

OPTIMASI KONDISI DEPOLIMERISASI PULP BIJI KAKAO

GANDA PUTRA, HARIJONO, SUSANTO,
KUMALANINGSIH DAN AULANNI'AM

Universitas Udayana Denpasar

Email: putu_gandraputra@yahoo.com

ABSTRACT

Pulp breaking on cocoa processing could be conducted with depolymerization of cocoa pulp by enzyme polygalacturonase (PG) endogenous. This research was aimed to determination the optimum condition of depolymerization of cocoa pulp by enzyme polygalacturonase endogenous during incubation. This research was carried out by incubating cocoa pulp for 6 days on various of optimum condition of PG endogenous treatments, that is: temperature were 32.5° C, 37.5° C, 42.5° C, 47.5° C, 52.5° C and initial pH of pulp were 4.1; 4.6; 5.1, respectively. Optimum condition of depolymerization of cocoa pulp was determination by effectiveness test. Effectiveness test result, based on the highest effectiveness index, showed that the optimum condition of depolymerization of cocoa pulp was 47.5° C incubation temperature and 4,6 initial pH of pulp. Those treatment produced 18.29% of pulp liquid weight total during 5 days incubation with average per day for pectin content, galacturonic acid content, acid total content, and the change of pH were 1.12%, 8.36%, 0.209 meq NaOH/g and 0,19 in cocoa pulp extract was incubated for 6 days, respectively.

Key words: *depolymerization, polygalacturonase, cocoa pulp*

PENDAHULUAN

Pengolahan kakao adalah usaha untuk memproses buah kakao guna menghasilkan biji kakao kering yang memenuhi standar mutu dan semaksimal mungkin diupayakan untuk dapat memunculkan karakteristik khas kakao, yaitu cita rasa. Tahapan pengolahan yang dianggap paling dominan mempengaruhi mutu hasil biji kakao kering adalah fermentasi (Alamsyah, 1991). Fermentasi biji kakao bertujuan untuk menghancurkan pulp (eksternal) dan mengusahakan kondisi untuk terjadinya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji (internal). Pulp yang telah hancur akan mudah lepas dari biji sehingga biji kakao menjadi bersih dan cepat kering. Selanjutnya reaksi kimia dan biokimia dalam keping biji dimaksudkan untuk pembentukan prekursor cita rasa dan warna coklat.

Penghancuran pulp mungkin dapat dilakukan dengan depolimerisasi menggunakan enzim pektolitik endojinus. Pulp tersusun diantaranya oleh pektin, yang merupakan polisakarida struktural yang terdapat pada dinding sel primer dan ruang antar sel. Depolimerisasi pektin dapat berlangsung karena adanya aktivitas enzim pektolitik yang menghidrolisis substrat pektin. Depolimerisasi pektin yang merupakan bahan

perekat dari lamela tengah sel, menyebabkan jaringan pulp rusak terdisintegrasi, membentuk cairan dan menetes keluar tumpukan biji (*watery sweatings*). Selama ini mekanisme penghancuran pulp biji kakao didasarkan atas pendapat yang cenderung menekankan pada aktivitas mikroba semata (enzim eksojinus). Pendapat ini didukung oleh ditemukannya beberapa strain *yeast* yang dapat menghasilkan enzim pektolitik, misalnya *Kluyveromyces fragilis* (Carr, 1982; Schwan, 1998). Sedangkan peranan enzim pektolitik endojinus yang terdapat dalam pulp biji kakao belum pernah diungkap.

Menurut Fox (1991) dan enzim pektolitik diklasifikasikan berdasarkan cara pemotongan asam galakturonat pada molekul pektin, yaitu: (1) pektinmetilesterase (PME), (2) poligalakturonase (PG), (3) pektat liase (PAL) dan (4) pektin liase (PL). Blanco *et al.* (1999), menambahkan bahwa enzim PME dan PG banyak ditemukan pada jaringan tanaman, tetapi juga dapat diproduksi oleh beberapa strain jamur, bakteri dan *yeast*. Sedangkan menurut Stephen (1995), enzim PAL dan PL hanya diproduksi oleh mikroorganisme.

Enzim PME atau pektin pektilhidrolase (EC 3.1.1.11) menghidrolisis ikatan metil ester substrat pektin menjadi asam pektat (poligalakturonat)

dan metanol. Pelepasan metil ester, menyebabkan asam pektat memiliki lebih banyak gugus karboksilat bebas. Sedangkan PG atau poli- α -1,4-D-galakturonida glikano-hidrolase (EC 3.2.1.15 dan 3.2.1.67) menghidrolisis ikatan glikosidik antar unit-unit asam galakturonat yang berdekatan dengan gugus karboksilat bebas. Hal ini menyebabkan pektin mengalami depolimerisasi. PAL atau poli- α -1,4-D-galakturonida liase (EC 4.2.2.2 dan 4.2.2.9) atau asam pektat liase juga memecah ikatan glikosidik asam pektat, tetapi tidak dengan bantuan air, melainkan dengan *trans* (β)-eliminasi. PL atau poli- α -1,4-D-metoksialgalakturonida liase (EC 4.2.2.10) yang hanya ada dengan tipe *endo*, memecah ikatan glikosidik antar residu metoksil galakturonida dengan reaksi *trans* (β)-eliminasi, yang lebih menyukai HM (*high methoxyl*) pektin (Fox, 1991; Whitaker, 1996).

