

**POTENSI EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma Cacao L.*)
SEBAGAI ALTERNATIF DALAM PERBAIKAN KADAR GULA DARAH :
UJI PADA TIKUS DIABETES**

**POTENTIAL OF COCOA POD HUSK (*Theobroma Cacao L.*) EXTRACT AS
AN ALTERNATIVE IN IMPROVING BLOOD SUGAR LEVELS:
TEST ON DIABETIC RATS**



RITA IRMA

K013211051



**PROGRAM DOKTORAL ILMU KESEHATAN MASYARAKAT
FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**POTENSI EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma Cacao L.*)
SEBAGAI ALTERNATIF DALAM PERBAIKAN KADAR GULA DARAH :
UJI PADA TIKUS DIABETES**

RITA IRMA

K013211051



**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN MASYARAKAT
PROGRAM DOKTORAL FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**POTENTIAL OF COCOA POD HUSK (*Theobroma Cacao* L.) EXTRACT AS
AN ALTERNATIVE IN IMPROVING BLOOD SUGAR LEVELS :
TEST ON DIABETIC RATS**

RITA IRMA

K013211051



**DOCTORAL STUDY PROGRAM OF PUBLIC HEALTH SCIENCE
PUBLIC HEALTH FACULTY
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

**POTENSI EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma Cacao L.*)
SEBAGAI ALTERNATIF DALAM PERBAIKAN KADAR GULA DARAH :
UJI PADA TIKUS DIABETES**

Disertasi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor

Program Studi Ilmu Kesehatan Masyarakat

Disusun dan diajukan oleh

**RITA IRMA
K013211051**

kepada

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN MASYARAKAT
PROGRAM DOKTORAL FAKULTAS KESEHATAN MASYARAKAT
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**POTENTIAL OF COCOA POD HUSK (Theobroma Cacao L.) EXTRACT AS
AN ALTERNATIVE IN IMPROVING BLOOD SUGAR LEVELS :
TEST ON DIABETIC RATS**

Dissertation

as one of the requirements for achieving a doctoral degree

Study Program of Public Health Science

Prepared and submitted by

**RITA IRMA
K013211051**

to

**DOCTORAL STUDY PROGRAM OF PUBLIC HEALTH SCIENCE
PUBLIC HEALTH FACULTY
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

DISERTASI

**POTENSI EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma Cacao L.*)
SEBAGAI ALTERNATIF DALAM PERBAIKAN KADAR GULA DARAH :
UJI PADA TIKUS DIABETES**

**RITA IRMA
NIM. K013211051**

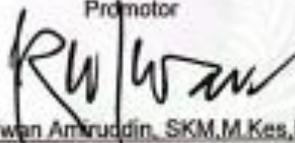
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor pada tanggal Sebelas
Bulan Juni tahun Dua Ribu Dua Puluh Empat dan dinyatakan telah
Memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Doktor Ilmu Kesehatan Masyarakat
Fakultas Kesehatan Masyarakat
Universitas Hasanuddin
Makassar

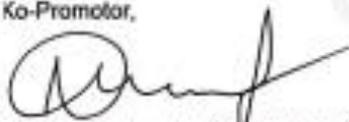
Mengesahkan:

Promotor



Prof. Dr. Ridwan Amiruddin, SKM, M.Kes, M.Sc, PH
NIP. 19671227 198212 1 001

Ko-Promotor,



Prof. Dr. Nurhaedar Jafar, Apt, M.Kes
NIP. 19641231 199002 2 001

Ko-Promotor



Dr. Wahiduddin, SKM, M.Kes
NIP. 19760407 200501 1 004

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kesehatan Masyarakat



Prof. Dr. Anwarul Karim Syarif, SKM, M.Kes, M.Med.Ed
NIP. 19670317 199903 1 001

Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat
Universitas Hasanuddin,



Prof. Saiful Palluhun, SKM, M.Kes, M.Sc, PH, Ph.D
NIP. 19720627 200112 1 001

DISSERTATION

POTENTIAL OF COCOA POD HUSK (*Theobroma Cacao L.*) EXTRACT AS
AN ALTERNATIVE IN IMPROVING BLOOD SUGAR LEVELS :
TEST ON DIABETIC RATS

RITA IRMA

NIM. K013211051

The dissertation has been examined and defended in front of the Dissertation
Examination Committee on the eleventh day of June two thousand twenty-four,
and declared eligible

Approved by

Supervisor Commission,

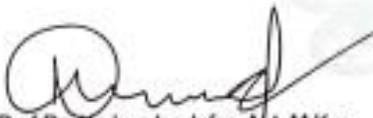
Supervisor



Prof. Dr. Ridwan Aminuddin, SKM, M.Kes, M.Sc, PH
NIP. 19671227 199212 1 001

Co-supervisor,

Co-supervisor,



Prof. Dr. Nurhaedar Jafar, Apt, M.Kes
NIP. 19641231 199002 2 001



Dr. Wahiduddin, SKM, M.Kes
NIP. 19760407 200501 1 004

Head of Study Program doctoral degree
Public Health,

Dean of the Faculty of Public Health
Universitas Hasanudin



Prof. Dr. Amaluddin Syah, SKM, M.Kes, M.Med.Ed
NIP. 19670817 199603 1 001



Prof. Suki Perituri, SKM, M.Kes, M.Sc, PH, Ph.D
NIP. 19620531 200112 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, disertasi berjudul "Potensi Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Sebagai Alternatif Dalam Perbaikan Kadar Gula Darah : Uji Pada Tikus Diabetes" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Prof. Dr. Ridwan Amiruddin, SKM, M.Kes, M.Sc.PH sebagai Promotor dan Prof. Dr. Nurhaedar Jafar, Apt.M.Kes sebagai co-promotor-1 serta Dr. Wahiduddin, SKM, M.Kes sebagai co-promotor-2). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari isi disertasi ini telah dipublikasikan di Jurnal (*Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, Volume 22, No. 4, hal. 441 - 454, dan DOI <http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2023.1187>) sebagai artikel dengan judul "*How Does Cocoa Waste Affect Health? A Systematic Review*" dan di Jurnal (*Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, Volume 23, No. 2, hal. 163 - 177 dan DOI : <https://doi.org/10.17306/J.AFS.001202>) dengan judul artikel "*Evaluation of The Bioactive Composition of Cocoa Pod Husk Sulawesi Island, Indonesia for Health Benefits*". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 10 Juni 2024



RITA IRMA
NIM. K013211051

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirabbil Alamin, segala puji dan syukur kepada Allah SWT, Tuhan seluruh alam, pengatur kehidupan terbaik, atas rahmat dan kasih Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Disertasi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Sebagai Alternatif Dalam Perbaikan Kadar Gula Darah : Uji Pada Tikus Diabetes”. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada Rahmatan Lil-Aalamin, baginda Nabi Muhammad SAW, yang telah mengeluarkan umatnya dari zaman kebodohan kepada zaman dikenalnya ilmu pengetahuan.

Penulis menyadari dalam penyusunan Disertasi ini tidak terlepas dari keterlibatan berbagai pihak yang telah memberikan arahan, masukan serta bantuan yang sangat berarti untuk perbaikan Disertasi ini. Oleh karenanya penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya serta penghormatan yang tinggi kepada bapak Prof. Dr. Ridwan Amiruddin, SKM, M.Kes, M.Sc.PH selaku promotor, ibu Prof. Dr. Nurhaedar Jafar, Apt. M.Kes dan Bapak Dr. Wahiduddin, SKM, M.Kes selaku ko-promotor, yang telah banyak meluangkan waktu dan memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran, keikhlasan. Insya Allah ini akan menjadi catatan amal kebaikan bagi bapak/ibu promotor dan ko-promotor dan Allah SWT akan membalasnya dengan berlipat ganda di yaumul hisab nanti, Aamiin.

Kepada kedua orang tua tercinta dan begitu saya kasihi, ayahanda H. Bachtiar Fatiha, dan ibunda Hj. Rosmina Muin, saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, kasih sayang dan pengorbanan serta motivasi selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada suami tercinta (Rochmad Munandar, SE., MM), adik-adikku tersayang (Chaerul Irwan, S.Si, Rika Irdayani, S.Kom, Irwin Agustiawan, S.Kom), keponakan, tante, sepupu, ipar dan seluruh keluarga besar atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Dalam kesempatan ini pula penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc selaku Rektor Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Doktorat Ilmu Kesehatan Masyarakat di Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Prof. Sukri Palutturi, S.KM., M.Kes., M.Sc.PH., Ph.D selaku Dekan Fakultas Kesehatan Masyarakat (FKM) yang telah memberikan kesempatan kepada penulis mendapatkan pengalaman Studi Doktorat Ilmu Kesehatan Masyarakat yang begitu membanggakan di Universitas Hasanuddin.
3. Bapak Prof. Dr. Aminuddin Syam, S.KM., M.Kes., M.Med.Ed., selaku Ketua Program Studi S3 Kesehatan Masyarakat FKM UNHAS yang telah banyak memberikan fasilitasi kepada penulis demi kelancaran proses pendidikan ini.
4. Bapak Dr. Toto Sudargo, M.Kes selaku penguji eksternal, bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt, bapak Sudirman Nasir, S.Ked., MWH., Ph.D dan Ibu Dr. Apik Indarty Moedjiono, SKM., M.Si selaku tim penguji internal yang telah memberikan masukan yang membangun kepada penulis dalam penyempurnaan disertasi ini.
5. Bapak Dirjen Tenaga Kesehatan Kementerian Kesehatan RI dan Direktur Poltekkes Kendari Kementerian Kesehatan RI atas tugas dan pembiayaan yang diberikan kepada penulis untuk melanjutkan pendidikan doktorat di Universitas Hasanuddin
6. Seluruh dosen dan staf prodi S3 (ibu Chia dan ibu Irma) Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Hasanuddin yang telah banyak memberikan bantuan yang sangat bermanfaat bagi penulis.

7. Kepala laboratorium Fakultas Farmasi universitas Hasanuddin ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt, bapak Prof. Firzan Nainu, S.Si, M.Biomed., sc., Ph.D, bapak Habibie, S.Si, M.Pharm.sc., Ph.D., Apt, bapak Muhammad Nur Amir, S.Si, M.Si, Apt, selaku dosen di fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang memberikan izin dan banyak memberikan arahan selama penulis melakukan penelitian, ibu Syamsiah, S.T selaku laboran di laboratorium Biofarmaks, ibu Dewi Primayanti Laela, S.Si selaku laboran di laboratorium Biofarmaka universitas Hasanuddin yang mendampingi penulis selama melakukan penelitian serta bapak Akhmad Rifai laboraton Teknik Kimia Politeknik Ujung Pandang.
8. Drh. Nurul Sulfi Andini, M.Sc yang telah membantu dan memberikan masukan pada penulis dalam analisis histopatologi di laboratorium terpadu RSH fakultas kedokteran Uniersitas Hasanuddin.
9. Rekan seperjuangan tugas belajar dari Kemenkes Poltekkes Kendari Risma, Sahmad, Feryani dan Sudarmin yang terus saling memberikan semangat untuk maju bersama, turut membantu dan melewati semua suka duka perkuliahan, semoga Allah SWT selalu memberikan kemudahan dan perlindungan bagi kita semua dalam menjalani cita- cita kehidupan.
10. Rekan-rekan seangkatan mahasiswa S3 Ilmu Kesehatan Masyarakat tahun 2021 yang begitu saya banggakan. Terimakasih atas kebersamaannya dan semangat untuk maju dan sukses bersama. Semoga kita akan selalu dipertemukan pada kesempatan-kesempatan berharga lainnya.
11. Semua pihak yang telah ikut membantu dalam kelancaran penyusunan hasil disertasi ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa Disertasi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga saran dan kritik yang konstruktif sangat diharapkan demi perbaikan dan kemajuan penulisan di masa yang akan datang.

Akhir kata semoga hasil disertasi ini dapat memberikan sumbangsih ilmiah secara referensial bagi kemajuan pengembangan dunia pendidikan. Amin Ya Robbal Alamiin..

Makassar, Juni 2024

Penulis,

Rita Irma

ABSTRAK

RITA IRMA. **Potensi Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*) Sebagai Alternatif Dalam Perbaikan Kadar Gula Darah : Uji Pada Tikus Diabetes** (dibimbing oleh Ridwan Amiruddin, Nurhaedar Jafar, dan Wahiduddin,).

