



## Identifikasi Senyawa Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Limbah Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Varietas *Trinitario*

Celvin Haryadi, I Gede Putu Wirawan\*, Made Sritamin

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana,  
Jl. PB. Sudirman, Denpasar, 80232, Indonesia

\*Corresponding author: [igpwirawan@yahoo.com](mailto:igpwirawan@yahoo.com)

### ABSTRACT

**Identification of Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity Test of Ethanol Extract of Cocoa Bean Shell Waste (*Theobroma cacao* L.) *Trinitario* Varieties.** Cocoa is one of the mainstay commodities of plantations in Indonesia, contributing to the country's foreign exchange earnings. Byproducts such as fruit skins and pulp are produced during the production of dry cocoa beans, and waste in the form of cocoa bean husks is produced during the processing of dry cocoa beans into chocolate products. So far, cocoa bean husk waste has not been used optimally, leading to a low economic value. The purpose of this study was to determine the bioactive compounds in the skin and the levels of antioxidant compounds in cocoa bean husk waste so that it could be used as a raw material for medicine. The GC-MS analysis method was used to identify bioactive compounds in cocoa bean husk waste, and the DPPH method was used to test antioxidant activity. According to the results of the GC-MS analysis, the cocoa bean husk waste extract contains four compounds with quality value higher than 90. These four compounds are Alpha-Copaene, Copaene, Caryophyllene, and Caffeine. The antioxidant test results of the cocoa bean husk waste extract revealed an  $IC_{50}$  value of 86,213 ppm, indicating strong antioxidant activity because the  $IC_{50}$  value is between 50-100 ppm.

---

**Keywords:** Cocoa, Alpha-Copaene, Copaene, Caryophyllene, Caffeine

### PENDAHULUAN

Kakao telah menjadi salah satu komoditas andalan perkebunan bagi Indonesia yang berperan dalam penghasil devisa negara. Pada produksi biji kakao kering akan menghasilkan produk sampingan seperti kulit buah dan pulp, lalu akan dihasilkan limbah berupa kulit biji kakao pada proses pengolahan biji kakao kering menjadi produk coklat seperti coklat bubuk, coklat batang, dan coklat cair. Limbah kulit biji kakao sejauh ini belum dimanfaatkan secara optimal sehingga nilai ekonomisnya terbilang

cukup rendah. Menurut Felita (2012), kulit biji kakao mengandung beberapa komponen fungsional seperti senyawa theobromine yang dapat mengurangi batuk dengan memengaruhi ujung saraf sensorik dari saraf vagus yang berjalan melalui paru-paru, kafein, dan polifenol yang berkontribusi menyehatkan tubuh bermanfaat sebagai anti kanker, antioksidan, anti hipertensi, menghilangkan stress dan menyehatkan jantung (Kelishadi, 2005).

Secara morfologi tanaman kakao terdiri dari daun, batang, akar, kulit, buah, biji dan

bunga. Buah kakao dapat dikonsumsi langsung ataupun diolah terlebih dahulu menjadi bahan baku pembuatan coklat melalui tahap fermentasi, pencucian, pengeringan, tempring, dan roasting. Setelah melalui tahap pengolahan banyak kulit biji kakao yang terbuang dan menjadi limbah. Salah satu cara memanfaatkan kulit biji kakao yang memiliki senyawa fungsional yaitu dengan cara menjadikan kulit biji kakao sebagai bahan baku berpotensi obat. Penggunaan limbah kulit biji kakao sebagai bahan baku berpotensi obat perlu diuji kandungannya menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry serta pengujian aktivitas antioksidan sehingga diketahui senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kulit biji kakao dan kadar aktivitas antioksidan yang terkandung.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian tertarik untuk mengetahui kandungan senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak limbah kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) varietas *Trinitario*.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Waktu dan Tempat Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Universitas Udayana, Laboratorium Forensik Polresta Denpasar, dan Laboratorium Teknik Pasca Panen Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana, mulai dari bulan Maret sampai dengan bulan Juli 2021.