Enzim PG yang dapat mendepolimerisasi pektin, aktivitasnya akan maksimum bila berada pada kondisi optimum. Hasil penelitian Ganda Putra, *dkk.* (2006), menunjukkan bahwa kondisi suhu dan pH optimum aktivitas relatif filtrat enzim PG pada pulp biji kakao adalah suhu 42,5°C dan pH 4,6. Suhu optimum tersebut hampir sama dengan suhu optimum enzim *endo*-PG pada *Verticillium albo-atrum* sebesar 46°C (Huang and Mahoney, 1999) dan PG pada pepaya 45°C Fox (1991). Begitu pula dengan pH optimum enzim PG pada beberapa buah-buahan yang berkisar antara 4,5–5,0 (Fox, 1991). Selanjutnya, berdasarkan kondisi optimum aktivitas enzim PG tersebut akan dapat digunakan sebagai acuan untuk proses depolimerisasi pulp biji kakao.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh variasi kondisi suhu dan pH optimum aktivitas enzim PG endojinus terhadap perubahan karakteristik ekstrak pulp biji kakao selama proses depolimerisasi dan menentukan kondisi optimum depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim PG endojinus selama inkubasi.

METODE

Bahan penelitian adalah buah kakao jenis lindak yang diperoleh dari petani kakao di Desa Tumpakrejo, Kecamatan Kalipare, Kabupaten Malang (\pm 60 km dari Kota Malang). Bahan lain adalah bahan-bahan kimia untuk preparasi sampel

dan analisis variabel pengamatan pada ekstrak pulp biji kakao.

Peralatan yang digunakan di antaranya: wadah plastik, oven inkubator, timbangan elektronik, oven pengering, pH meter, spektrofotometer, kain saring, kertas saring Whatman 1. Selain itu juga digunakan alat-alat gelas untuk analisis.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 2 faktor, dengan perlakuan variasi suhu dan pH awal pulp. Perlakuan suhu inkubasi (S), terdiri atas: 32,5°C, 37,5°C, 42,5°C, 47,5°C, dan 52,5°C, sedangkan pH awal pulp (P), terdiri dari: 4,1; 4,6; dan 5,1. Masing-masing kombinasi perlakuan diulang 2 kali, sehingga diperoleh 30 unit untuk percobaan.

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis variansi (Rancangan Acak Kelompok) dan dilanjutkan dengan uji BNT 5% bila perlakuan berpengaruh signifikan ($p < 0,05$). Penentuan kondisi optimum depolimerisasi pulp biji kakao didasarkan atas hasil uji efektivitas (De Garmo *et al.*, 1984).

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan terlebih dahulu memilih buah kakao yang masak optimal dan seragam. Buah kakao sebanyak 20 buah untuk masing-masing unit percobaan dicuci bersih dengan air (sumber PAM) dan dikeringkan dengan kain lap. Sebelum dibelah, kulit buah kakao disemprot dengan alkohol 90% untuk sterilisasi permukaan. Kemudian dipecah secara manual dengan pisau *stainless steel* dan biji kakao dipisahkan dari kulit dan plasentanya lalu ditampung dalam wadah plastik (pisau dan wadah sebelumnya telah disemprot dengan alkohol 90% untuk sterilisasi). Selanjutnya ditimbang sebanyak 2 kg sampel biji kakao, ditambahkan Na-bisulfit 0,1% (b/b), dimasukkan ke dalam wadah plastik berlubang yang telah disterilkan dengan alkohol 90%.

Biji kakao diinkubasi pada oven inkubator (sterilisasi dengan alkohol 90%) selama 6 hari pada variasi kondisi optimum aktivitas enzim PG (sesuai perlakuan). Pengaturan pH pulp biji kakao dilakukan dengan NaOH 2N dan/atau HCl 2N, sedangkan suhu dengan mengatur besaran suhu pada oven inkubator. Selama inkubasi, setiap hari dilakukan sampling biji kakao sebanyak 200 g.

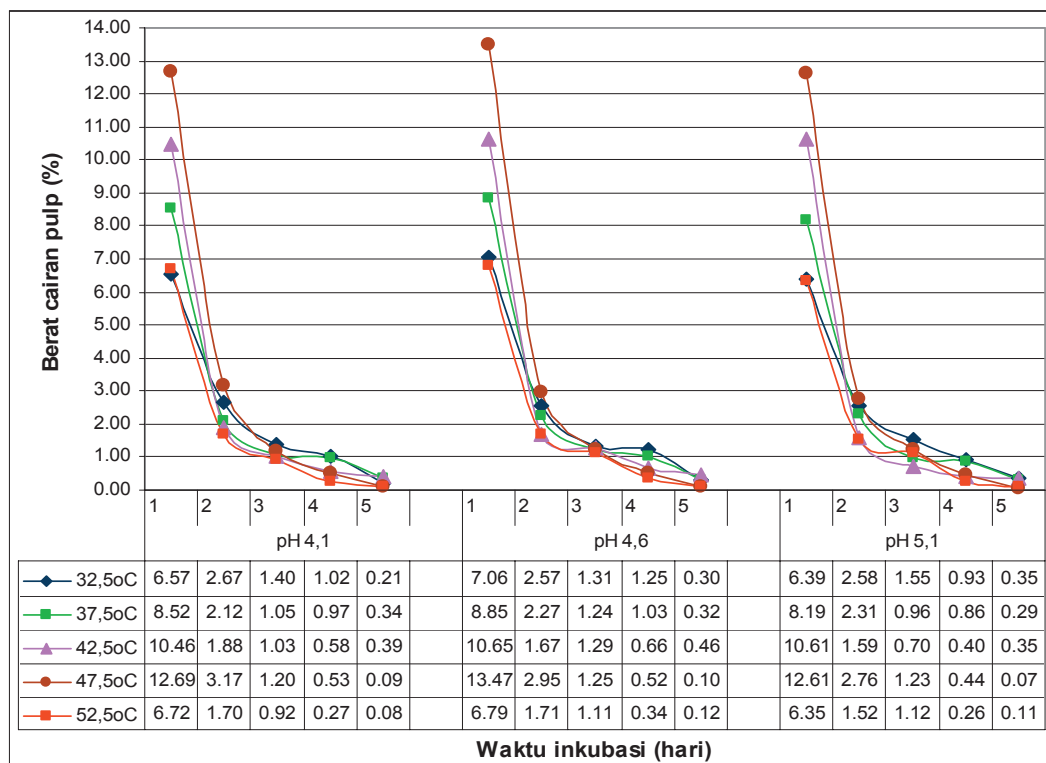
Setelah itu dilakukan ekstraksi pulp biji kakao dengan cara diaduk menggunakan pengaduk magnetik selama 10 menit pada suhu 50° C, lalu diperas secara manual dalam kain saring. Ekstrak pulp biji kakao ditampung untuk selanjutnya dianalisis.

