

KARAKTERISASI ENZIM POLIFENOL OKSIDASE BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* Linn.)

Characterization of Polyphenol Oxidase Enzyme of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* Linn.)

G.P. Ganda Putra, N.M. Wartini, A.A.M. Dewi Anggreni

Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Badung, Bali
E-mail: putu_gandaputra@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian dengan tujuan untuk: (1) mengetahui karakteristik enzim polifenol oksidase dan (2) menentukan kondisi (suhu, pH dan waktu inkubasi) optimum aktivitas enzim polifenol oksidase, yang diisolasi dari biji kakao kering. Hasil penelitian berupa kondisi (suhu, pH dan waktu inkubasi) optimum aktivitas enzim polifenol oksidase akan diaplikasikan untuk perbaikan mutu biji kakao kering melalui teknik rehidrasi. Penelitian ini dilakukan melalui tahapan: (1) isolasi enzim polifenol oksidase dari 10 sampel biji kakao kering di Provinsi Bali, (2) karakterisasi enzim polifenol oksidase (aktivitas, kinetika enzim, BM) dan (3) penentuan kondisi suhu, pH dan waktu inkubasi optimum. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa: (1) aktivitas enzim polifenol oksidase rata-rata $157,49 \pm 58,03$ U/gram (bk) biji kakao dengan aktivitas maksimum 258,22 U/gram (bk) biji kakao dan minimum 59,01 U/gram (bk) biji kakao; V_{maks} sebesar 595,24 U/gram (bk) biji kakao dan K_m sebesar 0,20 M; hasil SDS-PAGE enzim menunjukkan pita-pita protein yang terbentuk pada BM 11,75; 17,80; 27,80; 36,03 dan 131,52 kDa; dan (2) kondisi optimum aktivitas enzim adalah suhu 53,43°C; pH 5,42 dan waktu inkubasi 80,91 menit.

Kata kunci: Biji kakao, polifenol oksidase

ABSTRACT

This research was aimed to: (1) characterize polyphenol oxidase enzyme and (2) determine optimum condition (temperature, pH and incubation time) of polyphenol oxidase enzyme activity which isolated from cocoa beans. Those result will be used to improve the quality of cocoa through rehydration technique. This research was carried out through: (1) isolation of polyphenol oxidase enzyme from 10 samples of cocoa beans in Bali Province, (2) characterization of polyphenol oxidase enzyme (activity, enzyme kinetics, MW), and (3) determination of optimum condition of temperature, pH and incubation time. The results show that average value of polyphenol oxidase enzyme activity was $157,49 \pm 58,03$ U/gram (db) of cocoa beans with maximum and minimum values at 258,22 U/gram and 59,01 U/gram (db) of cocoa beans, respectively; V_{max} equals to 595,24 U/gram (db) of cocoa beans and K_m equals to 0,20 M; result of SDS-PAGE of enzyme shows protein bands at MW of 11,75; 17,80; 27,80; 36,03 and 131,52 kDa; and finally, optimum condition of enzyme activity is at the temperature of 53,43°C; pH 5,42 and incubation time of 80,91 minutes.

Keywords: Cocoa beans, polyphenol oxidase

PENDAHULUAN

Kakao merupakan salah satu komoditas perkebunan andalan yang terus dipacu pengembangannya, terutama untuk meningkatkan ekspor non migas. Selain itu juga digunakan untuk memenuhi kebutuhan beberapa industri dalam negeri, seperti: industri makanan dan minuman, farmasi dan kosmetika yang menggunakan bahan baku produk-produk kakao, se-

perti: bubuk, pasta dan lemak kakao. Dewasa ini pengusahaan perkebunan kakao berkembang cukup pesat, baik dalam bentuk pengembangan luas areal tanaman maupun peningkatan produksi biji kakao kering. Pada tahun 2007 luas areal perkebunan kakao Indonesia telah mencapai 1.193.903 ha, dengan produksi mencapai 794.040 ton biji kakao kering (Anonim, 2008).