### **Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan pada percobaan adalah limbah kulit biji kakao yang diperoleh dari Primo chocolate Factory Jl. Verdacchi, Pejaten, Kabupaten Tabanan, Bali, Bahan untuk analisis fitokimia dan uji kadar aktivitas antioksidan adalah pelarut etanol 96 persen, ekstrak kulit biji kakao dan DPPH. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah glass

filtration with vacuum, rotary evaporator, timbangan analitik, blender, pipet volume, pipet tetes, gelas beker, gelas ukur, erlenmeyer, labu ukur, tabung reaksi, mikropipet, toples, pisau, aluminium foil, kertas saring, kamera, spektrofotometri, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

### **Persiapan Sampel**

Sampel kulit biji kakao dikeringkan terlebih dahulu dengan oven dengan suhu 40°C sekitar 24 jam. Haluskan kulit biji kakao yang telah dikeringkan dengan menggunakan blender sehingga menjadi bubuk lalu ukur beratnya menggunakan timbangan analitik. Sampel kemudian dipersiapkan untuk ekstraksi di Laboratorium Sumber Daya Genetika dan Biologi Molekuler Universitas Udayana.

### **Ekstraksi Kulit Biji kakao**

Kulit biji kakao di ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 persen dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:10. Kemudian di lakukan proses maserasi selama 3 x 24 jam pada suhu ruang dalam keadaan tertutup dengan sesekali dikocok dan terhindar dari sinar cahaya langsung. Penyaringan dilakukan dengan cara memisahkan filtrat dari residunya menggunakan kertas saring dan alat filter vakum. Ekstrak dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Sampel kemudian dipersiapkan untuk analisis GCMS terhadap senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidan.

### **Identifikasi Ekstrak Kulit Biji Kakao Menggunakan GC-MS**

Ekstrak kental yang telah didapatkan akan diidentifikasi kandungan senyawa fitokimianya menggunakan alat GC-MS. Pertama ekstrak kental diambil sebanyak 1 mg dan dilakukan pengenceran sepuluh kali. Selanjutnya dimasukkan kedalam alat

*sentrifuge* selama 3 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah itu cairan bening hasil *sentrifuge* yang sudah homogen tersebut dideteksi, dengan cara pipet 1 µl cairan bening paling atas menggunakan split, lalu diinjeksikan ke dalam injector dengan kolom HP-5MS U, ukuran panjang kolom 30 m, diameter kolom 0,25 mm, dan ketebalan kolom fase diam 0,25 µm. analisis sampel ekstrak kulit biji kakao menggunakan gas N<sub>2</sub> sebagai carier dan split 1:50. Temperatur oven diatur pada lima menit awal disuhu 70°C, perlahan-lahan temperatur ditingkatkan rata-rata 10°C/menit hingga mencapai suhu 290°C. Suhu 290°C dipertahankan selama 3 menit. Proses ini memakan waktu selama 30 menit terhitung sejak sampel diinjeksi ke dalam inlet instrument. selanjutnya senyawa yang terdapat dalam sampel diidentifikasi dengan membandingkan waktu retensi masing-masing puncak kromatografi dengan senyawa yang terdapat didalam database.

#### Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao

Penentuan uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH mengacu pada (Khan et al., 2012). Sampel yang digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan adalah ekstrak yang diperoleh dari kulit biji kakao. Tahapan awal adalah pembuatan sampel uji yang di larutkan dalam etanol dengan beberapa konsentrasi Lalu ditambahkan larutan stok DPPH dengan perbandingan volume 1:1 kemudian dikocok dengan vorteks selama 2 menit. Campuran tersebut disimpan di ruangan gelap pada suhu ruang selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm dengan cara memindahkan larutan yang sudah dibuat ke dalam kuvet dengan cara memipet larutan sebanyak batas yang telah di tentukan pada kuvet yang di gunakan, untuk pengukuran absorbansi awal yaitu blanko dan blanko yang digunakan yaitu

larutan DPPH tanpa sampel lalu di lanjutkan dengan pengukuran absorbansi sampel uji yang telah dibuat dengan beberapa konsentrasi. Persen penghambatan dapat dihitung dengan menggunakan persamaan.