Pengamatan pada ekstrak pulp biji kakao meliputi: persentase berat cairan pulp (%) dengan metode penimbangan, kadar pektin kasar (%) dengan metode ekstraksi menggunakan asam dan aseton (Gardjito dan Wardana, 2003), asam galakturonat (%) menurut metode *Somogyi-Nelson* (Munoz dan Barcelo, 1996; Sudarmadji *et al.*, 1997), total asam (meq NaOH/g) dengan metode titrasi (James, 1995) dan pH dengan pH meter menurut metode pengujian standar mutu kakao (SNI: 01-2323-1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan persentase berat cairan pulp biji kakao selama inkubasi pada masing-masing variasi kondisi enzim PG disajikan pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1 dapat dilihat bahwa persentase berat cairan pulp biji kakao menurun drastis setelah 1 hari inkubasi dan makin lama waktu inkubasi berat cairan pulp semakin berkurang. Kondisi ini berlangsung hampir sama pada semua variasi suhu dan pH awal. Grafik perubahan persentase berat cairan pulp biji kakao terbesar pada suhu 47,5° C dan terkecil pada suhu 32,5° C dan 52,5° C yang berlaku hampir sama untuk masing-masing pH awal. Hal ini terjadi selain karena faktor karakteristik pulp biji kakao yang mempunyai kandungan air tinggi, yaitu sekitar 82–87% air (Lopez, 1986) sehingga pada tahap awal inkubasi air bebas yang terkandung akan menetes keluar, juga akibat aktivitas enzim pektolitik (PG) yang merombak pektin dalam pulp. Depolimerisasi pektin, yang merupakan bahan perekat lamela tengah sel, menyebabkan pulp hancur dan membentuk cairan yang menetes keluar tumpukan biji (*watery sweatings*). Proses depolimerisasi pulp oleh enzim PG masih terus berlangsung, namun aktivitasnya makin berkurang akibat kondisi lingkungan, khususnya pH pulp



Gambar 1. Grafik perubahan persentase berat cairan pulp biji kakao selama inkubasi pada variasi kondisi enzim PG

yang mengalami perubahan dan tidak lagi dalam kondisi optimumnya. Sebagaimana diuraikan di atas bahwa kondisi pH optimum aktivitas enzim PG adalah 4,6.

Hasil analisis variansi (RAK) menunjukkan bahwa perlakuan suhu dan pH awal berpengaruh sangat signifikan ($p < 0,01$), tetapi interaksi suhu dan pH awal tidak signifikan ($p > 0,05$) terhadap jumlah persentase berat cairan pulp biji kakao selama inkubasi. Jumlah persentase berat cairan pulp biji kakao pada variasi kondisi enzim PG selama inkubasi disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 dan dapat dikemukakan bahwa jumlah persentase berat cairan pulp yang tertampung selama 5 hari inkubasi meningkat secara signifikan sejalan dengan makin tingginya suhu inkubasi sampai pada suhu $47,5^{\circ}\text{C}$, tetapi kemudian menurun lagi dengan naiknya suhu inkubasi menjadi $52,5^{\circ}\text{C}$. Jumlah prosentase berat cairan pulp biji kakao tertinggi dihasilkan pada inkubasi dengan pH awal 4,6 yang berbeda secara signifikan dibandingkan dengan hasil dari inkubasi biji kakao pada pH awal 4,1 dan 5,1. Hal demikian kemungkinan berkaitan dengan pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim PG dalam mendepolimerisasi pulp biji kakao. Laju aktivitas enzim akan makin meningkat.

Sejalan dengan naiknya suhu sampai mencapai suhu tertentu (optimal), tetapi kemudian menurun setelah suhu dinaikkan lagi. Suhu optimal aktivitas

filtrat enzim PG adalah $42,5^{\circ}\text{C}$, namun aktivitas tertinggi dalam mendepolimerisasi pektin pulp untuk menghasilkan cairan pulp terjadi pada suhu $47,5^{\circ}\text{C}$, kemungkinan karena enzim tersebut berada dalam pulp sehingga diperlukan tambahan energi (suhu) untuk mengoptimalkan aktivitasnya. Sedangkan pengaruh pH terjadi karena proses depolimerisasi pulp oleh enzim PG akan berlangsung optimal pada kondisi pH optimum untuk aktivitasnya. Sebagaimana diuraikan di atas bahwa kondisi pH optimum aktivitas enzim PG adalah 4,6, sedangkan pH 4,1 dan 5,1 kurang optimum.

Perubahan kadar pektin kasar pada ekstrak pulp biji kakao selama inkubasi pada masing-masing variasi kondisi enzim PG disajikan pada Gambar 2.