Sementara itu, lebih dari 90 % (737.521 ton) produk biji kakao kering diproduksi oleh petani (Perkebunan Rakyat), si-

sanya oleh Perkebunan Besar Negara dan Swasta (Anonim, 2008). Kelemahan mendasar biji kakao kering produk petani adalah kadar kotoran, tingkat keasaman, dan kadar biji slaty yang relatif tinggi, cita rasa khas kakao yang lemah karena tidak terbentuknya prekursor cita rasa serta warna coklat yang tidak merata. Hal demikian terjadi karena petani umumnya tidak melakukan fermentasi, melainkan biji kakao langsung dijemur setelah dipisahkan dari kulit buah. Banyak hal yang menyebabkan petani enggan melakukan fermentasi, diantaranya karena fermentasi memerlukan waktu relatif lama serta didorong oleh kebutuhan ekonomi yang mendesak.

Mutu biji kakao produk petani yang tergolong masih rendah perlu diupayakan perbaikannya. Salah satunya dengan merekondisikan kembali aktivitas enzim polifenol oksidase yang terdapat dalam biji kakao menggunakan teknik rehidrasi. Enzim polifenol oksidase (EC.1.10.3.1) berperan dalam reaksi pencoklatan enzimatis terhadap senyawa fenolik. Pada umumnya polifenol (katekol) oksidase dapat mengkatalisis 2 tipe reaksi yakni hidroksilasi (aktivitas kresolase) dan dehidrogenasi (aktivitas katekolase). Tipe reaksi pertama adalah hidroksilasi monofenol menjadi o-difenol, sedangkan tipe kedua adalah oksidasi o-difenol menjadi kuinon (Whitaker, 1991). Selain itu, hidrolisis substrat polifenol berdampak dalam mengurangi rasa pahit dan kelat serta terbentuknya warna coklat (Lopez, 1986). Permana (1992), menambahkan bahwa pada biji kakao kering produk petani masih menunjukkan aktivitas enzim polifenol oksidase yang relatif tinggi, yaitu 122,98 unit/mg protein. Hal demikian dimungkinkan karena biji kakao tidak difermentasi.

Proses rehidrasi memungkinkan biji kakao kering produk petani menyerap air kembali sehingga dapat mengoptimalkan kondisi aktivitas katalitik enzim polifenol oksidase. Menurut Lopez (1986), aktivitas enzim polifenol oksidase dapat berlangsung pada kisaran kadar air substrat 40-10 % dan suhu 40-60 °C. Selain itu, menurut Fox (1991), aktivitas enzim akan maksimal apabila ditunjang oleh kondisi suhu, pH dan waktu yang optimum. Dilaporkan oleh Putra dan Wartini (2000), bahwa proses rehidrasi yang hanya didasarkan atas faktor waktu perendaman, tanpa memperhatikan lebih dalam mengenai kondisi suhu dan pH optimum aktivitas enzim polifenol oksidase, belum menghasilkan citarasa khas kakao yang optimal. Oleh karena itu kondisi proses rehidrasi yang akan dilakukan semestinya didasarkan atas kondisi optimum aktivitas enzim tersebut. Berkenaan dengan hal demikian, maka terlebih dahulu perlu dilakukan isolasi, karakterisasi dan penentuan kondisi suhu, pH dan waktu inkubasi optimum untuk aktivitas enzim polifenol oksidase yang diisolasi dari biji kakao kering produk petani.

Tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui karakteristik enzim polifenol oksidase dan (2) menentukan kondisi (suhu, pH dan waktu) optimum aktivitas enzim polifenol

oksidase yang diisolasi dari biji kakao kering produk petani. Hasil penelitian ini, berupa kondisi optimum aktivitas enzim polifenol oksidase, nantinya dapat diaplikasikan melalui teknik rehidrasi, sehingga akan mengoptimalkan kembali kondisi aktivitas enzim tersebut selama proses perendaman dan pengeringan kembali. Kondisi ini akan memungkinkan pembentukan warna coklat menjadi optimal dan berdampak pada penurunan rasa pahit dan kelat pada biji kakao kering yang dihasilkan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama adalah biji kakao kering produk petani, yang merupakan hasil sampling (10 sampel) dari kabupaten Tabanan (Desa Baturiti, Angseri, Jegu, Pesagi dan Babahan), Jembrana (Desa Asah Duren, Sekar Wangi, Manistutu dan Yeh Embang Kauh) dan Buleleng (Singaraja), sebagai sentra-sentra produksi kakao di Provinsi Bali. Bahan kimia, diantaranya: HCl, NaOH, air bebas ion, buffer N-asetat-asam asetat, substrat katekol, kemikalia untuk elektroforesis dan protein marker.

