

Perbandingan efektifitas *pretreatment* ozonolisis dan *hydrothermal pressure* dalam meningkatkan kandungan tanin dan kafein ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.)

Ozonolysis and hydrothermal pressure pretreatments for increasing tannin and caffeine contents of cocoa bean shell extract (Theobroma cacao L.)

Duhita Diantiparamudita Utama¹, Mohammad Djali², Yana Cahyana², Melia Siti Ajjjah¹

¹Fakultas Pertanian, Universitas Insan Cendekia Mandiri. Jl. Pasir Kaliki No 199 Bandung 40162, Indonesia

²Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran. Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor 45365, Indonesia

Korespondensi:
duhitautama@gmail.com

Submit:
12 Januari 2024

Direvisi:
20 Februari 2024

Diterima:
22 Februari 2024

Abstract. Cocoa bean shell, often considered as waste in chocolate production processes, contain bioactive compounds such as tannins and caffeine. To facilitate the extraction of these bioactive compounds, delignification pretreatment methods such as ozonolysis and hydrothermal pressure are required. The aim of this research was to compare the effectiveness of ozonolysis and hydrothermal pressure methods in enhancing the yield of tannin and caffeine compounds in cocoa bean shell extracts. Ozonolysis pretreatment was conducted using an ozonizer device, while hydrothermal pressure pretreatment utilized an autoclave. Extraction was performed using the maceration method. Data analysis was conducted using a Randomized Block Design (RBD) tested with Analysis of Variance (ANOVA) followed by Duncan Multiple Range Test (DMRT). The results showed that both ozonolysis and hydrothermal pressure pretreatment before the extraction process effectively increased the yield of bioactive compounds in cocoa bean shell extracts. These pretreatment methods exhibited a positive influence on the yield of total tannins and antioxidant activity, while no significant effect was observed on caffeine content. Ozonolysis pretreatment yielded the highest increase in caffeine content by 49.79%, resulting in 1.083 mg/g, while hydrothermal pressure pretreatment yielded the highest increase in total tannin content by 55.19%, resulting in 9.42 mg/g. Additionally, it was found that higher tannin concentrations correlated with higher antioxidant activity values.

Keywords: Caffein, cocoa bean shell, hydrothermal pressure, ozonolysis, tannin.

Abstrak. Kulit biji kakao, yang sering dianggap sebagai limbah dalam proses produksi coklat, mengandung senyawa-senyawa bioaktif seperti tanin dan kafein. Guna mempermudah ekstraksi senyawa-senyawa bioaktif tersebut, diperlukan metode *pretreatment* delignifikasi seperti ozonolisis dan *hydrothermal pressure*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan efektivitas metode ozonolisis dan *hydrothermal pressure* dalam meningkatkan perolehan senyawa tanin dan kafein pada ekstrak kulit biji kakao. Pada metode *pretreatment* ozonolisis menggunakan alat ozonizer, sedangkan pada metode *hydrothermal pressure* menggunakan alat autoklaf Sementara ekstraksi yang dilakukan yaitu dengan metode maserasi. Metode analisis data yang digunakan yaitu Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang diuji dengan Analisis Varian (ANOVA) serta dilanjutkan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan *pretreatment* ozonolisis dan *hydrothermal pressure* sebelum proses ekstraksi terbukti meningkatkan perolehan senyawa bioaktif ekstrak kulit biji kakao. Metode *pretreatment* tersebut menunjukkan pengaruh positif terhadap perolehan senyawa total tanin dan aktivitas antioksidan, sedangkan pada senyawa kafein tidak menunjukkan pengaruh nyata. Metode *pretreatment* ozonolisis menunjukkan hasil terbaik dalam meningkatkan perolehan kadar kafein sebesar 49,79% yaitu menjadi sebanyak 1,083 mg/g. sementara metode *pretreatment hydrothermal pressure* memberikan hasil terbaik dalam meningkatkan perolehan total tanin sebesar 55,19% yaitu menjadi sebanyak 9,42 mg/g. Selain itu diketahui juga bahwa semakin tinggi konsentrasi tanin, semakin tinggi pula nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan.

Kata-kata Kunci: *Hydrothermal pressure*, kafein, kulit biji kakao, ozonolisis, tanin.

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) dikenal sebagai tanaman penting yang menghasilkan biji kakao yang digunakan dalam berbagai produk seperti cokelat, minuman, dan makanan ringan. Peningkatan konsumsi kakao di Indonesia dalam bentuk cokelat instant dan cokelat bubuk tercatat fluktuatif selama periode 2010-2019, dengan angka pertumbuhan tahunan rata-rata sebesar 20,31% dan 85,72% (Rohmah, 2022). Proses pengolahan biji kakao menghasilkan limbah berupa kulit biji kakao, yang jika tidak dikelola dengan baik dapat menyebabkan dampak lingkungan dan ekonomi yang signifikan. Kulit biji kakao adalah produk sampingan utama dari industri cokelat, dipisahkan dari kotiledon selama proses pra-panggang atau setelah proses panggang (Rosyidi *et al.*, 2019). Menurut Kim *et al.* (2004), persentase kulit biji kakao terhadap total berat biji kakao kering mencapai 10-12%, sehingga peningkatan produksi kakao berpotensi mengakibatkan peningkatan limbah kulit biji kakao. Sementara itu, kulit biji kakao memiliki potensi sebagai sumber senyawa bioaktif, termasuk tanin dan kafein, yang memiliki manfaat kesehatan yang dapat dieksploitasi. Komposisi kimia kulit biji kakao setelah proses panggang (*roasting*) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan senyawa kimia pada kulit biji kakao setelah proses pemanggang (*roasting*)