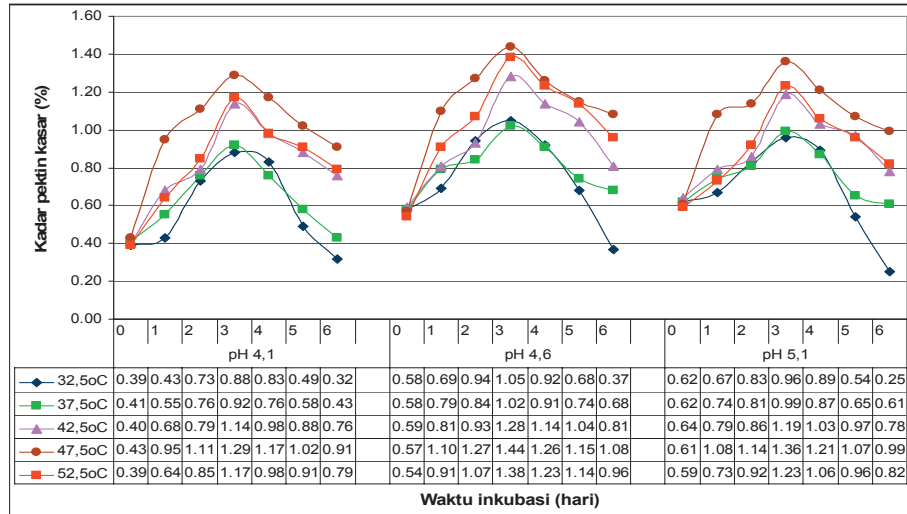
Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao meningkat dengan makin lama waktu inkubasi dan mencapai kadar tertinggi setelah inkubasi 3 hari, tetapi kemudian menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi. Kondisi ini berlangsung hampir sama pada semua variasi suhu dan pH awal. Grafik perubahan kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao terbesar terjadi pada suhu $47,5^{\circ}\text{C}$ dan terkecil suhu $32,5^{\circ}\text{C}$ yang berlaku hampir sama untuk masing-masing pH awal. Hal ini terjadi karena sebelum (hari ke-0) dan pada tahap awal inkubasi pektin pulp belum atau hanya sedikit mengalami depolimerisasi sehingga sel-sel pulp masih saling berikatan secara kuat. Kondisi ini menyebabkan efisiensi ekstraksi pulp kurang sempurna, sehingga ekstrak pulp biji kakao memiliki kadar pektin lebih rendah. Selanjutnya juga terjadi penurunan kadar pektin setelah 3 hari inkubasi karena proses depolimerisasi pektin pulp oleh enzim PG terus berlangsung sejalan dengan makin lama waktu inkubasi. Winarno (1992), menerangkan bahwa pektin terdapat di dalam dinding sel primer tanaman, khususnya di sela-sela antara selulosa dan hemiselulosa. Senyawa pektin berfungsi sebagai perekat lamela tengah sel, keterikatannya dengan selulosa menjadikan senyawa pektin tidak larut dalam air, dikenal dengan protopektin. Protopektin akan berubah menjadi pektin yang terdispersi dalam air bila dipanaskan dalam air mengandung asam.

Tabel 1. Jumlah Persentase Berat Cairan Pulp Biji Kakao (%) pada Variasi Kondisi Enzim PG Selama Inkubasi

Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	pH awal pulp			Rata-rata ^{*)}
	4,1	4,6	5,1	
32,5	11,85	12,48	11,79	12,04 d
37,5	13,00	13,71	12,61	13,11 c
42,5	14,33	14,71	13,64	14,23 b
47,5	17,67	18,29	17,10	17,68 a
52,5	9,68	10,05	9,35	9,69 e
Rata-rata ^{**)}	13,31 b	13,85 a	12,90 c	

^{*)} Huruf yang sama di samping nilai rata-rata pada kolom yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada uji BNT 5% ($= 0,4822$)

^{**)} Huruf yang sama disamping nilai rata-rata pada baris yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada uji BNT 5% ($= 0,3735$)



Gambar 2. Grafik perubahan kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao selama 6 hari inkubasi pada variasi kondisi enzim PG

Hasil analisis variansi (RAK) menunjukkan bahwa perlakuan suhu, pH awal serta interaksi suhu dan pH awal berpengaruh sangat signifikan ($p < 0,01$) terhadap rata-rata kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao per hari. Rata-rata kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao per hari selama inkubasi pada variasi kondisi enzim PG disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2 dapat dikemukakan bahwa rata-rata kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao per hari selama 6 hari inkubasi meningkat secara signifikan sejalan dengan makin bertambahnya suhu dan pH awal sampai pada suhu 47,5° C dan pH awal 4,6, tetapi kemudian menurun dengan makin tingginya suhu dan pH awal.

Tabel 2. Rata-rata kadar Pektin Kasar (%) Ekstrak Pulp Biji Kakao Per Hari Selama Inkubasi pada Variasi Kondisi Enzim PG

Suhu (°C)	pH awal pulp		
	4,1	4,6	5,1
32,5	0,58 l	0,76 i	0,68 j
37,5	0,63 k	0,79 h	0,76 i
42,5	0,80 h	0,94 e	0,89 f
47,5	0,98 d	1,12 a	1,07 b
52,5	0,82 g	1,03 c	0,90 f

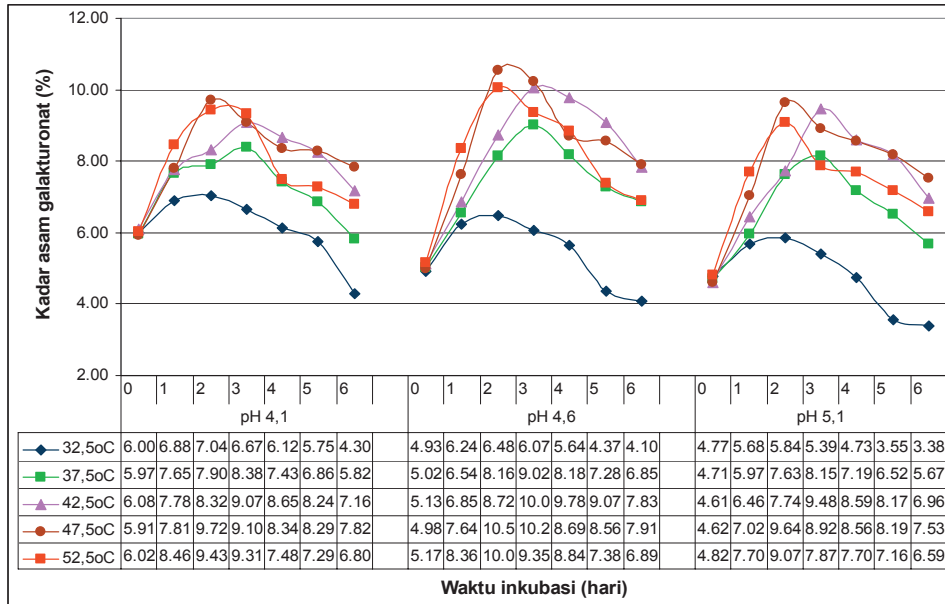
^{*)} Huruf yang sama **di samping** nilai rata-rata menunjukkan tidak beda nyata pada uji BNT interaksi 5% (= 0,0189)