Latar belakang. Kulit Buah Kakao (KBK) biasanya hanya menjadi limbah perkebunan, tetapi beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa itu bisa menjadi alternatif makanan fungsional. Namun, belum diketahui seberapa aman dan efektif terhadap diabetes. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan mempelajari potensi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao l.*) sebagai alternatif dalam perbaikan kadar gula darah melalui uji pre klinis pada tikus Diabetes. **Metode.** Penelitian dibagi tiga tahap, yakni: 1). Mengukur senyawa bioaktif dan proksimat, 2). menilai keamanan EKBK melalui uji toksisitas sub kronis oral, 3). menganalisis pengaruh EKBK terhadap gula darah, kolesterol, berat badan serta mempelajari waktu kesintasan/tahan hidup (*survival rate*) tikus Diabetes. Analisis data seluruhnya dilakukan menggunakan aplikasi SPSS 25. **Hasil.** Polifenol total rata-rata 98,68 mg asam galat E/gram sampel/EKBK; Flavonoid total 3,58 mg quersetin E/gram sampel/EKBK; Tanin 79,12 mg EGCG E/gram sampel/EKBK. Proksimat berupa kadar air rata-rata 25,63%; abu 8,48%, kadar lemak 0,65%, kandungan protein 10,34%, dan karbohidrat termasuk serat kasar 54,91%. Sebanyak 23 senyawa lain yang terdeteksi dalam EKBK melalui analisis GC-MS. Berdasarkan struktur kimia seluruh senyawa tersebut merupakan kelompok senyawa turunan terpenoid dan aromatik, asam lemak, serta steroid. 4 komposisi terbesar EKBK yang memiliki puncak dan persentase area paling tinggi yakni butyric acid (25,91%), Hexadecanoic acid, Methyl ester (24,35%), 13-Docosenoic acid, Methyl ester, (Z)-(CAS) (11,05%), dan 2-Furancarboxaldehyde (CAS) (8,14%). Secara keseluruhan terdapat 8% mortalitas pada uji toksisitas sub kronis pada semua kelompok kecuali pada kelompok EKBK 100 mg/kgBB. Pada seluruh kelompok, tidak ada perbedaan intake makan (p 0,934), intake minum (p 0,622), BB (p 0,586), GOT (p 0,423), GPT (p 0,088), kreatinin (p 0,460), glukosa (p 0,166), bobot hati (p 0,494), bobot ginjal (p 0,151), dan seluruh kelompok terdapat perubahan histologi jaringan hati dan ginjal. Intervensi pemberian EKBK pada tikus diabetes menunjukkan tidak ada perbedaan nilai gula darah (p 0,269), kolesterol (p 0,285), BB (p 0,341) antarkelompok. Tidak ada perbedaan waktu kesintasan antara kelompok (p 0,756). Namun, kelompok yang diberikan EKBK 300 mg/kgBB memiliki ketahanan hidup yang paling lama (26 hari). Analisis KM-model menunjukkan plot survival yang terus menurun dan sebaliknya plot hazard yang terus meningkat di setiap waktu. **Kesimpulan.** Senyawa bioaktif, tingkat keamanan dan perubahan pada gula darah, kolesterol dan BB KBK serta estimasi tingkat tahan hidup yang lebih lama yang ditemukan di dalam KBK berpotensi menjadi pangan fungsional dimasa yang akan datang.

Kata kunci: ekstrak kulit buah kakao ; senyawa bioaktif ; toksisitas sub kronis ; diabetes ; kolesterol ; berat badan ; waktu kesintasan-tingkat tahan hidup.



ABSTRACT

RITA IRMA. **Potential of Cocoa Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.) as an Alternative for Improving Blood Sugar Levels: Test on Diabetic Rats** (supervised by Ridwan Amiruddin, Nurhaedar Jafar, and Wahiduddin,).

Background. Despite multiple studies showing Cocoa Pod Husk (CPH) potential as a functional food substitute, it is typically wasted on plantations. Nevertheless, it is currently unknown how safe it is, how well it works against diabetes, and how long it lasts. **Aim.** This research aims to study the potential of cocoa pod extract (CPHE) as an alternative in improving blood sugar levels through pre-clinical testing on diabetic mice. **Method.** The research was divided into three stages, namely: 1). Measuring bioactive and proximate compounds, 2). assess the safety of CPHE through oral sub-chronic toxicity tests, 3). analyzed the effect of CPHE on blood sugar, cholesterol, body weight and studied the survival rate of diabetic mice. All data analysis was carried out using the SPSS 25 application. **Results.** Total polyphenols averaged 98.68 mg gallic acid E/gram sample/CPHE; Total flavonoids 3.58 mg quercetin E/gram sample/CPHE; Tannin 79.12 mg EGCG E/gram sample/CPHE. The proximate consists of an average water content of 25.63%; ash 8.48%, fat content 0.65%, protein content 10.34%, and carbohydrates including crude fiber 54.91%. A total of 23 other compounds were detected in CPHE through GC-MS analysis. Based on the chemical structure, all of these compounds belonged to a group of terpenoid and aromatic derivative compounds, fatty acids and steroids. The 4 largest compositions of CPHE which have the highest peak and area percentage are butyric acid (25.91%), Hexadecanoic acid, Methyl ester (24.35%), 13-Docosenoic acid, Methyl ester, (Z)-(CAS) (11.05%), and 2-Furancarboxaldehyde (CAS) (8.14%). Overall there was 8% mortality in the sub-chronic toxicity test in all groups except the CPHE 100 mg/kgBW group. In all groups, there were no differences in food intake (p 0.934), drink intake (p 0.622), BW (p 0.586), GOT (p 0.423), GPT (p 0.088), creatinine (p 0.460), glucose (p 0.166) , liver weight (p 0.494), kidney weight (p 0.151), and in all groups there were changes in the histology of haemorrhagic and renal tissue. The intervention of giving CPHE to diabetic mice showed that there were no differences in blood sugar values (p 0.269), cholesterol (p 0.285), BW (p 0.341) between groups. There was no difference in survival time between groups (p 0.756). However, the group given CPHE 300 mg/kgBW had the longest survival (26 days). KM-model analysis shows a survival plot that continues to decrease and conversely a hazard plot that continues to increase at all times. **Conclusion.** CPH has the potential to become a functional meal in the future because to its bioactive ingredients, safety levels, and changes in blood sugar, cholesterol, and body weight. It also has an expected longer survival rate.

Key words : cocoa pod husk extract; bioactive compounds; sub chronic toxicity; diabetes ; cholesterol; weight ; survival rate.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGANTAR	iv
LEMBAR PENGESAHAN	vi
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	viii
UCAPAN TERIMA KASIH	ix
ABSTRAK	xi
<i>ABSTRACT</i>	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH	xvii
BAB I PENDAHULUAN UMUM	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Kegunaan Penelitian	8
1.5 Kebaruan Penelitian	8
1.6 Kerangka Teori	9
1.7 Kerangka Konsep	10
1.8 Hipotesa	10
BAB II SENYAWA BIOAKTIF EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO	11
2.1 Abstrak	11
2.2 Pendahuluan	11
2.3 Metode	14
2.4 Hasil dan Pembahasan	18
2.5 Kesimpulan	26
2.6 Daftar Pustaka	26
BAB III TOKSISITAS EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO	32
3.1 Abstrak	32
3.2 Pendahuluan	32
3.3 Metode	34
3.4 Hasil dan Pembahasan	37
3.5 Kesimpulan	52
3.6 Daftar Pustaka	52
BAB IV PENGARUH EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO TERHADAP PERUBAHAN GULA DARAH, KOLESTEROL, BERAT BADAN DAN KETAHANAN HIDUP TIKUS DIABETES	55
4.1 Abstrak	55
4.2 Pendahuluan	55
4.3 Metode	58
4.4 Hasil dan Pembahasan	62
4.5 Kesimpulan	76
4.6 Daftar Pustaka	76
BAB V PEMBAHASAN UMUM	81
Percobaan I Analisis Senyawa Bioaktif dalam Ekstrak Kulit Buah Kakao	81
Percobaan II Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Buah Kakao	83

Percobaan III Analisis Pengaruh Ekstrak Kulit Buah Kakao terhadap Gula Darah, Kolesterol, Berat Badan dan Tingkat Tahan Hidup Tikus Diabetes	84
BAB VI KESIMPULAN UMUM	90
DAFTAR PUSTAKA	92
LAMPIRAN	98

DAFTAR TABEL

Nomor urut		Halaman
2.1	Kadar Polifenol dan Flavonoid Ekstrak Kulit Buah Kakao	18
2.2	Kadar Proksimat EKBK	19
2.3	Data Puncak Senyawa 1-23 yang terdeteksi dalam EKBK	20
3.1	Penentuan Nilai Probit	38
3.2	Morbiditas Hewan selama Uji Toksisitas Sub Kronis	40
3.3	Intake Pakan dan Minum selama Uji Toksisitas	41
3.4	Parameter BB selama Studi Toksisitas sub Kronis Oral	41
3.5	Parameter Biokmia Darah selama Studi Toksisitas sub Kronis Oral	43
3.6	Parameter Bobot Organ Relatif (gram) selama Studi Toksisitas sub Kronis	44
4.1	Kandungan Nutrisi Pakan & Komposisi Diet Tinggi Lemak	63
4.2	Nilai Gula Darah Puasa, Kolesterol dan BB selama Induksi Diet Tinggi Lemak	64
4.3	Nilai Gula Darah, Kolesterol dan Berat Badan Setelah Induksi STZ	66
4.4	Perbedaan Nilai Gula Darah, Kolesterol dan Berat Badan Sebelum dan Sesudah Intervensi	67
4.5	Perbandingan Distribusi Waktu Kesintasan / Ketahanan Hidup antar Kelompok Tikus Diabetes	70

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1.1 Kerangka Teori	9
1.2 Kerangka Konsep Penelitian	10
2.1 Alur Penelitian Topik 1	17
2.2 Kurva Standar Asam Galat dan Kuersetin	18
2.3 Komposisi Senyawa dalam EKBK yang Terdeteksi melalui GC-MS	19
2.4 Struktur Senyawa Turunan Terpenoid dan Aromatik dalam EKBK	21
2.5 Struktur Senyawa Turunan Asam lemak dalam EKBK	21
2.6 Struktur Senyawa Turunan Steroid dalam EKBK	22
3.1 Alur Penelitian Topik 2.	37
3.2 Tingkat Mortalitas selama Uji Toksisitas	38
3.3 Grafik Analisis Probit LD50	39
3.4 Perkembangan BB selama Uji Toksisitas	42
3.5 Histologi Jaringan Hati dan Ginjal Tikus yang Mati selama Uji Toksisitas Berlangsung	45
3.6 Histologi Jaringan Hati Kelompok Tikus	46
3.7 Histologi Jaringan Ginjal Kelompok Tikus	48
4.1 Alur Penelitian Topik 3.	62
4.2 Nilai Gula Darah selama Induksi Diet Tinggi Lemak	65
4.3 Nilai Kolesterol selama Induksi Diet Tinggi Lemak	65
4.4 Perkembangan BB selama Induksi Diet Tinggi Lemak	66
4.5 Trend perubahan Nilai Gula Darah selama Intervensi	68
4.6 Trend perubahan Nilai Kolesterol selama Intervensi	69
4.7 Trend perubahan BB selama Intervensi	69
4.8 Plot Fungsi Tahan Hidup pada Setiap Kelompok Tikus Diabetes	70
4.9 Plot Fungsi Hazard pada Setiap Kelompok Tikus Diabetes	71

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut		Halaman
1	Rekomendasi Etik	98
2	Perhitungan LD50	99
3	Hasil Analisa Statistik	101
4	Data Kadar Total Flavonoid	125
5	Data Kadar Total Polifenol	126
6	Data Hasil Analisis Proksimat	127
7	Data Report GCMS	128
8	Dokumentasi Pengumpulan Bahan Baku dan Pembuatan Simplisia Ekstrak Kulit Buah Kakao	129
9	Dokumentasi Proses Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao	130
10	Dokumentasi Analisis Senyawa Bioaktif Ekstrak Kulit Buah Kakao	131
11	Dokumentasi Uji Toksistas Sub Kronis Ekstrak Kulit Buah Kakao	132
12	Dokumentasi Pengumpulan Data Uji Efektifitas EKBK terhadap Diabetes	134
13	Curriculum Vitae	137

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

Singkatan/Istilah	Arti dan Penjelasan
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> , merupakan enzim yang berperan dalam sistem renin-angiotensin tubuh yang mengatur volume plasma darah, limfa, dan cairan jaringan tubuh, dan vasokonstriksi arteri.
CRP	C-Reactive protein merupakan jumlah protein reaktif dalam darah dan menentukan ada tidaknya peradangan dalam tubuh.
CVD	Cardiovascular Disease (Penyakit Kardiovaskular, seperti Jantung, Hipertensi)
DBP	Diastolik Blood Pressure / Tekanan darah
Diet HC	<i>High Cholesterolemic</i> , diet tinggi kolesterol.
Diet NC	<i>Normocholesterolemic</i> , Diet dengan kadar kolesterol normal.
Diuretik	Suatu kondisi, sifat atau penyebab naiknya laju urinasi
DM	Diabetes Melitus
DMT2	Diabetes Melitus Tipe 2
DN	Diet normal
Efek bloating	penumpukan gas dalam usus
EKBK	Ekstrak kulit buah kakao
Endotelin-1	Vasokonstriktor peptida yang disekresi oleh sel endotel yang berperan untuk mengkonter vasodilator oksida nitrat.
Farmakologi	ilmu yang mempelajari penggunaan obat untuk diagnosa, pencegahan dan penyembuhan penyakit
FKBKM	<i>Fermentation Cocoa pod husk Meal</i>
Fitokimia	Segala jenis zat kimia atau nutrien yang diturunkan dari sumber tumbuhan, termasuk sayuran ..
GDP	Gula darah puasa yang di ukur setelah seseorang puasa selama minimal 8 jam.
GDRI	<i>Glucose Dialysis Retardation Index</i> , yakni indeks untuk menilai pergerakan glukosa melintasi membran dialisis yang mengindikasikan potensi penurunan kadar gula dalam aliran darah.
Glukosa	Kadar Gula di dalam darah
Glukosidase	Enzim yang berperan dalam pemecahan karbohidrat menjadi glukosa.
GLUT-4	Protein transporter yang mentransfer glukosa untuk masuk ke dalam sel.
HBA1C	Hemoglobin A1C, merupakan pemeriksaan yang akurat dan tepat dalam mengukur kadar gula darah yang kronis dan berkorelasi positif dengan terjadinya risiko komplikasi diabetes.
HFD	<i>High Fat Diet</i> (Diet tinggi lemak).
Hiperglikemia	Kadar gula dalam darah melebihi batas normal.
Hipoglikemia	Kadar gula dalam darah di bawah batas normal.
Indek Glikemik	Indikator cepat atau lambatnya unsur karbohidrat dalam bahan pangan dalam meningkatkan kadar gula darah dalam tubuh.
Inflamasi	Reaksi kekebalan alami yang dimiliki tubuh untuk melawan