Sampling Biji Kakao Kering Produk Petani

Sampel biji kakao kering produk petani kakao di Provinsi Bali diperoleh dari hasil sampling pada 3 besar kabupaten sentra produksi kakao (Tabanan, Jembrana dan Buleleng). Jumlah sampel sebanyak 10 unit, yang diambil secara proporsional sesuai jumlah produksinya, yaitu: Jembrana 4 sampel, Tabanan 5 sampel dan Buleleng 1 sampel.

Isolasi Enzim Polifenol Oksidase

Isolasi enzim polifenol oksidase menggunakan metode isolasi *Worthington Enzyme Manual* (Flick dkk., 1977) sebagai berikut: Sampel biji kakao dihancurkan dan ditimbang sebanyak 10 g, lalu dihomogenisasi dengan 20 ml air bebas ion pada suhu 0°C menggunakan stirer selama 10 menit. Setelah itu disaring dengan keta saring Whatman #1 menggunakan pompa vakum. Filtrat yang diperoleh berupa enzim polifenol oksidase ditampung dalam wadah dan disimpan dalam lemari es (*freezer*) suhu -20 °C sebelum dikarakterisasi.

Karakterisasi Enzim Polifenol Oksidase

Karakteristik enzim yang diamati meliputi: aktivitas enzim, kinetika enzim (V_{maks} dan K_m), dan berat molekul (BM). Pengujian aktivitas enzim ditentukan dengan metode sebagai berikut (Flick dkk., 1977): enzim polifenol oksidase diambil sebanyak 0,1 ml, lalu ditambahkan dengan 2,6 ml buffer Na-asetat-Asam asetat (pH 5,0). Setelah itu ditambahkan 0,3 ml substrat katekol 0,5 M pada suhu 25°C, lalu dibaca

absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada λ 420 nm. Supaya hasil pengujian lebih baik, dilakukan ulangan 3 kali. Pembacaan absorbansi dilakukan selama 3 menit dengan selang waktu baca 1 menit. Satu unit (U) aktivitas enzim polifenol oksidase = perubahan absorbansi sebesar 0,001 per menit. Selanjutnya satuan U per volume (ml) enzim yang digunakan dalam pengujian dikonversi menjadi satuan U per gram (bk) biji kakao, dengan mempertimbangkan volume enzim hasil isolasi per gram sampel biji kakao kering dan kadar airnya.

Penentuan V_{maks} dan K_m didasarkan atas plot grafik, yang merupakan hubungan antara konsentrasi substrat [S] dan aktivitas enzim (V) (Whitaker, 1996; Fayyaz dkk., 1995; Dinu, 2001), sebagai berikut: Larutan substrat katekol dibuat dengan konsentrasi antara 0,1 – 0,8 M dalam masing-masing bufernya, lalu diperlakukan sama seperti pada kondisi standar pengujian aktivitas untuk enzim polifenol oksidase. Setelah itu ditentukan aktivitas enzim (unit aktivitas) pada masing-masing konsentrasi substrat yang digunakan. Selanjutnya dibuat tabel V dan [S] dan dikonversi menjadi 1/V dan 1/[S] serta dibuat plot grafik hubungan antara 1/V dan 1/[S]. Lalu ditentukan nilai V_{maks} dan K_m yang didasarkan atas persamaan kurva *Lineweaver-Burk*.

Penentuan BM enzim dengan teknik SDS-PAGE menurut metode Laemli (1970). Pada analisis ini digunakan marker protein yang terdiri atas 9 jenis protein dari BM 14 kDa sampai dengan 170 kDa.

