

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK POLIFENOL KASAR DARI KAKAO HASIL PENYANGRAIAN MENGGUNAKAN ENERGI GELOMBANG MIKRO

[Antioxidant Activity of Crude Polyphenol Extract from Microwave Roasted Cocoa Bean]

Supriyanto ¹⁾, Haryadi ²⁾, Budi Rahardjo ³⁾, dan Djagal Wiseso Marseno ⁴⁾

^{1), 2), 4)} Staf Pengajar Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian FTP-UGM

³⁾ Staf Pengajar Jurusan Teknik Pertanian FTP-UGM

Diterima 15 September 2006 / Disetujui 7 Mei 2007

ABSTRACT

Microwave heating is faster than the conventional way, therefore it is interesting to apply this technology for cocoa roasting. This research aimed to analyze the effect of microwave roasting of ground cocoa nib on the antioxidative properties of the crude polyphenol extract from the product. The results indicated that microwave roasting of ground cocoa nib for 5 min, adjusted at 20% of the full power (900W) gave no significant difference in the inhibition of linoleic acid oxidation and scavenging of DPPH radical activity of the crude polyphenol extract compared to that of the conventional roasting at 140°C for 40 min. But the product showed higher reduction of ferric ion activity and lower chelating ferro ion activity. The crude polyphenol extract inhibited linoleic acid oxidation and scavenged DPPH free radical. The inhibition was lower than that of either BHT or α -tocopherol at concentrations lower than 400 μ g/ml for linoleic acid oxidation and lower than 40 μ g/ml for DPPH free radical scavenging. The crude polyphenol extract reduced ferric ion, though lower than BHT

Key words : Cocoa bean, microwave, roasting, polyphenol, antioxidant activity.

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini produk kakao banyak mendapat perhatian karena mempunyai kemampuan sebagai antioksidan, bahkan dikatakan potensinya lebih besar dari pada produk teh dan beberapa buah-buahan yang telah dikenal sebagai sumber antioksidan alami. (Wilkinson, 1999). Polifenol golongan flavonoid terutama katekin dan epikatekin adalah komponen utama dalam produk kakao yang berperan sebagai antioksidan (Osakabe, et al., 1998). Biji kakao segar mengandung polifenol 12-18% berat kering, dan sekitar 35% dari total polifenol adalah berupa senyawa flavonoid katekin, tergantung pada varietas, budidaya dan daerah asal tanaman (Kim dan Keeney, 1984.; Shahidi dan Nacz, 1995). Polifenol memberi rasa sepat (*astringent sense*), rasa pahit dan flavor khas kakao bersama dengan alkaloid, beberapa asam, amino peptida dan pirasin (Bonvehi dan Coll, 1997, Nakamishi, et al., dalam Lee, et al., 2001)

Dalam tubuh manusia meskipun telah dilengkapi dengan sistem pertahanan tubuh, jika pada suatu kondisi tertentu produksi radikal oksigen spesies (ROS) berlebihan, maka diperlukan asupan senyawa antioksidan.

Mekanisme aktivitas antioksidatif polifenol kakao belum banyak dipublikasikan, meskipun beberapa peneliti menyatakan bahwa polifenol kakao dapat mencegah terbentuknya radikal bebas (Osakabe, et al., 1997, Sanbongi, et al., 1998), dapat melindungi oksidasi LDL darah (Osakabe, et al., 2001), berpengaruh

terhadap antimutagenik, dan dapat menghambat tumor (Yamagishi, et al., 2000).

Penyangraian biji kakao dimaksudkan untuk mempermudah pelepasan kulit biji, pembentukan komponen flavor, pengurangan kadar air, perubahan warna dan beberapa senyawa kimia dalam biji kakao (Lees dan Jackson, 1985., Minifie, 1982). Selama penyangraian polifenol mengalami kerusakan, sehingga rasa pahit dan sepat menurun, dipercepat oleh panas. Sampai sekarang penyangraian biji kakao masih dilakukan dengan pemanasan cara konvensional, dengan kecepatan perpindahan panas terbatas pada tiga cara standar yaitu konduksi, konveksi dan radiasi, menyebabkan pemanasan berlangsung lambat. Dalam keadaan demikian mungkin senyawa polifenol banyak berubah karena lama terpapar dengan oksigen udara pada suhu relatif tinggi, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas antioksidatifnya.