Inhibitor	berbagai serangan penyakit atau mikroorganisme jahat
Insulin	Zat yang menghambat atau menurunkan laju reaksi kimia hormon yang berfungsi membantu penyerapan glukosa ke dalam sel-sel tubuh untuk mengendalikan gula darah.
In vitro	Di luar tubuh makhluk hidup
In vitro digestion	Pencernaan di luar tubuh makhluk hidup
In vivo	Di dalam tubuh makhluk hidup.
Jalur pensinyalan reseptor insulin	Rangkaian proses atau jalan yang normal sehingga glukosa dalam darah bisa masuk ke dalam sel.
KBK	Kulit buah kakao
Ketoasidosis	Komplikasi serius diabetes yang terjadi ketika tubuh memproduksi asam darah tingkat tinggi yang disebut keton
Kreatinin	Produk limbah hasil metabolisme otot yang berfungsi untuk menguji kemampuan ginjal dalam menyaring darah dan urine.
Letal dosis	Indikasi toksisitas yang sampai mengakibatkan kematian.
Memodulasi fosforilasi NE	Penambahan gugus fosfat pada suatu protein/molekul. <i>Norepinephrine</i> , obat untuk mengatasi tekanan darah rendah.
No digestion	Tanpa pencernaan
Pelet	Kukis atau biskuit yang dielaborasi dengan kulit buah kakao. Tambahan lain berupa tepung terigu, air, mentega, gula, telur, baking powder, garam.
Penyakit Kardiovaskular	segala jenis penyakit yang disebabkan gangguan fungsi jantung dan pembuluh darah.
Plasebo	“Obat palsu” yang bentuknya dibuat mirip dengan obat asli. Sering digunakan sebagai pembanding untuk menguji efektivitas suatu obat dalam uji klinis.
Pulp	Bubur kakao
Recall 24 jam	Mencatat jenis dan jumlah bahan makanan yang dikonsumsi pada periode 24 jam yang lalu
Regenerasi pankreas	Proses alami tubuh makhluk hidup untuk memulihkan sel <i>xixancreas</i> yang rusak agar bisa berfungsi kembali.
Relaksan	Obat untuk meredakan nyeri, kejang otot.
Resistensi insulin	Kondisi ketika sel-sel tubuh tidak dapat menggunakan gula darah dengan baik akibat adanya gangguan dalam merespons insulin
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> adalah molekul yang sangat reaktif dan dapat merusak struktur sel seperti karbohidrat, asam nukleat, lipid, dan protein serta mengubah fungsinya
SBP	Sistolik Blood Pressure
SCFP	<i>Soluble cocoa fiber product.</i>
Sel adiposit	Sel yang terutama menyusun jaringan adiposa, terspesialisasi dalam menyimpan energi dalam bentuk lemak. [[]
Sensitivitas insulin	Kepekaan tubuh terhadap efek insulin
Senyawa bioaktif	Senyawa yang terkandung dalam tubuh hewan maupun tumbuhan yang memiliki berbagai manfaat bagi kehidupan manusia, seperti antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan antikanker.
SGOT / AST	<i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase / Aspartate</i>

SGPT / ALT	<p><i>Transaminase</i> adalah enzim yang biasanya ditemukan pada organ hati (liver), jantung, ginjal, dan otak.</p> <p><i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase / Alanine Aminotransferase</i> adalah enzim yang paling banyak terdapat dalam liver.</p>
Simplisia	Bahan alami yang digunakan untuk obat dan belum mengalami perubahan proses apa pun,
Stimulan miokard	Memacu sel-sel dalam otot jantung.
Stres oksidatif	Suatu kondisi yang terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan sistem pertahanan antioksidan di dalam tubuh
Vaskular	Pembuluh darah diluar pembuluh koroner meliputi adalah pembuluh arteri, vena, dan limpa.
Vasodilator.	Golongan obat yang digunakan untuk melebarkan pembuluh darah
Vasokonstriktor	Agen yang menyebabkan penyempitan pembuluh darah sehingga mengurangi aliran darah lokal ke suatu bagian tubuh.
WBC	White blood cell, merupakan sel darah putih ini berfungsi untuk membantu tubuh melawan berbagai penyakit infeksi sebagai bagian dari sistem kekebalan tubuh

BAB I.

PENDAHULUAN UMUM

1.1. Latar Belakang

Masalah kesehatan masyarakat merupakan masalah yang multi kausal. Karenanya, segala kegiatan baik langsung maupun tidak langsung untuk mencegah penyakit (preventif), meningkatkan kesehatan (promotif), terapi (fisik, mental, sosial) merupakan upaya dalam memecahkan masalah kesehatan masyarakat dengan berbagai multidisiplin ilmu (Syafurudin, 2015).

Saat ini salah satu dari sepuluh masalah kesehatan masyarakat global dan merupakan ancaman serius adalah kejadian Diabetes Melitus (DM). Ini dibuktikan dengan terus meningkatnya di seluruh wilayah dunia. *Internasional Diabetes Federation* (IDF) menyebutkan, bahwa di seluruh dunia pada tahun 2019 terdapat 463 juta penderita dan diperkirakan pada tahun 2030 meningkat menjadi 578 juta bahkan hingga tahun 2045 diperkirakan angka kejadian DM mencapai 700 juta atau mengalami kenaikan sebesar 51% (Diabetes Federation International, 2019).

Indonesia juga menghadapi situasi ancaman diabetes serupa dengan dunia. *International Diabetes Federation* (IDF) Atlas 2019 melaporkan bahwa epidemi Diabetes di Indonesia masih menunjukkan kecenderungan meningkat. Indonesia adalah negara peringkat keenam di dunia setelah Tiongkok, India, Amerika Serikat, Brazil dan Meksiko dengan jumlah penyandang Diabetes usia 20-79 tahun sekitar 10,3 juta orang. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) memperlihatkan peningkatan angka prevalensi Diabetes yang cukup signifikan, yaitu dari 6,9% di tahun 2013 menjadi 8,5% di tahun 2018; sehingga estimasi jumlah penderita di Indonesia mencapai lebih dari 16 juta orang. (Balitbangkes, 2013, 2018).

DM merupakan kelainan metabolisme heterogen yang ditandai dengan adanya hiperglikemia (kadar gula darah yang tinggi) akibat gangguan sekresi insulin, aksi insulin yang rusak atau keduanya (Punthakee, Goldenberg and Katz, 2018). Hiperglikemia merupakan penyebab utama stres oksidatif. Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadi peningkatan level *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS adalah molekul yang sangat reaktif dan dapat merusak struktur sel seperti karbohidrat, asam nukleat, lipid, dan protein serta mengubah fungsinya (Gupta *et al.*, 2014; Chikezie, Ojiako and Ogbuji, 2015).

Secara formal, dua yang dipertimbangkan untuk menjadi etiologi yang berbeda. DM tipe 1 ditandai dengan kerusakan autoimun sel beta pankreas, sehingga kegagalan untuk memproduksi insulin. DM tipe 2 disebabkan oleh fungsi sel beta terganggu dan kapasitas untuk mensekresi insulin, ditambah dengan penurunan sensitivitas jaringan terhadap insulin (Cervin, C.etal; 2008). DM tipe 2 umumnya terjadi setelah usia 40 dan begitu, ini dikenal sebagai diabetes onset dewasa dan hal itu terjadi karena resistensi insulin atau berkurangnya sensitivitas terhadap insulin (Choudhary *et al.*, 2014).

Manifestasi klinik Diabetes Mellitus dengan konsekuensi metabolik defisiensi insulin adalah akibat gangguan sekresi insulin, aksi insulin yang rusak atau keduanya (Punthakee, Goldenberg and Katz, 2018). Tiga efek utama kekurangan insulin yang dikaitkan dengan sebagian besar patologi DM adalah sebagai berikut : (1)

pengurangan penggunaan glukosa oleh sel-sel tubuh, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi glukosa darah hingga 300 sampai 1200 mg/100 ml., (2) peningkatan mobilisasi lemak dari jaringan adiposa sehingga menyebabkan kelainan metabolisme lemak maupun pengendalian lipid pada dinding vaskuler yang menyebabkan atherosclerosis; dan (3) pengurangan protein dalam jaringan tubuh. (Guyton, 1990)

Dalam keadaan normal kira-kira 50 % glukosa yang dimakan mengalami metabolisme sempurna menjadi CO₂ dan H₂O, 5 % diubah menjadi glikogen dan kira-kira 30 – 40 % diubah menjadi lemak. Pada keadaan DM semua keadaan tersebut terganggu, glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel sehingga energy terutama diperoleh dari metabolisme protein dan lemak. (Bagian Farmakologi FKUI, 1995)

Sebenarnya Hiperglikemia sendiri relatif tidak berbahaya, kecuali jika hiperglikemia berat dan melebihi ambang batas ginjal maka timbul *glikosuria*. Glikosuria ini akan mengakibatkan diuresis osmotik yang meningkatkan pengeluaran urin (*poliuria*), dan akan timbul rasa haus (*polidipsia*). Karena glukosa hilang bersama urin, maka penderita DM mengalami keseimbangan kalori negatif dan berat badan berkurang. Selain kedua konsekuensi metabolik tersebut manifestasi klinik yang terjadi adalah rasa lapar yang semakin besar (*polifagia*), akan timbul sebagai akibat kehilangan kalori. (Price and Wilson, 2005), (Bagian Farmakologi FKUI, 1995).

Klasifikasi DM meliputi Diabetes Tipe 1 (*Juvenile onset*) atau *insulin dependent Diabetes Mellitus*, Tipe 2 (*Onset maturitas*) atau *Non Insulin Dependent*. Klasifikasi selanjutnya adalah Diabetes Gestasional (GDM) , 4 % kehamilan dipengaruhi oleh Diabetes gestasional. Faktor resiko terjadinya diabetes pada kehamilan adalah usia tua, etnik, obesitas, multiparitas, riwayat keluarga dan riwayat diabetes gestasional terdahulu. Tipe khusus lain adalah karena ; a. kelainan genetik pada sel Beta ; b. Kelainan genetik pada insulin ; c. penyakit pada eksokrin pankreas menyebabkan pankreatitis kronik ; d. penyakit endokrin seperti akromegali dan sindrom *Chusing* ; e. obat-obatan yang bersifat toksik terhadap sel beta dan ; f. infeksi. (Price and Wilson, 2005).

DM sebagai penyakit kronis memiliki implikasi jangka panjang yang berkontribusi pada kualitas hidup yang buruk (Hostalek, 2019). Penyakit ini menjadi penyebab utama kebutaan, penyakit jantung dan gagal ginjal (Kementerian Kesehatan RI., 2020). Hal inilah yang akan memperburuk kondisi klinis penderitanya (Iyer *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020). Dan pada akhirnya meningkatnya angka kematian. Sekitar 75% penderita DM dilaporkan meninggal karena mengalami komplikasi penyakit vaskular (Forbes & Cooper, 2013).

DM juga sangat meningkatkan pengeluaran kesehatan. Pengobatannya membutuhkan biaya perawatan kesehatan yang seringkali mahal dan lama. Karenanya ini menjadi beban besar bagi perekonomian suatu negara. *Amerika Diabetes Association* (ADA) memperkirakan biaya perawatan DM pada tahun 2017 saja sudah mencapai 237 miliar dolar, termasuk biaya rawat inap untuk merawat komplikasi DM seperti makrovaskular dan penyakit mikrovaskular, biayanya mencapai 43% dari keseluruhan anggaran (Iyer *et al.*, 2020). 2012). Data yang dirilis IDF menunjukkan setiap penyandang Diabetes di Indonesia bisa menghabiskan dana sebesar 323,8 dolar per tahun. Biaya ini meningkat hingga 305 persen bila dibandingkan sepuluh tahun silam. Setiap tahun anggaran ini akan terus merangkak naik. Pada 2030

diprediksi meningkat hingga 14 persen, menjadi 370,6 dolar. Selanjutnya bisa memakan anggaran hingga 431,7 dolar per orang pada 2045. Laju peningkatannya setara dengan 33 persen bila dibandingkan tahun 2021.

DM merupakan salah satu penyakit mematikan dan menjadi penyebab kematian dini di seluruh dunia. Dikutip dari data WHO 2016, 70% dari total kematian di dunia dan lebih dari setengah beban penyakit. (Diabetes Federation International, 2019). Sampai saat ini, angka kematian akibat DM masih tinggi, namun tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) pasien DM masih sedikit yang diketahui (Zhao *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil penelitian (Dewi, Suciptawati and Tastrawati, 2018) menyimpulkan bahwa probabilitas waktu sintasan pasien DM pada kurun waktu 1 sampai 29 hari terhitung sejak pasien DM menjalani perawatan pertamakali di RSUD Wangaya Denpasar peluang pasien bertahan hidup kurang dari 5 hari sebesar 0,5 (50%) dan diakhir perawatan peluang bertahan hidup menurun menjadi 0,039 (3,9%).

