambahan 0 hari berbeda sangat nyata dengan perlakuan lama pra-perkecambahan 1, 2, 3, 4, dan 5 hari. Hasil analisa kandungan polifenol tertinggi pada perlakuan pra-perkecambahan 0 hari sebesar 2,46 µg/mg. Sedangkan kandungan polifenol terendah terdapat pada perlakuan lama pra-perkecambahan 5 hari sebesar 1,46 µg/mg.

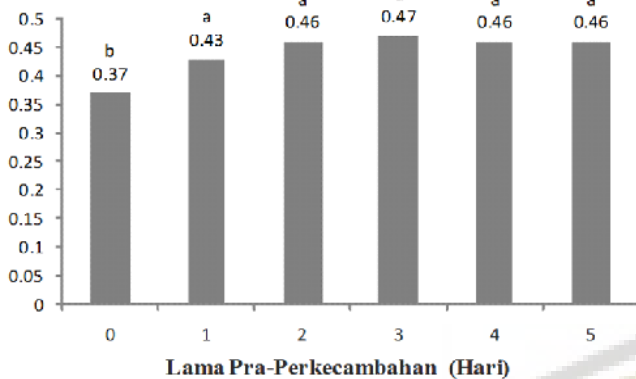
Perlakuan kontrol pada biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit biji dinilai paling baik, karena mengandung polifenol tertinggi. Tingginya kandungan polifenol ini dapat bertindak sebagai antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan manusia karena mampu menghentikan reaksi rantai radikal bebas pada oksidasi lipid (Kocher and Rossell, 1990).

Perubahan Kandungan Antioksidan

Hasil analisa menggunakan uji F, diperoleh bahwa perlakuan pra-perkecambahan berbeda sangat nyata terhadap kandungan antioksidan biji kakao tanpa kulit dengan nilai ($p > 0,01$), uji BNT menunjukkan perlakuan lama pra-perkecambahan 2 hari berbeda tidak nyata dengan lama pra-perkecambahan 3, 4 dan 5 hari. Kandungan antioksidan biji kakao tanpa kulit terendah pada perlakuan pra-perkecambahan 0 hari (kontrol) sebesar 0,37 µg/mg dan kandungan antioksidan tertinggi terdapat pada perlakuan lama pra-perkecambahan 3 hari sebesar 0,47 µg/mg.

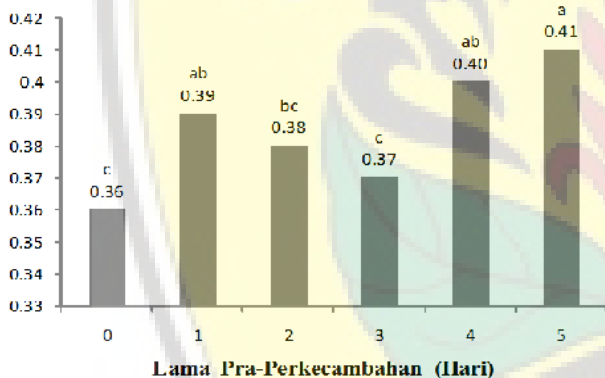
Kandungan antioksidan biji kakao dengan kulit biji menunjukkan pola yang cenderung menurun (Gambar 4). Pada lama pra-perkecambahan 2 hari, kandungan antioksidan menurun sampai pada lama pra-perkecambahan 3 hari. Penurunan kandungan tersebut diikuti dengan penurunan kemampuan tanaman dalam menangkal radikal bebas. Namun, selama pra-perkecambahan 4 hari dan 5 hari kandungan antioksidan

meningkat kembali dengan intensitas warna ungu yang pekat akibat adanya reaksi dari senyawa antioksidan diphenyl picrylhydrazyl yang dapat mewakili radikal bebas sesungguhnya.



Gambar 3. Kandungan antioksidan ($\mu\text{g}/\text{mg}$) biji kakao tanpa kulit biji selama pra-perkecambahan.