Rata-rata kadar pektin kasar ekstrak pulp biji kakao per hari selama inkubasi tertinggi dicapai pada kombinasi perlakuan suhu 47,5° C dan pH awal 4,6 dan terendah pada kombinasi perlakuan suhu 32,5° C dan pH awal 4,1. Hal demikian kemungkinan berkaitan dengan pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim PG dalam mendepolimerisasi pektin pulp biji kakao.

Laju aktivitas enzim akan makin meningkat sejalan dengan naiknya suhu yang didukung dengan kondisi pH yang optimal, tetapi kemudian menurun dengan makin tingginya suhu dan pH awal.

Perubahan kadar asam galakturonat pada ekstrak pulp biji kakao selama inkubasi pada masing-masing variasi kondisi enzim PG disajikan pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3 dapat dilihat bahwa kadar asam galakturonat pada ekstrak pulp biji kakao meningkat dengan makin lama waktu inkubasi dan mencapai kadar tertinggi setelah inkubasi 2 hari pada suhu 32,5° C, 47,5° C, 52,5° C; dan 3 hari pada suhu 37,5° C dan 42,5° C, tetapi kemudian menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi untuk masing-masing variasi pH awal. Grafik perubahan kadar asam galakturonat ekstrak pulp biji kakao terbesar terjadi pada suhu 47,5° C dan terkecil pada suhu 32,5° C yang berlaku hampir sama untuk masing-masing pH awal. Hal demikian berhubungan dengan pengaruh suhu terhadap



Gambar 3. Grafik perubahan kadar asam galakturonat ekstrak pulp biji kakao selama 6 hari inkubasi pada variasi kondisi enzim PG

mekanisme reaksi enzimatik oleh enzim PG. Pada suhu yang lebih tinggi (47,5° C dan 52,5° C) proses depolimerisasi pektin pulp berlangsung lebih cepat sehingga lebih banyak asam galakturonat yang terkandung dalam ekstrak pulp biji kakao.

Selanjutnya mengalami penurunan walaupun proses depolimerisasi pektin terus berlangsung, karena sebagian asam galakturonat yang terbentuk terdispersi dalam cairan pulp yang ikut menetes keluar. Fox (1991) dan Whitaker (1996) mengemukakan bahwa enzim PG menghidrolisis ikatan glikosidik antar unit-unit asam galakturonat yang berdekatan dengan gugus karboksilat bebas. Hal ini menyebabkan substrat pektin mengalami depolimerisasi membentuk unit-unit asam galakturonat. Aktivitas enzim PG akan sangat ditentukan oleh suhu dan pH, pada suhu dan pH optimum akan berlangsung reaksi enzimatik yang maksimal.

Hasil analisis variansi (RAK) menunjukkan bahwa perlakuan suhu, pH awal serta interaksi suhu dan pH awal berpengaruh sangat signifikan ($p < 0,01$) terhadap rata-rata kadar asam galakturonat ekstrak pulp biji kakao per hari. Rata-rata kadar asam galakturonat ekstrak pulp

biji kakao per hari selama inkubasi pada variasi kondisi enzim PG disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata Kadar Asam Galaturonat (%) Ekstrak Pulp Biji Kakao Per Hari Selama Inkubasi pada Variasi Kondisi Enzim PG

Suhu (°C)	pH awal pulp		
	4,1	4,6	5,1
32,5	6,11 l	5,40 m	4,76 n
37,5	7,14 j	7,29 i	6,55 k
42,5	7,90 e	8,21 b	7,43 h
47,5	8,14 c	8,36 a	7,78 g
52,5	7,83 f	8,01 d	7,27 i

^{a)} Huruf yang sama **di samping** nilai rata-rata menunjukkan tidak beda nyata pada uji BNT interaksi 5% (= 0,0305)

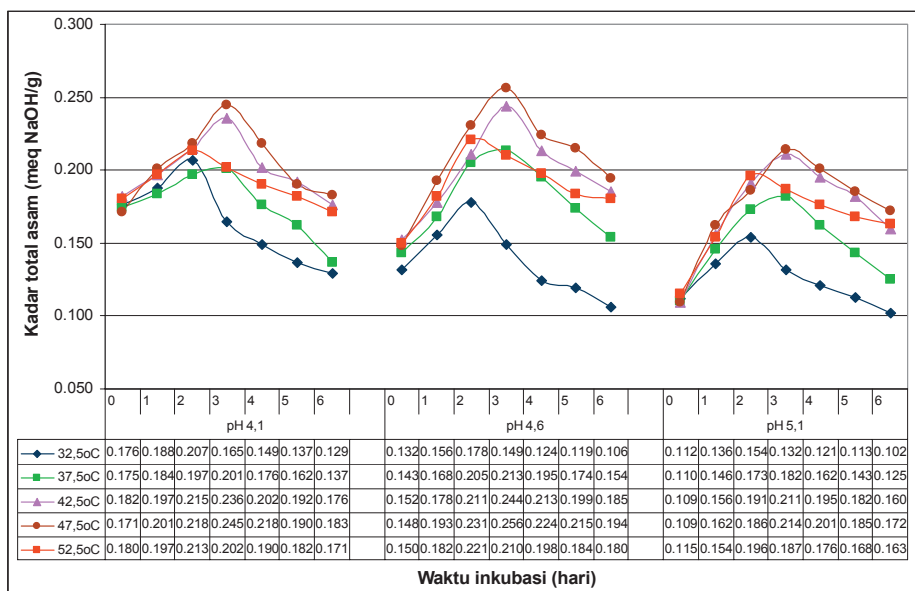
Berdasarkan Tabel 3 dapat dikemukakan bahwa rata-rata kadar asam galakturonat ekstrak pulp biji kakao per hari selama inkubasi cenderung meningkat secara signifikan sejalan dengan makin bertambahnya suhu dan pH awal, kecuali pada suhu inkubasi 32,5° C sampai pada suhu 47,5° C dan pH awal 4,6, tetapi kemudian menurun dengan makin tinggi suhu dan pH awal. Rata-rata kadar

