

Optimasi Waktu Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Menggunakan Ragi Tape Terhadap Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Optimization of Cocoa Beans (*Theobroma cacao L.*) Fermentation Time Using Tape Yeast Towards Antioxidant Activity with DPPH Method

Kadek Dian Pratiwi^{a,1}, Dewa Ayu Ika Pramitha^{a,2*}, I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani^{a,3}

^aFakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jalan Kamboja No. 11a Denpasar, 80233 Indonesia

¹Kadekdianpratiwi02@gmail.com; ²ika.pramitha@unmas.ac.id ³kusumawardani@unmas.ac.id

* Corresponding author

Abstrak

Biji kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan salah satu bagian dari tanaman kakao yang dipercaya mengandung senyawa polifenol cukup tinggi yang berperan sebagai antioksidan. Biji kakao mengandung senyawa polifenol dan flavonoid yang cukup tinggi, dimana senyawa tersebut berperan penting dalam pembentukan antioksidan. Biji kakao yang difermentasi memiliki mutu serta kualitas yang lebih baik dari segi rasa, aroma, dan warna namun proses fermentasi dapat menyebabkan turunnya kandungan senyawa polifenol pada biji kakao sehingga menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan. Pada proses fermentasi, penambahan fermentor seperti ragi tape dapat mempersingkat waktu fermentasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi waktu fermentasi untuk menghasilkan aktivitas antioksidan biji kakao (*Theobroma cacao L.*) yang lebih tinggi, yang dievaluasi dengan metode DPPH. Hasil uji antioksidan biji kakao menunjukkan nilai IC₅₀ pada sampel biji kakao tanpa fermentasi sebesar 15,360 ppm, pada sampel fermentasi 1 hari sebesar 23,757 ppm, pada sampel fermentasi 2 hari sebesar 3,574 ppm, pada sampel fermentasi 3 hari sebesar 7,985 ppm, pada sampel fermentasi 4 hari sebesar 27,70 ppm, pada sampel fermentasi 5 hari sebesar 33,111 ppm, pada sampel fermentasi 6 hari sebesar 2,456 ppm, dan pada asam askorbat sebagai kontrol positif sebesar 2,463 ppm. Dari data hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai antioksidan yang paling optimum terdapat pada sampel yang difermentasi selama 6 hari.

Kata Kunci: biji kakao (*Theobroma cacao L.*), fermentasi, DPPH, nilai IC₅₀

Abstract

Cocoa beans (*Theobroma cacao L.*) are known to contain high levels of polyphenols, which play a crucial role as antioxidants. These beans are rich in polyphenols and flavonoids, which significantly contribute to antioxidant formation. Fermentation improves the quality of cocoa beans in terms of taste, aroma, and color; however, this process can lead to a reduction in polyphenol content, subsequently decreasing antioxidant activity. The addition of fermenters, such as tape yeast, can shorten the fermentation duration. This study aims to optimize the fermentation time to obtain cocoa beans with higher antioxidant activity, evaluated using the DPPH method. The antioxidant assay results showed IC₅₀ values of 15.360 ppm for unfermented cocoa beans, 23.757 ppm for 1-day fermentation, 3.574 ppm for 2-day fermentation, 7.985 ppm for 3-day fermentation, 27.700 ppm for 4-day fermentation, 33.111 ppm for 5-day fermentation, 2.456 ppm for 6-day fermentation, and 2.463 ppm for ascorbic acid as the positive control. These findings indicate that the optimum antioxidant activity is achieved with a fermentation duration of 6 days.

Keywords: cocoa bean (*Theobroma cacao L.*), fermentation, DPPH, IC₅₀ value

PENDAHULUAN

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat, menunda serta mencegah reaksi oksidasi yang terjadi pada sistem biologis atau sistem pangan yang disebabkan oleh adanya radikal bebas [1]. Beberapa tanaman dipercaya

memiliki kandungan senyawa yang tinggi akan antioksidan, salah satunya tanaman biji kakao (*Theobroma cacao L.*). Biji kakao merupakan salah satu bagian dari tanaman yang dipercaya mengandung senyawa polifenol cukup tinggi yang berperan sebagai antioksidan. Total fenolik pada

² email korespondensi : ika.pramitha@unmas.ac.id

biji kakao yaitu sebesar $49,54 \pm 3,39$ mg dan kandungan flavonoidnya sebesar $22,42 \pm 0,98$ mg. Klasifikasi kandungan polifenol pada kakao diantaranya yaitu katekin, leukosianidin, proantosianidin, dan antosianin [2].

