

Kajian Metode *Pretreatment* Ozonasi Dan Pemanasan Uap Terhadap Polifenol Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma Cacao L.*)

Duhita Diantiparamudita Utama^{1✉}, Mohammad Djali², Yana Cahyana³

^{1,2&3} Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima 20 Februari 2021
Disetujui 25 Maret 2021
Dipublikasi 21 April 2021

Kata Kunci:
antioksidan, autoklaf,
ekstraksi, kulit biji kakao,
ozon, polifenol,
pretreatment

Abstrak

Kulit biji kakao merupakan kulit tipis, lunak dan agak berlendir yang menyelubungi keping biji kakao yang dihasilkan dari sisa produksi pengolahan biji kakao. Kulit biji kakao diketahui masih mengandung senyawa aktif seperti polifenol dan antioksidan yang berpotensi dimanfaatkan sebagai produk fungsional. Namun, komponen bioaktif dalam bahan berlignoselulosa sulit dipisahkan sehingga ekstrak bioaktif yang didapat kurang maksimal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode *pretreatment* ozonasi dengan pemanasan uap bertekanan dalam meningkatkan perolehan senyawa polifenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji kakao. Perlakuan dalam penelitian ini yaitu tanpa *pretreatment*, *pretreatment* ozonasi (laju alir oksigen= 2L/menit, t= 1 menit, konsentrasi= 18 ppm) dan *pretreatment* pemanasan uap bertekanan (autoklaf, T=129°C, 2 atm, t= 5 menit). Parameter yang diukur meliputi total fenol dan aktivitas antioksidan. Berdasarkan hasil penelitian, metode *pretreatment* pemanasan uap bertekanan menunjukkan hasil terbaik dengan perolehan senyawa polifenol (GAE) 10,13 mg/g dan aktivitas antioksidan (IC₅₀)277,14 ppm. Sedangkan pada metode *pretreatment* ozonasi menghasilkan perolehan senyawa polifenol (GAE) 7,62 mg/g dan aktivitas antioksidan (IC₅₀) 559,24 ppm. Kedua metode *pretreatment* tersebut secara keseluruhan meningkatkan perolehan baik polifenol maupun aktivitas antioksidan dibandingkan dengan tanpa perlakuan (GAE 3,97 mg/g, IC₅₀ 1361,18 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan *pretreatment* delignifikasi penting dilakukan untuk meningkatkan perolehan polifenol dan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao.

Article Info

Keywords:
antioxidant, autoclave,
extraction, cocoa bean
shell, ozone, polyphenols,
pretreatment

Abstract

Cocoa bean shell is a thin, soft and slightly slimy skin that covers the cocoa pods who produced from the residual production of cocoa bean processing. The cocoa bean shell is known to still contain active compounds such as polyphenols and antioxidants that have the potential to be used as functional products. However, the bioactive components in the lignocellulosic material are difficult to separate so that the bioactive extracts obtained are not optimal. This study aims to determine the ozonation pretreatment method with pressurized steam heating to increase the yield of polyphenol compounds and antioxidant activity in the extract of the cocoa bean shell. The treatments in this study were without pretreatment, ozonation pretreatment (ozonizer, oxygen flow rate = 2 L / minute, t = 1 minute, concentration = 18 ppm) and pressurized steam heating pretreatment (autoclave, T = 129°C, 2 atm, t = 5 minutes). The parameters measured include total phenol and antioxidant activity. Based on the research results, the pressurized steam heating pretreatment method showed the best results with the acquisition of polyphenol compounds (GAE) 10.13 mg/g and antioxidant activity (IC₅₀) 277.14 ppm. Meanwhile, the ozonation pretreatment

method resulted in the acquisition of polyphenol compounds (GAE) 7.62 mg / g and antioxidant activity (IC₅₀) 559.24 ppm. The two pretreatment methods overall increased the acquisition of both polyphenols and antioxidant activity compared to those without treatment (GAE 3.97 mg / g, IC₅₀ 1361.18 ppm). This suggests that delignification pretreatment is important to increase the yield of polyphenols and the antioxidant activity of cocoa bean shell extract.

