

AKTIVITAS LIPASE INDIGENOUS SELAMA PERKECAMBAHAN BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

Indogenous Lipase Activities during Cocoa Bean (*Theobroma cacao* L.) Germination

I Dewa Gde Mayun Permana¹, Retno Indrati², Pudji Hastuti², Suparmo²

¹Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana, Kampus Bukit Jimbaran, Bali 80364

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gajah Mada, Jl. Flora No. 1,

Bulaksumur, Yogyakarta 55281

Email: mayun_dev@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aktivitas tertinggi lipase biji kakao selama perkecambahan. Aktivitas lipase dianalisis setiap hari selama 10 hari perkecambahan. Lipase terekstrak menunjukkan aktivitas hidrolisis tertinggi dari perkecambahan 3 hari = 0,138 U/gram biji dan aktivitas esterifikasi pada perkecambahan 4 hari = 0,252 U/ gram biji. Aktivitas esterifikasi lebih tinggi dibandingkan hidrolisis selama perkecambahan. Berat biji, kadar lemak mengalami penurunan selama perkecambahan, sedangkan kadar air mengalami peningkatan. Asam lemak bebas dan protein terlarut berfluktuasi selama perkecambahan.

Kata kunci: Hidrolisis, esterifikasi, lipase, kakao, kecambah

ABSTRACT

The aim of the research was to find the highest activity of cocoa bean lipase during germination. The lipase activity was determined every day for 10 days germination period. The result indicated that the highest hydrolysis activity of the extracted lipase was found at the 3th day of germination = 0,138 U/gram bean and that of esterification was at 4th day = 0,252 U/gram bean. During germination, bean weight and fat content decreased while water content increased. Free fatty acid and soluble protein were in fluctuation during germination.

Keywords: Hydrolysis, esterification, lipase, cocoa, germination

PENDAHULUAN

Biji merupakan tempat cadangan makanan bagi calon tanaman. Cadangan makanan tersebut akan dimetabolisme selama proses perkecambahan menjadi energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan (Sutopo, 2002). Lemak merupakan salah satu cadangan makanan dan akan dihidrolisis oleh lipase pada fase perkecambahan biji. Lipase mengatur kecepatan pemecahan lemak (hidrolisis) dan sintesa lemak (esterifikasi) pada tahap perkecambahan dan pertumbuhan embrio. Secara umum biji-bijian yang mengandung lemak tinggi merupakan sumber lipase (Lotti dan Alberghina, 2007). Menurut Huang dkk. (1988) lipase pada biji-bijian mempunyai afinitas yang tinggi terhadap asam lemak yang dominan pada biji tersebut. Sifat seperti ini yang tidak dimiliki oleh lipase dari mikroba.

Sedangkan Enujiugha dkk. (2004) menyatakan bahwa lipase dari biji berlemak mempunyai kemampuan yang efektif untuk menghidrolisis trigliserida pada posisi sn-1,3. Lipase yang mempunyai sifat spesifik banyak dibutuhkan untuk industri dan pengembangan iptek. Hal tersebut mendorong eksplorasi lipase dari biji-bijian.

Fase perkecambahan tiap biji berbeda yang disebabkan oleh perbedaan persyaratan tumbuh dan komponen dalam biji seperti kandungan flavonoid, kulit biji dan lain-lain (Debeaujon dkk., 2007). Perbedaan tersebut menyebabkan puncak aktivitas lipase setiap jenis biji berbeda selama perkecambahan biji. Lipase biji rami (*Linum usitatissimum*) mempunyai aktivitas puncak pada perkecambahan 2-3 hari (Wanasundara dkk., 1999), linseed 3 hari (Sammour, 2005), biji lobak (Jachmanian dkk., 1995) dan biji jarak (Hills dan

Beevers, 1987) selama 4 hari, dan *scutella* jagung (Lin dkk., 1983) pada perkecambahan 6 hari. Aktivitas lipase juga ditemukan pada biji yang belum berkecambah (dorman) seperti biji african (Enujiugha dkk., 2004), oat (Billyk dkk., 1992), bay laurel (Isibilir dkk., 2008), *Nigella sativa* L (Tuter dkk., 2003) dan *Pachira aquatica* (Polizelli dkk., 2008). Sedangkan pada biji bunga matahari (Sagiroglu dan Arabaci, 2005; Bahri, 2000) dan biji *Jatropha curcas* L. (Abigor dkk., 2002) aktivitas lipase dapat diperoleh pada biji baik yang belum dikecambahkan maupun yang dikecambahkan. Maka untuk mendapatkan aktivitas tertinggi lipase biji perlu diketahui waktu perkecambahan optimalnya.