Penentuan Kondisi Suhu, pH dan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan kondisi optimum aktivitas enzim polifenol oksidase, yang akan diaplikasikan sebagai kondisi proses rehidrasi untuk perbaikan mutu biji kakao kering produk petani, dilakukan dengan memperlakukan kondisi pengujian enzim polifenol oksidase pada variasi suhu, pH dan waktu inkubasi. Variasi suhu terdiri atas: 30, 40, 50, 60 dan 70°C; pH terdiri atas: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 dan 7,0; dan waktu inkubasi terdiri atas: 30, 60, 90, 120, dan 150 menit. Pengaturan pH dengan cara mengatur pH bufernya dan suhu dengan mengatur suhu inkubasi dalam *water bath*. Setelah diinkubasi dengan variasi waktu inkubasi tersebut, dilakukan pengujian aktivitas enzim (Flick dkk., 1977). Data yang diperoleh dianalisis dengan metode regresi multivariat ($Y = a + bX_1 + cX_2 + dX_3$) yang diselesaikan dengan teknik "Response Surface Methodology" (RSM) metode Box-Behnken Design, dimana: Y = unit aktivitas isolat enzim polifenol oksidase (U/gram bk biji kakao), X_1 = suhu (°C), X_2 = pH dan X_3 = waktu inkubasi (menit).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Enzim Polifenol Oksidase

Hasil pengujian aktivitas enzim polifenol oksidase, yang diisolasi dari 10 sampel biji kakao kering produk petani di Provinsi Bali seperti disajikan pada Tabel 1. Dari 10 sampel biji kakao kering tersebut, rata-rata aktivitas enzim polifenol oksidase 157,49 ± 58,03 U/gram (bk) biji kakao, dengan aktivitas maksimum 258,22 U/gram (bk) biji kakao dan minimum 59,01 U/gram (bk) biji kakao. Lebih lanjut menurut Nicolas dkk. (2002), bahwa aktivitas enzim polifenol oksidase masih tersisa sepertiga pada biji warna coklat dan setengah pada biji warna ungu, dibandingkan dengan sisa aktivitas yang ditemukan pada biji slaty (tidak difermentasi). Misnawi dkk. (2002), menambahkan bahwa sisa aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam pengolahan kakao masih memungkinkan dinkubasikan untuk reaksi enzimatik selanjutnya.

Tabel 1. Aktivitas enzim polifenol oksidase dari biji kakao kering produk petani di Provinsi Bali

Asal sampel (<i>Desa</i>)	Aktivitas enzim (U/gram)
Jembrana 1 (<i>Asah Duren</i>)	138,43
Jembrana 2 (<i>Sekar Wangi</i>)	158,14
Jembrana 3 (<i>Manistutu</i>)	59,01
Jembrana 4 (<i>Yeh Embang Kauh</i>)	183,43
Tabanan 1 (<i>Baturiti</i>)	258,22
Tabanan 2 (<i>Angseri</i>)	191,95
Tabanan 3 (<i>Jegu</i>)	147,94
Tabanan 4 (<i>Pesagi</i>)	85,39
Tabanan 5 (<i>Babahan</i>)	142,65
Buleleng (<i>Singaraja</i>)	209,70

Kinetika Enzim

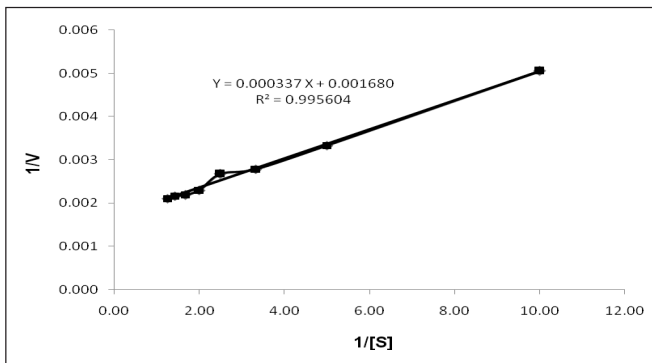
Penentuan V_{maks} dan K_m dilakukan dengan terlebih dahulu menguji aktivitas enzim polifenol oksidase pada beberapa konsentrasi substrat katekol, yaitu: 0,10 – 0,80 M, dengan interval 0,10 M. Aktivitas isolat enzim polifenol oksidase pada beberapa konsentrasi substrat katekol (Tabel 2), menunjukkan bahwa aktivitas isolat enzim polifenol oksidase mula-mula meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat, sampai dengan konsentrasi 0,50 M, tetapi tidak signifikan lagi setelah konsentrasi substrat ditingkatkan menjadi 0,60 - 0,80 M. Pada kondisi dimana kecepatan reaksi enzimatik tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya konsentrasi substrat disebut kecepatan maksimum (V_{maks}) (Wiesman, 1989; Fox, 1991).