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \quad (1)$$

Nilai konsentrasi dari masing-masing larutan dan hasil perhitungan persen antioksidan di input ke dalam program microsoft excel untuk mendapatkan hasil dari kurva persamaan regresi linear aktivitas antioksidan  $y = ax + b$ , lalu dikonversikan ke nilai IC<sub>50</sub> Nilai y merupakan 50 dan nilai x merupakan konsentrasi dari sampel. IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan. Molyneux (2004) juga melaporkan bahwa suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat apabila nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 50 ppm, aktivitas kuat apabila nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan hasil antara 50-100 ppm, aktivitas sedang apabila nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan hasil antara 100-150 ppm dan lemah bila nilai IC<sub>50</sub> berada diantara 150-200 ppm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Bahan

Hasil ekstraksi kulit biji kakao menggunakan 100 gr limbah kulit biji kakao yang telah di haluskan menggunakan blender dan diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 1000 ml dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:10, didapatkan filtrat sebanyak 900 ml berwarna coklat kekuningan (Gambar 1). Adanya pengurangan volume yang di sebabkan oleh pelarut etanol yang mudah menguap dan juga terbawa oleh residu. Filtrat kemudian di pekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 35°C dengan perputaran 128 rpm. Didapatkan

ekstrak kental berwarna coklat kekuningan sebanyak 5 gr.

**Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)**

Analisis senyawa fitokimia ekstrak kulit biji kakao di lakukan dengan mennggunakan alat GC-MS. Didapatkan hasil kromatogram pada sampel ekstrak kulit biji kakao (Gambar 2) memperlihatkan 4 peak yang dapat terdeteksi sehingga ada 8 senyawa yang terkandung didalam sampel kulit biji kakao. Senyawa yang dapat terdeteksi (Tabel 1).

Berdasarkan hasil kromatogram terdapat 4 puncak yang terdeteksi oleh alat GC-MS terdiri dari peak 1 yang memiliki waktu retensi 3.604 dan persen area 26.92%, peak 2 memiliki waktu retensi 12.190 dan

persen area 14.22%, peak 3 memiliki waktu retensi 12.811 dan persen area 7.54%, dan pada peak 4 memiliki waktu retensi 17.749 dan persen area 51.32%. Berikut senyawa – senyawa yang terdeteksi.

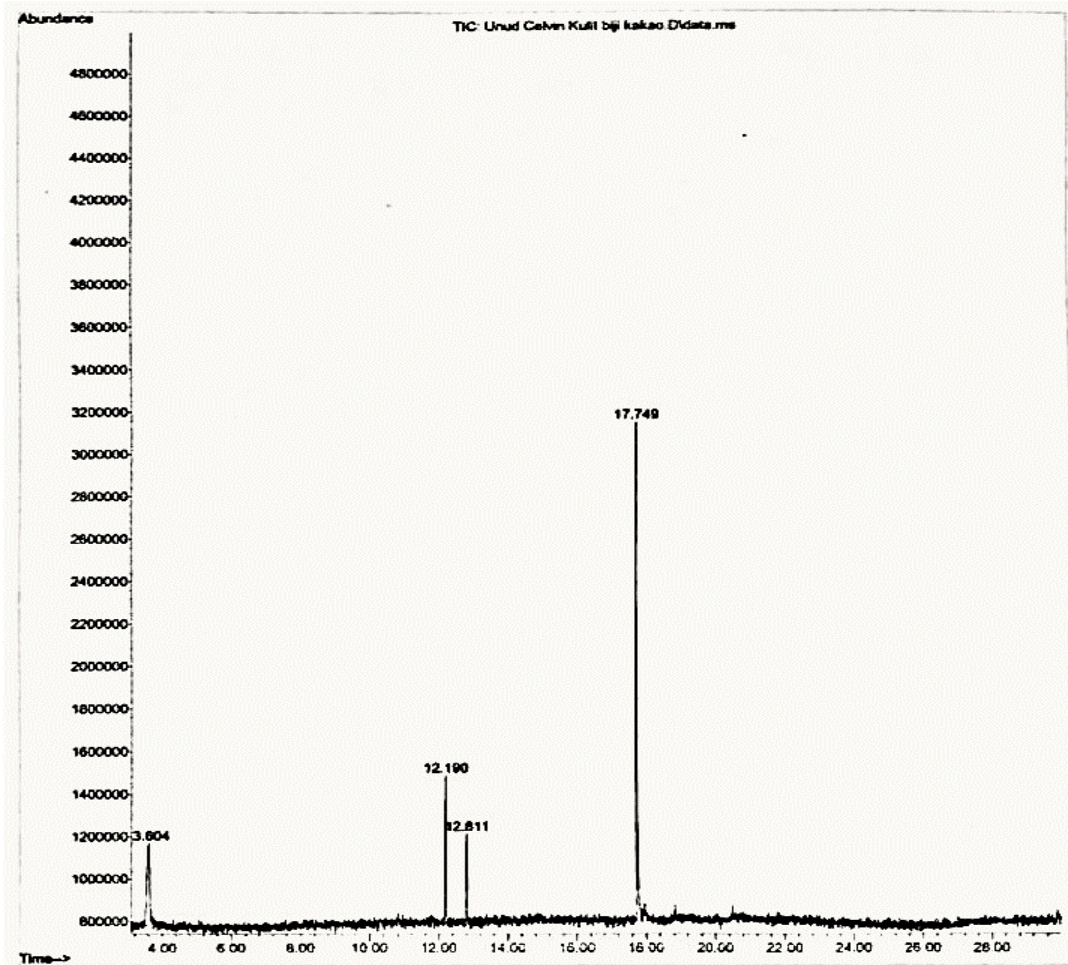
Dalam pengujian ekstrak kulit biji kakao terdapat empat puncak yang teridentifikasi pada waktu retensi 3.604, 12.198, 12.811, 17.749. Dari beberapa senyawa yang di temukan terdapat empat senyawa yang memiliki nilai “qual”>90. Artinya senyawa yang terdeteksi dapat di katakan adalah senyawa yang benar atau serupa dengan senyawa yang terdaftar pada database, beberapa nama senyawa yang terdaftar adalah alfa-Copaene, Copaene, caryophyllene, dan caffein.