Kualitas rasa, aroma, serta warna biji kakao dapat dipengaruhi oleh proses fermentasi. Biji kakao yang difermentasi memiliki mutu serta kualitas yang lebih baik, karena pada proses fermentasi akan terbentuk asam organik, dimana asam organik tersebut akan menginduksi reaksi enzimatis yang terdapat di dalam biji kakao sehingga terbentuk prekursor biokimia dari rasa, warna, serta aroma pada biji kakao [3]. Namun proses fermentasi yang berlangsung lama dapat menyebabkan terjadinya penurunan dari senyawa polifenol yang terkandung pada biji kakao. Biji kakao terfermentasi sempurna mempunyai kandungan polifenol yang lebih rendah daripada yang terfermentasi sebagian karena semakin lama waktu fermentasi menyebabkan kehilangan polifenol yang lebih besar pada biji kakao [4]. Total senyawa polifenol biji kakao pada tahap awal fermentasi sebanyak 16,11% b/b, dan setelah enam hari difermentasi menjadi 6,01% b/b. Kandungan senyawa polifenol yang turun setelah fermentasi disebabkan karena difusi polifenol keluar dari kotiledon. Selain itu polifenol juga mengalami oksidasi dan kondensasi [5].

Proses fermentasi pada biji kakao dengan menambahkan ragi pada saat fermentasi akan mempercepat waktu fermentasi [6]. Selain itu penambahan ragi tape dalam proses fermentasi juga dapat meningkatkan nilai uji organoleptik meliputi rasa dan aroma dari biji kakao yang disebabkan oleh mikroorganisme yang berperan sangat aktif dalam pembentukan enzimatis rasa serta aroma dari biji kakao [7].

Berdasarkan dari hal tersebut, dapat dikatakan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka semakin menurun kandungan polifenol pada biji kakao sehingga aktivitas antioksidannya juga semakin menurun. Namun belum ditemukan waktu optimum untuk fermentasi pada biji kakao untuk mendapatkan biji kakao dengan aktivitas

antioksidan yang optimum. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi waktu fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan ragi tape terhadap aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, *rotary evaporator* (Buchi R-300, Switzerland), oven (Memmert), cawan porselin, gelas ukur (Pyrex), *beaker glass* (Herma), sendok tanduk, batang pengaduk, *waterbath*, kaca arloji, labu ukur (Herma), blender (Philips), gunting, timbangan analitik (Ohaus), timbangan digital (Acis Type BC-500), anak timbangan, aluminium foil, pipet mikro, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung, toples, plastik. Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Jepang).

Bahan

Bahan yang digunakan yaitu, biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang sudah masak, amil alkohol (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck Jerman), alkohol klorhidrat (Brataco, Merck) larutan FeCl_3 1% (Merck, Jerman), ragi tape (NKL). Bahan untuk uji aktivitas antioksidan yaitu DPPH (*2,2-difenil-1-pikrihidrazil*) (Smart-Lab, Indonesia), Metanol p.a (EMSURE).

Metode

Penelitian ini termasuk ke dalam jenis penelitian laboratorium dengan pendekatan metode eksperimental. Percobaan ini berupa perlakuan intervensi terhadap suatu variabel. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh waktu optimum fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan ragi tape, yang dievaluasi terhadap aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.

Penyiapan Bahan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan bahan biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari salah satu kebun warga di Desa Dawan Kaler, Kecamatan Dawan, Kabupaten

Klungkung. Biji kakao yang digunakan diambil dari buah kakao masak, kemudian dilakukan proses fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dengan menambahkan ragi tape sebanyak 2% dari bobot biji kakao kemudian meletakkan biji kakao pada 6 kotak fermentasi yang dialasi daun pisang dan ditutup dengan plastik. Biji kakao difermentasi selama 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 hari. Setelah proses fermentasi selesai, selanjutnya dilakukan proses pengeringan dengan cara diangin-anginkan selama kurang lebih 7 hari.

Kemudian dilanjutkan dengan proses ekstraksi. Biji kakao yang sudah kering diblender hingga membentuk bubuk kakao. Bubuk kakao kemudian diekstraksi dengan pelarut methanol menggunakan metode maserasi selama 3x24 jam.