Tabel 2. Aktivitas enzim polifenol oksidase pada beberapa konsentrasi substrat katekol

Konsentrasi substrat (M)	Aktivitas enzim (U/gram)
0,10	197,85 ^d
0,20	299,89 ^c
0,30	358,85 ^b
0,40	373,89 ^b
0,50	435,32 ^a
0,60	456,75 ^a
0,70	462,46 ^a
0,80	475,41 ^a

Keterangan: Superscript sama menunjukkan tidak beda nyata (P>0,05)

Hasil perhitungan penentuan V_{maks} dan K_m enzim polifenol oksidase, diperoleh bahwa nilai V_{maks} sebesar 595,24 U/gram (bk) biji kakao dan K_m sebesar 0,20 M. Hasil tersebut diperoleh dari persamaan garis regresi $Y = 0,000337X + 0,001680$ dengan $R^2 = 0,9956$; seperti pada grafik hubungan antara $1/[S]$ dan $1/V$ (Gambar 1).



Gambar 1. Grafik hubungan $1/[S]$ dan $1/V$ enzim polifenol oksidase

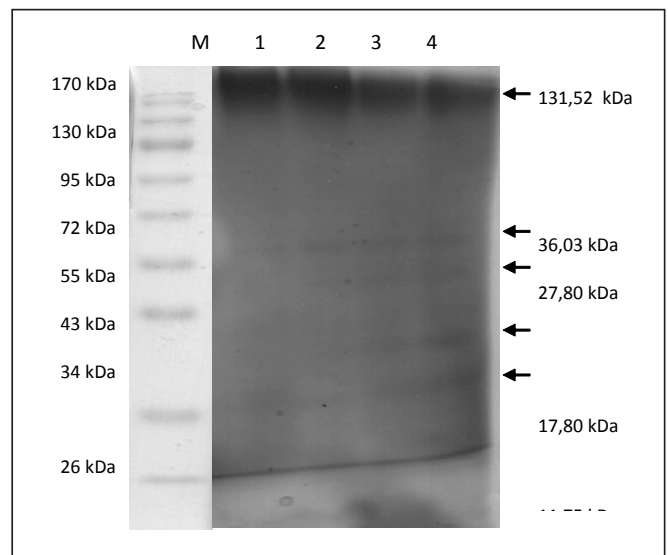
Sebagai ilustrasi nilai V_{maks} dan K_m enzim polifenol oksidase dari beberapa sumber, diantaranya seperti dilaporkan oleh Chikezie (2006), bahwa enzim polifenol oksidase pada biji kola (*Cola nitida* dan *Cola acuminata*) memiliki aktivitas maksimum (V_{maks}) sebesar $2,5 \times 10^{-3}$ O.D/detik dan K_m $5,0 \times 10^{-3}$ M. Sedangkan pada *Chinese cabbage* nilai K_m sebesar 682,5 mM dan V_{maks} sebesar 67,6 OD/min pada substrat katekol (Takeshi and Nobutaka, 2001). Sementara Lee dkk. (2006), melaporkan bahwa enzim polifenol oksidase pada biji kakao memiliki nilai K_m sebesar 0,02 M pada substrat katekol yang diujikan pada pH 6,8. Aktivitas enzim tersebut dipengaruhi oleh karakteristik psikokemikal dan kadar enzim. Nilai V_{maks} dan K_m seperti itu tentunya tidak sepenuhnya dapat dikomparasikan karena berbeda dalam proses isolasi maupun kondisi pengujian dan juga substrat enzimnya.