Hasil analisa pada biji kakao dengan kulit menunjukkan bahwa perlakuan pra-perkecambahan berbeda sangat nyata ($p > 0,01$), uji BNT menunjukkan perlakuan lama pra-perkecambahan 1 hari berbeda tidak nyata dengan perlakuan lama pra-perkecambahan 4 hari, begitu juga dengan perlakuan lama pra-perkecambahan 0 hari berbeda tidak nyata dengan perlakuan 3 hari, sedangkan pada perlakuan lainnya berbeda nyata. Kandungan antioksidan pada biji kakao dengan kulit tertinggi yaitu pada perlakuan lama pra-perkecambahan 5 hari sebesar $0,41 \mu\text{g}/\text{mg}$, sedangkan kandungan antioksidan terendah pada perlakuan lama pra-perkecambahan 0 hari sebesar $0,36 \mu\text{g}/\text{mg}$.



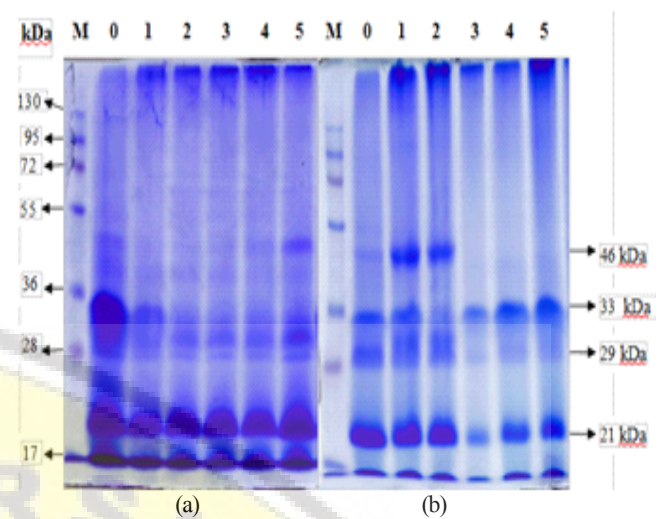
Gambar 4. Kandungan antioksidan ($\mu\text{g}/\text{mg}$) biji kakao dengan kulit biji selama pra-perkecambahan.

Kandungan antioksidan yang tinggi dari biji kakao sangat bermanfaat bagi kesehatan efektif menghilangkan radikal bebas dalam tubuh, serta berperan penting untuk mempertahankan produk pangan. Berbagai kerusakan seperti ketengikan, perubahan nilai gizi, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lain karena proses oksidasi radikal bebas dapat yang dihambat oleh antioksidan tersebut. Biji kakao mengandung antioksidan yang kuat, seperti epikatekin dan Procyanidin Pentameric yang telah terbukti untuk membantu mengurangi efek kanker, diabetes dan penyakit jantung. Mengonsumsi biji kakao telah terbukti baik untuk menurunkan tekanan darah dan menurunkan resistensi insulin (faktor resiko kencing manis).

Profil Protein Biji Kakao Selama Pra-Perkecambahan

Metode analisis elektroforesis profil protein ekstrak biji kakao dianalisis dengan metode SDS-PAGE ditunjukkan dengan memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan ukuran dan bentuk partikelnya. Pada biji kakao tanpa dan dengan kulit biji menunjukkan profil protein yang beragam. Variasi band (pita) protein ditunjukkan dengan muncul dan hilangnya pita protein pada biji kakao tanpa dan dengan kulit biji, terdapat 4 protein dengan berat molekul yang berbeda dengan jumlah protein

terbanyak pada lama pra-perkecambahan tanpa perlakuan (kontrol) biji kakao tanpa kulit dengan berat molekul 33 kDa sedangkan yang dengan kulit biji jumlah protein terbanyak dengan berat molekul 21 kDa yang terlihat pada (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil Scan Elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE 12,5% (a) Profil Protein Biji Kakao Tanpa Kulit Biji; (b) Profil Protein Biji Kakao Dengan Kulit Biji. M: Marker; kDa : Satuan berat molekul protein (kilodalton)

Kandungan protein selama pra-perkecambahan, yang terlihat secara kualitatif di tunjukkan dengan munculnya pita-pita protein hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE terdapat 4 protein yang terlihat dengan berat molekul yang berbeda-beda yaitu protein 46 kDa, 33 kDa, 29 kDa, 21 kDa.