Penelitian tentang penyangraian biji kakao menggunakan energi gelombang mikro (EGM) telah dilakukan, dalam bentuk hancuran nib kakao lolos ayakan 20 mesh. Dari hasil penelitian tersebut diketahui bahwa berdasarkan parameter kadar air, warna, kadar total polifenol dan aktivitas penghambatan oksidasi asam lemak linoleat, penyangraian selama 5 menit dengan EGM pada power 20% dari 900 W adalah setara dengan penyangraian konvensional selama 40 menit pada suhu 140°C (Supriyanto, et al., 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penyangraian biji kakao menggunakan EGM, terhadap kandungan polifenol, serta potensi dan mekanisme aktivitas antioksidatif dari produk kakao yang

dihasilkannya, dibandingkan dengan pengaruh penyangraian konvensional.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan baku untuk penelitian ini adalah biji kakao kering Indonesia jenis lindak (*bulk cocoa*) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember. Bahan kimia meliputi katekin standar, DPPH (diphenyl picrylhydrazyl), asam linoleat, ferosin, tokoferol standar, BHT (*butylated hydroxy toluene*), aseton, buffer fosfat, heksan, ferro klorida dan amonium tiosianat. Bahan kimia untuk analisis sebagian besar adalah *analytical grade*, dari Sigma Chemical Company, St. Louis, MO USA.

Peralatan utama yang digunakan meliputi alat penggiling (*grinder*), oven EGM. GE, 900 Watt, 2450 MHz, oven listrik MEMERT, alat ekstraksi polifenol, evaporator vacuum, alat pengering beku dan spektrofotometer SHIMADZU Model UV 1601.

Metode

Persiapan sampel

Biji kakao kering dipanaskan dalam oven listrik suhu 50 °C selama 1 jam sampai kadar airnya sekitar 6%, dihilangkan kulit bijinya dan dihancurkan dengan alat penghancur, sehingga diperoleh hancuran keping biji (nib) kakao lolos ayakan 20 mesh.

Hancuran nib (50g) ditempatkan dalam mangkok kaca, dimasukkan dalam oven gelombang mikro (EGM). Penyangraian dilakukan pada *power* terkecil (20%) selama 5 menit. Penyangraian cara konvensional sebagai pembanding, dilakukan dengan menggunakan oven listrik pada suhu 140°C selama 40 menit.

Ekstraksi Polifenol kasar

Hancuran biji kakao sangrai (20g) diekstrak lemaknya menggunakan heksana (perbandingan 1 bagian sampel : 5 bagian heksana), dilakukan 4 kali. Hancuran kakao bebas lemak lolos ayakan 100 mesh (5g) selanjutnya diekstrak polifenolnya menggunakan larutan aseton 80%, sebanyak 3 kali, masing-masing 5 jam pada suhu 80 °C. Pelarut dalam ekstrak diuapkan dalam evaporator vakum, dibekukan dalam ruang pembeku, kemudian dikeringkan menggunakan alat pengering beku, hingga dihasilkan ekstrak polifenol yang masih kasar dalam bentuk kering beku.

Analisis kandungan total polifenol

Kandungan total polifenol dalam ekstrak dianalisis menggunakan Metode *PrussianBlue* (Natsume, et al., 2000., Osakabe, et al., 1998.; Price dan Butler dalam Shahidi dan Nacz, 1995). Ekstrak kering beku disuspensikan dalam akuades 10 ml, dilakukan secara bertahap, 5 ml akuades dicampurkan dengan

ekstrak, dikocok kemudian ditambahkan lagi 5 ml akuades. Suspensi yang dihasilkan kemudian diinjeksikan menggunakan *syringe* ke dalam Sep-pak Catridge C₁₈ yang sebelumnya telah diprekondisikan terlebih dahulu menggunakan larutan methanol 2 ml, diikuti dengan akuades 5 ml. Polifenol yang tertahan dalam Sep-pak Catridge di elusi dengan aseton 80%. Eluen atau larutan ekstrak sebanyak 50 µl dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan berturut-turut 950 µl akuades, 1 ml larutan feriklorida 15 mM, dan 1 ml larutan potasium ferisianida 1,2 mM. Campuran dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 720 nm. Sebagai larutan blangko digunakan aseton 80%. Kadar total polifenol ditentukan dengan menggunakan kurva standar dari senyawa katekin.