asam galakturonat ekstrak pulp biji kakao per hari tertinggi dicapai pada kombinasi perlakuan suhu 47,5° C dan pH awal 4,6 dan terendah pada kombinasi perlakuan suhu 32,5° C dan pH awal 5,1. Hal demikian juga berkaitan dengan pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim PG dalam mendepolimerisasi pektin pulp biji kakao untuk menghasilkan asam galakturonat. Laju aktivitas enzim akan makin meningkat sejalan dengan naiknya suhu yang didukung dengan kondisi pH yang optimal, tetapi kemudian menurun dengan makin tinggi suhu dan pH awal. Penurunan rata-rata kadar asam galakturonat ekstrak pulp biji kakao per hari pada suhu lebih tinggi (52,5° C) terjadi karena aktivitas enzim PG menurun akibat rusaknya enzim. Fox (1991), mengemukakan bahwa lebih dari 80% total aktivitas enzim PG pada pepaya hilang dengan perlakuan suhu 85° C selama 10 menit, begitu pula PG pada alpukat akan kehilangan 60% aktivitasnya setelah diperlakukan pada suhu 50° C selama 10 menit.

Perubahan kadar total asam pada ekstrak pulp biji kakao selama inkubasi pada masing-masing variasi kondisi enzim PG disajikan pada Gambar 4.

Pada Gambar 4 dapat dilihat bahwa kadar total asam pada ekstrak pulp biji kakao meningkat

dengan makin lama waktu inkubasi dan mencapai kadar tertinggi setelah inkubasi 2 hari pada suhu 32,5° C dan 52,5° C; dan 3 hari pada suhu 37,5° C, 47,5° C dan 42,5° C, tetapi kemudian menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi untuk masing-masing variasi pH awal. Grafik perubahan kadar total asam ekstrak pulp biji kakao terbesar terjadi pada suhu 47,5° C dan terkecil pada suhu 32,5° C yang berlaku hampir sama untuk masing-masing pH awal. Hal demikian berhubungan dengan pengaruh suhu terhadap mekanisme reaksi enzimatik oleh enzim PG pada substrat pektin pulp. Pada suhu tinggi (52,5° C) proses depolimerisasi pektin pulp berlangsung lebih cepat sehingga lebih banyak dihasilkan asam galakturonat yang akan memberikan kontribusi terhadap kadar total asam. Sedangkan pada suhu rendah (32,5° C), peningkatan kadar total asam kemungkinan selain disebabkan oleh mekanisme disimilasi gula pulp menjadi asam-asam organik, juga oleh proses depolimerisasi pektin pulp yang juga berlangsung namun lebih lambat. Selanjutnya mengalami penurunan walaupun proses depolimerisasi pektin pulp terus berlangsung, karena sebagian asam galakturonat maupun asam organik lain yang terbentuk, terdispersi dalam cairan pulp yang ikut menetes keluar. Sulistyowati



Gambar 4. Grafik perubahan kadar total asam ekstrak pulp biji kakao selama 6 hari inkubasi pada variasi kondisi enzim PG

(1988), menyebutkan bahwa pada pulp biji kakao yang difermentasi terdapat asam-asam organik, seperti: asam sitrat, laktat, asetat, tartrat, oksalat, malat, suksinat dan piruvat.

Hasil analisis variansi (RAK) menunjukkan bahwa perlakuan suhu, pH awal serta interaksi suhu dan pH awal berpengaruh sangat signifikan ($p < 0,01$) terhadap rata-rata kadar total asam ekstrak pulp biji kakao per hari. Rata-rata kadar total asam ekstrak pulp biji kakao per hari selama inkubasi pada variasi kondisi enzim PG disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 dapat dikemukakan bahwa rata-rata kadar total asam ekstrak pulp biji kakao per hari selama inkubasi cenderung meningkat secara signifikan sejalan dengan makin bertambahnya suhu dan pH awal, kecuali pada suhu inkubasi 32,5° C, sampai pada suhu 47,5° C dan pH awal 4,6, tetapi kemudian menurun dengan makin tinggi suhu dan pH awal. Rata-rata kadar total asam ekstrak pulp biji kakao per hari tertinggi dicapai pada kombinasi perlakuan suhu 47,5° C dan pH awal 4,6 dan terendah pada kombinasi perlakuan suhu 32,5° C dan pH awal 5,1. Hal demikian kemungkinan juga berkaitan dengan pengaruh suhu dan pH terhadap aktivitas enzim PG dalam mendepolimerisasi pektin pulp biji kakao untuk menghasilkan asam galakturonat,

Tabel 4. Rata-rata Kadar Total Asam (meq NaOH/g) Ekstrak Pulp Biji Kakao Per Hari Selama Inkubasi pada Variasi Kondisi Enzim PG