Parameter	Jumlah
Energi (kcal/100 g)	122,00
Air (%)	3,60-13,13
Abu (g/100 g)	5,96-11,42
Protein (g/100 g)	10,30-27,40
Lemak (g/100 g)	1,50-8,49
Karbohidrat (g/100 g)	7,85-70,25
Serat pangan (g/100 g)	39,25-66,33
Polifenol	
- Total fenol (mg GAE/g)	3,12-94,95
- Total flavonoid (mg CEQ/g)	1,65-40,72
- Total tannin (mg CEQ/g)	1,70-25,30
Metilxantin	
- Kafein (g/100 g)	0,04-0,42
- Teobromin (g/100 g)	0,39-1,83

Sumber: Rojo-Poveda *et al.* (2020)

Senyawa kimia kulit biji kakao tidak jauh berbeda dengan senyawa kimia kulit buah kakao dan senyawa kimia biji kakao (Yumas, 2017). Rojo-Poveda *et al.* (2020) menyebutkan bahwa kulit biji kakao memiliki kandungan total fenolik sebesar 1,65-40,72 mg CEQ/g. Tingginya kandungan senyawa fenolik pada kulit biji kakao diduga akibat terjadinya difusi senyawa fenolik dari keping biji ke kulit biji selama proses fermentasi (Albertini *et al.*, 2015). Dinding sel dan membran utuh pada bahan tanaman merupakan hambatan utama difusi molekul, sehingga meningkatkan permeabilitasnya menjadi kunci untuk meningkatkan hasil dan laju ekstraksi senyawa yang diinginkan. Meningkatkan permeabilitas

dinding sel dan membran melalui berbagai metode pra-perlakuan (*pretreatment*) menjadi strategi penting untuk memaksimalkan ekstraksi senyawa bermanfaat dari bahan tanaman (Zhao *et al.*, 2014).

Metode *pretreatment* meliputi perlakuan fisik, biologi, dan kimia. Berbagai metode *pretreatment* memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Dalam metode fisik (tekanan tinggi, medan listrik berdenyut, ultrasonikasi) memiliki keunggulan hemat energi, ramah lingkungan, cepat, dan sebagian besar senyawa bioaktif tetap utuh. Meski begitu, *pretreatment* fisik memiliki kelemahan seperti biaya tinggi, pilihan pelarut terbatas, dan distribusi energi tidak seragam. Dalam metode biologis, diterapkan berbagai enzim pengurai dinding sel untuk memecah dinding sel atau membran dan mengurangi resistensi internal secara keseluruhan untuk memindahkan senyawa bioaktif dari matriks internal ke larutan eksternal. Namun, metode biologi memiliki kelemahan sifat enzim yang sensitif dipengaruhi oleh pH dan suhu, karakteristik bahan baku, pelarut, dan lingkungan, serta beberapa enzim mahal atau tidak stabil terhadap lingkungan. Dalam metode kimia, diperkenalkan berbagai bahan kimia untuk meningkatkan permeabilitas membran dalam atau luar. *Pretreatment* kimia lebih efektif untuk jaringan yang sangat terlignifikasi. Meskipun metode kimia berdampak pada masalah lingkungan, keefektifannya yang tinggi dalam mendegradasi dinding sel pada serat tanaman membuat sebagai *pretreatment* yang perlu dipertimbangkan. Untuk jaringan yang sangat terlignifikasi tersebut, *pretreatment* kimia merupakan metode yang lebih tepat untuk diterapkan (Zhao *et al.*, 2014).

Pretreatment delignifikasi, seperti *pretreatment* ozonolisis (kimia) dan *pretreatment* *hydrothermal pressure* (fisik), dianggap sebagai metode yang efektif untuk mengurai lignin dalam bahan lignoselulosa, sehingga memfasilitasi pelepasan senyawa bioaktif. Delignifikasi sendiri bertujuan untuk mendegradasi lignin secara selektif sehingga dapat mengurai ikatan kimia (ikatan hydrogen, ikatan kovalen atau ikatan *van der waals*) dengan komponen kimia lain pada bahan berlignoselulosa tanpa merusak komponen lainnya (Agustini & Efiyanti, 2015). Beberapa penelitian sebelumnya telah mengungkapkan bahwa ekstraksi senyawa bioaktif dari kulit biji kakao dapat menjadi lebih efisien dengan penerapan metode *pretreatment* delignifikasi. Misalnya, penelitian oleh Travani *et al.* (2013) menyoroti efektivitas *pretreatment* ozonolisis dalam memecah lignin pada berbagai bahan berlignoselulosa. Selain itu Schultz-Jensen *et al.* (2011) menyatakan bahwa *pretreatment* ozonolisis menghasilkan perolehan produk degradasi dari lignin (sumber unik senyawa aromatik terbarukan) dan hemiselulosa. Pola pelepasan berurutan dari berbagai produk degradasi (misalnya fenol, benzena, asam lemak) selama *pretreatment* menunjukkan bahwa ozonolisis akan menjadi *pretreatment* yang tepat untuk mendapatkan produk turunan lignin.