Biji kakao mengandung lemak sekitar 30-32% pada biji basah atau lebih dari 50% pada biji kering. Lemak kakao mempunyai komposisi utama trigliserida yang terdistribusi berupa POS_2 , S_1OS_1 dan POP (P = asam palmitat, O = asam oleat dan S_1 = asam stearat) sebesar 70% - 88% (Smith, 2001). Berdasarkan kandungan lemaknya yang tinggi dapat diduga biji kakao sebagai sumber lipase. Menurut Lehrman dan Patterson (1983) pada fase perkecambahan biji kakao terjadi penurunan komponen biji seperti lemak, karbohidrat dan protein selama perkecambahan oleh aktivitas enzim. Samsumoharto (2008) telah mengisolasi lipase biji kakao yang belum dikecambahkan, namun aktivitas tertinggi selama perkecambahan belum diungkap. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aktivitas tertinggi lipase biji kakao selama perkecambahan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Biji kakao klon KKM4 diambil dari perkebunan PT. Pagilaran di Samigaluh Kabupaten Kulon Progo Daerah Istimewa Yogyakarta. Isooktan, buffer fosfat pH 7,5, sukrosa, $CaCl_2$, minyak zaitun, piridin, Cu-asetat, asam oleat, *polyphenylpyrrolidone* (PVPP) dari Sigma Co., USA. dan petroleum eter, isooktan dari Merk, Jerman.

Perkecambahan Biji Kakao

Perkecambahan biji kakao mengacu pada metode Abigor dkk. (2002). Biji kakao dari klon KKM4 diambil dari buah yang sudah matang penuh yang ditandai dengan warna kulit menguning. Biji dicuci dengan air bersih dan dihilangkan pulp (lendir) dengan cara menggosok. Biji yang telah bersih dari pulp direndam dalam larutan fungisida 0,1% selama 5 menit untuk mencegah pertumbuhan jamur. Biji ditiriskan dan dikecambahkan dalam loyang plastik dengan cara dihamperkan diatas kertas saring yang dibasahi. Loyang ditutup dengan kain saring putih dan diinkubasi pada suhu

ruang. Perkecambahan dilakukan selama 10 hari dan setiap hari biji dianalisis aktivitas lipase, berat biji, protein terlarut dengan metode Lowry dkk. (1951), kadar asam lemak bebas, kadar lemak dengan metode Soxhlet, dan kadar air dengan metode pemanasan (AOAC, 1980).

Ekstraksi Lipase

Ekstraksi lipase dilakukan menggunakan metode Abigor dkk. (2002) yang telah dimodifikasi (Permana dkk., 2012). Lima gram biji kakao yang telah dihilangkan kulitnya ditambah PVPP 0,4 g kemudian digerus. Bubuk kakao ditambah 15 ml buffer fosfat pH 7,5 yang mengandung 0,6 M sukrosa dan 1 mM $CaCl_2$ kemudian dihomogenisasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm menggunakan homogenizer Nissei AM-10. Homogenat kemudian disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 g pada suhu 4°C menggunakan sentrifuge Eppendorf 5804 R. Supernatan diambil sebagai lipase kasar untuk pengujian aktivitas lipase.

Pengujian Aktivitas Hidrolisis

Pengujian aktivitas hidrolisis mengacu pada metode Marseno dkk. (1998). Lima mililiter minyak zaitun 60% dalam isooktan ditambahkan 0,25 ml larutan lipase kemudian divorteks dan diinkubasi dalam *shaker waterbath* selama 1 jam pada suhu 35°C. Lapisan minyak diambil 4 ml dan ditambahkan 1 ml larutan 5% Cu-asetat piridin pH 6 kemudian digojog selama 90 detik. Campuran disentrifugasi selama 5 menit pada 2.000 rpm selanjutnya ditera absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 715 nm. Satu unit aktivitas (U) lipase adalah jumlah lipase untuk melepaskan 1 mmol asam lemak (asam oleat) tiap menit.

