

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Produk berbasis kakao diminati di seluruh dunia karena rasa dan aromanya yang unik. Selain unggul dalam rasa dan aroma, kualitas bubuk kakao yang baik memiliki manfaat untuk kesehatan karena kakao kaya akan sumber antioksidan seperti vitamin E (tokoferol) dan kandungan fenol. Kualitas produk olahan kakao yang baik sangat tergantung dari kualitas biji kakao dan proses pengolahan (Suprapti, 2006).

Proses fermentasi merupakan proses pengolahan yang mempengaruhi kualitas biji kakao. Selama proses fermentasi komponen-komponen biji kakao akan mengalami perubahan seperti terbentuknya cita rasa khas kakao, aroma, warna, pengurangan rasa pahit, sepat, perbaikan kenampakan fisik biji kakao (Susanto, 1994). Selain itu akan terbentuk senyawa-senyawa flavonoid seperti katekin, epikatekin dan galokatekin (Suprapti, 2006).

Kualitas kakao dipengaruhi oleh kehadiran tokoferol dan total fenol sebagai wujud ekspresi dari aroma dan flavor pada kakao. Kualitas kakao yang baik diperlukan proses fermentasi. Selama ini petani jarang melakukan proses fermentasi diakibatkan karena membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga kualitas kakao menjadi rendah. Proses fermentasi kakao yang dilakukan oleh petani berlangsung secara spontan, yaitu tanpa penambahan starter mikroba. Fermentasi spontan menyebabkan mutu kakao yang dihasilkan tidak konsisten karena jenis dan jumlah mikroorganisme yang terlibat sangat beragam. Selain mikroorganisme yang ditunjukkan dalam proses fermentasi, mikroorganisme pembusuk dan patogen juga dapat tumbuh. Kontaminasi mikroba selama fermentasi menyebabkan mutu biji kakao menjadi rendah karena akan mengganggu aktivitas mikroba yang berperan selama fermentasi akibat berebut nutrisi (Minifie, 1999). Sampai saat ini telah dilakukan penelitian untuk perbaikan terhadap mutu biji kakao seperti penambahan mikroorganisme dalam bentuk khamir yang ternyata dapat mempersingkat masa fermentasi (Siregar *et al.*, 1989).

Pada proses fermentasi, 24 jam pertama *yeast* mendominasi fermentasi, kemudian menurun dan digantikan oleh pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL). Menurut Galvez

et al. (2007), *Lactobacillus plantarum* merupakan BAL yang konsisten selama proses fermentasi. Telah diketahui bahwa BAL memiliki aktivitas antimikroba karena memproduksi asam organik yang akan menurunkan pH sehingga menghasilkan penghambatan terhadap mikroorganisme pembusuk (Kusumawati, 2000). Peranan BAL selama proses fermentasi akan menghasilkan metabolit primer (asam laktat) dan metabolit sekunder (senyawa fenol) (Primurdia & Kusnadi, 2013). Kondisi asam yang dihasilkan oleh adanya BAL akan meningkatkan dan menstabilkan aktivitas antioksidan seperti fenol dan tokoferol, dan senyawa fenol dari metabolit sekunder dapat meningkatkan mutu pada kakao. Berdasarkan penelitian Zubaidah *et al.* (2010), BAL dapat mendegradasi senyawa fenol yang terikat pada serat tidak larut. Terdapat senyawa-senyawa hemiselulosa, pektin, pati dan fenol yang terikat pada plasenta (kulit ari pembungkus biji) kakao (Alam *et al.*, 2010).

Saat ini penggunaan kultur BAL semakin banyak diminati karena dapat meningkatkan mutu produk pangan (peningkatan senyawa fenolik seperti tokoferol). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian dengan penambahan BAL pada proses fermentasi dengan tujuan dapat meningkatkan komponen tokoferol dan total fenol pada biji kakao. Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti menguji perubahan kandungan tokoferol dan total fenol selama proses fermentasi spontan dan fermentasi menggunakan penambahan BAL (*Lactobacillus plantarum*) pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao (*Theobroma cacao* L.), termasuk dalam famili *Sterculiaceae* yang merupakan tanaman asli Amerika utara, saat ini tanaman kakao telah dibudidayakan di daerah tropis. Tinggi tanaman kakao berkisar antara 4-8 m (Minifie, 1999). Buah kakao berbentuk lonjong dengan panjang sekitar 15-30 cm dan lebar 8-10 cm. Buah kakao yang matang berwarna kuning-oranye (Gambar 1.a) dengan berat sekitar 500 g. Terdapat sekitar 20-60 biji kakao yang dilapisi *pulp* berwarna putih (Gambar 1.b) yang terletak di dalam kulit buah kakao (Gambar 1.c). Setiap butir biji kakao mengandung lemak sekitar 40-50 % (Sunanto, 1992).