Aktivitas penghambatan oksidasi asam linoleat

Analisis aktivitas penghambatan oksidasi asam linoleat dilakukan menggunakan metode tiosianat (Mitsuda, et al., 1966 dalam Yen dan Chen, 1995). Larutan ekstrak polifenol kasar dibuat satu seri pengenceran dengan variasi konsentrasi 10, 100, 200, 400, 1000 µg ekstrak kering beku/ ml aseton 80%. Diambil larutan ekstrak masing-masing sebanyak 0,5 ml, dan aseton 80% 0,5 ml yang digunakan sebagai larutan blangko. Kepada larutan ekstrak dan blangko masing-masing ditambahkan 2,5 ml emulsi asam linoleat 0,02 M pH 7,0 dan 2 ml bufer fosfat 0,2 M pH 7,0. Campuran tersebut kemudian di inkubasikan pada 37 °C, dan dilakukan pengamatan terhadap nilai absorbansinya setiap 24 jam.

Pengamatan absorbansi dilakukan dengan cara sebagai berikut; Etanol 75% sebanyak 4,7 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, tambahkan larutan amonium tiosianat 30% sebanyak 0,1 ml, tambahkan larutan sampel 0,1 ml, tambahkan larutan ferro-klorida 0,02 M dalam 3,5% HCl sebanyak 0,1 ml. Aduk dengan menggunakan vortex selama 3 menit kemudian dibaca absorbansinya pada 500 nm. Untuk pengamatan absorbansi blangko dilakukan dengan cara mengganti larutan sampel dengan larutan blangko.

Absorbansi yang dimaksud dalam persamaan adalah nilai absorbansi sampel pada saat nilai absorbansi blangko maksimal

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blangko}} \times 100\%$$

Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH (diphenyl picrylhydrazyl)

Analisis aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dilakukan dengan metode spektrofotometri (Burda dan Oleszek, 2001., Lai, et al., 2001., Tang, et al., 2001., Yen dan Chen, 1995).

Larutan ekstrak polifenol kasar dibuat satu seri pengenceran pada variasi konsentrasi 5; 12,5; 25; 50; 75; 100, dan 125 µg ekstrak kering beku / ml aseton 80%, kemudian disaring menggunakan Sep-pak Catridge C₁₈. Setiap larutan ekstrak diambil sebanyak 4 ml, dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,75 mM, kemudian diinkubasikan dalam keadaan gelap pada suhu kamar (± 28 °C) selama 30 menit. Dibaca absorbansinya pada 517 nm dan dibuat larutan blangko dari aseton 80%

$$\% \text{ Aktivitas penangkapan DPPH} = 1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blangko}} \times 100\%$$

Analisis aktivitas pengikatan ion fero (Fe²⁺).

Analisis aktivitas pengikatan ion fero dilakukan dengan metode spektrofotometri (Decker dan Welch, 1990 dalam Lai, et al., 2001; Tang, et al., 2001). Larutan ekstrak polifenol kasar di encerkan sehingga konsentrasinya 1000, 2000, dan 2500 ppm menggunakan pelarut aseton 80%, kemudian disaring menggunakan Sep-pak Catridge C₁₈. Sebanyak 1 ml larutan ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3,7 ml akuades, 0,1 ml larutan FeCl₃ 2 mM dan 0,2 ml larutan Ferozin 5mM. Sampel diinkubasikan pada suhu kamar (± 28 °C) selama 20 menit kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 562 nm.

$$\% \text{ Aktivitas pengikatan ion fero} = 1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blangko}} \times 100\%$$

Analisis aktivitas pereduksi ion feri (Fe³⁺)

Analisis aktivitas pereduksi ion feri dilakukan dengan metode spektrofotometri (Yen and Chen, 1995). Larutan ekstrak polifenol kasar dibuat satu seri pada variasi konsentrasi 50, 150, 250, 350 dan 500 µg ekstrak kering beku /ml aseton 80%, saring menggunakan Sep-pak Catridge C₁₈. Dari setiap pengenceran diambil larutan ekstrak sebanyak 2,5 ml dan dicampur dengan 2,5 ml bufer fosfat (0,2M pH 6,6), kemudian ditambahkan 2,5 ml larutan potasium ferisianida 1%. Sampel kemudian diinkubasi dalam penangas air (50°C) selama 20 menit. Selanjutnya tambahkan 2,5 ml larutan trikloro asetat 1%, dan dipusingkan pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah itu diambil 2,5 ml larutan dalam tabung dibagian atas dan dicampur dengan 2,5 ml akuades. Kemudian kedalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 ml larutan feri klorida 0,1%, didiamkan selama 1 menit lalu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 700 nm. Daya pereduksi ekstrak polifenol kasar ditunjukkan oleh besarnya absorbansi yang terbaca pada panjang gelombang 700 nm