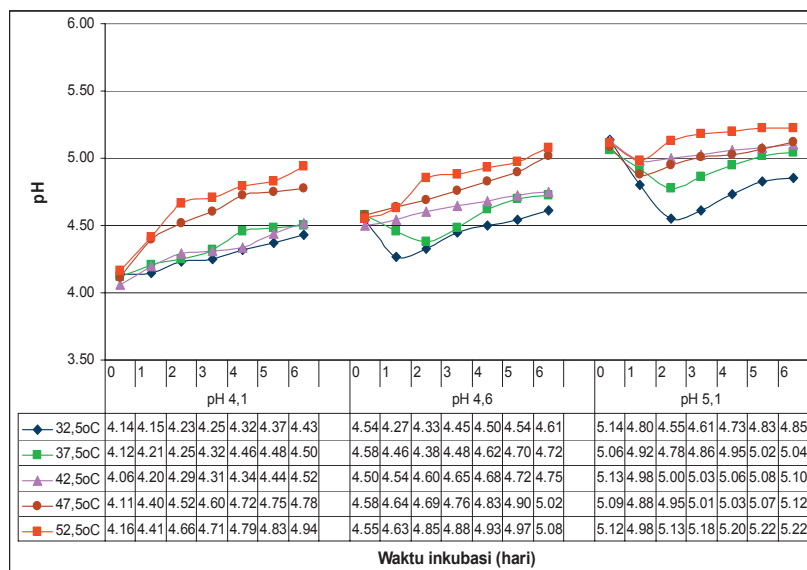
Suhu (°C)	pH awal pulp		
	4,1	4,6	5,1
32,5	0,164 g	0,138 i	0,124 j
37,5	0,176 e	0,179 e	0,149 h
42,5	0,200 c	0,197 c	0,172 f
47,5	0,204 b	0,209 a	0,176 e
52,5	0,191 d	0,189 d	0,166 g

^{a)} Huruf yang sama **di samping** nilai rata-rata menunjukkan tidak beda nyata pada uji BNT interaksi 5% (= 0,0031)

yang berkontribusi terhadap kadar total asam. Laju aktivitas enzim akan makin meningkat sejalan dengan naiknya suhu yang didukung dengan kondisi pH yang optimal, tetapi kemudian menurun dengan makin tinggi suhu dan pH awal.

Perubahan pH ekstrak pulp biji kakao selama inkubasi pada masing-masing variasi kondisi enzim PG disajikan pada Gambar 5.

Berdasarkan Gambar 5 dapat dilihat bahwa pH ekstrak pulp biji kakao meningkat selama inkubasi pada masing-masing suhu dengan pH awal 4,1. Pada pH awal 4,6, pH ekstrak pulp biji kakao cenderung meningkat selama inkubasi, kecuali



Gambar 5. Grafik perubahan pH ekstrak pulp biji kakao selama 6 hari inkubasi pada variasi kondisi enzim PG

pada suhu 32,5° C dan 37,5° C yang cenderung menurun sampai dengan 4 hari inkubasi, tetapi kemudian naik lagi. Sedangkan pada pH awal 5,1, pH ekstrak pulp biji kakao cenderung menurun selama inkubasi, kecuali pada 52,5° C terjadi peningkatan setelah 2 hari inkubasi. Grafik peningkatan pH ekstrak pulp biji ka kao terbesar terjadi pada suhu 52,5° C dan terkecil pada suhu 32,5° C yang berlaku hampir sama untuk masing-masing pH awal. Kecenderungan peningkatan pH ekstrak pulp biji kakao selama inkubasi dengan pH awal pulp lebih rendah (4,1 dan 4,6) kemungkinan terjadi lebih karena faktor metabolisme asam sitrat yang terkandung dalam pulp, sebanyak 1–2% (Lopez, 1986), walaupun telah terjadi pembentukan asam galakturonat namun kontribusinya terhadap pH rendah karena termasuk asam yang lebih lemah daripada asam sitrat. Sedangkan kecenderungan terjadinya sedikit penurunan pH ekstrak pulp yang diinkubasi dengan pH awal pulp lebih tinggi (5,1) karena total asam yang terbentuk lebih kecil dibandingkan dengan pH awal pulp 4,1 dan 4,6 (Tabel 4).

Hasil analisis variansi (RAK) menunjukkan bahwa perlakuan suhu, pH awal serta interaksi suhu dan pH awal berpengaruh sangat signifikan ($p < 0,01$) terhadap rata-rata perubahan pH ekstrak pulp biji kakao per hari. Rata-rata perubahan pH ekstrak pulp biji kakao per hari selama inkubasi pada variasi kondisi enzim PG disajikan pada Tabel 5.

Berdasarkan Tabel 5 dapat dikemukakan bahwa rata-rata perubahan pH ekstrak pulp biji kakao per

Tabel 5. Rata-rata Perubahan Ph Ekstrak Pulp Biji Kakao Per Hari Selama Inkubasi pada Variasi Kondisi Enzim PG

Suhu (°C)	pH awal pulp		
	4,1	4,6	5,1
32,5	0,13 ef	0,08 f	0,35 bc
37,5	0,21 de	0,02 f	0,11 ef
42,5	0,25 cd	0,13 ef	0,08 f
47,5	0,44 ab	0,19 de	0,06 f
52,5	0,48 a	0,29 cd	0,03 f

^{a)} Huruf yang sama **disamping** nilai rata-rata menunjukkan tidak beda nyata pada uji BNT interaksi 5% ($=0,1110$)

hari selama inkubasi cenderung menurun secara signifikan sejalan dengan makin rendahnya suhu dan makin bertambahnya pH awal pulp, kecuali pada pH awal pulp 5,1 terjadi peningkatan sejalan dengan makin rendahnya suhu. Rata-rata nilai perubahan pH ekstrak pulp biji kakao per hari tertinggi dicapai pada kombinasi perlakuan suhu 52,5° C dan pH awal pulp 4,1 dan terendah pada kombinasi perlakuan suhu 37,5° C dan pH awal pulp 4,6. Hal ini sebagai implikasi dari kecenderungan menurunnya pH ekstrak pulp selama inkubasi sejalan dengan makin rendahnya suhu dan makin bertambahnya pH awal pulp, kecuali pada pH awal pulp 5,1 yang cenderung terjadi peningkatan sejalan dengan makin rendahnya suhu.