The WHO *Global Diabetes Compact* menjadikan pencegahan dan pengobatan DM menjadi fokus utama. Hal ini dikarenakan prevalensi yang terus meningkat tajam dan dampak yang ditimbulkan. Seiring dengan dikeluarkannya resolusi WHA (*World Health Assembly*) baru untuk memberikan dorongan yang sangat dibutuhkan untuk upaya pencegahan dan pengendalian diabetes. Salah satu yang menjadi rekomendasi tindakan pencegahan dan pengendalian adalah pada bidang obat lain serta produk kesehatan untuk pengobatan DM (WHO, 2021a, 2021b).

Meskipun metode pengobatan yang ada dapat secara efektif mengontrol gejala DM dan menunda perkembangannya, namun metode tersebut belum memberikan peningkatan yang memuaskan dalam kualitas hidup dan pengobatan pasien (Sun *et al.*, 2021).

Oleh karena itu saat ini terapi DM berbasis makanan dari tanam tanaman yang mengandung senyawa bioaktif telah menjadi metode pengobatan yang penting dan telah mendapat perhatian yang semakin tinggi karena memiliki efek pada berbagai fungsi biologis, termasuk sekresi insulin dan regenerasi sel pankreas (Ganesan, Arulselvan and Choi, 2017). Berdasarkan pengalaman ribuan tahun digabungkan dengan hasil penelitian ekperimental modern terhadap obat-obatan herbal tradisional dan ekstraknya dapat menjadi penemuan dalam manajemen klinis DM (Sun *et al.*, 2021). Hasil penelitian sebelumnya di Cina menunjukkan adanya efek terapeutik terhadap DM dari ekstrak beberapa tanaman seperti daun mimba (*Azadirachta indica*), tanaman *Cichorium intybus*, buah *Cornus officinalis*, akar emas (*Rhodiola rosea* L), jamur *Cordyceps militaris*, *Dendrobium officinal* (Sun *et al.*, 2021). Selain itu, daun sukun (*Artocarpus altilis*) juga banyak digunakan dalam pengobatan diabetes baik dalam bentuk ekstrak maupun rebusan (Tandi *et al.*, 2017; Farlona and Suhaemi, 2021; Sitorus *et al.*, 2022). Namun, uji coba terkontrol secara acak (RCT) harus dilakukan untuk mendapatkan lebih banyak bukti klinis (Li *et al.*, 2017). Pengendalian DM berbasis tanaman herbal juga banyak di gunakan oleh penduduk Indonesia. Salah satu yang menjadi alasan penderita tidak patuh mengkonsumsi obat dokter adalah karena minum obat tradisional (25,29%). Dan alternatif herbal menempati urutan ke-3 setelah pengaturan makan dan olahraga sebagai pilihan dalam pengendalian DM (Balitbangkes, 2018).

Pemanfaatan obat herbal sebagai alternatif ataupun komplementer memerlukan pembuktian yang dapat di percaya dan memiliki nilai secara ilmiah. Metode yang disepakati saat ini dan telah ditetapkan dengan peraturan dari Badan POM adalah melalui uji praklinik dan uji klinik. Uji praklinik merupakan persyaratan uji untuk calon obat, dari uji ini diperoleh informasi tentang khasiat dan keamanan suatu calon produk obat atau pangan sebelum digunakan secara luas. Uji ini pada mulanya dilakukan pada kultur sel terisolasi atau organ terisolasi, selanjutnya bila dianggap perlu maka dilakukan uji pada hewan. Hewan yang baku digunakan adalah galur tertentu seperti mencit, tikus, kelinci, marmot, hamster, anjing atau beberapa uji menggunakan primata. Sedangkan uji klinik adalah pengujian khasiat dan keamanan obat pada manusia yang dapat “menjamin” apakah hasil *in vitro* atau hasil pada hewan coba sama dengan pada manusia (BPOM, 2014; Mahan, 2014). Pada dasarnya uji praklinik dan uji klinik adalah suatu usaha untuk memastikan efektivitas, keamanan dan gambaran efek samping yang sering timbul pada manusia akibat pemberian suatu obat. Bila uji klinik tidak dilakukan maka dapat terjadi malapetaka pada banyak orang bila langsung dipakai secara umum seperti pernah terjadi dengan talidomid (Jawi, 2017).

Di tinjau dari aspek khasiat, studi menunjukkan bahwa sebagian besar ekstrak dari polong tanaman mengandung senyawa antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, antijamur dan aktivitas biologis lainnya. Sifat antioksidan sebagian besar terkait dengan kandungan polifenol yang tinggi seperti katekin dan asam galat. Dengan aktivitas biologis ini, ekstrak tanaman berpotensi untuk digunakan dalam produk nutraceutical dimasa datang (Karim and Azlan, 2012). Nutraceutical merupakan produk herbal dan makanan yang, selain nilai gizinya, digunakan untuk mengobati atau mencegah penyakit (Habashy *et al.*, 2020).

Kakao merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai produk herbal ataupun produk turunan pangan yang cukup melimpah di Indonesia. Bahkan menjadi salah satu komoditi hasil perkebunan yang mempunyai peran cukup penting dalam kegiatan perekonomian di Indonesia. Indonesia merupakan negara produsen dan eksportir kakao terbesar ketiga dunia setelah Ghana dan Pantai Gading. (BPS, 2018). Di Indonesia, pulau Sulawesi mewakili wilayah utama dalam produksi kakao (Lu, Rodriguez-Garcia and Damme, 2018). Pada tahun 2018, Sulawesi Tenggara (Sultra) menempati urutan ke-3 dari 5 (lima) provinsi dengan produksi Kakao terbesar di Indonesia yang mencapai 92.831 ton atau sekitar 16,17% dari total kontribusi produksi Kakao dengan luas area 254.957 Ha (BPS, 2018). Dan ditahun 2019-2022, Sultra telah menempati posisi ke-2 sebagai sentra Kakao terbesar di Indonesia dengan jumlah produksi 115,961 ton (Kementerian Pertanian RI, 2022).

Komponen buah kakao terdiri dari kulit buah dan biji kakao. Biji kakao diolah menjadi produk coklat. Sedangkan komponen kulit buah Kakao (KBK) merupakan bagian dari buah Kakao yang paling besar yakni mencapai 52 – 76% buah Kakao. Dalam pengolahan biji kakao menjadi produk coklat menghasilkan limbah kulit biji kakao yang cukup banyak. Dalam 1 ton biji coklat kering rata-rata menghasilkan limbah kulit kakao sebanyak 10 ton (Campos-Vega, Nieto-Figueroa and ..., 2018). Sehingga jika mengacu pada pernyataan tersebut, maka memberikan estimasi dengan produksi kakao di Indonesia tahun 2022 sebanyak 728.046 ton, itu berarti menghasilkan kulit kakao sekitar 661.860 ton. Dan dengan produksi 115,961 ton kakao di Sultra,

menghasilkan sekitar 105,419 ton kulit kakao.

Pada umumnya kulit kakao yang dihasilkan terbuang percuma dan hanya dibiarkan membusuk begitu saja di sekitar area perkebunan sehingga nilai ekonomi yang diperoleh dari pemanfaatan tersebut masih cukup rendah. Padahal KBK akan menjadi sampah atau limbah pada lahan perkebunan jika tidak ditangani secara serius yang akan meningkatkan kontaminasi pencemaran lingkungan (Purnamawati and Utami, 2014; Kamelia and Fathurohman, 2017; Sitorus and Lumbantoruan, 2020). Berbagai hasil penelitian menunjukkan penggunaan KBK umumnya di daur ulang kembali ke tanah perkebunan sebagai pupuk, seringkali dibuang, pakan ternak dan bahan dasar pembuatan sabun (Lu, Rodriguez-Garcia and Damme, 2018).

. Pengembangan herbal baik sebagai upaya promotif, paliatif, preventif, kuratif maupun rehabilitatif serta sebelum sebuah produk menjadi produk pangan ataupun obat untuk dikonsumsi manusia, maka diperlukan banyak tahapan dan uji untuk membuktikan bahwa produk tersebut benar-benar layak dan aman. Menurut (BPOM, 2014), studi klinis pada manusia memiliki persyaratan antara lain berupa keberadaan senyawa bioaktif atau senyawa penanda, dan juga aman perlu adanya pembuktian ilmiah yang memenuhi persyaratan yakni adanya senyawa penanda, standardisasi dan uji toksisitas (BPOM, 2014).

Secara ilmiah, senyawa penanda dalam KBK yang berpotensi sebagai antidiabetik telah ditunjukkan dalam berbagai penelitian. KBK kaya akan senyawa fenolik. Kandungan total fenolik nya berkisar antara 46 dan 57 mg asam galat setara (GAE)/g bahan kering (Karim *et al.*, 2014) Beberapa senyawa polifenol diidentifikasi oleh LC-MS/MS dalam ekstrak KBK (80% etanol berair, 40 °C, 30 menit); asam fenolik (asam protocatechuic dan turunannya danp-asam hidroksibenzoat), flavonoid (apigenin, rhamnetin, turunan kaempferol, turunan flavon), luteolin, apigenin dan linarin (Karim *et al.*, 2014b). Beberapa dari fenolat ini diukur dalam KBK segar terdiri dari katekin (36%), kuersetin (21%), epikatekin (21%) dan galat (11,3%), kumarat (6,5%) dan asam protocatechuic (4,5% dari total senyawa fenolik) (Valadez-Carmona *dkk.*, 2017). Total kandungan fenolat, flavonoid dan flavonol dari KBK segar masing-masing adalah 3,24 mg GAE/g, 0,97 mg dan 0,34 mg epikatekin (EE)/g, dw (Valadez-carmona *et al.*, 2017).

Polifenol berperan sebagai inhibitor glukosidase yang akan memperlambat pemecahan polisakarida, disakarida menjadi glukosa sehingga mengurangi jumlah glukosa yang di serap usus (HM Chen, XJ Yan, 2005; Kwon, Apostolidis and Shetty, 2006). Polifenol yang memiliki kapasitas antioksidan dapat mencegah sel dari kerusakan akibat radikal bebas dan juga menghambat glukosidase dan amilase (Perron and Brumaghim, 2009). KBK juga mengandung antioksidan Flavonoid. Flavonoid dapat menghambat penyerapan glukosa (Chusniasih, 2019). Telah dibuktikan pula bahwa KBK dapat menurunkan kadar *Malondialdehia* (MDA) sebagai penanda stress oksidatif. Stres oksidatif merupakan penyebab utama resistensi insulin. Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadi peningkatan level *Reactive Oxygen Species* (ROS). Banyak penelitian membuktikan bahwa ROS terlibat dalam etiologi DM (Yan, 2014). Selain itu, KBK juga mengandung berbagai senyawa bioaktif dan nutrisi yang baik seperti alkaloid, tanin, saponin, tritepenoid, pektin, teobromin, serat makanan, mineral , protein, karbohidrat serta antioksidan (flavonoid) (Nguyen and

Nguyen, 2017; Campos-Vega, Nieto-Figueroa and Oomah, 2018) (Vásquez *et al.*, 2019) (Kayaputri *et al.*, 2014). Berbagai senyawa tersebut menjadikan kulit buah kakao berpotensi menghasilkan produk nutraceutical atau makanan fungsional baru bagi manusia (Hidalgo *et al.*, 2019a) (Campos-Vega, Nieto-Figueroa and ..., 2018).

Efikasi KBK dibuktikan dalam beberapa penelitian secara *in vitro* yang dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak yang mengandung kulit kakao yang berasal dari Spanyol, sebanyak 10 gram dapat meningkatkan penyerapan glukosa (Rebollo-Hernanz *et al.*, 2019a). Penelitian *in vitro* lainnya yang mengevaluasi aktivitas antidiabetik ekstrak KBK yang dikumpulkan dari kabupaten Sleman, Yogyakarta melaporkan bahwa fraksi larut heksana ekstrak KBK memiliki aktivitas penghambatan glukosidase tertinggi dengan IC50 sebesar 10,8 g/ml (Indrianingsih *et al.*, 2021). Ekstrak KBK dengan dosis 100 mg/kgBB selama 14 hari menunjukkan penurunan rata-rata gula darah baik pada kelompok tikus yang diberikan metformin maupun pada kelompok tikus yang diberikan ekstrak KBK (Iskandar *et al.*, 2021). Riset kukis berbasis kulit kakao menunjukkan ada penurunan gula darah sebesar 10,9% pada kelompok pasien yang diberikan kukis berbasis kulit kakao 12,5 mg selama 8 minggu (León-Flores *et al.*, 2020)..