Sementara itu, penelitian Hidayat (2013) membahas penerapan *pretreatment hydrothermal pressure* yaitu kemampuan tenaga uap dalam mengurai struktur kompleks lignoselulosa. Menurut Ruiz *et al.* (2020) *hydrothermal pressure* adalah salah satu metode *pretreatment* yang paling matang secara teknologi untuk bahan baku lignoselulosa. Degradasi komponen lignin, hemiselulosa, dan selulosa sebagai pengikat metabolit sekunder pada kulit kopi mempengaruhi hasil ekstraksi senyawa bioaktif (Kurniawati, 2015).

Namun, hingga saat ini, perbandingan langsung antara metode *pretreatment* ozonolisis dan *pretreatment hydrothermal pressure* dalam konteks ekstraksi tanin dan kafein dari kulit biji kakao masih merupakan aspek yang perlu diteliti lebih lanjut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengisi kesenjangan pengetahuan ini dan bertujuan untuk mengevaluasi metode *pretreatment* yang paling efektif dalam meningkatkan perolehan senyawa tanin dan kafein dari ekstrak kulit biji kakao.

Berdasarkan penelitian tersebut, diharapkan dapat memberikan kontribusi signifikan dalam pemahaman tentang potensi limbah kulit biji kakao sebagai sumber senyawa bioaktif, serta memberikan pandangan yang lebih jelas terkait penerapan metode *pretreatment* delignifikasi dalam konteks ekstraksi tanin dan kafein. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk pengembangan metode ekstraksi yang efisien dan berkelanjutan dari limbah kulit biji kakao.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli-September 2019 di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan, Kementerian Kesehatan Bandung dan Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah ozonizer set, tabung *stainless steel*, autoklaf, botol schott, neraca, toples kaca tertutup, pompa vakum, *rotary evaporator*, labu ukur, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), spektrofotometer UV-Vis, dan pipet ukur. Bahan yang digunakan yaitu serbuk kulit biji kakao berukuran 100 mesh dengan varietas criolo dari Dusun Gambiran, Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta, akuades (Brataco, Indonesia), kertas saring (Whatman, *China*), methanol (Brataco, Indonesia), etanol 70% (Brataco, Indonesia), larutan standar kafein (Sigma-Aldrich, *Germany*), larutan Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, *Germany*), Na_2CO_3 (Brataco, Indonesia), dan asam tanat (Sigma-Aldrich, *Germany*).

Pretreatment Ozonolisis

Dalam prosedur *pretreatment ozonolisis*, perangkat yang digunakan adalah ozonizer set (generator ozon, tabung oksigen, dan laptop). Sebanyak 100 gram serbuk kulit biji kakao dimasukkan ke dalam tabung *stainless steel* tertutup berukuran 1 liter, dengan celah lubang untuk selang gas ozon pada bagian penutupnya. Gas ozon dialirkan ke dalam wadah dengan laju oksigen sebesar 2 L/menit selama 1 menit dengan konsentrasi 18 ppm. Setelah proses pengozonan selesai, sampel dibiarkan selama 10 menit, dan dilakukan homogenisasi dengan memutar wadah sampel setiap 2 menit, secara horizontal atau vertikal (Utama *et al.*, 2021).

Pretreatment Hydrothermal Pressure

Dalam prosedur *pretreatment hydrothermal pressure*, perangkat yang digunakan adalah autoklaf. Sebanyak 100 gram serbuk kulit biji kakao dimasukkan ke dalam botol schott berukuran 1 liter. Botol schott yang berisi sampel kemudian ditutup rapat dan ditempatkan dalam autoklaf bertekanan 2 atm, dengan suhu 129 °C selama 5 menit (Utama *dkk.*, 2021).

Ekstraksi

Dalam prosedur ekstraksi, metode yang digunakan adalah maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Serbuk kulit biji kakao yang telah dilakukan berbagai perlakuan *pretreatment* (tanpa *pretreatment*, *pretreatment ozonolisis*, dan *pretreatment hydrothermal pressure*) dimasukkan ke dalam toples kaca yang tertutup rapat. Selanjutnya, 500 mL etanol 70% ditambahkan ke dalam toples berisi sampel, dan campuran diaduk hingga homogen. Untuk melindungi dari paparan cahaya langsung, seluruh permukaan toples ditutup dengan *aluminium foil*, lalu disimpan pada suhu ruang (25-27°C) selama 24 jam. Hasil maserasi dilakukan penyaringan dengan menggunakan alat pompa vakum yang sudah dilapisi dengan kertas saring whatman. Filtrat hasil penyaringan dilakukan proses selanjutnya yaitu pengkonsentrasian menggunakan *rotary evaporator* selama 1 jam dengan suhu 40 °C hingga pelarut menguap sepenuhnya (Utama *dkk.*, 2021).