Tabel 1. Hasil analisa uji GC-MS ekstrak kulit biji kakao

No	RT	Area (%)	Nama senyawa	Qual
1	3.604	26.92	4-Hydroxy-3[[1,3-dihydroxy-2-propoxy]methyl]-1H-pyrazole-5-carboxamide	38
			Dimethylamine, N-(neopentyloxy)-	9
			1,2,3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)]-	9
2	12.198	14.22	.alfa.-Copaene	99
			Copaene	99
			1-Naphthalenecarboxylic acid, decahydro-1,4a-dimethyl-6-methylene-5-(3-methyl-2,4-pentadienyl)-, methyl ester, [15-[1.alpha.,4a.alpha.,5.alpha.(z),8a.beta]]-	60
			caryophyllene	91
3	12.811	7.54	caryophyllene	91
4	17.749	51.32	caffeine	96



Gambar 1. Ekstrak Kental Kulit Biji Kakao (Sumber : Dokumentasi Pribadi)



Gambar 2. Grafik hasil uji GC-MS ekstrak kulit biji kakao

Menurut Nishida (2000) Copaene merupakan nama kimia umum (atau sepele) dari hidrokarbon cair berminyak yang ditemukan di sejumlah tanaman penghasil minyak esensial. memiliki manfaat sebagai antimikroba, sitotoksik dan antiproliferasi. Struktur molekul Copaene dapat dilihat pada Gambar 3.

Menurut Turkez (2014) Alpha copaene memiliki sifat antimikroba, sitotoksik dan antiproliferasi. Alpha copaene menunjukkan aktivitas anti mikroba yang cukup besar terhadap bakteri gram positif dan negatif. Hal ini dikarenakan alpha copaene memiliki kemampuan untuk mengurangi pertumbuhan atau berkembangbiakan pesat yang menghasilkan jaringan baru, bagian, sel, atau

keturunannya. Dalam jumlah yang kecil, alpha copaene dapat dimanfaatkan dalam merusak sel yang merugikan (misal; sel kanker) atau bersifat sitotoksik. Namun, sifat sitotoksik dari senyawa ini bukan hanya terjadi pada sel yang merugikan, tetapi kerusakan juga akan terjadi pada sel normal. Sehingga kandungan senyawa alpha copaene dalam minyak nilam perlu memiliki batas maksimal. Struktur molekul Alpha copaene dapat dilihat pada Gambar 4.

Menurut M. Naufal H. Caryophyllene sering terdapat pada minyak esensial terutama minyak cengkeh. Caryophyllene memiliki peran sebagai obat antiinflamasi nonsteroid, pewangi, dan penarik serangga. pada industri farmasi, senyawa caryophyllene mempunyai

aktivitas farmakologi sebagai analgesik, antibakterial, antidepresi, antiinflamasi, antiproliferatif, antioksidan, anxiolitik, dan neuroprotektif. Struktur molekul Caryophyllene dapat dilihat pada Gambar 5.