Harga V_{maks} dan K_m suatu enzim tergantung pada tingkat kemurnian enzim, jenis substrat, keadaan lingkungan seperti suhu dan pH juga kekuatan ion. Enzim yang murni

memungkinkan sisi-sisi aktifnya dapat bereaksi secara lebih baik, sehingga meningkatkan aktivitasnya yang berdampak pada penurunan nilai K_m . Selain itu enzim yang diisolasi dari sumber berbeda akan memiliki sifat-sifat berbeda, terutama responnya terhadap kondisi lingkungan, seperti: suhu, pH dan konsentrasi NaCl optimum untuk aktivitasnya. Kekuatan ion-ion dari beberapa jenis molekul kecil juga sangat penting diperhatikan karena akan mempengaruhi mekanisme penghambatan aktivitas enzim.

Berat Molekul

Hasil SDS-PAGE protein enzim polifenol oksidase serta protein *marker* dalam bentuk elektroforegram pita-pita protein, menunjukkan bahwa dalam larutan enzim polifenol oksidase terdapat pita-pita protein yang mempunyai berat molekul 11,75; 17,80; 27,80; 36,03 dan 131,52 kDa, seperti disajikan pada Gambar 2. Pita-pita protein yang tersebut ada yang mendekati berat molekul enzim polifenol oksidase dari berbagai sumber, seperti: pada jamur sebesar 120 kDa (Duckworth dan Coleman, 1970), *lettuce* sebesar 56 kDa dan pada *Chinese cabbage* sebesar 65 kDa (Takeshi dan Nobutaka, 2001). Selain itu terdapat juga pita-pita protein dengan BM antara 11,75 - 36,03 kDa pada elektroforegram enzim polifenol oksidase. Hal ini kemungkinan karena enzim polifenol oksidase yang diisolasi dari biji kakao produk petani masih berupa enzim kasar sehingga masih dimungkinkan terdapat protein non enzim.

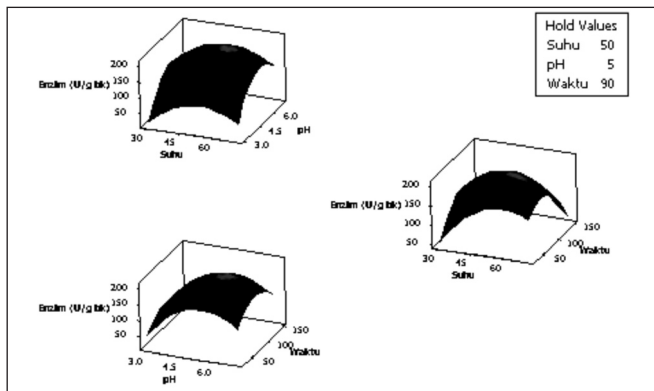


Gambar 2. Elektroforegram pita-pita protein enzim polifenol oksidase dari 4 daerah asal berbeda (1, 2, 3 dan 4) serta protein marker (M) hasil SDS-PAGE

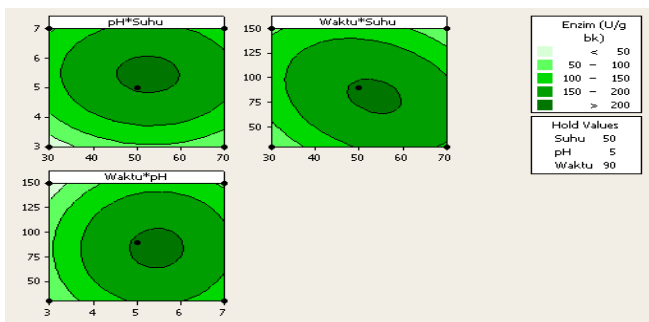
Kondisi Optimum Enzim

Hasil analisis regresi untuk pembentukan kurva respon permukaan aktivitas enzim polifenol oksidase pada variasi

kondisi suhu, pH dan waktu inkubasi, menunjukkan bahwa model persamaan regresi kurva respon permukaan aktivitas enzim polifenol oksidase adalah: $Y = -996,100 + 17,781X_1 + 207,851X_2 + 4,083X_3 - 0,142X_1^2 - 18,840X_2^2 - 0,017X_3^2 - 0,091X_1X_2 - 0,027X_1X_3 + 0,021X_2X_3$, koefisien determinasi (R^2) = 0,9427. Dari persamaan regresi kurva respon permukaan tersebut, diperoleh kombinasi kondisi suhu 53,43°C; pH 5,42 dan waktu inkubasi 80,91 menit yang memberikan aktivitas enzim polifenol oksidase optimum sebesar 208,46 U/gram (bk) biji kakao. Adapun kurva dan kontur respon permukaannya seperti pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Kurva respon permukaan aktivitas isolat enzim polifenol oksidase versus suhu, pH dan waktu inkubasi