Kondisi optimum depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim PG ditentukan dengan uji efektivitas terhadap 15 alternatif perlakuan variasi kondisi optimum enzim PG. Masing-masing variabel pengamatan ditetapkan bobot variabelnya, berturut-turut: 1,00 untuk berat cairan pulp; 0,80 untuk pektin kasar dan asam galakturonat; 0,70 untuk total asam; dan 0,5 untuk nilai perubahan pH. Penetapan bobot variabel tersebut didasarkan atas kontribusi masing-masing variabel pada proses depolimerisasi pulp biji kakao. Persentase berat cairan pulp mendapat bobot variabel maksimal didasarkan atas tujuan depolimerisasi pulp biji kakao, yaitu pulp menjadi rusak terdisintegrasi membentuk cairan yang menetes keluar. Hal ini sangat dikehendaki pada fermentasi biji kakao. Selanjutnya kadar pektin dan asam galakturonat dengan bobot lebih rendah karena pektin sebagai substrat pada reaksi enzimatis oleh enzim PG, yang akan menghasilkan produk asam galakturonat. Berikutnya kadar total asam, mengingat produk asam galakturonat hasil depolimerisasi pektin pulp kemungkinan akan berkontribusi terhadap total asam. Terakhir, perubahan pH karena asam-asam yang terbentuk juga akan mempengaruhi pH ekstrak pulp biji kakao.

Nilai terbaik dan terjelek adalah hasil pengamatan tertinggi dan terendah pada masing-masing variabel pengamatan. Nilai tertinggi merupakan hasil maksimal yang dicapai sebagai akibat depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim PG. Dalam hal ini terdapat hubungan yang proporsional antara besaran nilai masing-masing

variabel pengamatan dengan kesempurnaan mekanisme proses depolimerisasi pulp biji kakao.

Hasil uji efektivitas terhadap alternatif alternatif perlakuan diperoleh bahwa indeks efektivitas tertinggi adalah sebesar 0,92. Berdasarkan indeks efektivitas tersebut maka alternatif perlakuan yang ditetapkan sebagai kondisi optimum depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim PG adalah suhu 47,5° C dan pH 4,6. Kondisi suhu optimum depolimerisasi lebih tinggi dari pada kondisi suhu optimum untuk aktivitas filtrat enzim PG (42,5° C). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh keberadaan enzim PG yang terdapat dalam pulp biji kakao, sehingga memerlukan penambahan energi (panas) untuk optimalisasi aktivitasnya. Sedangkan kondisi pH pulp awal optimum sama dengan pH optimum untuk aktivitas enzim PG.

SIMPULAN

Suhu dan pH awal pulp berpengaruh terhadap perubahan karakteristik pulp biji kakao selama inkubasi pada proses depolimerisasi oleh enzim PG endojinus.

Kondisi depolimerisasi pulp biji kakao optimum oleh enzim PG endojinus adalah suhu 47,5° C dan pH awal pulp 4,6.

Perlakuan kondisi optimum tersebut menghasilkan total berat cairan pulp 18,29% selama 5 hari inkubasi, serta rata-rata per hari untuk kadar pektin 1,12%, kadar asam galakturonat 8,36%, kadar total asam 0,209 (meq NaOH/g), dan perubahan pH 0,19 pada ekstrak pulp biji kakao yang diinkubasi selama 6 hari.

DAFTAR PUSTAKA

Alamsyah, T.S., 1991. Peranan fermentasi dalam pengolahan biji kakao kering. Suatu Tinjauan. *Berita Perkebunan*, 1(2): 97-103.
Carr, J.G. 1982. Cocoa. In A.H. Rose (Ed.). *Fermented Foods*. New York: Academic Press, Inc.

De Garmo, E.G., W.G. Sullivan dan J.R. Cerook., 1984. *Engineering Economy*. 7th. Edition. New York: Macmilland Publ. Co.
Fox, P.F., 1991. *Food Enzimology*. Vol. 1. London. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., p. 636.
Ganda Putra, G.P., Harijono, T. Susanto dan S. Kumalaningsih, 2006. *Isolasi, karakterisasi dan optimasi enzim pektolitik endojinus pada pulp biji kakao*. Prosiding Seminar Nasional Basic Science III di FMIPA-Universitas Brawijaya, Malang tanggal 25 Pebruari 2006.
Gardjito, M. dan Wardana, A.S., 2003. *Hortikultura, Teknik Analisis Pasca Panen*. Yogyakarta: Transmedia Mitra Printika.
Huang, L.K.dan R.R., Mahoney, 1999. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *J. App. Microb.*, 86 (1) : 145-156.
James, C.S., 1995. *Analytical Chemistry of Foods*. , London: Blackie Academic & Professional.
Lopez, A.S., 1986. *Chemical change occurring during the processing of cacao. Proceeding of The Cacao Biotechnology Symposium*. Dept. Of Food Science College of Agricultutre, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA.
Munoz, R. dan A.R. Barcelo, 1996. *Enzymes*. In L.M.L. Nollet (Ed.). Handbook of Food Analysis. Vol. 1. New York: Marcel Dekker, Inc.
Schwan, R.F. 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ Microbiol.*, 64(4): 1477-83.
Stephen, A.M. 1995. *Food Polysaccharides and Their Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 654.
Sudarmadji, S.B. Haryono dan Suhardi, 1997. *Prosedur analisis untuk bahan makanan dan pertanian*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
Sulistiyowati, 1988. Keasaman biji kakao dan masalahnya. *Pelita Perkebunan*, 3(4): 151-8.
SNI01-2323-1995. *Standar Nasional Indonesia Biji Kakao*. Dewan Standardisasi Nasional-DSN, Jakarta.
Whitaker, J.R., 1996. *Enzymes*. In O. R. Fennema (Ed.). Food Chemistry. 3rd Edition. New York: Maecel Dekker, Inc., p. 1067.
Winarno, F.G., 1992. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.