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan total polifenol

Kandungan total polifenol dalam ekstrak polifenol kasar dari kakao yang disangrai dengan EGM lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak dari hasil penyangraian secara konvensional maupun dengan kontrol atau yang tidak disangrai (Tabel 1). Namun secara statistik tidak berbeda nyata (p<0,05). Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaruh penyangraian terhadap kandungan total polifenol sangat kecil, mungkin disebabkan karena katekin dan epikatekin penyusun sebagian besar polifenol kakao dalam bentuk oligomer diduga cukup resisten terhadap panas, dibandingkan dengan dalam bentuk monomernya seperti dalam teh, dan diduga mempunyai titik leleh lebih tinggi (Misnawi, et al., 2002).

Tabel 1. Kandungan total polifenol dalam ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian konvensional dan EGM

Perlakuan	Kadar total polifenol (%)
Kontrol	16,3 ± 0,7 a
EGM	16,1 ± 0,9 a
Konvensional	16,5 ± 0,7 a

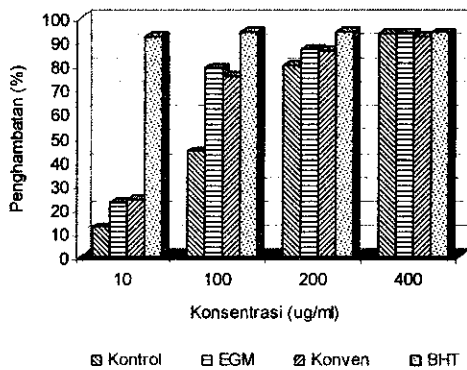
Keterangan : Kadar total polifenol dalam % terhadap berat ekstrak kering beku. Notasi statistik yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Ekstrak polifenol yang dihasilkan masih berupa ekstrak kasar, sehingga sangat dimungkinkan tercampur dengan bahan lain misalnya senyawa reduktion, yaitu senyawa hasil degradasi Amadori yang terjadi selama penyangraian mempunyai sifat sebagai reduktor yang kuat (Bailey, et al., dalam Shahidi, 1997), sehingga berpengaruh terhadap hasil analisis kadar total polifenol ke nilai yang lebih besar.

Informasi tersebut diatas didukung oleh data hasil penelitian yang menunjukkan bahwa penyangraian pada suhu 120 °C selama 45 menit hanya merubah atau menurunkan kandungan total polifenol sebesar 3% (Misnawi, et al., 2002).

Aktivitas penghambatan oksidasi asam lemak linoleat

Ekstrak polifenol kasar dari biji kakao yang telah disangrai masih mempunyai kemampuan menghambat oksidasi asam lemak linoleat. Penghambatan oksidasi asam lemak linoleat oleh ekstrak polifenol dari kakao hasil penyangraian EGM dan konvensional ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas penghambatan oksidasi asam lemak linoleat oleh ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian EGM dan konvensional pada berbagai konsentrasi

Ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian EGM, konvensional maupun tanpa penyangraian, telah menunjukkan aktivitas antioksidatifnya mulai pada konsentrasi 10 µg / ml, dan mencapai maksimal pada konsentrasi 400 µg/ml. Ekstrak polifenol kasar pada konsentrasi 400 µg/ml dapat menghambat oksidasi asam lemak linoleat sebesar 90% lebih, hampir sama dengan aktivitas antioksidan sintesis BHT.

Gambar 1 menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan oksidasi asam lemak linoleat oleh ekstrak polifenol dari kakao yang disangrai dengan EGM dan konvensional lebih besar dibandingkan dengan kontrol ($p \leq 0,05$). Perbedaan tersebut tampak pada kisaran konsentrasi rendah yaitu antara 10 sampai 200 µg/ml, menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut, pengaruh penyangraian lebih efektif.

Aktivitas penghambatan terhadap oksidasi asam lemak linoleat oleh ekstrak polifenol dari kakao yang disangrai menggunakan EGM justru lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak disangrai, padahal pada ekstrak kakao yang tidak disangrai seharusnya polifenol yang merupakan senyawa paling berperan belum banyak mengalami perubahan. Akan tetapi hal tersebut juga terjadi pada penyangraian konvensional, sehingga bukan disebabkan oleh pengaruh penggunaan EGM.