KBK juga memiliki potensi menjaga perubahan berat badan (BB) secara stabil. Penelitian yang dilakukan pada tikus yang diberi pakan mengandung KBK 215 g per kg diet basal dan mengandung 10% serat selama 3 minggu menunjukkan pertambahan BB yang relatif lebih rendah dibandingkan pada kelompok yang mendapatkan pakan dengan kandungan kolesterol normal maupun pada kelompok tinggi kolesterol (Ramos *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2010). Riset lain menunjukkan penurunan BB, indeks massa tubuh dan pengurangan lingkaran pinggang pada pasien yang mendapat kukis dari kulit kakao (León-Flores *et al.*, 2020). Sebaliknya penelitian lain menunjukkan pertambahan total berat badan akhir dan perubahan bobot secara signifikan pada kelinci yang diberi tepung kulit kakao fermentasi (FKBKM) sebanyak 12,5%, meskipun hasil tersebut juga ternyata di pengaruhi oleh ras kelinci (Olugosi *et al.*, 2021).

Penelitian terkait potensi senyawa bioaktif pada KBK baik dalam mengatasi gula darah, kolesterol maupun masalah berat badan sebagian besar masih menggunakan studi *in vitro* dan meskipun telah ada beberapa studi intervensi pada hewan coba ataupun pada manusia dalam bentuk pangan (kukis) dan menunjukkan hasil yang positif.

Adapun persyaratan agar sebuah produk aman, maka harus dilakukan uji toksisitas, yakni suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada system biologi dan ntuk memperoleh data dosis respon yang khas dari sediaan uji. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberi informasi mengenai derajat bahaya sediaan uji tersebut bila paparan pada manusia, sehingga dapat ditentukan dosis penggunaannya demi keamanan manusia (BPOM, 2022). Uji toksisitas menggunakan hewan uji sebagai model berguna untuk melihat adanya reaksi biokimia, fisiologik dan patologik pada manusia terhadap suatu sediaan uji dalam hal ini yaitu EKBK. Hasil uji ini tidak dapat digunakan secara mutlak untuk membuktikan keamanan EKBK pada manusia, namun dapat memberikan petunjuk ada tidaknya toksisitas relatif dan membantu identifikasi efek toksik bila terjadi paparan pada manusia.

Sejauh ini KBK cukup aman untuk dikonsumsi. Meskipun KBK kaya akan Theobromin yang merupakan salah satu senyawa *Methylxantine* utama yang ada dalam

kakao dan bersifat toksik pada hewan, namun hingga saat ini tidak ada laporan kasus keracunan Theobromine pada manusia, meski telah mengonsumsi coklat selama berabad-abad. (Figueroa, García and Vega, 2020). Keamanan KBK juga di buktikan dari hasil penelitian secara *in vitro* dengan menggunakan prosedur uji toksisitas LC50 yang menunjukkan bahwa setelah 24 jam paparan sampel EKBK, tingkat kematian larva *Artemia* tidak mencapai 50% yang berarti bahwa semua sampel EKBK tidak beracun (Cura *et al.*, 2021). Begitupula hasil penelitian dengan substitusi 30% kulit buah kakao de-theobrominasi ke dalam pakan tikus tidak menyebabkan kematian atau toksisitas pada organ spesifik seperti pada testis, ginjal, limpa atau hati (Oduro-Mensah *et al.*, 2020).

Mengingat adanya potensi KBK sebagai antidiabetik, dan untuk pengembangan nilai produk sampingan kakao, sekaligus dapat mengurangi pencemaran limbah kulit kakao, maka penelitian ini menjadi penting untuk dilakukan untuk membuktikan keamanan dan pengaruh KBK terhadap gula darah, kolesterol dan berat badan pada tikus DM, serta membuktikan tingkat tahan hidup tikus diabetes yang diberikan EKBK, sebelum nantinya benar-benar bisa menjadi salah satu alternatif pangan fungsional bagi masyarakat.

1.2. Perumusan Masalah

Kondisi Diabetes merupakan masalah serius. Produk berbahan alam sebagai salah satu upaya pencegahan dan penanganan seringkali menjadi menjadi pilihan alternatif. Penelitian terdahulu menunjukkan KBK kaya akan senyawa fitokimia seperti Flavonoid yang berperan dalam mencegah dan mengatasi kondisi Hiperglikemia yang jika tidak teratasi akan menimbulkan berbagai komplikasi serius pada tubuh. Meski tidak banyak, namun ada beberapa penelitian sebelumnya yang membuktikan pengaruhnya terhadap gula darah, kolesterol dan BB. Selain itu penelitian terkait tingkat keamanan KBK juga masih sangat terbatas. Oleh karena itu rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- 1.2.1. Berapa kadar senyawa bioaktif dalam EKBK ?
- 1.2.2. Berapa letal dosis (LD50) dan Bagaimana tingkat keamanan EKBK ?
- 1.2.3. Bagaimana pengaruh EKBK terhadap gula darah tikus Diabetes ?
- 1.2.4. Bagaimana pengaruh EKBK terhadap kolesterol tikus Diabetes ?
- 1.2.5. Bagaimana pengaruh EKBK terhadap berat badan tikus Diabetes ?
- 1.2.6. Bagaimana pengaruh EKBK terhadap waktu kesintasan / tingkat tahan hidup (*survival rate*) pada tikus Diabetes ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagai alternatif dalam perbaikan kadar gula darah melalui uji pre klinis pada tikus Diabetes.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Mengukur senyawa bioaktif dan proksimat ekstrak kulit buah kakao.
2. Menilai keamanan melalui perhitungan LD50 dan uji toksisitas sub kronis oral ekstrak kulit buah kakao.
3. Melakukan analisis pengaruh ekstrak kulit buah kakao terhadap gula darah tikus Diabetes
4. Melakukan analisis pengaruh ekstrak kulit buah kakao terhadap kolesterol tikus Diabetes.
5. Melakukan analisis pengaruh ekstrak kulit buah kakao terhadap berat badan tikus Diabetes.
6. Mempelajari pengaruh ekstrak kulit buah kakao terhadap waktu kesintasan/tahan hidup (*survival rate*) tikus Diabetes.

1.4. Kegunaan Penelitian

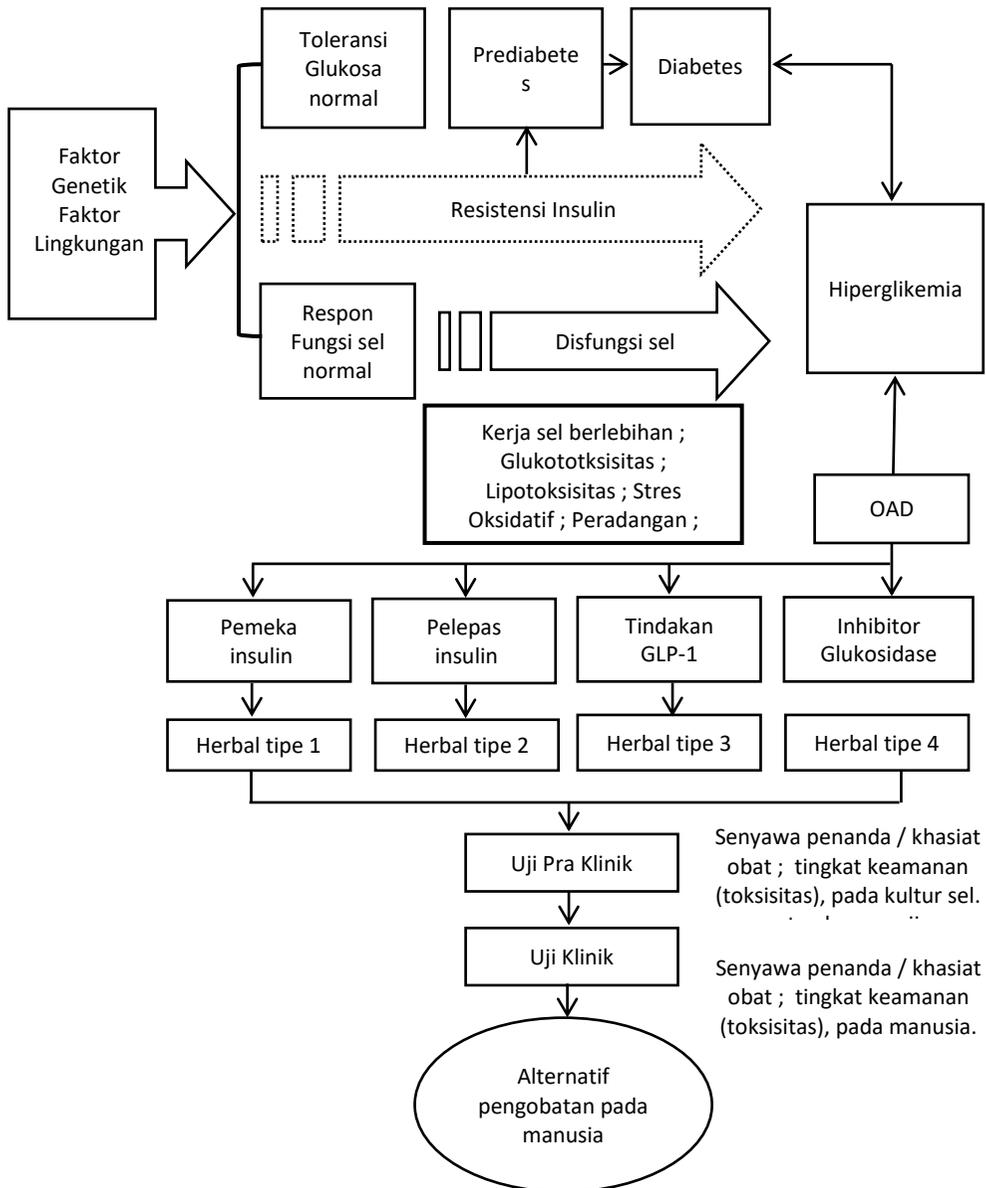
Penelitian ini diharapkan juga memberikan manfaat bagi masyarakat sebagai berikut :

- 1.4.1. Menambah khasanah ilmu pengetahuan khususnya dibidang kesehatan dan gizi tentang potensi KBK untuk pencegahan dan penanganan DM.
- 1.4.2. Memberikan masukan bukti empiris kepada pemerintah khususnya pemprov Sultra tentang potensi khusus dalam pengelolaan limbah KBK, meningkatkan nilai ekonomis dan menambah kekayaan intelektual komunal bagi Provinsi Sulawesi Tenggara.
- 1.4.3. Bagi Peneliti ; sebagai aplikasi ilmu, mengurai keterbaruan dalam riset yang berkaitan dengan pemanfaatan dan pengembangan KBK, meningkatkan kualitas diri dalam keahlian dan pengembangan ilmu kesehatan masyarakat khususnya dalam bidang gizi dan nutraceutical.

1.5. Kebaruan Penelitian

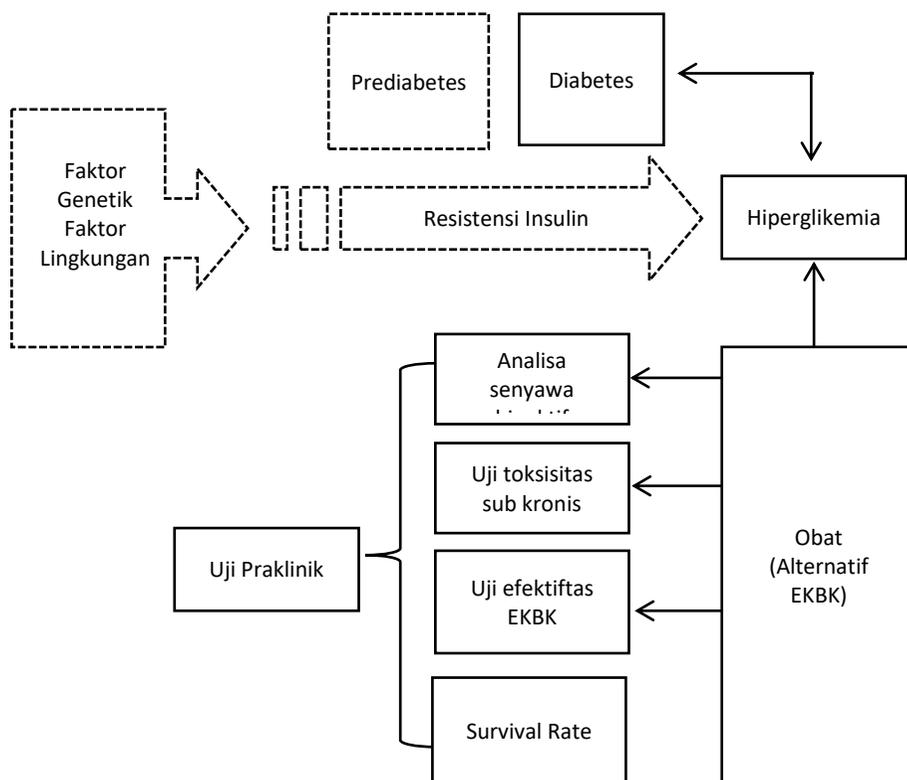
- 1.5.1. Analisa preklinis berupa uji toksisitas sub kronis oral 28 hari. Ini merupakan riset pertama yang menggunakan uji toksisitas sub kronis. Riset sebelumnya menggunakan uji toksisitas menggunakan *Brine shrimp lethal test* (BSLT), uji toksisitas dengan menghilangkan zat Theobromine, sedangkan penelitian ini tidak menghilangkan zat Theobromine.
- 1.5.2. Analisa pengaruh EKBK terhadap perubahan kadar gula darah, kolesterol dan berat badan pada hewan coba Diabetes dengan beberapa tingkatan dosis (100 mg/kgBB, 300 mg/kgBB, 500 mg/kgBB) dan dibandingkan dengan obat Diabetes. Penelitian sebelumnya hanya membandingkan obat Dabetes dengan EKBK dengan satu tingkatan dosis (dosis 100 mg/kgBB), menguji pengaruh Kukis KBK terhadap gula darah, kolesterol dan berat badan pada hewan coba non Diabetes.
- 1.5.3. Analisa tingkat kelangsungan hidup (*survival rate*) pada tikus Diabetes yang diberikan EKBK. Sebelumnya belum ada laporan penelitian terkait waktu kesintasan tius Diabetes yang diberikan EKBK.