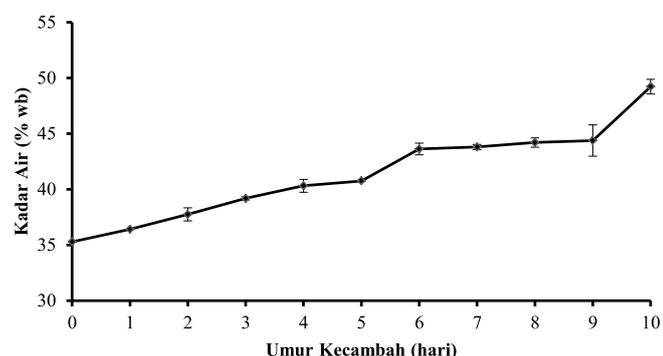
Pengujian Aktivitas Esterifikasi

Esterifikasi menggunakan metode Watanabe dkk. (2003) dan sisa asam lemaknya diuji dengan metode Marseno dkk. (1998). Lipase kasar sebanyak 5% ditambahkan ke dalam 10 μ mol/ml asam oleat, divorteks selama 10 menit. Gliserol 20 μ mol/ml ditambahkan ke dalam campuran secepatnya dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 6 jam. Selesai inkubasi segera dimasukkan ke dalam es untuk beberapa saat. Sampel diambil 300 μ L, ditambah 2,7 mL isooktan dan 0,6 mL Cu asetat piridin pH 6, digojog larutan tersebut selama 90 detik dengan tangan. Setelah itu larutan tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit, kemudian ditera absorbansinya pada panjang gelombang 715 nm. Satu unit aktivitas (U) esterifikasi adalah jumlah lipase untuk esterifikasi 1 μ mol asam lemak (asam oleat) dengan gliserol tiap menit

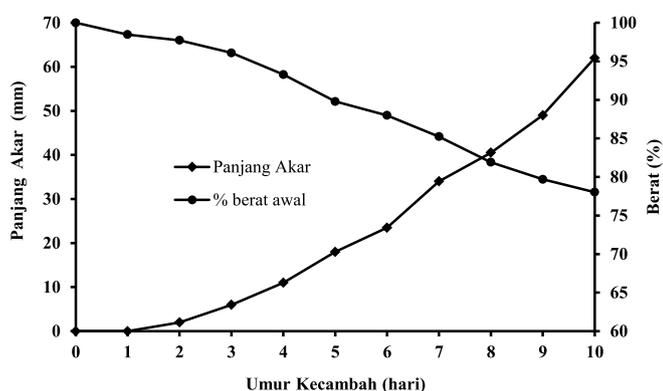
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Air Biji Kakao selama Perkecambahan

Kadar air biji kakao selama perkecambahan mengalami peningkatan dari 35,3% menjadi 49,9% pada hari ke-10 (Gambar 1). Kenaikan kadar air disebabkan oleh terjadinya penyerapan air dari media tumbuh dan hasil metabolisme. Kadar air selama perkecambahan terjadi peningkatan sampai mencapai 40-60%. Air sangat dibutuhkan untuk pembentukan asam giberilat dalam perkecambahan biji. Asam giberilat merupakan hormon yang berperan menstimulasi aktifnya enzim-enzim metabolisme seperti lipase, protease dan amilase (Debeaujon dkk., 2007). Aktifnya enzim-enzim metabolisme akan memecah cadangan makanan menjadi energi dan komponen-komponen yang diperlukan untuk perkecambahan.



Gambar 1. Perubahan kadar air selama perkecambahan biji kakao



Gambar 2. Perubahan berat biji dan panjang akar selama perkecambahan biji kakao

Berat biji selama perkecambahan mengalami penurunan sampai 15% selama 10 hari perkecambahan dan terutama pada perkecambahan 4 dan 5 hari (Gambar 2). Walaupun kadar air meningkat selama perkecambahan namun disisi lain terjadi perombakan makromolekul seperti lemak, protein dan karbohidrat. Hasil perombakan makromolekul menghasilkan

energi, CO₂ dan H₂O sehingga ada sebagian unsur yang hilang. Sedangkan selama perkecambahan belum mampu melakukan fotosintesis untuk membentuk makromolekul sehingga menyebabkan berat biji turun (Debeaujon dkk., 2007). Hasil yang sama juga terjadi pada biji rami (*Linum usitatissimum*), terjadi penurunan berat biji bahkan mencapai 35% dari berat biji awal (Wanasundara dkk., 1999).