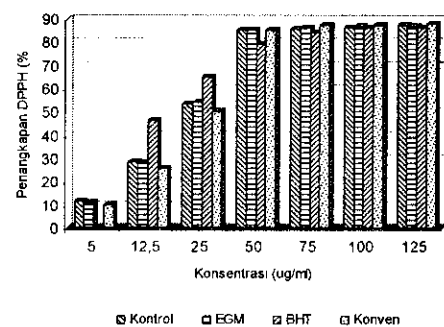
Peningkatan aktivitas antioksidatif selama penyangraian mungkin disebabkan karena terbentuk senyawa baru yang berpotensi sebagai antioksidan, seperti misalnya produk hasil reaksi antara senyawa karbonil dengan asam amino, reaksi antara produk oksidasi lipida dengan protein dan karbohidrat, atau mungkin juga reaksi karamelisasi gula (Yen dan Hsieh, 1998). Senyawa tersebut mungkin sebagian ikut terekstrak dalam pelarut selama ekstraksi polifenol, ditunjukkan oleh warna coklat pada ekstrak yang diperoleh.

Hasil penelitian Osakabe (1998), menunjukkan pada ekstrak polifenol dari produk kakao yang telah mengalami penyangraian ditemukan senyawa klovamid yang dapat menghambat oksidasi asam lemak linoleat lebih besar dibandingkan dengan katekin dan epikatekin.

Kemampuan ekstrak polifenol kakao menghambat oksidasi asam lemak linoleat menunjukkan bahwa polifenol kakao dapat berperan sebagai donor proton (H) terhadap radikal peroksi, sehingga radikal tersebut tidak bisa bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh untuk membentuk radikal bebas. Dengan demikian dapat memperlambat tahap reaksi propagasi pada proses autooksidasi. Proton hidrogen yang di donorkan dipengaruhi oleh jumlah dan posisi gugus OH dalam molekul polifenol, sehingga pada konsentrasi polifenol makin besar aktivitas antioksidatifnya juga makin besar (Shahidi, 1997).

Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH

Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH oleh ekstrak polifenol kasar dari kakao ditunjukkan pada Gambar 2. Ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian konvensional, EGM, dan kontrol sudah mulai tampak aktivitasnya pada konsentrasi 5 µg / ml, jika konsentrasi dinaikkan aktivitasnya bertambah besar, dan mencapai maksimal pada konsentrasi 50 µg / ml. Pada kisaran konsentrasi 5 s/d 125 µg / ml menunjukkan bahwa aktivitas penangkapan radikal DPPH antara kontrol, penyangraian EGM dan konvensional tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$).



Gambar 2. Aktivitas penangkapan radikal DPPH oleh ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian EGM dan konvensional pada berbagai konsentrasi

Kemampuan ekstrak polifenol kasar menangkap radikal DPPH dikaitkan dengan kemampuannya sebagai donor proton (Lai, et al., 2001) Jumlah proton hidrogen yang bisa di donorkan dipengaruhi oleh jumlah dan posisi gugus OH. Apabila aktivitas penangkapan DPPH antara kontrol, konvensional dan EGM tidak berbeda, mungkin karena polifenol sebagai senyawa yang paling berperan dalam

ekstrak kakao selama penyangraian tidak banyak mengalami perubahan. Data ini sesuai dengan pernyataan Misnawi, et al.,(2002) bahwa penyangraian pada 120°C selama 45 menit hanya menurunkan kadar polifenol total sekitar 3%.

Polifenol golongan flavonoid mengandung gugus OH lebih banyak dibandingkan dengan antioksidan sintetis BHT dan α -tokoferol yang hanya mempunyai satu gugus OH (Shahidi, 1997), tetapi aktivitas antioksidatif ekstrak kakao lebih kecil. Hal ini mungkin disebabkan karena dalam ekstrak polifenol kasar masih tercampur dengan senyawa lain yang ikut terekstrak pada waktu ekstraksi polifenol, sedangkan ke dua antioksidan sintetis tersebut dalam keadaan murni. Disamping itu tidak semua gugus OH dalam flavonoid berperan aktif dalam mendukung aktivitas antioksidatif, misalnya pada katekin hanya gugus OH pada posisi C₃ dan C₄ pada cincin B yang aktif, didukung oleh C₃ pada cincin C tengah (Rajalaksmi dan Narasimhan dalam Madhavi, et al., 1996., Shahidi, et al., 1997).