1.6. Kerangka Teori



Gambar 1.1. Kerangka Teori
Modifikasi (Chang *et al.*, 2013; BPOM, 2022)

1.7. Kerangka Konsep



Gambar 1.2. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :



= Variabel yang di teliti



= Variabel yang tidak diteliti

1.8. Hipotesa

- 1.8.1. Ada perbedaan tingkat keamanan dosis EKBK pada kelompok tikus
- 1.8.2. Ada pengaruh pemberian EKBK terhadap gula darah tikus Diabetes .
- 1.8.3. Ada pengaruh pemberian EKBK terhadap kolesterol tikus Diabetes .
- 1.8.4. Ada pengaruh pemberian EKBK terhadap berat badan tikus Diabetes .
- 1.8.5. Ada pengaruh pemberian EKBK terhadap kelangsungan hidup tikus Diabetes.

BAB II. SENYAWA BIOAKTIF EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO

2.1. Abstrak

Latar Belakang. Indonesia merupakan negara penghasil kakao terbesar ke-3 dunia. Kakao menjadi komoditas unggulan perkebunan yang berperan penting dalam perekonomian Indonesia. Pengolahan biji kakao menjadi produk cokelat menghasilkan limbah kulit buah kakao (KBK) yang cukup banyak. Limbah ini sebagian besar tidak digunakan padahal KBK mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi menghasilkan produk farmasi, medis, nutraceuticals atau makanan fungsional baru. Pulau Sulawesi khususnya Sulawesi Tenggara sebagai sentra utama Kakao di Indonesia, namun belum banyak mengeksplor kandungan fitokimia dari kulit buah kakao yang berasal dari wilayah tersebut. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan menganalisis kandungan proksimat, Polifenol, flavonoid, serta senyawa bioaktif lainnya pada ekstrak KBK. **Metode.** Penelitian laboratorium yang bersifat eksperimen atau percobaan untuk mengukur kandungan senyawa bioaktif berupa senyawa Polifenol, flavonoid, dan proksimat serta kandungan lain dalam EKBK. Analisis polifenol dan flavonoid menggunakan metode Spektrofotometer UV-Vis ; proksimat dengan metode AOC dan senyawa bioaktif lainnya diukur dengan analisis GC-MS. **Hasil.** EKBK memiliki rata-rata kadar air sebesar 25,63%, abu 8,48%, lemak 0,65%, protein 10,34%, karbohidrat termasuk serat 54,91%. Polifenol total 98,68 mg GAE/g, flavonoid 3,58 mg quercetin/g, tanin 79,12 mg EGCG/g. Ditemukan 23 senyawa yang teridentifikasi dan berdasarkan struktur kimianya senyawa dalam CPHE merupakan senyawa turunan terpenoid, asam lemak dan steroid. Komposisi senyawa terbesar dalam adalah *butyric acid* (25,91%), *Hexadecanoic acid, Methyl ester* (24,35%), *13-Docosenoic acid, Methyl ester, (Z)-(CAS)* (11,05%), dan *2-Furancarboxaldehyde* (8,14%). *Butane-1,2,3,4-tetraol* (5,44%), *9,12-octadecadienoic acid methyl ester* (4,71%), dan *Methyl 2-hydroxy-3-butenoate* (3,67%). Senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi manfaat bagi kesehatan. **Kesimpulan.** EKBK asal Sulawesi Tenggara, Indonesia memiliki komposisi bioaktif (proksimat, polifenol, flavonoid, tanin) yang hampir sama dengan KBK yang berasal dari berbagai negara lainnya maupun dari wilayah Indonesia lainnya, meskipun memiliki kadar yang berbeda-beda. Senyawa utama yang teridentifikasi dari analisa GCMS dengan puncak area tertinggi adalah *butyric acid, Hexadecanoic acid, Methyl ester, 13-Docosenoic acid, Methyl ester,* dan *2-Furancarboxaldehyde*, dan berdasarkan struktur kimianya merupakan senyawa turunan terpenoid, asam lemak dan steroid dimana senyawa-senyawa ini memiliki efek positif bagi kesehatan. Namun masih perlu terus dibuktikan dan dikembangkan untuk memverifikasi manfaat kesehatan CPH baik secara in vitro, pre klinis sebelum benar-benar diaplikasikan ke manusia. Pemanfaatan CPH menjadi produk-produk bagi kesehatan juga dapat membantu mengurangi dampak lingkungan dari limbah KBK.

Kata Kunci : Cocoa pod husk, flavonoid, polifenol, proksimat, senyawa kimia, tanin

2.2. Pendahuluan

Kakao (*Theobroma L. cocoa*) merupakan tanaman pangan yang memiliki habitat alam beriklim tropis. Menurut Organisasi Kakao International, produksi kakao dunia antara tahun 2022-2023 mencapai 4,9 juta ton (International Cocoa Organization

(ICCO), 2022). Indonesia sebagai salah satu negara beriklim tropis merupakan negara produsen kakao terbesar ketiga dunia setelah Ghana dan Pantai Gading. Hasil estimasi menggunakan model *double exponential smoothing* menunjukkan rata-rata pertumbuhan kakao Indonesia tahun 2022-2026 tumbuh secara positif sebesar 1,97% pertahun meskipun kenaikannya berfluktuatif, namun diperkirakan ketersediaan kakao di Indonesia akan meningkat dari 509 ribu ton pada tahun 2022 menjadi 550 ribu ton di tahun 2026 (Kementerian Pertanian, 2020).

Kulit kakao pada dasarnya merupakan hasil sampingan atau produk turunan dari buah kakao yang dihasilkan setelah biji dikeluarkan dari buahnya (Figueroa, García and Vega, 2020), selanjutnya kulit ini sebagian besar tidak digunakan, hanya terbuang percuma dan menjadi limbah yang berpotensi membusuk dapat mencemari lingkungan di perkebunan kakao (Mansur *et al.*, 2014; Forero-Nuñez, Jochum and Vargas, 2015). Kulit kakao ini terutama terdiri dari KBK, kulit biji kakao dan lendir kakao (Figueroa, García and Vega, 2020; Delgado-Ospina *et al.*, 2021).

KBK adalah bagian luar buah yang tebal, kasar dan berbetuk oval (Ouattara *et al.*, 2020), yang merupakan hasil sampingan kakao yang paling banyak yakni mewakili 75% dari berat buah (Laconi and Jayanegara, 2015) atau berkisar antara 67-76% dari seluruh berat kakao utuh. Kulit buah ini juga terdiri atas 3 lapisan, yakni : endokarp (lapisan paling dalam), mesokarp (lapisan tengah) dan epikarpus (lapisan paling luar) (Campos-Vega, Nieto-Figueroa and Oomah, 2018).

Perkembangan penelitian di berbagai negara akhir-akhir ini telah melaporkan bahwa KBK mengandung berbagai senyawa bioaktif yang berpotensi menghasilkan produk farmasi, medis, nutraceuticals atau makanan fungsional baru hingga kosmetik (Nguyen and Nguyen, 2017; Campos-vega, Nieto-figueroa and Oomah, 2018; Vásquez *et al.*, 2019).

Banyak penelitian telah menunjukkan kandungan protein dalam KBK berkisar antara 5,9-9,1%, lemak kasar 1,2-10%, serat 22,6-35,7% serta mineral (Figueroa, García and Vega, 2020). KBK juga merupakan sumber serat makanan yang baik. Total serat adalah jumlah serat makanan larut (SDF) seperti : pektin (SDF paling dominan dalam KBK) -glukan, dan oligosakarida dan beberapa hemiselulosa. Sedangkan serat makanan tidak larut (IDF), seperti lignin, selulosa dan hemiselulosa (Lu *et al.*, 2018). Total serat makanan dalam KBK (59%) masing-masing mencakup 11 dan 48% dari serat larut dan tidak larut.. KBK mengandung total serat makanan yang lebih tinggi dibandingkan dengan sumber serat lainnya, seperti jeruk (35-37%), apel (51%), dan pisang (33-52%), tetapi lebih rendah dari sabut kelapa (63%), kulit kacang polong (75%), dan kulit buah markisa kuning (74-82%) produk sampingan (Yapo *et al.*, 2013). KBK kaya akan pektin yang diekstrak dari beberapa produk samping tanaman banyak digunakan sebagai pembentuk gel, pengental, dan agen penstabil dan memiliki beberapa efek positif pada kesehatan manusia, termasuk menurunkan kadar kolesterol dan glukosa serum, mengurangi kanker dan merangsang respon imun (Figueroa, García and Vega, 2020). KBK juga merupakan sumber potensial fenolat/antioksidan yang dapat digunakan sebagai bahan alami dalam produk bernilai tambah. Senyawa fenolik seperti flavan-3-ol sebelumnya telah ditemukan dalam produk terkait kakao, termasuk monomer (catechin dan epicatechin) dan dimer, yaitu procyanidin. Sekam kakao fermentasi dari genotipe kakao Meksiko kaya akan senyawa bioaktif dan serat

dengan aplikasi potensial sebagai ekstrak fungsional baru untuk digunakan dalam formulasi makanan atau untuk tujuan nutraceutical (Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

Profil fenolik dalam makanan, termasuk kakao, dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor: lingkungan (asal sampel, varietas, kematangan, dan iklim) dan pengolahan (pemanggangan, suhu, alkalisasi), dan penyimpanan (Hernández-Hernández *et al.*, 2018). Senyawa fenolik disimpan dalam kotiledon biji kakao; Namun, selama fermentasi hilangnya senyawa ini terjadi karena difusi keluar dari kotiledon (Figueroa, García and Vega, 2020). Akibatnya, sekam diperkaya senyawa bioaktif ini (Arlorio *et al.*, 2005). Kulit kakao memiliki sejumlah besar senyawa bioaktif setelah fermentasi, yang bersama dengan kandungan seratnya yang tinggi dan aktivitas antibakteri (Hernández-Hernández *et al.*, 2018). Senyawa fenolik yang teridentifikasi dalam KBK kering adalah katekin, quercetin, (-)-epicatechin, asam galat, asam kumarat, dan asam protocatechuic. Kapasitas antioksidan KBK adalah 24-42 M setara Trolox (TE)/g, 18-34 M TE/g, dan 0,7-2 M TE/g (ABTS, DPPH, dan FRAP assays, masing-masing) dan lebih tinggi dari kakao (Figueroa, García and Vega, 2020).

Theobromin merupakan salah satu anggota *Methylxantine* utama yang ada dalam kakao. Theobromine ini merupakan stimulan susunan saraf pusat dan memiliki karakteristik antioksidan dan pro-oksidan. Meski pada hewan bersifat toksik, namun hingga saat ini tidak ada laporan kasus keracunan Theobromine pada manusia, meski telah mengonsumsi coklat selama berabad-abad. Theobromin disintesis dilapisan luar (pericarp) dan dalam kotiledon (embrio biji) buah kakao muda. Namun selama fase pematangan konsentrasinya menurun drastis pada pericarp sebaliknya pada kotiledon meningkat, dan kemungkinan bermigrasi diantara biji dan pericarp (HJ., 2018). Saat ini Theobromine dianggap sebagai nutraceutical bagi manusia. Theobromine dianggap sebagai diuretik, relaksan otot polos, stimulan miokard dan vasodilator. Berdasarkan hasil ekstraksi KBK dengan menggunakan etanol 70% selama 90 menit dan dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan larutan timbal asetat 10%, menunjukkan kadar Theobromine dalam Kakao mencapai 6,79 mg/100 gr berat kering (Figueroa, García and Vega, 2020).

KBK juga mengandung antinutrien seperti tanin, fitat dan oksalat yang jika dikonsumsi dalam jumlah yang tepat dapat memberikan manfaat bagi kesehatan. Kadarnya berkurang setelah mengalami fermentasi jika dibandingkan dengan KBK segar. Pengaruh fermentasi terhadap sifat antinutrisi (fitat, tanin, dan oksalat) sampel KBK yang tidak difermentasi dan yang difermentasi menunjukkan bahwa untuk ke-3 jenis KBK dari jenis Trinitario, Forastaro, dan Criollo, bagian yang tidak difermentasi masing-masing mengandung 1,83, 0,89, dan 0,59 mg/100g fitat. Sedangkan bagian yang difermentasi masing-masing mengandung 0,35, 0,17, dan 0,47mg/100g. Dengan menurunnya kadar anti nutrisi pasca fermentasi, maka fermentasi KBK dapat menjadi salah satu pilihan untuk meningkatkan bioavailabilitas nutrisinya (Sa, S. and Adamson, 2017).