Caffeine adalah alkaloid methylxanthine yang ditemukan dalam biji, kacang-kacangan, atau daun dari sejumlah tanaman asli dari amerika selatan dan asia timur yang secara struktural terkait dengan adenosin dan bertindak terutama sebagai antagonis reseptor adenosin dengan aktivitas psikotropika dan anti-inflamasi. Caffeine merupakan komponen utama kopi, teh, dan coklat. Pada manusia caffeine dapat bertindak sebagai stimulan sistem saraf pusat, juga dapat bertindak sebagai pestisida alami bagi tanaman. (Pubchem, 2004). Struktur molekul Caffeine dapat dilihat pada Gambar 6.

#### Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Kulit Biji Kakao

Hasil uji aktivitas antioksidan kulit biji kakao menggunakan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV.

Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa setiap konsentrasi memiliki aktivitas antioksidan dan nilai absorbansi yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi pada ekstrak maka akan menunjukkan nilai absorbansi mengalami penurunan dan pada aktivitas antioksidan akan mengalami peningkatan.

Hasil uji antioksidan ekstrak kulit biji kakao menunjukkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 86,213 ppm dimana  $IC_{50}$  yang semakin kecil menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan (Gambar 7). Molyneux (2004) melaporkan bahwa suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat apabila nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50 ppm, aktivitas kuat apabila nilai  $IC_{50}$  antara 50-100 ppm, aktivitas sedang apabila nilai  $IC_{50}$  antara 100-150 ppm dan lemah bila nilai  $IC_{50}$  antara 150-200 ppm Molyneux (2004). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak kulit biji kakao dengan metode maserasi pada penelitian ini tergolong memiliki aktivitas

antioksidan kuat, artinya memiliki hambatan yang cukup efektif untuk menghambat radikal DPPH.

Hasil  $IC_{50}$  dengan persamaan regresi linear menggunakan Microsoft Excel 2010 for Windows didapatkan nilai:

$$a = 7,2664$$

$$b = 495,67$$

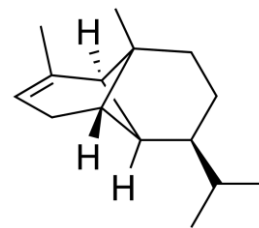
$$\text{maka, } y = bx + a \quad (2)$$

$$50 = 495,67x + 7,2664$$

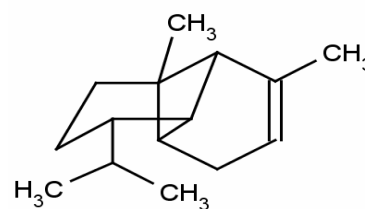
$$x = \frac{50-7,2664}{495,67} \quad (3)$$