Akar biji terus mengalami pertumbuhan selama perkecambahan. Sebagai gambaran terjadinya perubahan panjang akar kecambah biji kakao dapat dilihat pada Gambar 3. Debeaujon dkk. (2007) menyatakan bahwa makromolekul yang dirombak selama perkecambahan selain dijadikan energi juga diubah menjadi komponen-komponen yang dibutuhkan dalam pembentukan sel-sel baru untuk perkembangan organ tanaman.

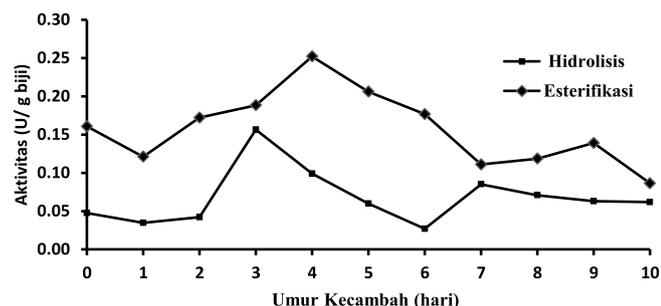


Gambar 3. Foto panjang akar kecambah biji kakao umur 3 hari dan 10 hari

Aktivitas Lipase Biji Kakao selama Perkecambahan

Biji kakao yang belum dikecambahkan (perkecambahan 0 hari) sudah ada aktivitas lipase, tetapi aktivitas hidrolisis tertinggi terjadi pada perkecambahan 3 hari dan aktivitas esterifikasinya pada umur kecambah 4 hari. Aktifitasnya cenderung menurun setelah perkecambahan hari ke-4 (Gambar

4). Aktivitas lipase selama perkecambahan dipengaruhi oleh kebutuhan energi dan stimulator dalam biji (Penfield dkk., 2007). Aktivitas lipase pada perkecambahan biji distimulasi oleh asam giberilat untuk memecah trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol untuk selanjutnya dimetabolisme menjadi energi (Debeaujon dkk., 2007). Terjadinya penurunan aktivitas setelah hari ke-4 karena terjadinya hidrolisis protein oleh protease sehingga sebagian lipase kemungkinan ikut terhidrolisis. Menurut Lehrian dan Patterson (1983) pada fase perkecambahan biji kakao terjadi peningkatan aktivitas enzim seperti protease yang menghidrolisis protein menjadi asam amino. Hal yang menarik untuk diperhatikan adalah aktivitas esterifikasi pada lipase biji kakao selama perkecambahan selalu lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas hidrolisisnya, hal ini berbeda dengan lipase dari mikrobia yang umumnya aktivitas hidrolisisnya lebih tinggi dari esterifikasi.



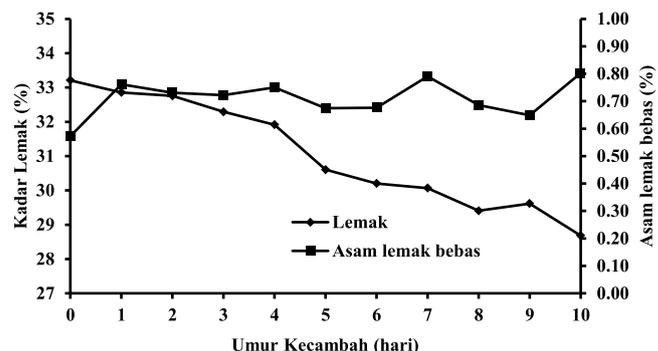
Gambar 4. Aktivitas lipase biji kakao selama perkecambahan

Aktivitas lipase biji kakao ada baik pada biji yang belum dkecambahkan maupun yang dkecambahkan, seperti halnya pada biji bunga matahari (Sagiroglu dan Arabaci, 2005; Bahri, 2000) dan biji *Jatropha curcas* L. (Abigor dkk., 2002) aktivitas lipase sudah ada pada biji yang belum dkecambahkan. Samsumoharto (2008) juga telah mengisolasi lipase biji kakao yang belum dkecambahkan, namun dari hasil penelitian ini ternyata aktivitas lipase yang tertinggi didapat pada biji yang dkecambahkan 3 hari. Berdasarkan aktivitas hidrolisis yang diperoleh ada kesamaan waktu perkecambahan optimum biji kakao dengan perkecambahan biji rami (*Linum usitatissimum*) aktivitas puncaknya pada perkecambahan 2-3 hari (Wanasundara dkk., 1999), dan linseed 3 hari (Sammour, 2005). Sedangkan waktu perkecambahan optimum untuk aktivitas esterifikasinya tidak disebutkan dari masing-masing biji.