Meskipun komposisi kimia KBK telah banyak diteliti di beberapa negara, namun masing-masing memiliki fokus pada komposisi kimia tertentu, metode dan tentu saja negara asal tanaman berbeda meskipun sama-sama beriklim tropis. Begitu juga di Indonesia, beberapa penelitian yang telah dilakukan untuk mengukur kandungan

antioksidan KBK, diantaranya analisis kadar flavonoid ekstrak methanol KBK yang berasal dari Jawa Barat (Azizah, Kumolowati and Faramayuda, 2014), kadar fenolik ekstrak etanol KBK asal Bali berdasarkan lama maserasi (Pratyaksa, Putra and Suhendra, 2020), kandungan tanin ekstrak methanol KBK asal Sulawesi Selatan dan Sulawesi Barat (Pappa, Jamaluddin and Ris, 2019), Polifenol total liquid volatile matter dari hasil pirolisis KBK asal Sulawesi tenggara (Pallawagau *et al.*, 2019). Meskipun begitu, komposisi kimia dapat berbeda beda dikarenakan Indonesia memiliki kondisi iklim, tanah, topografi dan sifat fisik lingkungan yang sangat beragam baik antar wilayah maupun dalam wilayah itu sendiri (Djaenudin, Sulaeman and Abdurachman, 2002). (Tjahjana, Supriadi and Rokhmah, 2008; Alam, Salim and Siswo, 2010) menyatakan faktor iklim seperti suhu, curah hujan, kadar air, angin dan intensitas cahaya matahari secara langsung berpengaruh terhadap aktivitas enzim pada proses metabolisme, yang pada akhirnya berdampak pada kadar kimia kakao.

Komitmen baru terhadap reevaluasi KBK mungkin menjadi penting bagi Indonesia sebagai salah satu negara dengan perkebunan kakao terbesar di dunia. Di negara ini, kakao merupakan komoditas unggulan perkebunan yang memiliki peranan penting dalam perekonomian Indonesia karena sebagai penyedia lapangan kerja, sumber pendapatan petani dan sumber devisa negara (BPS, 2018; Kementerian Pertanian, 2020). Namun, informasi tentang proksimat dan senyawa bioaktif lainnya dalam kulit buah kakao masih terbatas khususnya kulit kakao yang berasal dari Sulawesi Tenggara sebagai salah satu sentra utama kakao di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini mencoba memfokuskan pada kadar proksimat, polifenol, flavonoid, tanin, serta menentukan secara kualitatif komposisi bioaktif lainnya, untuk memberi nilai pada limbah kulit buah kakao dari wilayah ini agar membuka saluran baru untuk pemanfaatan limbah kakao sebagai sumber yang melimpah, murah, terbarukan khususnya pengembangan makanan.

2.3. Metode

2.3.1. Jenis Penelitian

Penelitian pada tahap ini merupakan penelitian laboratorium (*laboratory research*) yang bersifat eksperimen atau percobaan untuk mengukur kandungan senyawa bioaktif berupa senyawa Polifenol, flavonoid, dan proksimat serta kandungan lain dalam EKBK.

2.3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Waktu :

- a. Pembuatan ekstrak KBK dilaksanakan pada bulan Februari dan April 2023.
- b. Pengujian senyawa bioaktif dan proksimat dilaksanakan pada bulan Maret – April 2023.

2. Lokasi :

Penelitian dilakukan di beberapa laboratorium, yaitu :

- a. Laboratorium Biofarmaka Universitas Hasanuddin (Menguji senyawa fenolik, flavonoid);

- b. Laboratorium Produktivitas & Kualitas Perairan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin (Menguji kadar proksimat) ;
- c. Laboratorium Kimia Fakultas Teknik Kimia Politeknik Ujung Pandang Makassar (Analisa GC-MS).

2.3.3. Alat, Bahan dan Hewan Uji

1. Alat

Peralatan yang digunakan antara lain : rotary evaporator, gelas laboratorium, rak tabung reaksi, blender, timbangan analitik, aluminium foil, kertas saring, spektrofotometer UV-Vis, waterbath, vortex, desikator, hot plate, aerator, oven, bejana maserasi, blender simplisia, batang pengaduk, cawan penguap, cawan petri, chamber, corong kaca, gunting, labu ukur, lemari pendingin, oven, penjepit tabung, pipet tetes, pipet ukur, sendok tanduk, tabung reaksi, timbangan.

2. Bahan

Bahan baku berupa buah kakao yang telah matang dan tidak nampak kerusakan atau kecacatan pada kulit dikumpulkan dari perkebunan rakyat kabupaten Kolaka provinsi Sulawesi Tenggara, Indonesia (-4.040324, 121.549185). Etanol P. (Medika), methanol P. (Jennychem), reagen folin-ciocalteau (sigma-Aldrich), quercetin (Sigma-Aldrich), epigallocatechin gallat (EGCG) (Sigma-Aldrich), aquades, NaOH (KGaA Germany), Aluminium chloride (KGaA Germany), natrium acetat (KGaA Germany).

2.3.4. Pengumpulan Data / Prosedur Kerja

1. Pengambilan dan Preparasi Sampel KBK

Sampel buah kakao diperoleh dari perkebunan kakao di kabupaten Kolaka. KBK yang telah dipisahkan dari bijinya, dicuci, di potong-potong kecil kemudian di kering kan dibawah sinar matahari selama 8 jam hari. Setelah kering dihaluskan dengan blender sampai berbentuk serbuk dan diayak dengan ayakan 40 mesh. Kegiatan ini dilakukan oleh seorang tenaga yang telah memiliki pengalaman sebelumnya dalam membantu peneliti mempersiapkan sampel KBK.

Adapun pemilihan sampel KBK menggunakan spesifikasi sebagai berikut :

- a. Berasal dari buah kakao jenis *forastero*, yang merupakan jenis kakao yang umum di budidayakan khususnya di Indonesia.
- b. Memiliki buah yang telah matang.
- c. Berat 1 (satu) buah utuh tidak kurang dari 400 gram.
- d. Kulit tidak cacat atau rusak baik disebabkan oleh proses alami akibat mikroorganisme atau akibat proses pemetikan dan distribusi.

2. Prosedur Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi secara maserasi. Proses ekstraksi dilakukan terhadap simplisia KBK yang telah dikeringkan di bawah sinar matahari. Simplisia dimasukkan ke dalam bejana kaca, kemudian dicampurkan dengan pelarut etanol 96% sampai terendam. Perbandingan pelarut dengan simplisia adalah 1 : 10. Kemudian simplisia yang telah terendam ditutup dan dibiarkan selama 3 x 24 jam terlindung dari cahaya sambil berkali-kali diaduk selama

6 jam pertama sampai berubah warna. Filtrat yang didapat kemudian ditampung pada botol kaca dan sisa penyaringan dimaserasi kembali dengan pelarut yang baru serta dilakukan pengadukan beberapa kali sehari. Proses dilakukan sampai warna filtrat menjadi berubah warna. Ekstrak etanol kemudian dipekatkan menggunakan alat rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental etanol KBK.

3. Prosedur Kerja Penentuan Kadar Polifenol

Polifenol total ditentukan dengan menggunakan cara reduksi Folin-Ciocalteu menggunakan asam galat sebagai standar (Waterhouse, 2022). Sebanyak 0,2 g ekstrak, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, tambahkan 25 ml *metanol P*, aduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik. Saring ke dalam labu tentukur 25 ml, tambahkan *metanol P* sampai batas tanda. 10 mg larutan pembanding di masukkan ke dalam labu tentukur 25 ml, dilarutkan dan ditambahkan dengan *metanol P*, sampai batas tanda. Pengenceran dengan kadar 5, 15, 30, 50, 70 dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Pada masing-masing 1 mL larutan uji dan enceran larutan pembanding dalam tabung reaksi, tambahkan 5 mL enceran *Folin-Ciocalteu LP* (7,5% dalam air). Diamkan selama 8 menit, tambahkan 4 mL NaOH 1% inkubasi selama 1 jam (Kementerian Kesehatan RI., 2013). Selanjutnya kadar polifenol KBK dihitung berdasarkan kurva kalibrasi asam galat standar dengan membandingkan waktu retensi dan luas puncak asam galat standar dengan ekstrak kulit buah kakao.

4. Prosedur kerja Penentuan Kadar Flavonoid

Flavonoid total ditentukan dengan mengikuti metode yang telah ditetapkan (Kementerian Kesehatan RI., 2013) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 0,2 g ekstrak, dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, tambahkan 25 ml *etanol P*, aduk selama 30 menit dengan pengaduk magnetik. Saring ke dalam labu tentukur 25 ml, tambahkan *etanol P* sampai batas tanda. 10 mg quercetin di masukkan ke dalam labu tentukur 25 ml, dilarutkan dan ditambahkan dengan *etanol P* sampai batas tanda. Pengenceran secara kuantitatif dengan kadar 25, 50, 75, dan 100 $\mu\text{g/mL}$. Untuk pengukuran, secara terpisah 0,5 mL larutan ekstrak dan enceran larutan kuersetin di tambahkan pada masing-masing 1,5 mL etanol P, 0,1 mL aluminium klorida P 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquades. Kocok dan diamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Pengukuran blanko dilakukan dengan cara yang sama tanpa penambahan aluminium klorida. Selanjutnya kadar flavonoid KBK dihitung berdasarkan kurva kalibrasi quercetin standar (Pandey *et al.*, 2020) dengan membandingkan waktu retensi dan luas puncak kuersetin standar dengan ekstrak kulit buah kakao.

5. Penentuan Kadar Proksimat (AOAC, 1984)

Komposisi proksimat di tentukan dengan menggunakan metode resmi AOAC (1998). Kadar air ditentukan dengan menggunakan oven udara panas 100°C selama semalam. Kandungan abu diukur dengan memanaskan KBK di dalam tanur pada suhu 600°C selama 5 jam. Kandungan lipid kasar ditentukan dengan ekstraksi menggunakan metode soxhlet setelah ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Kandungan protein kasar ditentukan dengan mengukur

kandungan nitrogen menggunakan metode Kjeldahl kemudian kandungan protein dihitung dengan mengalikan kandungan nitrogen dengan factor 6,25. Karbohidrat termasuk serat kasar dihitung dari persamaan : % Karbohidrat = 100 – (kadar air + abu + lipid + protein).

Pengukuran senyawa bioaktif dan proksimat seluruhnya dilakukan secara berulang (*triplo*).

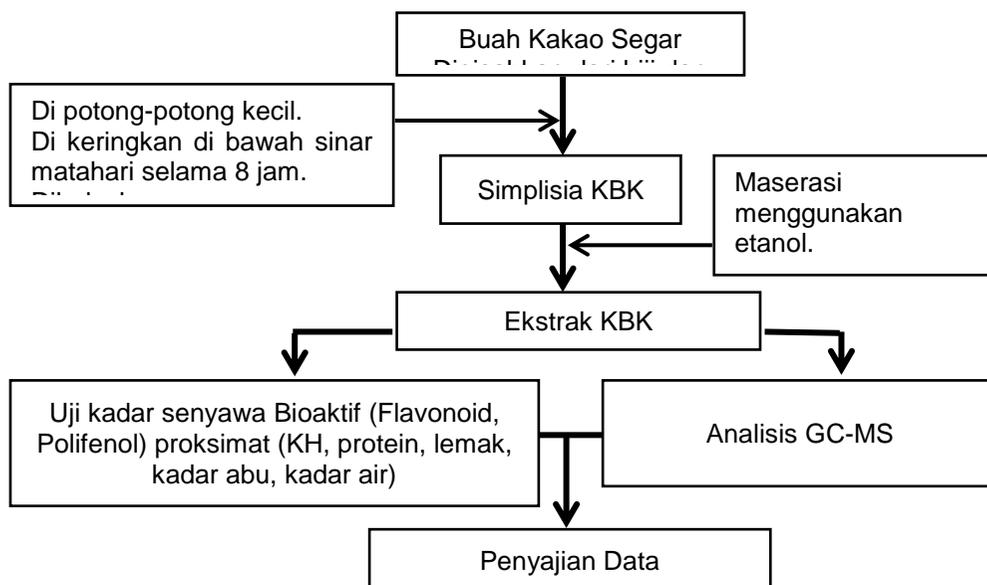
6. Penentuan senyawa dengan GC-MS

Analisis GC-MS menggunakan GC-MS Ultra QP 2010 Shimadzu, dengan terlebih dahulu menyiapkan sampel ekstrak ± 0.2 g isolat ditambahkan metanol (p.a) sebanyak 5 mL. ekstraksi dengan menggunakan sonikator selama 20 menit pada suhu 40° C. ekstrak dimasukkan ke dalam vial GC-MS. Kondisi instrumen GC-MS Suhu injektor 250°C dengan mode Splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 14 mL/min dan rasio 1:10. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C, waktu solvent cut 3 menit, 400-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 100°C/min dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 50°C/min sehingga total waktu analisa 36 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan *library* NIST 17 dan Wiley 9.

2.3.5. Penyajian Data

Data yang telah dianalisa kemudian disajikan dalam bentuk tabulasi, grafik dan narasi.