Analisis Total Tanin

Ekstrak cair kulit biji kakao, sebanyak 500 mg dilarutkan dalam metanol dalam labu ukur berukuran 10 mL untuk membentuk larutan *stock* sampel. Larutan *stock* sampel kemudian diencerkan 4 kali dalam labu ukur berukuran 5 mL, ditanda batas dengan menggunakan metanol, dan homogenisasi dilakukan. Sebanyak 0,5 mL dari larutan sampel hasil pengenceran dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 25 mL, diikuti dengan penambahan 7 mL akuades dan 1,25 mL pereaksi Folin-Ciocalteu 50%. Campuran ini dicampur dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah periode inkubasi, 2,5 mL Na_2CO_3 jenuh ditambahkan ke dalam larutan, dicampur, dan diinkubasi selama 5 menit lagi pada

suhu ruang. Setelah itu, larutan diencerkan dengan penambahan akuades hingga mencapai tanda batas, homogenisasi, dan inkubasi 60 menit di suhu 27-30 °C. Kemudian, larutan uji dimasukkan kedalam spektrofotometer UV-Vis untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm, menggunakan asam tanat sebagai standar dengan konsentrasi bervariasi (50; 100; 150; 200; 250; 300; 350 ppm) (AOAC, 2005).

Analisis Kafein

Ekstrak cair kulit biji kakao, sebanyak 500 mg dilarutkan dalam metanol ke dalam labu ukur berukuran 10 mL untuk membuat larutan stok sampel. Konsentrasi kafein ditentukan menggunakan HPLC dengan kolom Supelcosil LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) dan deteksi pada panjang gelombang 267 nm. Larutan standar kafein dibuat dengan beberapa konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Fase gerak terdiri atas air (eluen A), metanol (eluen B), dan larutan asam ortofosfat 0,1% (eluen C) dengan perbandingan (A:B:C, 80:19,9:0,1, v/v) dan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan kalibrasi eksternal dan larutan standar kafein 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Hasil analisis kafein diukur dalam satuan mg/g (Coco *et al.*, 2007).

Analisis Data

Metode analisis data yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang diuji dengan Analisis Varian (ANOVA) serta dilanjutkan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Tanin

Jumlah total tanin dalam setiap ekstrak diukur dengan menggunakan TAE (*Tannic Acid Equivalent*). Asam tanat digunakan untuk membuat kurva standar dan hasil akhir dinyatakan dalam miligram ekivalen asam tanat (TAE) per 1 gram sampel (Diniyah *et al.*, 2020). Hasil analisis rata-rata nilai total tanin dari ekstrak kulit biji kakao dapat ditemukan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan total tanin hasil perlakuan berbagai *pretreatment* terhadap ekstrak kulit biji kakao

Faktor perlakuan	TAE (mg/g)
Tanpa <i>Pretreatment</i>	6,07 ± 0,24 ^a
<i>Pretreatment</i> Ozonolisis	9,37 ± 0,22 ^b
<i>Pretreatment</i> <i>Hydrothermal Pressure</i>	9,42 ± 0,16 ^b

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang ditandai dengan huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada taraf uji 5% berdasarkan uji lanjut Duncan.

Berdasarkan Tabel 2, dari hasil rata-rata perlakuan pada penelitian ini menunjukkan bahwa sampel kulit biji kakao tanpa perlakuan *pretreatment* berbeda nyata dengan perlakuan *pretreatment* ozonolisis dan *hydrothermal pressure*. Sementara perlakuan *pretreatment* ozonolisis tidak berbeda nyata dengan perlakuan *pretreatment* *hydrothermal pressure*. Selain itu, jika dibandingkan nilai rata-rata yang diperoleh didapat bahwa seluruh perlakuan *pretreatment* baik ozonolisis maupun *hydrothermal pressure* menunjukkan nilai rata-rata total tanin yang lebih tinggi dibandingkan tanpa *pretreatment*. Hal ini menunjukkan bahwa *pretreatment* delignifikasi terbukti mampu meningkatkan perolehan senyawa total tanin pada ekstrak kulit biji kakao.

Hasil analisis kadar total tanin ekstrak kulit biji kakao tanpa perlakuan (Tabel 2) menunjukkan nilai TAE 6,07 mg/g. Kandungan total tanin kulit biji kakao ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Rojo-Poveda *et al.* (2020) yaitu berada dalam rentang 1,70-25,30 mg/g. Perbedaan nilai TAE dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi kandungan total tanin pada bahan, antara lain adalah perbedaan varietas, asal didapatkannya, cara ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada ekstrak kulit biji kakao setelah dilakukan perlakuan *pretreatment* ozonolisis menghasilkan kadar total tanin sebanyak 9,37 mg/g atau terjadi peningkatan sebesar 54,61% dibandingkan dengan tanpa perlakuan *pretreatment* (6,07 mg/g). Hal tersebut menunjukkan bahwa *pretreatment* ozonolisis terbukti dapat meningkatkan perolehan total tanin pada ekstrak kulit biji kakao. Berbeda dengan penelitian Yan *et al.* (2012) menyatakan bahwa terjadi penurunan kadar tannin pada tepung sorgum seiring dengan meningkatnya kadar ozon akibat pemberian ozon secara berulang. Hal ini terjadi karena ozon dapat menurunkan makromolekul seperti lignin, dan pati, namun degradasi yang serupa dapat terjadi pada tanin dalam kulit biji kakao yang diberi perlakuan ozon karena perlakuan ozon dapat mengubah struktur beberapa kelompok fungsional dalam molekul tanin. Jika dibandingkan dengan penelitian Yan *et al.* (2012), peningkatan kadar total tanin pada penelitian ini disebabkan karena jumlah paparan ozon yang tidak berulang disertai dengan konsentrasi ozon yang optimal sehingga cukup untuk mendegradasi lignin saja.