Lama Pra-perkecambahan

ada perlakuan kontrol biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit tidak terjadi proses pra-perkecambahan sehingga tidak terjadi perombakan protein menjadi asam amino asam amino yang lebih sederhana. Namun dimulai pada pra-perkecambahan 1 sampai 3 hari profil protein biji kakao tanpa kulit biji cenderung menurun. Dalam hal ini biji perkecambahan belum bisa mensintesis makanan sendiri, sehingga protein terlarut dalam biji kakao dihidrolisis menjadi asam amino sederhana oleh enzim protease kemudian di translokasikan ke titik tumbuh embrio untuk perkecambahan biji. Pada lama pra-perkecambahan 4 dan 5 hari terjadi peningkatan kandungan protein dengan diikuti pembentukan kembali protein terlarut dalam biji yang kemudian dirombak untuk proses perkecambahan selanjutnya. Pada biji kakao dengan kulit biji profil protein cenderung meningkat pada lama pra-perkecambahan 1 dan 2 hari. Pada lama pra-perkecambahan 3 hari menurun kemudian meningkat kembali pada lama pra-perkecambahan 4 sampai 5 hari.

KESIMPULAN DAN SARAN

Metode pra-perkecambahan memberikan pengaruh sangat nyata terhadap kandungan kandungan polifenol dan antioksidan biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit biji. Kandungan antioksidan tertinggi untuk biji kakao tanpa kulit biji sebesar $0,47 \mu\text{g}/\text{mg}$ pada lama pra-perkecambahan 3 hari dan untuk biji kakao dengan kulit biji sebesar $0,41 \mu\text{g}/\text{mg}$ pada lama pra-perkecambahan 5 hari. Kandungan polifenol biji kakao tanpa kulit dan dengan kulit biji terbaik yaitu pada perlakuan kontrol memiliki kandungan tertinggi sebesar $2,67 \mu\text{g}/\text{mg}$ untuk biji kakao tanpa kulit dan $2,46 \mu\text{g}/\text{mg}$ untuk biji kakao dengan kulit. Penelitian ini perlu dilakukan pengujian lebih lanjut dengan perlakuan penambahan waktu atau pengurangan waktu pra-perkecambahan untuk membandingkan perlakuan mana yang lebih baik guna meningkatkan kandungan antioksidan, polifenol dan protein tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Harbone JB. 1987. *Phytochemical methods*. London: Chapman and Hall Ltd.
- Hsu TF., K Mitsuo MF Wang, I Yukihiko MD Yang, A Hiromichi Y, Rie Y, Jyunichi Y, K Daisuke, Y Shigeru Y. 2008. Effect of pre-germinated brown rice on blood glucose and lipid levels in free-living patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes. *Jurnal Nutr Sci Vitaminol*. 54:163-168
- Keen CL, RR Holt, P Oteiza, C Fraga, HH Schmitz. 2005, Cocoa antioxidant and cardio vascular health. *Am. J. Clin. Nutrition*. 81(1): 298-303.
- Misnawi, S Jinap, B Jamilah, S Nazamid, 2004. Fermentation sensory properties of cocoa liquor as affected by polyphenol concentration and duration of roasting. *Food Quality and Preference* 15:403-409
- Miyake K. R Morita, T Handoyo, T Maeda, N Morita. 2004. Characterization of graded buckwheat flours and some properties of germinated 'Mancan' buckwheat grains. *Fagopyrum*. 21:91-97
- Otman A, A Ismail, NA Ghani, I Adenan. 2007, Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa bean. *Food Chemistry*. 100(40):1523-1530.
- Watanabe M, T Maeda, K Tsukahara, H Kayahara N Morita. 2004. An application of pre-germinated brown rice for bread-making. *Cereal Chem* 81:450-455.
- Weisburger JH. 2001. Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 226:891-897.