Skrining Fitokimia

Uji skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder tumbuhan meliputi senyawa golongan flavonoid, dan polifenol yang terkandung di dalam ekstrak biji kakao dengan menggunakan berbagai variasi pelarut.

Uji Aktivitas Antioksidan

Pembuatan larutan stok DPPH 40 ppm dan pembuatan larutan sampel uji biji kakao (10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm) dan larutan uji asam askorbat sebagai kontrol positif (1ppm, 2 ppm, 3ppm, 4 ppm, 5 ppm). Dilakukan penetapan panjang gelombang maksimum dengan mengamati spektrum serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran serapan larutan blanko dilakukan dengan memipet 2mL larutan DPPH dan ditambahkan 2 mL methanol absolut kemudian dikubasi selama 30 menit, lalu diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm.

Pengukuran serapan sampel uji dan asam askorbat dilakukan dengan memasukkan larutan sampel dengan seri konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya

dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada ruangan gelap lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Pengujian dilakukan dengan cara larutan asam askorbat dengan seri konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan DPPH 40 ppm dengan perbandingan 1:1 Selanjutnya dihomogenkan lalu serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm.

Pengolahan dan Analisis Data

Parameter yang digunakan untuk mengetahui kekuatan aktivitas antioksidan dari ekstrak biji kakao adalah *inhibition concentration* (IC₅₀). Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linier antara % inhibisi dengan konsentrasi penghambatan terhadap radikal bebas. % inhibisi dihitung dengan menggunakan rumus berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%.$$

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan garis linier yang telah diperoleh dengan mengganti variabel y dengan angka 50 sehingga dapat diperoleh nilai variabel x yang merupakan nilai IC₅₀. Angka 50 menunjukkan konsentrasi inhibisi larutan uji yang mampu menangkal 50% radikal bebas DPPH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Fermentasi

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi waktu fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan ragi tape terhadap aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Proses fermentasi dilakukan dengan penambahan ragi tape untuk mempercepat fermentasi. Proses fermentasi dibagi menjadi 6 variasi berdasarkan lama waktu fermentasi. Perbedaan hasil fermentasi dapat dilihat dari warna pada biji kakao serta aromanya. Hasil fermentasi dapat disajikan pada tabel 1. dimana pada hari keempat fermentasi aroma dan warna biji kakao sudah menunjukkan kualitas yang baik dilihat dari aroma

dan warnanya yang menunjukkan khas aroma dan warna kakao [8], dimana hal ini menunjukkan bahwa penambahan ragi tape dapat mempercepat waktu fermentasi dari biji kakao.

Tabel 1. Hasil Fermentasi pada biji kako pada lama waktu fermentasi 0 – 6 hari

Lama Waktu Fermentasi (Hari)	Warna	Aroma	Gambar
0	Ungu	Tidak ada Aroma kakao	
1	Ungu gelap	Tidak ada aroma kakao	
2	Ungu gelap	Aroma kakao sangat lemah	
3	Coklat	Agak khas aroma kakao	
4	Coklat gelap	Aroma khas kakao	
5	Coklat gelap	Aroma kakao sangat khas	
6	Coklat gelap	Aroma kakao sangat khas	

Hasil Ekstraksi

Hasil perhitungan rendamen ekstrak pada seluruh sampel diperoleh hasil sebesar 12% pada sampel tanpa fermentasi, 9,50% pada sampel dengan 1 hari fermentasi, 8% pada sampel dengan 2 dan 3 hari fermentasi, 3% pada sampel dengan 4 hari fermentasi, dan 5% pada sampel dengan 5 dan 6 hari fermentasi. Hasil perhitungan rendemen menunjukkan adanya penurunan rendemen yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti kondisi pohon pengambilan sampel, proses pengeringan dan suhu pengeringan yang tidak stabil [9].

Hasil Skrining Fitokimia

Hasil skrining senyawa flavonoid dan polifenol menunjukkan keberadaan kedua

senyawa fitokimia tersebut pada seluruh sampel yang ditunjukkan dengan pembentukan warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol jika positif senyawa flavonoid, dan terbentuknya warna hijau kehitaman hingga hitam pekat jika positif senyawa polifenol.