Gambar 4. Kontur respon permukaan aktivitas isolat enzim polifenol oksidase versus suhu, pH dan waktu inkubasi

Perubahan aktivitas enzim polifenol oksidase akibat perlakuan suhu terjadi karena pengaruh suhu berkaitan dengan laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Semakin tinggi suhu menyebabkan meningkatnya energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi, sehingga laju reaksinya semakin meningkat. Selanjutnya sampai batas suhu tertentu (optimal), peningkatan suhu justru menurunkan aktivitas enzim akibat laju kerusakan enzim melampaui laju aktivitas enzim. Lebih lanjut menurut Sofro (1990), kerusakan enzim menyebabkan perubahan struktur enzim, sehingga sisi aktif enzim tidak dapat lagi digunakan dalam mengikat substrat.

Akan halnya pengaruh pH, berkaitan dengan terjadinya aktivitas enzim yang maksimal pada pH optimum, sedangkan diatas dan dibawah pH optimum aktivitas enzim mengalami penurunan. Di sekitar pH optimum, enzim mempunyai stabilitas yang tinggi, sedangkan bila diatas atau dibawah pH optimum kestabilan enzim menurun. Enzim bersifat amfolitik, yaitu enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal aminonya. Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH disebabkan oleh perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim-substrat. Ketika pH lingkungan berubah, struktur tiga dimensi protein akan terganggu dan perubahan pH yang ekstrim akan menyebabkan denaturasi protein (Whitaker, 1996). Begitu pula dengan pengaruh waktu inkubasi, dimana setiap reaksi katalitik enzim memerlukan waktu tertentu untuk berlangsung secara sempurna. Waktu yang makin panjang memungkinkan pula aktivitas menjadi menurun akibat sudah jenuhnya sisi aktif enzim oleh substrat.

Suhu optimum isolat enzim polifenol oksidase (53,43 °C) hampir sama dengan suhu optimum enzim polifenol oksidase pada buah vanili kering selama kuring adalah 45 °C (Hanum, 1997), pada *Chinese cabbage* 48 °C (Takeshi dan Nobutaka, 2001), pada biji kakao sebesar 45°C (Lee dkk., 2006) dan enzim polifenol oksidase relatif stabil pada kisaran suhu 50-70 °C. Hal yang sama juga ditunjukkan pada pH optimum isolat enzim polifenol oksidase (pH 5,42), dimana kondisi pH optimum tersebut berada pada kisaran pH optimum enzim polifenol oksidase pada *Chinese cabbage* yaitu pH 6,0 dan masih stabil pada kisaran pH 4,0 - 7,0 (Takeshi dan Nobutaka, 2001), pada jamur kisaran pH 6,0 - 7,0 (Duckworth dan Coleman, 1970), pada biji kakao pH 6,8 (Lee dkk., 2006) dan dari sumber lain diketahui kondisi optimum pada kisaran pH 5,0 - 7,0.

Atas dasar kondisi suhu, pH dan waktu inkubasi optimum tersebut, akan dapat digunakan sebagai kondisi proses rehidrasi biji kakao kering produk petani. Proses rehidrasi memungkinkan biji kakao kering produk petani menyerap air kembali sehingga dapat mengoptimalkan kondisi aktivitas katalitik enzim polifenol oksidase. Menurut Lopez (1986), aktivitas enzim polifenol oksidase dapat berlangsung pada kisaran kadar air substrat 40-10 % dan suhu 40-60 °C. Dilaporkan oleh Ganda Putra dan Wartini (2000), bahwa proses rehidrasi yang hanya didasarkan atas faktor waktu perendaman, tanpa memperhatikan lebih dalam mengenai kondisi optimum aktivitas enzim polifenol oksidase, belum menghasilkan citarasa khas kakao yang optimal. Oleh karena itu kondisi proses rehidrasi yang akan dilakukan semestinya didasarkan atas kondisi suhu, pH dan waktu inkubasi optimum untuk aktivitas enzim polifenol oksidase.