Gambar 1. Buah Kakao (a); Biji kakao yang dilapisi dengan *pulp* (b); Kulit buah kakao (c) (Sumber: Dokumentasi pribadi, 2013)

Di Indonesia biji kakao yang dihasilkan sebagian besar adalah biji kakao lindak. Penghasil biji kakao terbesar adalah Sulawesi mencapai 70% dari seluruh hasil produksi Indonesia. Mutu kakao yang dihasilkan di Indonesia sangat rendah dan beragam dalam hal kualitas. Hal ini disebabkan karena 80% produksi kakao tidak difermentasi (*unfermented*) dan masih sering terkontaminasi dengan serangga dan mikroba kontaminan sehingga biji kakao Indonesia tidak memiliki aroma khas kakao (berkaitan dengan senyawa fenol) (Rosniati, 2008).

Nilai jual kakao yang tinggi disebabkan karena kakao memiliki warna, cita rasa dan aroma yang khas akibat adanya proses fermentasi. Senyawa yang berperan dalam proses pembentukan warna, cita rasa dan aroma pada kakao merupakan senyawa fenol. Senyawa ini akan terbentuk akibat adanya reaksi-reaksi enzimatik dalam proses fermentasi. Menurut Genovese & Lannes (2008), kandungan total fenol pada bubuk kakao sebesar 1158 mg GAE/100g.

1.2.2. Fermentasi

Salah satu faktor yang mempengaruhi mutu kakao adalah penanganan pasca panen seperti proses fermentasi. Fermentasi dilakukan dengan menempatkan biji buah kakao di dalam kotak atau ditimbun, selanjutnya ditutup dengan daun pisang. Penggunaan daun pisang sebagai penutup bertujuan untuk menjaga suhu selama proses fermentasi dan menciptakan kondisi yang anaerob. Proses fermentasi adalah titik berat pengolahan biji kakao. Pada proses ini akan terjadi pembentukan cita rasa khas kakao, aroma,

warna, pengurangan rasa pahit, sepat, perbaikan kenampakan fisik kakao dan perubahan kimiawi didalam keping biji. Di samping mempengaruhi mutu biji kakao, fermentasi juga mempermudah penghancuran lapisan *pulp* pada biji (Susanto, 1994). Perubahan kimiawi meliputi perubahan lemak, nitrogen dan senyawa tannin. Proses fermentasi menyebabkan kenaikan lemak sekitar 4% berdasarkan berat kering selama proses fermentasi. Kenaikan lemak diikuti dengan peningkatan asam organik (asam stearat dan asam oleat) (Yusianto *et al.*, 1997). Peningkatan lemak akan menyebabkan adanya peningkatan senyawa tokoferol karena tokoferol larut dalam lemak (Rosniati, 2008).

Proses fermentasi sangat kompleks karena melibatkan mikroba tertentu seperti *yeast*, BAL dan bakteri asam asetat. Gunanya untuk memacu reaksi-reaksi enzimatik dalam merangsang pembentukan senyawa *flavonoid* (katekin, epikatekin, dan galokatekin) dan derajat fermentasi biji kakao yang ditandai dengan perubahan warna pada kotiledonnya (Suprpti, 2006). Pada fermentasi spontan pertumbuhan *yeast*, BAL dan bakteri asam asetat berasal dari lingkungan yang mengkontaminasi daging buah (*pulp*) dan biji kakao yang berperan dalam perubahan biokimiawi selama fermentasi kakao (Galvez *et al.*, 2007). Akibatnya mutu kakao yang dihasilkan tidak konsisten, karena jenis dan jumlah mikroorganisme yang terlibat sangat beragam. Selain mikroorganisme yang ditunjukkan dalam proses fermentasi, mikroorganisme pembusuk dan patogen juga dapat tumbuh. Kontaminasi mikroba selama fermentasi menyebabkan mutu biji kakao menjadi rendah karena akan mengganggu aktivitas mikroba yang berperan selama fermentasi akibat berebut nutrisi serta merusak kualitas biji kakao (baik rasa, aroma, warna, rasa sepat yang berhubungan dengan senyawa fenolik) (Minifie, 1999). Pada awal 24 jam fermentasi didominasi oleh *yeast*, kemudian menurun dan digantikan oleh pertumbuhan BAL (*Lactobacillus plantarum*) (Kustyawati & Setyani, 2008). Semula, peranan BAL dalam fermentasi kakao tidak diketahui dengan jelas, sampai ditemukannya *Lactobacillus plantarum* yang konsisten berada selama fermentasi (Galvez *et al.*, 2007).