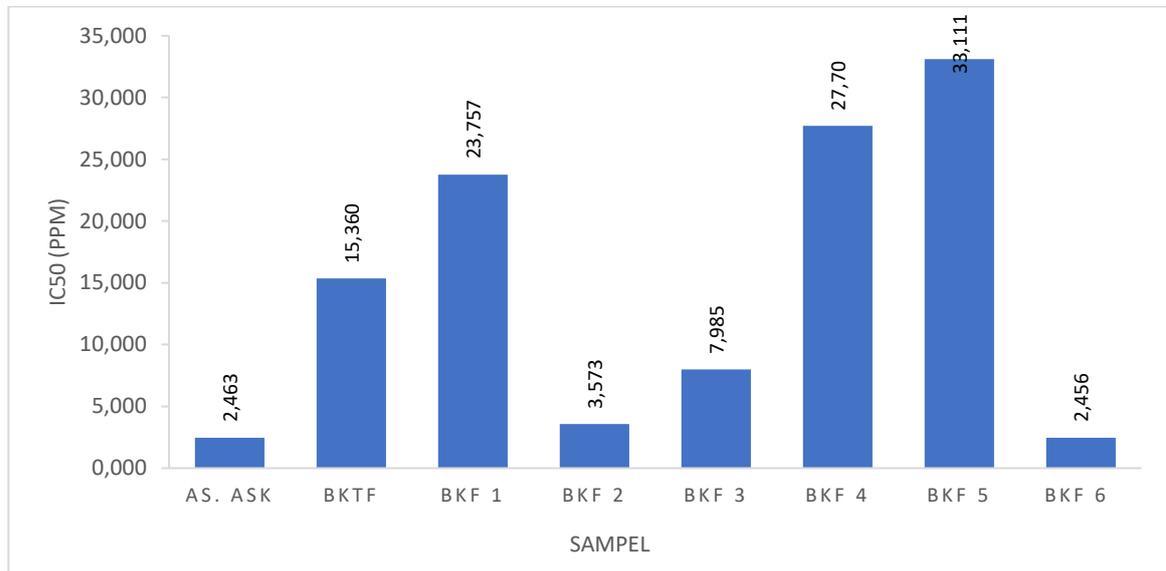
Hasil Uji Aktivitas Antioksidan (Nilai IC₅₀)

Nilai IC₅₀ diartikan sebagai besarnya konsentrasi dari senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Prinsip kerja dari pengukuran nilai IC₅₀ ini adalah adanya radikal bebas stabil yaitu DPPH yang dicampurkan dengan senyawa antioksidan yang memiliki kemampuan mendonorkan hidrogen, sehingga radikal bebas dapat diredam. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka

Optimasi Waktu Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Menggunakan Ragi Tape Terhadap aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi. Tingkat kekuatan aktivitas antioksidan akan dikatakan sangat kuat jika memiliki nilai $IC_{50} < 50$ ppm, kuat dengan nilai $IC_{50} = 50-150$ ppm, sedang

dengan nilai $IC_{50} = 150-250$ ppm, lemah dengan nilai $IC_{50} = 250-500$ ppm dan sangat lemah dengan nilai $IC_{50} > 500$ [10].



Gambar 1. Grafik Nilai IC_{50} asam Askorbat dan Sampel

Keterangan: BKTF : Biji Kakao Tanpa Fermentasi, BKF1 : Biji Kakao Fermentasi 1 hari, BKF2 : Biji Kakao Fermentasi 2 hari, BKF3 : Biji Kakao Fermentasi 3 hari, BKF5 : Biji Kakao Fermentasi 4 hari, BKF6 : Biji Kakao Fermentasi 6 hari

Hasil data absorbansi yang didapatkan kemudian digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) didapat dari presentasi nilai inhibisi yang yang diperoleh digunakan dalam pembuatan kurva persamaan regresi linear dengan menghubungkan konsentrasi pada masing-masing sampel uji dengan nilai absorbansi. Nilai IC_{50} pada setiap sampel dan pada asam askorbat ditunjukkan pada gambar 1. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa seluruh sampel yang telah diuji memiliki aktivitas antioksidan yang dikategorikan sangat kuat.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Caligianti dkk. (2007)^[5], dan Aikpokpodion & Dongo (2010)^[11], menyatakan bahwa Beberapa penelitian menunjukkan adanya penurunan kandungan senyawa polifenol setelah fermentasi, yang juga menyebabkan penurunan aktivitas penghambatan radikal [5], [11]. Meskidemikian, hasil penelitian tersebut tidak sebanding dengan hasil pada penelitian ini. Hal ini bisa disebabkan oleh beberapa faktor seperti parameter lingkungan, lokasi pengambilan sampel,

jenis sampel, umur tanaman, proses pengolahan sampel, lama masa simpan ekstrak, kondisi tanah, suhu dan sanitasi cahaya matahari [12], [13].