KESIMPULAN

Aktivitas isolat enzim polifenol oksidase yang diisolasi dari 10 sampel biji kakao kering produk petani rata-rata $157,49 \pm 58,03$ U/gram (bk) biji kakao; maksimum 258,22 U/gram (bk) biji kakao dan minimum 59,01 U/gram (bk) biji kakao. Parameter kinetika enzim polifenol oksidase menunjukkan bahwa V_{maks} sebesar 595,24 U/gram (bk) biji kakao dan K_m sebesar 0,20 M. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa dalam larutan enzim polifenol oksidase terdapat pita-pita protein yang mempunyai berat molekul 11,75; 17,80; 27,80; 36,03 dan 131,52 kDa. Kondisi optimum aktivitas enzim polifenol oksidase pada suhu 53,43 °C; pH 5,42 dan waktu inkubasi 80,91 menit. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi kondisi suhu, pH dan waktu inkubasi optimum enzim polifenol oksidase sebagai kondisi proses rehidrasi, untuk perbaikan mutu biji kakao kering produk petani.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Batch II, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan No.: 309/SP2H/PP/DP2M/VI/2009 tanggal 16 Juni 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim (2008). Statistik Perkebunan Indonesia. <http://agribisnis.deptan.go.id/kebun/statistik/default.htm> [13/03/09].
- Chikezie, P.C. (2006). Extraction and activity of polyphenol oxidase from kolanuts (*Cola nitida* and *Cola acuminata*) and cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Agriculture and Food Science* **4**: 115-124.
- Coseteng, M.Y. dan Lee, C.Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science* **52**: 985-989.
- Dinu, D. (2001). Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Roumanian Biotechnological Letters* **6**: 397-402.
- Fayyaz, A., Asbi, B.A., Ghazali, H.M., Che-Man, Y.B. dan Jinap, S. (1995). Kinetics of papaya pectin esterase. *Food Chemistry* **53**: 129-135.
- Flick, G.J., Robert, J.R., Ory, L. dan Angelo, J.A.S. (1977). Comparison of nutrient composition and enzyme activity in purple, green and white eggplants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **25**: 117-120.
- Fox, P.F. (1991). *Food Enzymology*. Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *A. Bacteriophage T4*. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, P.M., Lee, K.H., Ismail, H. dan Karim, A. (2006). Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *Journal of Science, Food and Agriculture* **55**: 251-260.
- Lopez, A.S. (1986). Chemical change occurring during the processing of cacao. *Proceeding of The Cacao Biotechnology Symposium*. Dept. Of Food Science College of Agriculture, The Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Misnawi, Jinap, S., Nazamid, S. dan Jamilah, B. (2002). Activation of remaining key enzymes in dried under-fermented cocoa beans and its effect on aroma precursor formation. *Food Chemistry* **78**: 407-417.
- Munoz, R. dan Barcelo, A.R. (1996). Enzymes. In L.M.L. Nollet (ed.). *Handbook of Food Analysis*. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Nicolas, N., Christina, R., Lina, S. dan Reinhard, L. (2002). Residual enzyme activities in traded cacao samples and their relevance to cacao processing and quality. *Proceeding of the 15th International Cocoa Research Conference*. Kota Kinabalu, Sabah.
- Permana, I.D.G.M. (1992). Penyebaran senyawa polifenol dan aktivitas fenolase dalam biji kakao hasil pengolahan petani untuk mengatasi penyebab slaty. Tesis S-2, Fakultas Pascasarjana UGM, Yogyakarta.
- Putra, G.P.G. dan Wartini, N.M. (2000). Pengaruh waktu perendaman biji kakao kering terhadap citarasa bubuk kakao. *Gitayana* **6**: 12-16.
- Sofro, A.S.M. (1990). *Biokimia*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta.
- Takeshi, N. dan Nobutaka, S. (2001). Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage (*Brassica rapa L.*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **49**: 3922-3926.
- Whitaker, J. R. (1996). Enzymes. In O. R. Fennema (Ed.). *Food Chemistry*. 3rd Edition. Maedel Dekker, Inc., New York.
- Wiseman, A. (1989). *Handbook of Enzymes Biotechnology*. 2nd. Edition. Ellis Howard, New York.