Keberadaan BAL akan memproduksi asam-asam organik dan alkohol, yang selanjutnya akan berpenetrasi ke dalam biji dan memulai reaksi kimia sehingga terbentuk prekursor flavor coklat. Pada saat *pulp* mulai mencair oksigen mengalir ke dalam kotak fermentasi dan memacu pertumbuhan bakteri asam asetat dan memproduksi asam

asetat. Selama pertumbuhan ini suhu dalam kotak meningkat ke sekitar 50°C, sehingga terjadi difusi asam dan panas ke dalam biji yang mengakibatkan kematian biji, selanjutnya dimulai proses pembentukan warna, aroma dan flavor yang meliputi gula, asam amino dan peptida-peptida, secara enzimatik di dalam biji (Schwan & Wheals, 2004).

1.2.3. Bakteri Asam Laktat

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan mikroorganisme yang dapat memecah karbohidrat menjadi asam laktat dan senyawa lainnya (Widyastuti & Sofarianawati, 1999). BAL memiliki beberapa ciri yaitu merupakan bakteri gram positif, tidak bereaksi terhadap katalase, tidak membentuk spora, berbentuk batang atau kokus, memiliki sifat non motil dan menghasilkan asam laktat selama proses fermentasi (Aly *et al.*, 2006).

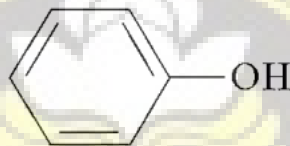
Bakteri Asam Laktat (BAL) memiliki aktivitas antimikroba karena memproduksi asam organik yaitu asam laktat, asam format dan asam asetat, diasetil, H₂O₂, CO₂ serta bakteriosin. Berdasarkan kemampuan menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir metabolisme BAL dapat digolongkan menjadi dua, yaitu bakteri homofermentatif dan bakteri heterofermentatif. Bakteri homofermentatif memecah gula menjadi asam laktat, sedangkan bakteri heterofermentatif memecah gula menjadi asam laktat, asam asetat, dan etanol. Akumulasi produk akhir berupa asam akan menyebabkan penurunan pH yang akan menghasilkan penghambatan yang luas terhadap mikroorganisme, termasuk bakteri gram-positif dan bakteri gram-negatif. Diasetil dapat menghambat baik mikroba patogen maupun pembusuk dan paling efektif terhadap bakteri gram-negatif (Nopsagiarti, 2007).

Lactobacillus plantarum merupakan BAL yang bersifat anerob atau fakultatif anaerob, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam dan mampu memproduksi asam laktat. Adanya asam laktat yang menimbulkan kondisi asam dapat menstabilkan dan menaikkan aktivitas antioksidan seperti kandungan tokoferol dan total fenol (Primurdia & Kusnadi, 2013). Kandungan gula yang digunakan sebagai substrat maka BAL akan merombak gula menjadi metabolit primer (asam laktat) dan metabolit sekunder (fenol). Semakin lama waktu fermentasi maka BAL akan semakin

berkembang biak sehingga kemampuan bakteri dalam memecah glukosa menjadi metabolit primer (fenol) dan metabolit sekunder (fenol) semakin banyak (Primurdia & Kusnadi, 2013). Menurut Zubaidah *et al.* (2010), peranan *L. plantarum* dapat mendegradasi serat tidak larut menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga terlepasnya ikatan kovalen senyawa fenolik.

1.2.4. Total Fenol

Fenol adalah senyawa dengan satu gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada cincin aromatik (Gambar 2). Fenolik merupakan metabolit sekunder yang tersebar dalam tumbuhan. Senyawa fenolik dalam tumbuhan dapat berupa fenol sederhana, antrakuinon, asam fenolat, kumarin, flavonoid dan tanin (Wahyuningrum, 2006). Kandungan fenolik total dalam tumbuhan dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE) yaitu jumlah kesetaraan miligram asam galat dalam 100 gram sampel. Sebagian besar fenolik dalam bahan pangan umumnya bersifat larut air atau pelarut organik (Shahidi & Nacz, 1995).