© 2021 Poltekkes Kemenkes Pontianak

✉ Alamat korespondensi:

Fakultas Teknologi Industri Pertanian

Email: duhita17001@mail.unpad.ac.id

Pendahuluan

Kakao merupakan salah satu komoditas hasil perkebunan yang mempunyai peran cukup penting dalam kegiatan perekonomian nasional khususnya sebagai penyedia lapangan pekerjaan, sumber devisa negara dan pendapatan yang kontinyu bagi petani karena kakao dapat dipanen sepanjang tahun (Siagian, 2016). Menurut Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian 2019 saat ini Indonesia merupakan negara produsen Kakao terbesar ketiga di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana. Angka proyeksi Ditjen Perkebunan menunjukkan bahwa luas areal tanaman menghasilkan pada tahun 2019 seluas 786.324 hektar dengan produktivitas sebesar 0,76 ton/hektar dan jumlah produksi biji kakao mencapai 596.477 ton (Rohmah, 2019).

Selain jumlah produksi yang tinggi tingkat konsumsi kakao di Indonesia dalam bentuk coklat instan dan coklat bubuk meningkat tajam sepanjang tahun 2008-2017 yakni 58,93% dan 17,32% untuk rata-rata pertumbuhan setiap tahunnya (Rohmah, 2019). Jumlah produksi kakao yang semakin tinggi berpotensi menghasilkan limbah kulit biji kakao yang meningkat pula. Kulit biji kakao merupakan kulit tipis, lunak dan agak berlendir yang menyelubungi keping biji kakao. Kulit biji kakao dihasilkan dari sisa produksi pengolahan biji kakao. Persentase kulit biji kakao yaitu sekitar 10-12 % dari keseluruhan berat kering biji kakao (Kim *et al.*, 2004).

Keberadaan limbah kulit biji kakao sering kali dibiarkan begitu saja menjadi sampah industri pengolahan coklat sehingga menyebabkan pencemaran lingkungan (Sumasa *et al.*, 2014). Padahal kulit biji kakao diketahui masih mengandung senyawa aktif yang tidak berbeda jauh dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah kakao dan biji kakao itu sendiri (Yumas, 2017). Menurut Lecumberri *et al.* (2007) kulit biji kakao merupakan sumber antioksidan karena mengandung senyawa polifenol dengan total fenolik sebesar 5,78 %. Senyawa fenolik tersimpan di dalam keping biji kakao, namun selama fermentasi mengalami difusi sehingga senyawa keluar dari keping biji. Akibatnya, kulit biji kakao menjadi bahan yang

kaya akan senyawa bioaktif (Nazaruddin *et al.*, 2006).

Senyawa aktif yang terkandung dalam kulit biji kakao dapat dipisahkan dengan proses ekstraksi (Yuswi, 2017). Menurut Kurniawati (2015), perolehan hasil ekstraksi senyawa bioaktif dapat dipengaruhi oleh terdegradasinya selulosa, hemiselulosa dan lignin sebagai pengikat senyawa metabolit sekunder. Pendegradasian komponen lignoselulosa (lignin, selulosa dan hemiselulosa) dapat menggunakan metode *pretreatment* dalam hal ini yaitu dengan cara delignifikasi. Delignifikasi merupakan suatu proses mengubah struktur kimia biomasa berlignoselulosa dengan tujuan mendegradasi lignin secara selektif sehingga menguraikan ikatan kimianya baik secara ikatan kovalen, ikatan hidrogen maupun ikatan *van der waalls*, dengan komponen kimia lain pada bahan berlignoselulosa (selulosa dan hemiselulosa), dan diusahakan komponen tersebut tetap utuh (Agustini & Efiyanti, 2015). Tahap *pretreatment* merupakan tahapan kunci yang akan menentukan perolehan ekstrak bioaktif yang dihasilkan nantinya.

Metode *pretreatment delignifikasi* memiliki *banyak variasi*, berdasarkan prinsip teknologinya dapat digolongkan menjadi perlakuan fisika, perlakuan kimia, perlakuan fisika-kimia, dan perlakuan biologis (Hidayat, 2013). Beberapa metode *pretreatment delignifikasi* secara biologi yang telah dicobakan sebelumnya untuk degradasi lignoselulosa pada kulit biji kakao memiliki kelemahan seperti proses *pretreatment*-nya memerlukan waktu yang lama dan memerlukan perhatian khusus sehingga kurang disukai (Defria, 2018).