Untuk mengetahui lebih jauh pengaruh penyangraian dengan EGM dibandingkan dengan penyangraian konvensional, ekstrak polifenol kakao yang diperoleh dengan menggunakan pelarut aseton 80% dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan Sep-pak Catridge C₁₈ dengan pelarut etil asetat, etanol 80%, dan metanol 80%, kemudian eluen atau fraksi yang diperoleh dari masing-masing pelarut diuji aktivitas antioksidatifnya. Fraksi yang diperoleh dari masing-masing pelarut ternyata mempunyai aktivitas penangkapan radikal DPPH berbeda (Tabel 2). Fraksi yang larut dalam etil asetat, untuk ekstrak kakao kontrol, hasil penyangraian konvensional maupun EGM, mempunyai aktivitas yang paling besar dibandingkan dengan pelarut lain. Dari antar jenis pelarut dan cara penyangraian, maka pelarut etil asetat dan penyangraian dengan EGM memberikan perbedaan yang paling besar. Data ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak kakao hasil penyangraian dengan EGM perbedaan antara fraksi non polar dengan fraksi polar adalah paling besar. Hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak kakao tersebut fraksi penyusun yang dominan adalah fraksi non polar.

Aktivitas penangkapan DPPH dari ekstrak kakao meskipun sedikit lebih rendah dibandingkan dengan α -tokoferol, tetapi lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktivitas dari ekstrak teh. Sebagai gambaran, aktivitas penangkapan radikal DPPH dari ekstrak teh hijau sebesar 59,4%, teh hitam 49,0% dan teh Oolong 54,6%, masing-masing pada konsentrasi 500 μ g/ml (Yen dan Chen, 1995).

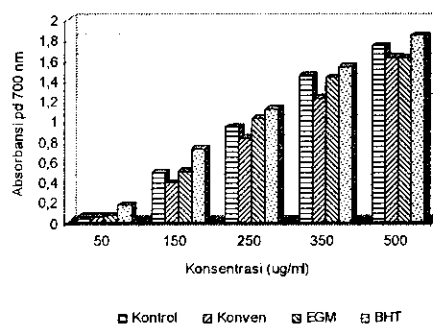
Tabel 2. Aktivitas penangkapan radikal DPPH fraksi ekstrak polifenol kakao yang larut dalam etil asetat, metanol dan etanol

	Aktivitas penangkapan DPPH (%)		
	Kontrol	Konvensional	EGM
Etil asetat	77,4 \pm 2,5 a	78,2 \pm 2,3 x	76,6 \pm 2,2 u
Metanol 80%	74,3 \pm 2,8 a	76,4 \pm 3,6 x	72,3 \pm 2,6 v
Etanol 80%	67,1 \pm 1,9 b	69,4 \pm 3,9 y	54,9 \pm 1,4 w

Keterangan : Notasi statistik yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan berbeda nyata

Aktivitas reduksi ion feri

Ekstrak polifenol kakao dapat berperan sebagai senyawa reduktor dalam hal ini mampu mereduksi ion feri menjadi fero, yang besarnya dipengaruhi oleh cara penyangraian dan konsentrasi (Gambar 3). Pada konsentrasi rendah (50 s/d 150 ppm) kemampuan mereduksi ekstrak polifenol dari kakao hasil penyangraian menggunakan EGM, penyangraian konvensional dan kontrol tidak berbeda nyata ($p \leq 0,05$), tetapi pada konsentrasi sedang (250 s/d 350 ppm) kemampuan mereduksi ekstrak polifenol dari kakao hasil penyangraian menggunakan EGM lebih besar dibandingkan dengan penyangraian konvensional, sedang pada konsentrasi 500 ppm kemampuan mereduksi ekstrak polifenol dari kakao hasil penyangraian menggunakan EGM dan konvensional tidak beda nyata ($p < 0,05$).



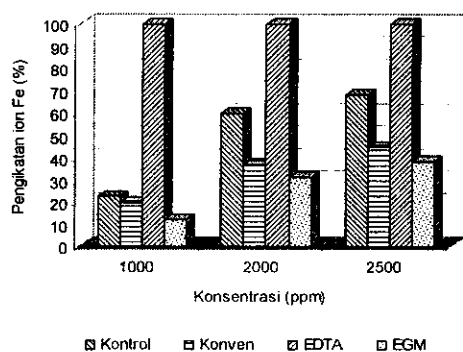
Gambar 3. Aktivitas reduksi ion feri oleh ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian EGM dan konvensional pada berbagai konsentrasi

Aktivitas ekstrak polifenol kakao sebagai reduktor cukup tinggi, meskipun sedikit dibawah BHT tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak teh hitam yang besarnya sekitar 1,32 pada konsentrasi 1000 μ g/ml (Yen dan Chen, 1995).