Kadar Lemak dan Asam Lemak Bebas

Kadar lemak biji kakao mengalami penurunan selama perkecambahan, sedangkan kadar asam lemak mengalami fluktuasi (Gambar 5). Kadar lemak biji yang menurun

disebabkan oleh aktivitas lipase yang menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Hidrolisis lemak akan terus berlangsung untuk memenuhi kebutuhan energi dan komponen-komponen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan selama perkecambahan (Debeaujon dkk., 2007; Lehrian dan Patterson, 1983). Hasil yang sama diperoleh pada perkecambahan *scutella* jagung (Lin dkk., 1983) dan biji lobak (Jachmanian dkk., 1995), kadar lemak terus mengalami penurunan selama perkecambahan.



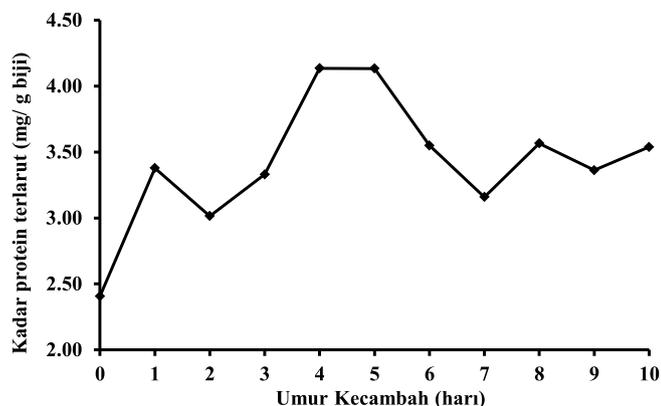
Gambar 5. Kadar lemak dan asam lemak bebas selama perkecambahan biji kakao

Kadar asam lemak bebas yang berfluktuasi dalam biji disebabkan adanya regulasi atau pengaturan dalam metabolisme lemak. Asam lemak hasil hidrolisis diaktifkan menjadi asil-KoA akan masuk ke dalam peroxisoma dengan bantuan comatose dan selanjutnya masuk ke siklus b oksidasi. Apabila kebutuhan energi (ATP atau NADH) telah mencukupi maka NADH akan menghambat *comatose* sehingga asil-KoA tidak bisa masuk ke peroxisoma. Akibat penghambatan tersebut menyebabkan terjadinya akumulasi asil-KoA sehingga terjadi penghambatan aktivitas lipase. Apabila NADH berkurang maka *comatose* tidak terhambat sehingga asil-KoA akan mampu masuk ke peroxisoma dan penghambatan lipase terhenti (Quettier dan Eastmond, 2009; Penfield dkk., 2007). Kadar asam lemak bebas yang berfluktuasi juga terjadi pada perkecambahan biji lobak (Jachmanian dkk., 1995).

Kadar Protein Terlarut

Protein terlarut biji kakao selama perkecambahan kadarnya berfluktuasi tetapi selalu lebih tinggi dibandingkan sebelum berkecambah (Gambar 6). Fluktuasi protein terjadi karena adanya regulasi dalam metabolisme protein selama perkecambahan. Protease aktif pada proses perkecambahan menghidrolisis protein menjadi rantai yang lebih pendek dan asam amino untuk dimetabolisme menjadi energi atau komponen-komponen untuk pertumbuhan. Asam amino aspartat dan glutamat dalam bentuk amidanya akan ditranslokasikan ke embrio. Asam amino triptofan akan diubah menjadi indole

acetic acid (IAA) yang menstimulir pertumbuhan. Selama perkecambahan biji selain adanya pemecahan protein, juga terjadi sintesa asam amino atau protein baru yang diperlukan untuk pertumbuhan. Pada perkecambahan *Psophocarpus tetragonolobus* juga terjadi fluktuasi protein terlarut tetapi perubahannya tidak signifikan (King dan Puwastein, 1987). Namun pada perkecambahan biji kakao terjadi fluktuasi yang signifikan.