Salah satu metode perlakuan fisik yang bisa digunakan dalam mendegradasi komponen lignoselulosa yaitu *pretreatment* pemanasan uap bertekanan. Tenaga uap memiliki kemampuan untuk mendegradasi struktur kompleks lignoselulosa (Hidayat, 2013). Menurut Toor & Savage (2006) suhu tinggi mampu melepaskan dinding sel fenolik atau ikatan fenolik akibat pemecahan sel, ini menyebabkan polifenol lebih banyak terekstraksi.

Selain itu terdapat variasi perlakuan *pretreatment* delignifikasi lain yaitu secara kimia dengan menggunakan gas ozon. Ozon (O₃) merupakan molekul yang mempunyai tingkat delignifikasi yang tinggi (Tomas-Pejo *et al.*, 2011). Menurut Sun dan Cheng (2002), ozon dapat digunakan untuk mendegradasi lignin dan hemiselulosa pada banyak bahan berlignoselulosa seperti jerami gandum, ampas tebu, kacang, pinus, jerami kapas, dan serbuk gergaji. Metode ozonasi memiliki beberapa keuntungan yaitu secara efektif menghilangkan lignin, tidak menghasilkan residu beracun, dan reaksi dilakukan pada temperatur dan tekanan ruang.

Tahap *pretreatment delignifikasi* merupakan tahapan kunci yang akan menentukan perolehan ekstrak bioaktif yang dihasilkan nantinya. Penggunaan metode *pretreatment* yang tidak optimal akan menyebabkan degradasi hemiselulosa dan lignin secara parsial (Tomas-Pejo *et al.*, 2011).

Berdasarkan uraian diatas penulis tertarik untuk meneliti perbandingan *pretreatment* ozonasi dan pemanasan uap bertekanan, sehingga diketahui metode *pretreatment* delignifikasi yang menghasilkan perolehan senyawa polifenol dan aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak kulit biji kakao.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui metode *pretreatment* ozonasi dengan pemanasan uap bertekanan dalam meningkatkan perolehan senyawa polifenol dan aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji kakao.

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran dan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit biji kakao varietas criolo yang berasal Dusun Gambiran, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta, etanol 70%, gas oksigen, methanol, larutan DPPH, asam galat, asam tanat, Folin-ciocalteu 50%, Na₂CO₃ 7%, Na₂CO₃ jenuh, aquades, dan kertas saring.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ozonizer terkomputerisasi (Ozonizer TIP), ozon generator, tabung oksigen yang dilengkapi flowmeter, laptop untuk mengatur flowrate dan waktu ozonasi, autoklaf, pompa vakum, rotary evaporator, spektrofotometer UV-VIS, wadah tabung stainless 1L tertutup, botol schott 1L, toples kaca bertutup 650 ml, neraca digital, mikropipet, tabung reaksi, labu ukur, spatula, tang krus, erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, corong, botol gelas 100 ml, dan batang pengaduk.

Penelitian dilaksanakan melalui beberapa tahap yaitu:

1) Pretreatment Ozonasi

Dalam metode *pretreatment* ozonasi alat yang digunakan adalah Ozonizer TIP. Sampel berupa serbuk kulit biji kakao berukuran 100 mesh sebanyak 100 g. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam wadah tabung *stainless steel* tertutup berukuran 1L yang memiliki celah untuk selang gas ozon di penutup wadahnya. Wadah yang berisi sampel dialiri gas ozon dengan laju alir oksigen 2 L/menit selama 1 menit. Setelah selesai proses pengozonan, sampel didiamkan selama 10 menit dan setiap 2 menit wadah berisi sampel diputar secara vertikal atau horizontal untuk menghomogenkan sampel dengan gas ozon.

2) Pretreatment Pemanasan Uap Bertekanan

Pada metode pemanasan alat yang digunakan adalah autoklaf. Bahan baku berupa serbuk kulit biji kakao berukuran 100 mesh sebanyak 100 g kedalam botol *schott* ukuran 1L. Kemudian botol *schott* yang berisi sampel ditutup rapat dan dimasukkan kedalam autoklaf dengan suhu 129°C dan tekanan 2 atm selama 5 menit.

3) Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan untuk menarik komponen bioaktif yang terdapat dalam kulit biji kakao. Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan jenis pelarut etanol 70%. Bahan yang digunakan yaitu serbuk kulit biji kakao berbagai perlakuan (tanpa *pretreatment*, *pretreatment* ozonasi dan *pretreatment* pemanasan uap bertekanan). Sampel masing-masing perlakuan dimasukkan kedalam toples kaca tertutup. Selanjutnya sebanyak 500 ml pelarut etanol 70% dicampurkan kedalam toples yang berisi sampel kemudian diaduk hingga seluruh serbuk larut. Selanjutnya seluruh permukaan toples ditutup dengan menggunakan aluminium foil untuk menghindari kontak dengan cahaya langsung, dan didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang. Filtrat dipisahkan dari residunya menggunakan pompa vakum yang sudah dilapisi kertas saring. Selanjutnya filtrat dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C selama 1 jam hingga pelarut teruapkan seluruhnya.

4) Analisis kandungan polifenol (Zuraida *et al.*, 2017)

Sebanyak 500 mg ekstrak kulit biji kakao dilarutkan menggunakan methanol kedalam labu ukur 10 ml sehingga didapat larutan stok sampel. Larutan stok sampel diencerkan 10x kedalam labu ukur 5 ml ditandabatkan dengan methanol dan dihomogenkan. Kemudian sebanyak 2 ml larutan sampel hasil pengenceran dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml lalu ditambahkan 5 ml aquadest dan 0,5 ml pereaksi Folin-Ciocalteu 50% lalu dicampurkan. Campuran tersebut diinkubasi dalam suhu ruang selama 5 menit. Setelah 5 menit lalu ditambahkan 1 ml Na₂CO₃ 7% dan

ditambahkan aquades hingga tanda batas kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang. Selanjutnya larutan uji diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 725 nm menggunakan Asam Galat sebagai standar dengan berbagai konsentrasi (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70 ppm)

5) Analisis Antioksidan (Meizarna, 2019)

Aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao diukur menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Penetapan IC_{50} (*Inhibition concentration* 50) dari larutan uji menggunakan DPPH dengan spektrofotometer UV-Vis (Molyneux, 2004).

a) Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 10 mg serbuk DPPH dilarutkan dengan methanol dalam labu ukur 10 ml dan dicukupkan hingga tanda batas sehingga didapat larutan stok DPPH dengan konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya 2,5 ml larutan stok DPPH dimasukkan kedalam labu ukur 50 ml dan dicukupkan hingga tanda batas dengan metanol sehingga didapat larutan DPPH dengan konsentrasi 50 ppm.

b) Pembuatan larutan sampel

Sebanyak 500 mg ekstrak pekat kulit biji kakao dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan methanol hingga tanda batas sehingga didapat larutan stok sampel dengan konsentrasi 50000 ppm. Selanjutnya 0,1 ml larutan induk dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan methanol hingga tanda batas sehingga didapat larutan sampel dengan konsentrasi 500 ppm.

c) Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 2 ml methanol dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 50 ppm dan dihomogenkan. Larutan didiamkan selama 30 menit dalam ruangan gelap. Selanjutnya larutan blanko diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

d) Pembuatan larutan uji

Larutan sampel terlebih dahulu dilakukan pengenceran hingga konsentrasi tertentu. Untuk sampel Tanpa *Pretreatment* (500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppm), *Pretreatment* pemanasan uap bertekanan (100, 200, 300, 400, 500 ppm), *Pretreatment* Ozonasi. Setelah larutan sampel siap, dimasukkan 2 ml larutan sampel dengan konsentrasi yang berbeda kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 ml larutan DPPH 50 ppm kemudian dihomogenkan dan diinkubasi dalam suhu ruang dan ruangan gelap selama 30 menit.

e) Pengukuran absorbansi dan % inhibisi larutan uji.