Selain itu hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa *pretreatment hydrothermal pressure* menunjukkan kadar total tanin tertinggi yaitu 9,42 mg/g atau terjadi peningkatan sebesar 55,19% dibandingkan dengan tanpa perlakuan *pretreatment* (6,07 mg/g). Hal ini didukung oleh Shonisani (2010) yang menyatakan bahwa jumlah tanin meningkat seiring dengan peningkatan temperatur dan waktu pemanasan. Selain itu menurut Kusumaningsih dkk. (2015) efek pemanasan berpengaruh terhadap kadar tanin, semakin tinggi suhu ekstraksi, kadar tanin juga semakin meningkat.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, perlakuan *pretreatment* baik ozonolisis maupun *hydrothermal pressure* menghasilkan perolehan total tanin yang lebih tinggi dibandingkan tanpa *pretreatment*. Hal ini menunjukkan bahwa *pretreatment* delignifikasi baik menggunakan metode *pretreatment* ozonolisis maupun *hydrothermal pressure* terbukti berpengaruh nyata dalam meningkatkan perolehan senyawa total tanin pada ekstrak kulit biji kakao. Meningkatnya perolehan senyawa total tanin pada ekstrak kulit biji kakao disebabkan karena degradasi lignin dan hemiselulosa sehingga mengakibatkan pelepasan senyawa polifenol. Menurut Deaville *et al.* (2010) tanin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol, sehingga dengan terbebasnya senyawa polifenol, maka senyawa tanin pun ikut terlepas sehingga nilai rata-rata perolehan senyawa total tanin pada ekstrak kulit biji kakao menjadi meningkat.

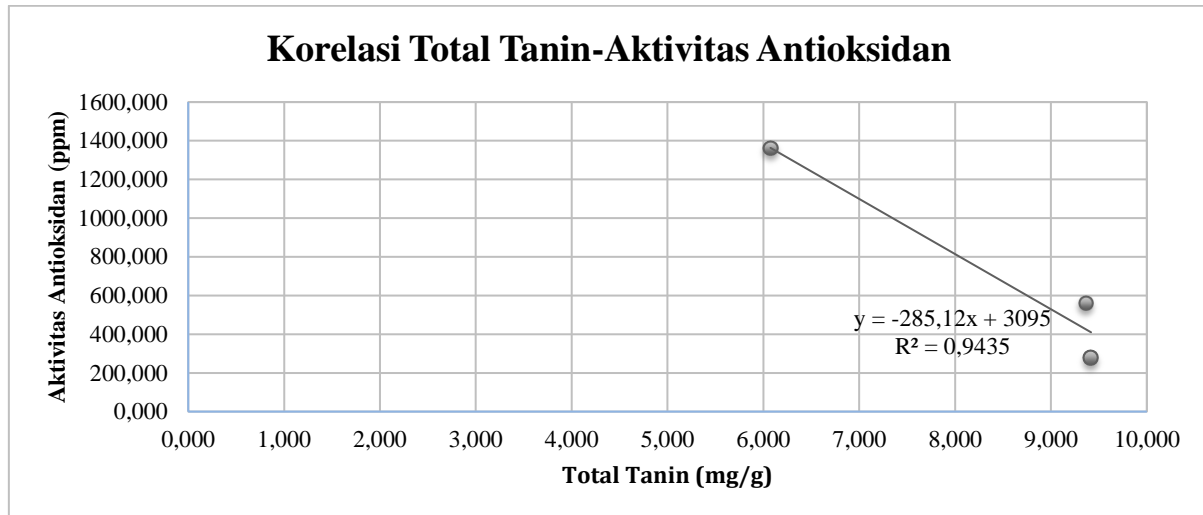
Kandungan tanin pada suatu bahan pangan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari bahan pangan tersebut. Dewi dkk. (2021) menyatakan bahwa kulit biji kakao mengandung senyawa polifenol dengan total fenolik mencapai 1,65-40,72 mg CEQ/g dimana senyawa polifenol merupakan senyawa yang berperan sebagai sumber antioksidan. Temuan ini didukung oleh penelitian dari Utama dkk. (2021) yang menyatakan bahwa kulit biji kakao setelah menjalani *pretreatment* ozonolisis dan *pretreatment hydrothermal pressure* menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Informasi lebih lanjut mengenai nilai aktivitas antioksidan pada kulit biji kakao dapat ditemukan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas antioksidan dengan berbagai *pretreatment* pada ekstrak kulit biji kakao

Faktor perlakuan	IC ₅₀ (ppm)
Tanpa <i>Pretreatment</i>	1361,18
<i>Pretreatment</i> Ozonolisis	559,24
<i>Pretreatment Hydrothermal pressure</i>	277,14