$$x = 0,086213 \text{ mg/mL} \quad (4)$$

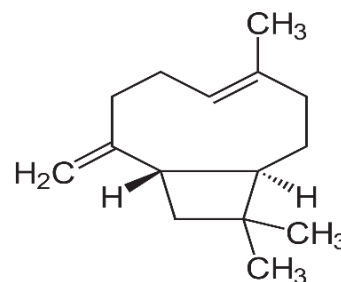
$$x = 86,213 \text{ ppm} \quad (5)$$



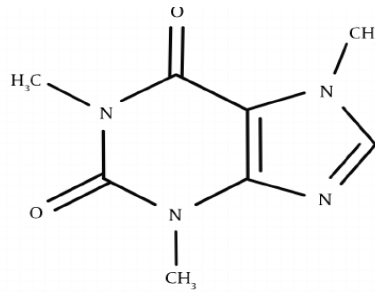
Gambar 3. Struktur molekul copaene



Gambar 4. Struktur molekul Alpha copaene



Gambar 5. Struktur molekul Caryophyllene

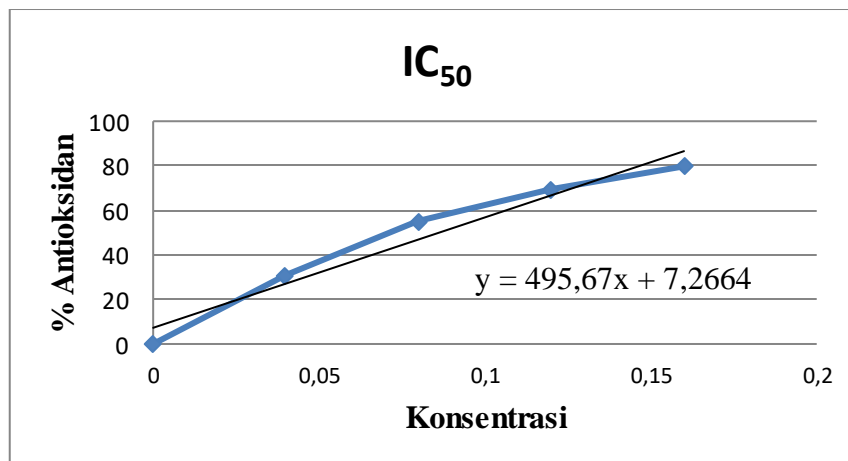


Gambar 6. Struktur molekul Caffeine

Tabel 2. Nilai aktivitas antioksidan (%) ekstrak kulit biji kakao

Konsentrasi Ekstrak Mg/ml	Absorbansi sampel	% aktivitas antioksidan	Persamaan ( $y = bx + a$ )	IC50
0	0,578	0		
0,04	0,401	30,623	$y = 495,67 + 7,2664$	86,213
0,08	0,261	54,844		
0,12	0,177	69,377		
0,16	0,117	79,757		

Keterangan:  $y =$  % Inhibisi,  $a =$  Konstanta,  $b =$  Gradien,  $x =$  Konsentrasi DPPH  
 $IC_{50} =$  Konsentrasi efektif penghambat DPPH



Gambar 7. Grafik Analisis Regresi konsentrasi terhadap % antioksidan

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa Ekstrak Kulit biji kakao mengandung empat senyawa kimia yang memiliki nilai quality sama atau di atas 90 dari nilai 1-100 melalui

hasil uji dengan alat GC-MS, empat senyawa yang terkandung yaitu alfa-Copaene, Copaene, caryophyllene, dan caffeine yang dapat di manfaatkan sebagai bahan baku berpotensi obat. Ekstrak kulit biji kakao memiliki hasil uji antioksidan menggunakan metode DPPH

dengan nilai IC50 sebesar 86,213 ppm dengan kategori aktivitas antioksidan kuat.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Laboratorium Rekayasa Genetika Universitas Udayana, Laboratorium Forensik Polresta Denpasar, Laboratorium Analisis Pangan Universitas Udayana atas segala fasilitas yang telah diberikan dalam kelancaran penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Felita. 2012. Changes in total polyphenols, o-diphenols and anthocyanin concentrations during fermentation of pulp preconditioned Cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *International Food Research Journal*, 19(3): 1071-1077.
- Ikalinus, R., K. Wisyaatuti Setiasih. 2015. Skrining fitokimia ekstrak etanol kulit batang kelor. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*. 4 (1): 71-79.
- Indira Lanti Kayaputri, Debby M. Sumanti, Mohamad Djali, Rossi Indiarjo, Dita Listya Dewi. 2014. Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). Jurusan Teknologi Industri Pangan, Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Kelishadi. 2005. Cacao to Cocoa to Chocolate : Helthy Food? *ARYA Journal* Vol. 1., issue 1 : 28-34.78-481.
- Khan H, Khan MA, Dullah A. 2012. Antibacterial, antioxidant and alkaloid and sterols content of decoction of Joshanda: Identification of components indentification through thin layer chromatography. *Toxicology and industrial Health*, doi: 10.1177/0748233712468023.
- Naufal H. 2018. IPB Kegunaan Eugenol, Metil Eugenol, dan Caryophyllene dalam industri. Institut Pertanian Bogor, bogor. F34120053.
- Molyneux P. 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakar J. Sci Technol.* , 26(2), 211-21
- Nishida. 2000. *Journal of Chemical Ecology*. 26: 87. doi:10.1023/A:1005489411397.
- Pubchem. 2004. Caffeine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine>. (diakses pada 19 Maret 2022)
- Turkez H, Togar B, Polat E. Olive leaf extract genetic and oxidative damage in rats. *Cytotechnology*. 2012;64:459-464.