Larutan uji yang telah diinkubasi dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Setelah didapat nilai absorbansi maka dapat dihitung % inhibisi, dimana % inhibisi merupakan persentase kapasitas penghambatan radikal bebas. Nilai % inhibisi masing-masing konsentrasi dapat ditentukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\%i = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Keterangan: (%i = %inhibisi)

Selanjutnya dibuat kurva antara % inhibisi dan konsentrasi. Kurva dibuat dengan memplotkan nilai % inhibisi terhadap masing-masing konsentrasi. Nilai konsentrasi sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y kemudian ditentukan persamaan garis linier $y=ax+b$.

f) Pengukuran IC_{50}

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

Hasil dan Pembahasan

Kandungan Polifenol

Kadar polifenol total masing-masing ekstrak dinyatakan dalam GAE (*Gallic Acid Equivalent*). GAE merupakan jumlah kesetaraan miligram asam galat dalam 1 gram sampel (Lee et al., 2003). Adapun hasil analisis nilai rata-rata aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Perlakuan Terhadap Polifenol Ekstrak Kulit Biji Kakao

Jenis perlakuan	GAE (mg/g)
Tanpa <i>Pretreatment</i>	3,97 ± 0,57
<i>Pretreatment</i> Ozonasi	7,62 ± 0,22
<i>Pretreatment</i> Pemanasan Uap Bertekanan	10,13 ± 0,55

Berdasarkan Tabel 1. perlakuan *pretreatment* pemanasan uap bertekanan menunjukkan nilai GAE tertinggi yaitu 10,13 mg/g dibandingkan dengan tanpa *pretreatment* (3,97 mg/g) dan *pretreatment* ozonasi (7,62). Selain itu hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa perlakuan *pretreatment* baik pemanasan uap bertekanan maupun ozonasi menghasilkan perolehan polifenol yang lebih tinggi dibandingkan tanpa *pretreatment*. Ini terjadi karena proses *pretreatment* mampu mendegradasi dinding sel dimana senyawa polifenol terikat kuat secara kovalen pada dinding sel (Gonzalez et al.,

2011).

Menurut Cerda et al. (2013) dinding sel tumbuhan merupakan kompleks yang sangat resisten yang menggabungkan molekul hemiselulosa, selulosa, pektin, lignin, dan protein, dimana senyawa fenolik terperangkap didalamnya, pengkondisian bahan baku dapat mendorong ekstraksi senyawa bioaktif. Senyawa polifenol dapat diperoleh dengan merusak atau mendegradasi komponen lignoselulosa yang mengikatnya seperti lignin, protein, dan karbohidrat (selulosa, hemiselulosa). Hal ini sejalan dengan penelitian Kurniawati (2015), yang menyatakan bahwa terdegradasinya komponen selulosa, hemiselulosa dan lignin sebagai pengikat senyawa metabolit sekunder, berpengaruh terhadap perolehan hasil ekstraksi senyawa bioaktif pada kulit kopi.

Hasil perlakuan *pretreatment* pemanasan uap bertekanan mengalami peningkatan dari nilai GAE ekstrak kulit biji kakao tanpa *pretreatment* 3,97 mg/g menjadi 10,13 mg/g. Hal ini disebabkan karena tingginya suhu pemanasan yang menyebabkan terjadinya degradasi dinding sel pada kulit biji kakao karena rusaknya karbohidrat (termasuk serat) dan protein (komponen tidak terlarut) oleh panas sehingga akan semakin memudahkan keluarnya polifenol dari bahan (Chu & Juneja, 1997). Menurut Wekas (2013) sebagian komponen kulit biji kakao adalah serat sebanyak 13,39% dan protein sebanyak 17,5%.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan polifenol adalah enzim polifenol oksidase (Kusnandar, 2010). Salah satu tujuan pemanasan adalah untuk inaktivasi enzim polifenol oksidase. Menurut Wekas (2013) semakin tinggi suhu pemanasan maka semakin tinggi inaktivasi enzim polifenol oksidase sehingga aktivitas enzim akan semakin rendah dan kerusakan polifenol semakin kecil.