Aktivitas ekstrak polifenol kakao sebagai senyawa pereduksi menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat bertindak sebagai donor elektron dan dapat bereaksi dengan radikal bebas untuk mengubahnya menjadi produk yang stabil dan menghentikan reaksi radikal berantai (Lai, et al., 2001.,Yen dan Chen, 1995).

Aktivitas pengikatan ion fero

Ekstrak polifenol kakao mempunyai aktivitas mengikat atau mengkelat ion fero, yang besarnya dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak dan cara penyangraian (Gambar 4). Pada semua perlakuan jika konsentrasi ekstrak dinaikkan aktivitasnya makin besar, tetapi jika dibandingkan antar perlakuan, ekstrak kakao hasil penyangraian menggunakan EGM dan konvensional mempunyai aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak polifenol kakao kontrol. Hal ini mungkin disebabkan karena pembentukan kompleks metal dari flavonoid yang merupakan senyawa paling berperan dalam ekstrak kakao, bisa terjadi karena di dalam molekul terdapat gugus OH atau CO pada posisi orto (Heywood, 1972). Pada proses penyangraian mungkin jumlah dan posisi gugus tersebut berubah atau mengalami substitusi dengan gugus lain, sehingga mengurangi aktivitasnya.



Gambar 4. Aktivitas pengikatan ion fero oleh ekstrak polifenol kasar dari kakao hasil penyangraian EGM dan konvensional pada berbagai konsentrasi

Polifenol golongan flavonoid seperti yang terkandung dalam kakao telah dilaporkan mampu mengikat ion logam membentuk kompleks inert, sehingga tidak bisa membentuk radikal alkoxi maupun peroksi terutama dari senyawa hidroperoksida. Dengan demikian tidak bisa memulai reaksi radikal berantai, karena kedua macam radikal tersebut dapat mengambil atom H dari asam lemak tidak jenuh menghasilkan radikal lipida bebas (Madhavi, et al., 1996)

Aktivitas ekstrak polifenol kakao mengikat ion fero sangat penting artinya karena ion fero merupakan senyawa katalisator terjadinya oksidasi, dan tidak semua senyawa polifenol mempunyai aktivitas mengikat ion fero, termasuk antioksidan sintetis seperti BHT dan α -Tokoferol (Lai, et al., 2001). Meskipun demikian jika dibandingkan dengan ekstrak teh, aktivitas pengikatan ion fero oleh ekstrak kakao lebih rendah (Tang, et al., 2001).

KESIMPULAN

Ekstrak polifenol kakao dapat menghambat oksidasi asam linoleat, menangkap radikal bebas, mereduksi ion feri, dan mengikat ion fero, meskipun kemampuannya masih sedikit dibawah antioksidan sintetis BHT dan α -tokoferol. Kadar polifenol, aktivitas penghambatan oksidasi asam linoleat, dan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dari ekstrak polifenol kakao hasil penyangraian menggunakan EGM tidak berbeda nyata dengan ekstrak polifenol hasil penyangraian konvensional. Namun demikian mempunyai aktivitas reduksi ion feri lebih besar, tetapi aktivitas mengikat ion fero lebih kecil.

Aktivitas penghambatan oksidasi asam linoleat oleh ekstrak polifenol kakao dimulai pada konsentrasi 10 μ g/ml dan mencapai maksimal pada konsentrasi 400 μ g/ml, dengan nilai sekitar 90% mendekati aktivitas BHT. Aktivitas penangkapan radikal bebas mulai tampak pada konsentrasi ekstrak 5 μ g/ml dan maksimal pada 50 μ g/ml sebesar 85,44%. Aktivitas reduksi ion feri mulai tampak pada 50 μ g/ml dengan nilai absorbansi 0,057, dan pengikatan ion fero pada 1000 ppm sebesar 12,15%

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada LPIU QUE Project Batch III Tahun 2000, pada Program studi Teknologi Pengolahan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian UGM, yang telah memberi dana untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonveh, J.S.; F.V. Coll, 1997. Evaluation of Bitterness and Astringency of Polyphenolic Compounds in Cocoa Powder. *J. Food Chemistry* 60 (3) 365-370.
- Burda, S., and W. Oleszek, 2001., Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food. Chem.* 49, 2774 – 2779.
- Heywood, V.H., 1972. *Plant Phenolics*, Oliver and Boyd Tweeddale Court, 14 High Street, Edinburgh EH 1 YL.
- Kim, H dan P.G. Keeney, 1983. Method of Analysis for (-) -Epicatechin in Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography. *J. of Food Sci.* 48 548-551.
- Lai, L.S., S.T. Chou, and W.W. Chao, 2001., Studies on the Antioxidative Activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens Hems!*) Leaf Gum. *J. Agric. Food Chem.* 49, 963-968.
- Lee, SY., S.S.Yoo, M.J. Lee, I.B. Kwon, and Y.R. Pyun, 2001., Optimization of Nib Roasting in Cocoa