Gambar 2. Struktur fenol (Shahidi & Nacz, 1995)

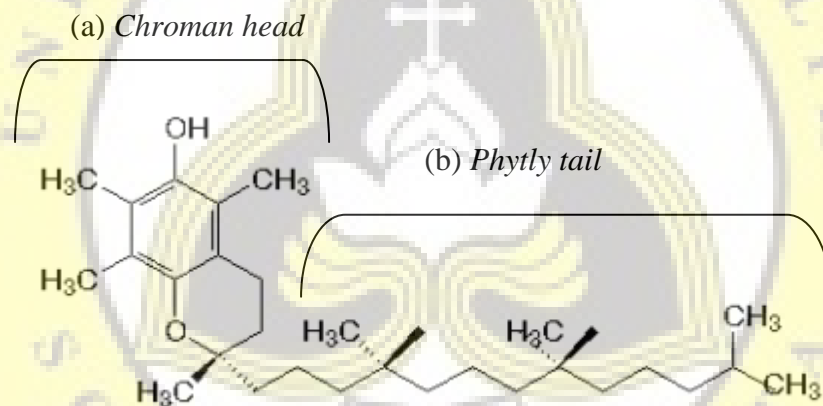
Menurut Selly (2008), antioksidan fenolik seperti vitamin E, flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, dan komponen fenolik, umumnya merupakan antioksidan primer karena mampu menghentikan reaksi rantai radikal bebas pada oksidasi lipid. Suatu molekul dapat berfungsi sebagai antioksidan primer jika dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal lipid atau dikonversi menjadi produk stabil.

Munculnya senyawa-senyawa fenol terutama golongan flavonoid disebabkan karena adanya proses fermentasi yang sangat kompleks karena melibatkan berbagai macam mikroba yang memacu reaksi-reaksi enzimatik dalam merangsang pembentukan senyawa flavonoid. Senyawa fenol ini berperan dalam pembentukan cita rasa khas kakao, aroma, warna dan perbaikan kenampakan fisik kakao. Senyawa flavonoid

memberikan efek yang menguntungkan bagi tubuh. Selain itu bisa mengurangi resiko kanker, osteoporosis dan bisa mencegah penyakit neurodegenerative serta diabetes mellitus (Suprapti, 2006).

1.2.5. Tokoferol

Vitamin E terbagi menjadi 4 jenis yaitu alfa-, beta-, gamma- dan delta-tokoferol. Bentuk alfa-tokoferol (Gambar 3) merupakan bentuk yang paling aktif sehingga sering menjadi acuan untuk mengukur vitamin E dalam makanan. Karakteristik kimia utamanya adalah bertindak sebagai antioksidan. Mekanisme vitamin E sebagai antioksidan yaitu memberikan hidrogen dari gugus hidroksil (-OH) pada struktur cincin ke radikal bebas (Chun *et al.*, 2006). Kandungan vitamin E yang tinggi pada kakao (lemak kakao) menyebabkan lemak kakao menjadi stabil dan mempunyai masa simpan yang panjang yaitu 2-5 tahun (Rosianti, 2008).



Gambar 3. Struktur alfa-tokoferol; Bagian kepala disebut *chroman* memiliki cincin *phenol* dan cincin heterocyclic (a); Bagian ekor disebut *phytyl* memiliki 3 isoprenoid (b) (Ferdiningsih, 2012)

Peningkatan tokoferol selama proses fermentasi berkaitan dengan peningkatan total fenol. Peningkatan fenol disebabkan karena adanya proses fermentasi yang melibatkan berbagai macam mikroba yang memacu reaksi-reaksi enzimatik dalam merangsang pembentukan senyawa flavonoid. Hal ini disebabkan karena tokoferol merupakan senyawa monofenolik (Shahidi & Naczki, 1995), bagian kepala tokoferol memiliki cincin fenol (Ferdiningsih, 2012). Bourgeois (1992), menambahkan bahwa tokoferol memiliki sifat penurun dari alkohol atau fenol.

1.3. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui perubahan kandungan tokoferol dan total fenol selama proses fermentasi spontan dan fermentasi dengan penambahan BAL (*Lactobacillus plantarum*) pada biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