Sumber: Utama dkk., (2021)

Menurut Utama dkk., (2021) terdapat peningkatan aktivitas antioksidan pada kulit biji kakao setelah diberikan perlakuan *pretreatment* baik ozonolisis maupun *hydrothermal pressure*. Semakin kecil nilai IC₅₀, mengindikasikan tingkat aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Guna mengevaluasi hubungan antara jumlah tanin keseluruhan dan aktivitas antioksidan pada kulit biji kakao, dapat diperlihatkan melalui grafik korelasi. Gambaran tentang korelasi antara jumlah tanin keseluruhan dan aktivitas antioksidan pada kulit biji kakao dapat disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Korelasi total tanin dengan aktivitas antioksidan kulit biji kakao

Gambar 1 memperlihatkan adanya korelasi erat antara jumlah tanin keseluruhan dan aktivitas antioksidan yang dihasilkan, yang dijelaskan melalui persamaan garis linier. Model regresi ini memiliki koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9435, yang menunjukkan bahwa 94,35% dari variasi aktivitas antioksidan dapat dijelaskan oleh jumlah tanin keseluruhan, sementara 5,65% sisanya dipengaruhi oleh faktor-faktor lain. Koefisien korelasi (r) sebesar 0,971, menandakan bahwa terdapat hubungan yang sangat erat antara jumlah tanin keseluruhan dan aktivitas antioksidan. Koefisien korelasi (r) yang positif menyiratkan bahwa semakin tinggi konsentrasi tanin keseluruhan, semakin tinggi nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari ekstrak kulit biji kakao.

Banyaknya senyawa total tanin menunjukkan hubungan positif dengan besarnya aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji kakao. Menurut Momuat *et al.* (2019) dalam penelitiannya, terdapat hubungan yang kuat antara kandungan komponen fenolik (senyawa fenolik, flavonoid dan tanin terkondensasi) dengan aktivitas antioksidan dari empelur segar dan kering. Hal ini dikarenakan tanin memiliki fungsi sebagai antioksidan sekunder, karena tanin memiliki kemampuan mengkelat ion besi dan memperlambat oksidasi (Amarowicz, 2007).

Kandungan Kafein

Penentuan kafein ekstrak kulit biji kakao dilakukan menggunakan HPLC. Adapun hasil analisis nilai rata-rata kafein ekstrak kulit biji kakao disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kandungan kafein hasil perlakuan berbagai *pretreatment* terhadap ekstrak kulit biji kakao

Faktor perlakuan	Kafein (mg/g)
Tanpa <i>Pretreatment</i>	0,723 ± 0,244 ^a
<i>Pretreatment</i> Ozonolisis	1,083 ± 0,338 ^a
<i>Pretreatment</i> Hydrothermal pressure	0,996 ± 0,111 ^a

Keterangan: Rata-rata perlakuan yang ditandai dengan huruf yang berbeda menyatakan berbeda nyata pada taraf uji 5% berdasarkan uji lanjut Duncan.

Berdasarkan Tabel 4 rata-rata perlakuan pada penelitian ini yaitu antara perlakuan tanpa *pretreatment*, *pretreatment* ozonolisis, dan *pretreatment* hydrothermal pressure seluruhnya menunjukkan hasil tidak berbeda nyata satu sama lain. Hal ini menunjukkan bahwa hasil analisis kadar kafein dari setiap perlakuan tidak menunjukkan perubahan yang signifikan, atau dapat dikatakan perlakuan *pretreatment* delignifikasi tidak mempengaruhi jumlah perolehan senyawa kafein pada ekstrak kulit biji kakao. Namun, jika dibandingkan nilai rata-rata yang diperoleh, didapat bahwa seluruh

perlakuan *pretreatment* baik ozonolisis maupun *hydrothermal pressure* menunjukkan nilai rata-rata kafein yang lebih tinggi dibandingkan tanpa *pretreatment*. Hal ini menunjukkan bahwa *pretreatment* delignifikasi mampu meningkatkan perolehan senyawa kafein pada ekstrak kulit biji kakao walaupun sangat kecil.

Pada perlakuan *pretreatment* ozonolisis menunjukkan nilai kafein tertinggi yaitu 1,083 mg/g dibandingkan dengan *pretreatment hydrothermal pressure* (0,996 mg/g) dan tanpa *pretreatment* (0,723 mg/g). Sebagaimana yang dapat dilihat bahwa hasil analisis dari kadar kafein ekstrak kulit biji kakao tanpa *pretreatment* adalah sebesar 0,723 mg/g atau 0,723%. Kandungan kafein kulit biji kakao ini lebih rendah dibandingkan penelitian sebelumnya oleh Botella-Martínez *et al.* (2021) yang menemukan bahwa kandungan kafein pada kulit biji kakao berkisar antara 4,02 hingga 6,13 mg/g. Perbedaan nilai kafein ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi tergantung pada varietas kakao, kondisi tanah, dan metode pengolahan.

Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa *pretreatment* ozonolisis menunjukkan kadar kafein tertinggi yaitu 1,083 mg/g atau terjadi peningkatan sebesar 49,79% dibandingkan dengan tanpa *pretreatment* (0,723 mg/g). Dengan meningkatnya rata-rata perolehan senyawa kafein maka didapat bahwa *pretreatment* ozonolisis terbukti dapat mendegradasi dinding sel pada kulit biji kakao. Menurut Takashina *et al.* (2017) pada penelitiannya dalam mendegradasi kafein pada limbah pengolahan kopi dengan menggunakan konsentrasi ozon 5-15 ppm dan waktu reaksi 15-45 menit menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ozon maka semakin tinggi tingkat degradasi kafein, serta semakin lama waktu pengozonan maka semakin tinggi pula tingkat degradasi kafein pada periode waktu 15-30 menit, setelah 30 menit terjadi penurunan tingkat degradasi. Pada penelitian ini digunakan waktu yang sangat singkat yaitu 1 menit dengan laju alir oksigen 2L/menit dan konsentrasi 18 ppm, sehingga tidak menunjukkan perubahan kadar kafein yang signifikan. Perubahan kadar kafein yang tidak signifikan menunjukkan bahwa senyawa kafein tidak mudah teroksidasi akibat perlakuan *pretreatment* ozonolisis. Metode ozonolisis ini memiliki keunggulan, diantaranya pengoperasian dalam keadaan suhu dan tekanan rendah, selektivitas tinggi terhadap lignin, dan tidak menghasilkan residu beracun. Metode *pretreatment* ozonasi memiliki keunggulan dalam hal mendegradasi lignin pada suhu dan tekanan lingkungan tanpa meninggalkan sisa cemaran bagi lingkungan sehingga dapat menjadi pilihan bagi produk yang membutuhkan kondisi tersebut.

Selain itu hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa perlakuan *pretreatment hydrothermal pressure* menghasilkan kadar kafein sebanyak 0,996 mg/g atau terjadi peningkatan sebesar 37,74% dibandingkan dengan tanpa *pretreatment* (0,723 mg/g). Kenaikan kandungan kafein dapat disebabkan karena terjadinya degradasi dinding sel akibat pemanasan menggunakan autoklaf, sehingga senyawa kafein yang terikat di dalamnya dapat teridentifikasi. Menurut Hidayat (2013), tenaga uap memiliki kemampuan untuk mendegradasi struktur kompleks lignoselulosa. Pada penelitian Wu *et al.* (2011), menyatakan bahwa suhu *pretreatment* yang lebih tinggi (50 °C) memudahkan proses pelepasan hemiselulosa dan lignin serta laju delignifikasi bisa mencapai 90%. Sementara senyawa kafein tidak menunjukkan terjadinya degradasi akibat *pretreatment hydrothermal pressure* yang disebabkan karena waktu yang digunakan singkat yaitu 5 menit. Hal ini didukung oleh Kuncoro dkk. (2018) yang telah melakukan penelitian pengukusan biji kopi menggunakan autoklaf dengan suhu (110-120 °C) selama 7 jam, menyatakan bahwa semakin tinggi suhu dan semakin lama pengukusan menggunakan autoklaf menunjukkan adanya kecenderungan penurunan kafein pada biji kopi walaupun nilainya kecil.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang didapat pada penelitian ini, dapat diambil kesimpulan bahwa perlakuan *pretreatment* ozonolisis dan *hydrothermal pressure* sebelum proses ekstraksi terbukti meningkatkan perolehan senyawa bioaktif ekstrak kulit biji kakao. Metode *pretreatment* tersebut menunjukkan pengaruh positif terhadap perolehan senyawa total tanin dan aktivitas antioksidan sedangkan pada senyawa kafein tidak menunjukkan pengaruh nyata. Metode *pretreatment* ozonolisis menunjukkan hasil terbaik dalam meningkatkan perolehan kadar kafein sebesar 49,79% yaitu menjadi sebanyak 1,083 mg/g. Sementara metode *pretreatment hydrothermal pressure* memberikan hasil terbaik dalam