Gambar 6. Kadar protein terlarut selama perkecambahan biji kakao

KESIMPULAN

Aktivitas hidrolisis tertinggi lipase biji kakao terjadi pada umur kecambah 3 hari dan aktivitas esterifikasi tertinggi pada perkecambahan 4 hari. Aktivitas esterifikasi selalu lebih tinggi dibandingkan hidrolisisnya selama perkecambahan. Selama perkecambahan terjadi kenaikan kadar air, sedangkan kadar lemak dan berat biji mengalami penurunan. Kadar asam lemak bebas dan protein terlarut terjadi fluktuasi selama perkecambahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abigor, R.D., Uadia, P.O., Foglia, T.A., Hass, M.J., Scott, K. dan Savary, B.J., (2002). Partial and properties of lipase from germinating seeds of *Jatropha curcas* L. *Journal of the American Oil Chemists Society* **79**: 1123-1126.
- Bahri, S. (2000). Lipase activity in germinating sunflower seedlings. *Biochemical Society Transactions* **8**: 771-773.
- Debeaujon, I., Lepeniec, L., Pourcel, L. dan Routaboul, J-M. (2007). Seed coat development and dormancy. *Dalam: Bradford, K.J. dan Nonogasaki, H. (ed). Seed Development, Dormancy and Germination*, hal 25-49. Blackwell Publishing. Oxford.
- Enujiugha, V.N., Thani F.A., Sanni T.M. dan Abigor, R.D. (2004). Lipase activity in dormant seeds of the african oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth). *Food Chemistry* **88**: 405-410.
- Huang, A.H.C., Lin, Y. dan Wang, S. (1988). Characteristic and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists Society* **5**: 897-899.
- Isbilir, S.S., Ozcan, H.M. dan Yagar, H. (2008). Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L) seeds. *Journal of the American Oil Chemists Society* **85**: 227-233.
- Jachmanian, I., Nemska, M.P., Grompone, M-A. dan Mukherjee, K.D. (1995). Germinating rapeseed as biocatalyst: hydrolysis of exogenous and endogenous triacylglycerols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **42**: 2992-2996.
- King, R.D. dan Puwastien, P. (1987). Effects of germination on the proximate composition and nutritional quality of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds. *Journal of Food Science* **52**(1): 106-108.
- Lehrian, D.W. dan Patterson, G.R. (1983). Cocoa fermentation. *Dalam: Reed, G. (ed). Biotechnology Vol 5*. Verlag Chemie. Weinheim, Florida.
- Lin, Y-H, Wimer, L.T. dan Huang. A.H.C., (1983). Lipase in the lipid bodies of corn *Scutella* during seedling growth. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry* **73**: 460-463.
- Lotti, M. dan Alberghina, L. (2007). Lipases: molekular structure and function. *Dalam: Polaina, J. dan Mac-Cabe, (ed.). Industrial Enzym: Structure, Function and Application*. Springer, Netherland.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Favra, A.L. dan Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 : 265-275.
- Marsena, D.W., Indrati, R. dan Ohta, Y. (1998). A simplified method for determination of free fatty acids for soluble and immobilized lipase assay. *Indonesian Food and Nutrition Progress* **5**: 79-83.
- Penfield, S., Pinfield-Wells H. dan Graham, I.A. (2007). Lipid metabolism in seed dormancy. *Dalam: Bradford, K.J. dan Nonogasaki, H.(ed.). Seed Development, Dormancy and Germination*, hal 133-149. Blackwell Publishing. Oxford.

- Permana, D.G.M., Indrati, R. dan Hastuti, P. (2012). Optimasi isolasi lipase indigenous biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Agritech* **32**(1): 27-32.
- Polizelli, P.P., Tiera, M.J. dan Bonilla-Rodriguez, G.O. (2008). Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists Society* **85**: 749-753.
- Quettier, A-L. dan Eastmond P.J. (2009). Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 485-490.
- Sammour, R.H. (2005). Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipid body linseedlings. *Journal Botany* **29**: 177-184.
- Samsumaharto, R.A. (2008). Isolation and purification of lipase from cocoa bean (*Theobroma cacao* L.) of clone PBC 159. *Indonesian Journal of Chemistry* **8**(1): 104-110.
- Tuter, M., Aksoy, H.A., Ustun, G., Riva, S., Secundo, F. dan Jpekler, S. (2003). Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions enrichment of g-linolenic acid from borage oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* **80**(3): 237-241.
- Watanabe, T., Shimizu, M., Sugiura, M., Sato, M., Kohori, J., Yamada, N. dan Nakhanishi, K. (2003). Optimazion of reaction conditions for the productin of DAG Using immobilized 1,3-Regiospecific lipase lipozyme RM-IM. *Journal of the American Oil Chemists Society* **80**: 1201-1207.