Meningkatnya suhu pemanasan menyebabkan enzim polifenol oksidase akan semakin berkurang dan kandungan polifenol yang terdeteksi akan semakin meningkat. Selain itu, peningkatan total fenolik juga diakibatkan meningkatnya pelepasan komponen fitokimia dari matriks sel seperti asam-asam fenolik. Menurut Dewanto et al. (2002), proses *thermal* dapat merusak membran sel dan dinding sel serta melepaskan komponen fenolik terlarut dari ikatan ester yang bersifat tidak larut.

Sedangkan pada perlakuan *pretreatment* ozonasi menunjukkan kadar polifenol yang lebih rendah dapat disebabkan oleh faktor lamanya ozonasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Brodowska (2015) bahwa waktu perlakuan ozon yang lebih lama menyebabkan degradasi senyawa fenolik. Kontak waktu dengan ozon mempengaruhi kandungan fenolik dan itu

disebabkan oleh pembelahan hubungan glikosidik dengan gula atau oksidasi polifenol menjadi gugus karbonil (Diao et. al, 2014).

Kandungan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil). Aktivitas antioksidan digambarkan dengan nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration* 50%). IC₅₀ memiliki arti konsentrasi sampel yang menyebabkan reduksi terhadap aktivitas radikal bebas sebesar 50% (Prakash et al., 2001). Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidan yang terkandung didalam bahan tersebut (Molyneux, 2004). Adapun hasil analisis nilai rata-rata aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Perlakuan Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao

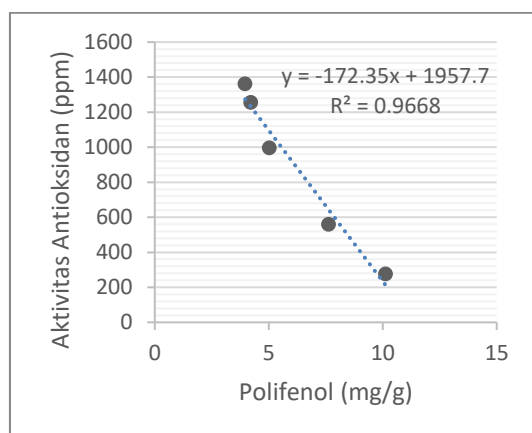
Jenis Perlakuan	IC₅₀ (ppm)
Tanpa <i>Pretreatment</i>	1361,18 ± 1,29
<i>Pretreatment</i> Ozonasi	559,24 ± 1,47
<i>Pretreatment</i> Pemanasan Uap Bertekanan	277,14 ± 0,73

Berdasarkan Tabel 2. perlakuan *pretreatment* pemanasan uap bertekanan menunjukkan nilai IC₅₀ terbaik yaitu 277,14 ppm dibandingkan dengan tanpa *pretreatment* (1361,18 ppm) dan *pretreatment* ozonasi (559,24 ppm). Meningkatnya aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji kakao disebabkan karena terekstraknya senyawa polifenol. Dimana polifenol merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan pada kulit biji kakao sehingga dengan meningkatnya senyawa polifenol dan tanin maka meningkat pula aktivitas antioksidannya.

Menurut Nenkova et al. (2011), tingginya aktivitas antioksidan sangat dipengaruhi oleh jumlah dan jenis senyawa fenol yang dihasilkan. Hal ini telah dibuktikan pada analisis sebelumnya dimana kandungan polifenol pada metode *pretreatment* pemanasan uap bertekanan menunjukkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan *pretreatment* ozonasi dan tanpa *pretreatment*. Menurut Lecumberri et al. (2007) kulit biji kakao merupakan sumber antioksidan karena mengandung senyawa polifenol dengan total fenolik sebesar 5,78%. Senyawa fenolik dapat berperan sebagai antioksidan karena kemampuannya untuk mendonasikan atom hidrogen atau elektron untuk membentuk intermedat radikal bebas yang stabil (Karunamoorthy et al., 2012).