meningkatkan perolehan total tanin sebesar 55,19% yaitu menjadi sebanyak 9,42 mg/g. Selain itu diketahui juga bahwa semakin tinggi konsentrasi tanin, semakin tinggi pula nilai aktivitas antioksidan yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini menggunakan fasilitas laboratorium yang dimiliki oleh Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran dan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung. Untuk itu, peneliti mengucapkan banyak terimakasih atas dukungan fasilitas dan bimbingan teknis selama pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, L., & Efiyanti, L. (2015). Pengaruh perlakuan delignifikasi terhadap hidrolisis selulosa dan produksi etanol dari limbah berlignoselulosa. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*. 33(1), 69-80.
- Albertini, B., Schoubben, A., Guarnaccia, D., Pinelli, F., Vecchia, M.D., Ricci, M., Renzo, G.C.D., & Blasi, P. (2015). Effect of fermentation and drying on cocoa polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63(45), 9948-9953.
- Amarowicz, R. (2007). Tannins: the new natural antioxidants?. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109, 549-551.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.). Arlington: Assoc. Off. Anal. Chem.
- Botella-Martínez, C., Lucas-Gonzalez, R., Ballester-Costa, C., Pérez-Álvarez, J.Á., Fernández-López, J., Delgado-Ospina, J., Chaves-López, C., & Viuda-Martos, M. (2021). Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells coproducts: Effect of particle size on chemical composition, bioactive compound content and antioxidant activity. *Agronomy*. 11(2), 401.
- Coco, F.L., Lanuzza, F., Micali, G., & Cappellano, G. (2007). Determination of theobromine, theophylline, and caffeine in by-products of cupuacu and cacao seeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 45(5), 273-275.
- Deaville, E.R., Givens, D.I., Mueller-Harvey, I. (2010). Chestnut and mimosa tannin silages: Effects in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilisation and losses. *Animal Feed Science and Technology*. 157(3-4), 129-138.
- Dewi, I.G.A.M., Putra, G.P.G., & Wrsiati, L.P. (2021). Karakteristik ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai sumber antioksidan pada perlakuan suhu dan waktu maserasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 9(1), 1-12.
- Diniyah, N., Bulgis, U.M., & Marchianti, A.C.N. (2020). *Antioxidant activity and phytochemical compositions of Mucuna pruriens L. in different conditions of time and temperature extraction*. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 1177 012042.
- Hidayat, M.R. (2013). Teknologi *pretreatment* bahan lignoselulosa dalam proses produksi bioetanol. *Biopropal Industri*, 4(1), 33-48.
- Kim, K.H., Lee, K.W., Kim, D.Y., Park, H.H., Kwon, I.B., & Lee, H.J. (2004). Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. *Process Biochemistry*. 39(12), 2043-2046.
- Kuncoro, S., Sutiarsa, L., Karyadi, J.N.W., & Masithoh, R.E. (2018). Kinetika reaksi penurunan kafein dan asam klorogenat biji kopi robusta melalui pengukusan sistem tertutup. *Agritech*, 38(1), 105-111.
- Kurniawati, N. (2015). Ekstraksi senyawa polifenol melalui degradasi biomassa lignoselulosa kulit kopi menggunakan konsorsium aktinomiset. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor: Tidak diterbitkan.
- Kusumaningsih, T., Asriyana, N.J., Wulandari, S., Wardani, D.R.T., & Fatikhin, K. (2015). Pengurangan kadar tanin pada ekstrak stevia rebaudiana dengan menggunakan karbon aktif. *Alchemy*, 11(1), 81-89.
- Momuat, L.I., Suryanto, E., Rantung, O., Korua, A., & Datu, H. (2019). Perbandingan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan antara sagu baruk segar dan kering. *Chemistry Progress*. 8(1), 17-24.
- Rohmah, Y. (2022). *Outlook Komoditas Perkebunan Kakao* (Susanti, A.A. & Widiyanto, R.K.P. (eds.)). Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal - Kementerian Pertanian.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell—A by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*. 12(4), 1123.
- Rosyidi, D., Purwadi, & Thohari, I. (2019). Characteristics of catechin extracted from cocoa husks using microwave assisted extraction (MAE). *Biodiversitas*, 20(12), 3626-3631.
- Ruiz, H.A., Conrad, M., Sun, S.N., Sanchez, A., Rocha, G.J.M., Romaní, A., Castro, E., Torres, A., Rodríguez-Jasso, R.M., Andrade, L.P., Smirnova, I., Sun, R.C., & Meyer, A.S. (2020). Engineering aspects of

- hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresour. Technol.* 299, p.122685.
- Schultz-Jensen, N., Kádár, Z., Thomsen, A.B., Bindslev, H., & Leipold, F. (2011). Plasma-assisted pretreatment of wheat straw for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165(3-4), 1010–1023.
- Shonisani, N. (2010). *Effect of brewing temperature and duration on quality of black tea (Camellia sinensis and eual (50:50) combination of bush tea (Athrixia phylicoides dc.) and black tea*. Mini-Dissertation. Faculty of Science and Agriculture (School of Agricultural and Environmental Sciences), University of Limpopo.
- Takashina, T.A., Leifeld, V., Zelinski, D.W., Mafra, M.R., & Igarashi-Mafra, L. (2017). Application of response surface methodology for coffee effluent treatment by ozone and combined ozone/UV. *Ozone: Science & Engineering.* 40(4), 293–304.
- Travaini, R., Otero, M.D.M., Coca, M., Da-Silva, R., & Bolado, S. (2013). Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresour. Technol.* 133, 332–339.
- Utama, D. D., Djali, M., & Cahyana, Y. (2021). Kajian perbandingan metode *pretreatment* ozonasi dan pemanasan uap bertekanan terhadap polifenol dan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Pontianak Nutrition Journal.* 4(1), 86-92.
- Wu, L., Arakane, M., Ike, M., Wada, M., Takai, T., Gau, M., & Tokuyasu, K. (2011). Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Biosour. Technol.* 102(7), 4793-4799.
- Yan, S., Wu, X., Faubion, J., Bean, S.R., Cai, L., Shi, Y., Sun, X.S., & Wang, D. (2012). Ethanol-production performance of ozone-treated tannin grain sorghum flour. *Cereal Chemistry Journal.* 89(1), 30–37.
- 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.
- Zhao, S., Baik, O.D., Choi, Y.J., & Kim, S.M. (2014). Pretreatments for the efficient extraction of bioactive compounds from plant-based biomaterials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 54(10), 1283–1297.