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa, ekstrak biji kakao yang telah difermentasi memiliki nilai aktivitas antioksidan yang sangat kuat, berdasarkan dari data hasil nilai IC_{50} yang telah didapatkan. Namun hasil nilai aktivitas antioksidan yang paling optimum terdapat pada sampel yang difermentasi selama 6 hari.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih banyak kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung penuh atas penyusunan dan pelaksanaan penelitian ini sehingga penelitian ini berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] R. R. Utami, "Antioksidan Biji Kakao: Pengaruh Fermentasi Dan Penyangraian Terhadap Perubahannya (Ulasan)," *J. Ind. Has. Perkeb.*, vol. 13, no. 2, p. 75, 2018, doi: 10.33104/jihp.v13i2.4062.
- [2] B. Zainal, M. A. Abdah, Y. Y. H. Taufiq, H. Roslida Abdul, and K. Rosmin, "Theobroma cacao: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds," *Trop. Life Sci. Res.*, vol. 53, no. 9, pp. 21–42, 2016.
- [3] E. O. Afoakwa, A. S. Budu, H. Mensah-Brown, J. F. Tarama, and E. Akomanyi, "Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans," *J. Nutr. Heal. Food Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 1–8, 2014, doi: 10.15226/jnhfs.2014.00121.
- [4] C. Bruna, I. Eichholz, S. Röhn, L. W. Kroh, and S. Huyskens-Keil, "Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins," *Journal of Applied Botany and Food Quality*, vol. 83, no. 1, pp. 9–13, 2009.
- [5] A. Caligianti, M. Cirilini, G. Palla, R. Ravaglia, and M. Arlorio, "GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin," *Chirality*, vol. 19, pp. 329–334, 2007, doi: 10.1002/chir.
- [6] G. A. Arieftha, G. G. Putra, and A. D. Anggreni, "Pengaruh Penambahan Ragi Tape Dan Waktu Fermentasi Terhadap Karakteristik Pulpa Biji Kakao," *J. Rekayasa Dan Manaj. Agroindustri*, vol. 4, no. 2, pp. 42–52, 2016.
- [7] W. B. J. Barus, A. Anwar, M. Nuh, I. Gunawan, Mahyudani, and S. Ginting, "Pengaruh Jenis Ragi Dan Lama Perendaman," vol. 10, no. 2, pp. 292–303, 2021.
- [8] C. W. V Sucipto and Y. A. Handoko, "Analisis Perbandingan Kualitas Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan Berbagai Wadah Fermentasi Menggunakan Kultur Campur," *Teknotan J. Ind. Teknol. ...*, vol. 16, no. 3, 2022, doi: 10.24198/jt.vol16n3.8.
- [9] C. A. Nuraskin, Reza, and T. Salfiyadi, "Identifikasi Ekstrak Metanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Bahan Dasar Pasta Gigi," *J. Mutiara Kesehatan. Masy.*, vol. 7, no. 2, pp. 67–73, 2022, doi: 10.51544/jmkm.v7i2.3194.
- [10] D. Pratiwi and I. Wardaniati, "Pengaruh Variasi Perlakuan (Segar dan Simplisia) Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kadar Fenol Total," *J. Farm. Higea*, vol. 11, no. 2, pp. 159–165, 2019.
- [11] P. E. Aikpokpodion and L. N. Dongo, "Effects of Fermentation Intensity on Polyphenols and Antioxidant Capacity," *Int. J. Sustain. Crop Prod.*, vol. 5, no. 4, pp. 66–70, 2010.
- [12] Prasanna & Arthi, "Hptlc finger print profile and in vitro antioxidant activity of *Gomphrena Globosa* L. Flowers," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 208–215, 2016.
- [13] A. Suhardiman, "Pengaruh Tempat Tumbuh Tanaman Daun Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam) dari Dua Daerah yang Berbeda terhadap Aktivitas Antioksidan The Effect of Plants Growing Agarwood Leaves (*Aquilaria malaccensis* Lam) from Two Different Areas on Antioxidant Activit," no. May, pp. 8–16, 2023.
- [14] V. Arthi and G. Prasanna, "Hptlc finger print profile and in vitro antioxidant activity of *Gomphrena Globosa* L. Flowers," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 208–215, 2016.