Berdasarkan pembahasan diatas untuk

mengetahui korelasi antara senyawa bioaktif polifenol dengan aktivitas antioksidan kulit biji kakao pada penelitian ini dapat ditunjukkan dengan grafik korelasi. Hubungan senyawa polifenol dengan aktivitas antioksidan pada kulit biji kakao dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Hubungan Polifenol dengan Aktivitas Antioksidan

Pada Gambar 1 dapat kita lihat bahwa terdapat hubungan yang erat antara polifenol dengan aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Hubungan ini digambarkan dengan persamaan garis linier. Model regresi tersebut memiliki koefisien determinasi (R^2) 0,9668 (lebih besar dari 0,75) yang berarti pengaruh polifenol terhadap aktivitas antioksidan sebesar 96%, sedangkan sisanya sebanyak 4% dipengaruhi oleh variabel lain. Koefisien korelasi (r) didapat sebesar 0,983 yang menunjukkan bahwa senyawa polifenol dengan aktivitas antioksidan memiliki hubungan yang sangat erat. Koefisien korelasi (r) yang positif menyatakan bahwa semakin tinggi kandungan senyawa polifenol yang terkandung, maka semakin besar juga nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan pada ekstrak kulit biji kakao.

Sedangkan pada perlakuan *pretreatment* ozonasi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibandingkan dengan *pretreatment* pemanasan uap bertekanan. Hal ini disebabkan karena ozon merupakan oksidator kuat yang dapat merusak komponen bioaktif yang terdapat dalam suatu bahan sehingga jumlah antioksidan pada bahan cenderung menurun. Menurut Xue *et al* (2008), ozon menyebabkan terbentuknya komponen yang sangat reaktif seperti hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$), hidroperoksida radikal ($\text{HO}_2\cdot$), anion superoksida radikal ($\text{O}_2\cdot^-$), dan anion ozon radikal ($\text{O}_3\cdot^-$). Komponen ini dapat bereaksi secara cepat dan bersifat non-selektif sehingga dapat mendegradasi senyawa aromatik yang terdapat dalam bahan. Hal ini sejalan dengan penelitian Meizarna (2019), yang menyatakan bahwa proses

ozonasi dapat menurunkan aktivitas antioksidan ekstrak betasianin.

Penutup

Berdasarkan hasil yang didapat pada penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa metode *pretreatment* pemanasan uap bertekanan menunjukkan hasil terbaik dengan perolehan senyawa polifenol (GAE) 10,13 mg/g dan aktivitas antioksidan (IC_{50}) 277,14 ppm.

Daftar Pustaka

- Agustini, L. dan L. Efiyanti. 2015. Pengaruh Perlakuan Delignifikasi terhadap Hidrolisis Selulosa dan Produksi Etanol dari Limbah Berlignoselulosa. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan* Vol. 33 No. 1, Maret 2015: 69-80.
- Brodowska A.J, K.Śmigielski, A.Nowak, A.Czyłowska, and A.Otlewska. 2015. The Impact of Ozone Treatment in Dynamic Bed Parameters on Changes in Biologically Active Substances of Juniper Berries. *PLoS ONE* 10(12): e0144855. doi:10.1371/journal.pone.0144855
- Cerda, A., M.Eugenia, C.Soto, P.Poirrier, J. R.Perez-correa, J. R.Vergara-salinas, and M.Elvira. 2013. The enhancement of antioxidant compounds extracted from *Thymus vulgaris* using enzymes and the effect of extracting solvent. *Food Chemistry*, 139(1-4), 138-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.044>
- Chu, D.C. and L.R. Juneja.1997. *General Chemical Composition of Green Tea and Its Infusion.Chemistry and Applications of Green Tea*. CRC Press LLC. USA. hal 13-21
- Defria, I.M. 2018. Degradasi Lignoselulosa Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Secara Mikrobiologi dengan Perlakuan Campuran Kapang *Aspergillus niger* dan *Trichoderma viride*. Skripsi. Universitas Padjadjaran. Bandung.Dewanto *et al.* (2002)
- Diao E., X. Shen, Z. Zhang, N. Ji, W. Ma, and H. Dong. 2014. Identification of the oxidative products and ozonolysis pathways of polyphenols in peanut skins. *J Food Nutr Res*. 2014; 2(3): 101-108.
- Gonzalez, M., A.R. Coronel, and M. Mancera. 2011. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technol Biotechnol*. 49: 374-378.
- Hidayat, M.R. 2013. Bahan lignoselulosa dalam proses produksi bioetanol. *Biopropal Industri*, 4, 33-48.
- Karunamoorthy, M., A. Perumal, and B. Thangavel. 2012. Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella*