- bean processing with Lotte-Better taste and Color process, *Food.Sci.Biotchnol*, Vol.10 No.3 286-293.
- Lees,R. and E.B. Jackson, 1985.** Sugar Confectionery and Chocolate Manufacture. Publish by Leonard Hill, Thompson Litho Ltd. East Kilbride, Scotland.
- Madhavi, D.L.; S.S. Deshpande; D.K. Salunkhe, 1996.** Food Antioxidant, Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York- Basel- Hong Kong.
- Minifie, B.W., 1982.,** Chocolate, Cocoa and Confectionery. AVI Publ. Co. Inc., Wesport, Connecticut.
- Misnawi, S.Jinap, B.Jamilah, S.Nazamid, 2002.** Effects of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenols content, Hydrophobicity and Tanning Capacity. Scientific Conference on Food Antioxidant, UPM., Malaysia
- Natsume, M., N.Osakabe, M.Yamagishi, T.Takizawa, T.Nakamura, H.Miyatake, T. Hatano, and T.Yoshida, 2000.,** Analyses of Polyphenols in Cocoa Liquor, Cocoa, and Chocolate by Normal-Phase and Reversed-Phase HPLC. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (12), 2581- 2587.
- Nicoli, M.C., M. Anese, and M. Parpinel, 1999.,** Influence of Pprocessing on the Antioxidant Properties of Fruit and Vegetables. *Trens in Food Science & Technology* 10, 94 – 100.
- Osakabe, N., M.Yamagishi, C.Sanbongi, M.Natsume, T.Takizawa, and T.Osawa, 1997.,** The Antioxidative Substances in Cacao Liquor. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 44, 313-321.
- Osakabe, N., C.Sanbongi, M. Natsume, T.Takaziwa, S. Gomi, and T.Osawa, 1998.,** Antioxidative Polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *J.Agric.Food Chem.* 46, 454-457.
- Osakabe, N.; S. Baba; A. Yasuda; T. Iwamoto; M. Kamiyama; T. Takizawa; H. Itakura; K. Kondo, 2001.** Daily Cocoa Intake Reduces The Susceptibility of Low-Density Lipoprotein to Oxidation as Demonstrated in Healthy Human Volunteers. *Free Radical Research*, 34, 93-99.
- Sanbongi, C.; N. Osakabe; M. Natsume; T.Takizawa; S. Gomi; T. Osawa, 1998.** Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma cacao*. *J. Agric. Food Chem.* 46 454-457.
- Shahidi, F., and M. Naczk, 1995.,** Food Phenolics, Sources, Chemistry, Effects Applications. Technomic Publ. Co. Inc. Basel Switzerland.
- Shahidi, F., 1997.** Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications. AOCS Press. Champaign, Illinois.
- Supriyanto, Haryadi, Budi Rahardjo, Djagal Wiseso Marseno, 2006.** Perubahan Suhu, Kadar Air, Warna, Kadar Polifenol, dan Aktivitas Antioksidatif kakao Selama Penyangraian Dengan Energi Gelombang Mikro. *Agritech (dalam proses pencetakan)*
- Tang,S.Z., J.P. Kerry, D.Sheehan, and D.J. Buckley, 2001.,** Antioxidative Mechanims of Tea Catechins in Chicken Meat System. *Journal of Food Chem* (76) 45-51
- Wilkinson, S.L., 1999.** Take Two Cups of Coffee And Call Me Tomorrow, Coffee and Chocolate Contain Antioxidants That May Promote Health. *Chemical and Engineering News*, April 12, 47-50.
- Yamaguchi, T.; H. Takamura; T. Matoba; J. Terao, 1998.** HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (6), 1201 – 1204.
- Yen, G.C.; H.Y. Chen, 1995.** Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43, 27 – 32.
- Yen,G.C., and C.L.Hsieh, 1998.,** Antioxidant Activity of Extracts from Du-zhong (*Eucomia ulmoides*) toward Various Lipid Peroxidation Models in Vitro. *J.Agric.Food.Chem*, 46, 3952-3957.