- marina (Butcher, 1952). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 342–S346.
- Kim, K.H., K.W.Lee, D.Y. Kim, H.H. Park, I.B. Kwon, and H.J. Lee. 2004. Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Process Biochemistry*, 39, 2043–2046. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.006>
- Kurniawati, N. 2015. Ekstraksi Senyawa Polifenol Melalui Degradasi Biomassa Lignoselulosa Kulit Kopi Menggunakan Konsorsium Aktinomiset [Institut Pertanian Bogor]. In Institut Pertanian Bogor. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/76906>
- Kusnandar, Feri. 2010. Kimia pangan. Komponen Pangan. PT. Dian Rakyat. Jakarta.
- Jakarta. Lecumberri, E., R. Mateosa, M.I. Pulido, P. Ruperez, L. Goya, and L. Bravo. 2007. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical Lee, K.I., Kim, Y.J., Lee, H.J., dan Lee, C.H., 2003, Cocoa Has More Phenolic Phytocemical And Higher Antioxidan Capacity Than Teas and Red Wine, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7292–7295.
- Meizarna, V. 2019. Optimasi Konsentrasi dan Lama Ozonasi terhadap Total Betasianin, Aktivitas Antioksidan dan Intensitas Warna Ekstrak Betasianin. Program Pascasarjana Universitas Padjadjaran.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 2004, 26(2):211-219
- Nazaruddin, R., L.K. Seng, O. Hassan, and M. Said. 2006. Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24, 87-94.
- Nenkova S, T Radoykova, and K Stanulov. 2011. Prepatation and antioxidant propetties of biomass low molecular phenolic compounds (Review). *Journal of the University of Chemichal Technology and Metallurgy*. 46 (2) : 109-120
- Prakash, A., F. Rigelhof, and E. Miller. 2001. Antioxidant Activity. Medallion Laboratories Analytical Progress, Minnesota
- Rohmah, Y. 2019. Buku Outlook Komoditas Perkebunan Kakao (A. A. Susanti & Akbar (eds.)). Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal - Kementerian Pertanian.
- Siagian, V.J. .2016. *Outlook Kakao*. (L. Nuryati & A. Yasin, Eds.). Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, Kementerian Pertanian.
- Sumasa, T.T.L., A.Ign. Kristijanto, dan Soetjipto H. 2014. Limbah Kulit Biji Coklat (*Theobroma cacao* Linn.) sebagai Pewarna Alami. Kain Mori dan Sutra (Pengaruh Jenis Fiksatif terhadap Ketuaan dan. Ketahanan Luntur Ditelaah dengan Metode Pengolahan Citra Digital RGB). http://repository.uksw.edu/bitstream/123456789/6106/2/T1_652009015_Ful%20text.pdf. Diakses: 25/10/2018
- Sun, Y., and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *Biosource Technology*, Vol. 83, pp. I - 11
- Tomas-Pejo E, Alvira P, Ballesteros M, Negro MJ. 2011. Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. Di dalam Pandey A (ed.), *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, pp: 149-176.
- Toor, R.K., and G.P. Savage. 2006. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry*, 94(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.054>
- Wekas, B.J. 2013. Pengaruh variasi suhu pemanasan terhadap kandungan polifenol dan karakteristik fisik kulit biji kakao kering ghana. Skripsi. Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran.
- Xue, J., L. Chen, and H. Wang. 2008. Degradation Mechanism of Alizarin Red in Hybrid Gas-Liquid Phase Dielectric Barrier Discharge Plasmas: Experimental and Theoretical Examination. *Chemical Engineering Journal*, 138, 120-127.
- Yumas, M. 2017. Pemanfaatan Limbah Kulit Ari Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Sumber Antibakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, 12(2), 7–20.
- Yuswi, N.C.R. 2017. Ekstraksi Antioksidan Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) dengan Metode Ultrasonic Bath (Studi Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 5(1), 71-79.
- Zuraida, Z., S. Sulistiyani, D. Sajuthi, dan I.H. Suparto. 2017. Fenol, Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Kulit Batang Pulaui (*Alstonia scholaris* R.Br). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 35(3), 211–219.