2.3.6. Alur Penelitian



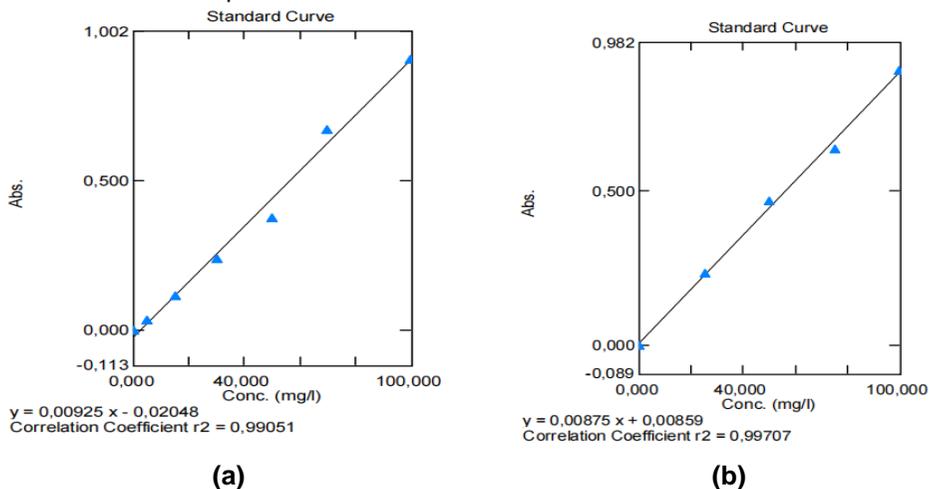
Gambar 2.1. Alur Penelitian 1

2.4. Hasil dan Pembahasan

2.4.1. Hasil

1. Kadar Polifenol, Flavonoid, Tanin dalam EKBK

Hasil pengukuran kadar Polifenol, Flavonoid dan Tanin diawali dengan kalibrasi standar asam galat dan kursetin. Berikut gambaran kurva standar berdasarkan analisa spektrofotometer UV Vis.



Gambar 2.2. Kurva Standar (a) Asam Galat (Flavonoid); (b) Kuersetin (Polifenol);

Selanjutnya nilai kadar Polifenol, dan Flavonoid dalam EKBK di uraikan dalam tabel berikut.

Tabel 2.1. Kadar Polifenol dan Flavonoid Ekstrak Kulit Buah Kakao

Sampel	Konsentrasi Total Sampel (ppm)	Absorban	Konsentrasi Sampel (ppm)	Kadar Total Sampel % b/b	Rata-rata Kadar Total Sampel % b/b
Polifenol					
EKBK 1	99,364	0,899	1000	9,936	9,868
EKBK 1	97,123	0,878	1000	9,712	
EKBK 1	99,538	0,900	1000	9,954	
Flavonoid					
EKBK 1	29,025	0,263	8000	0,363	0,358
EKBK 1	29,302	0,265	8000	0,366	
EKBK 1	27,584	0,250	8000	0,345	

Tabel 2.1 menunjukkan rata-rata kadar polifenol total yang terkandung dalam sampel sebesar adalah 9,868 % b/b atau setara dengan 98,68 mg asam galat E/gram sampel/EKBK. Rata-rata kadar flavonoid total yang terkandung dalam sampel sebesar adalah 0,358 % b/b atau setara dengan 3,58 mg quersetin E/gram sampel/EKBK.

2. Kadar Proksimat

Kadar proksimat EKBK di uraikan dalam tabel berikut.

Tabel 2.2. Kadar Proksimat EKBK

Proksimat *	Hasil Pengukuran Kadar (%) \pm SD	Nilai Proksimat Pembanding **
Kadar air	25,63 \pm 0,30	6,4 - 14,1
Abu	8,48 \pm 0,12	5,9 - 13,0
Lemak	0,65 \pm 0,02	5,9 - 13,0
Protein	10,34 \pm 0,04	2,1 - 9,1
Karbohidrat (termasuk serat kasar)	54,91 \pm 0,41	17,5 - 47,0

* Semua pengukuran proksimat dilakukan secara triplo.

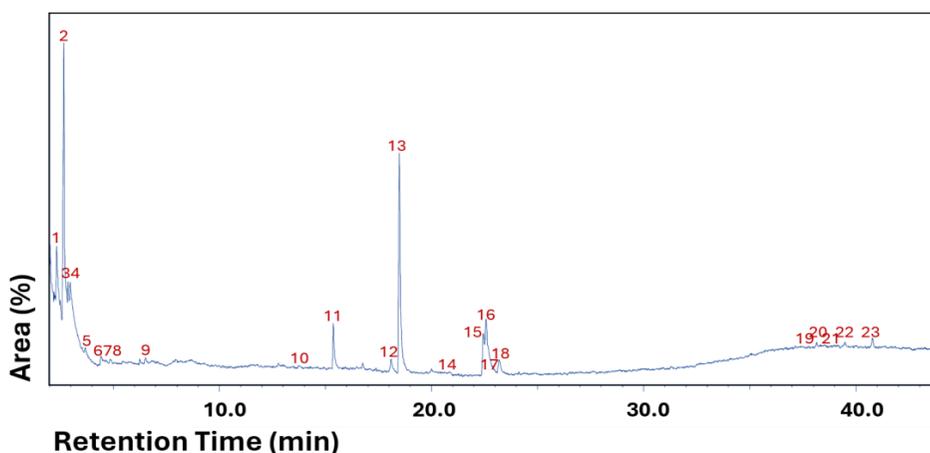
Kecuali air, semua fraksi dinyatakan dalam keadaan kering.

** Hasil pengukuran proksimat yang di ambil dari berbagai sumber (Martín-Cabrejas *et al.*, 1994; Serra Bonvehi and Aragay Benería, 1998; Redgwell *et al.*, 2003; A. Lateef *et al.*, 2008; Vriesmann, de Mello Castanho Amboni and De Oliveira Petkowicz, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Yapo *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2015; Esong *et al.*, 2015a; Laconi and Jayanegara, 2015; Chun, Husseinsyah and Yeng, 2016; Nguyen and Nguyen, 2017; Endraiyan *et al.*, 2017; Campos-Vega, Nieto-Figueroa and Oomah, 2018; Grillo *et al.*, 2019) (Arlorio, M., Coisson, J.D., Restani, P., and Martelli, 2001; Hale, S.E., Alling, V., Martinsen, 2013; Awolu, O. and Oyeyemi, 2015; Oloruntola, O.D., and Agbede, 2017)

Tabel 2.2 menunjukkan bahwa angka kadar air EKBK masih cukup tinggi jika dibandingkan, dengan kadar air KBK dari berbagai riset sebelumnya, nilai kadar abu masih berada dalam rentang yang sama dengan KBK lainnya, kadar lemak jauh lebih rendah, kadar protein lebih tinggi dari KBK yang ditemukan dari berbagai sumber, sedangkan karbohidrat termasuk serat kasar lebih tinggi jika dibandingkan dengan KBK lainnya, namun nilai karbohidrat KBK pembanding tersebut tidak termasuk serat kasar.

3. Deteksi Senyawa Lainnya dalam EKBK menggunakan GC-MS

Hasil analisa GC-MS mendeteksi beberapa senyawa yang terkandung dalam EKBK sebagaimana pada gambar berikut.



Gambar 2.3. Komposisi Senyawa dalam EKBK yang terdeteksi melalui analisis GC-MS

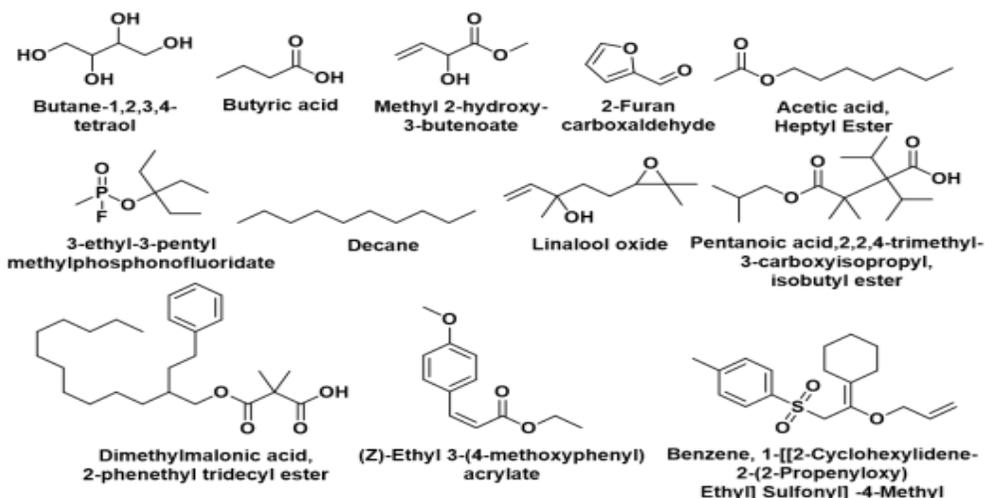
Gambar 2.3. menunjukkan ada 23 puncak senyawa yang teridentifikasi dalam EKBK dengan menggunakan GC-MS. Dan dari 23 senyawa tersebut, berdasarkan struktur kimia terbagi menjadi 3 kelompok senyawa, sebagaimana di uraikan dalam tabel berikut.

Tabel 2.3. Data Puncak Senyawa 1-23 yang terdeteksi dalam EKBK

Puncak	Waktu Retensi	Komponen	Kelompok Senyawa	Area (%)
1	2,328	Butane-1,2,3,4-Tetraol	Terpenoid	5,44
2	2,674	Butyric acid	Terpenoid	25,91
3	2,868	Methyl 2-hydroxy-3-butenoate	Terpenoid	3,67
4	2,977	2-Furancarboxaldehyde (CAS)	Terpenoid	8,14
5	3,681	Acetic acid, Heptyl Ester	Terpenoid	0,41
6	4,443	Dimethylmalonic acid, 2-phenethyl tridecyl ester	Terpenoid	1,04
7	4,650	3-ethyl-3-pentyl methylphosphonofluoridate	Terpenoid	0,93
8	4,859	Decane	Terpenoid	0,70
9	6,504	Linalool oxide	Terpenoid	0,48
10	13,751	Pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-carboxyisopropyl, isobutyl ester	Terpenoid	0,50
11	16,450	(Z)-Ethyl 3-(4-methoxyphenyl)acrylate	Terpenoid	4,64
12	18,090	9-Octadecenoic acid (Z),-, Methyl ester	Asam lemak	1,53
13	18,478	Hexadecanoic acid, Methyl ester	Asam lemak	24,35
14	20,833	Octadecanoic acid (Z),-, Methyl ester (CAS)	Asam lemak	0,39
15	22,441	9,12-Octadecadienoic acid (Z),- Methyl ester, (E,E)-	Asam lemak	4,71
16	22,570	13-Docosenoic acid, Methyl ester, (Z)-(CAS)	Asam lemak	11,05
17	22,892	Ethyl iso-allochololate	Steroid	0,63
18	23,187	Nonadecanoic acid, Methyl ester	Asam lemak	1,87
19	38,151	Cholesterol 3-O-((2-acetoxyethyl)-Benzene, 1-[[2-Cyclohexylidene-2-(2-Propenyloxy) Ethyl] Sulfonyl] -4-Methyl	Steroid	0,46
20	38,308	(2-Propenyloxy) Ethyl] Sulfonyl] -4-Methyl	Terpenoid	0,72
21	38,502	1-Monolinoleoylglycerol trimethylsilyl ether	Asam lemak	0,39
22	38,961	Cholest-5-en-3-yl (9Z)-9-Octadecenoate	Steroid	0,45
23	40,779	Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)-, tetradecanoate	Steroid	1,15
Total				100

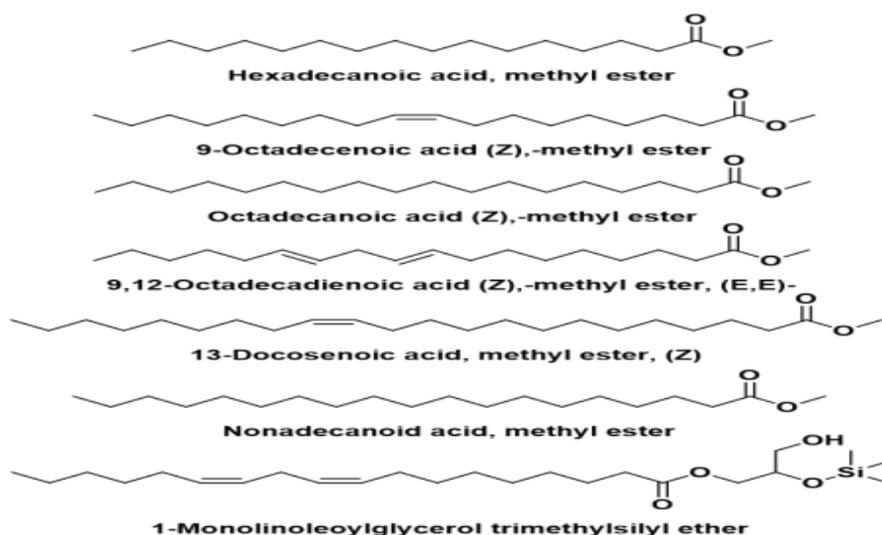
Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa yang paling dominan dalam EKBK adalah kelompok senyawa terpenoid dengan total area 52,58%, di ikuti oleh asam lemak 44,29% dan steroid merupakan kelompok senyawa paling kecil yakni hanya berkisar 2,69% total area.

Adapun struktur kimia seluruh senyawa yang teridentifikasi berdasarkan kelompok senyawa, tersebut dapat dilihat pada gambar gambar berikut.



Gambar 2.4. Struktur Senyawa Turunan Terpenoid dan Aromatik dalam EKBK yang Tampak dalam Analisis GC-MS

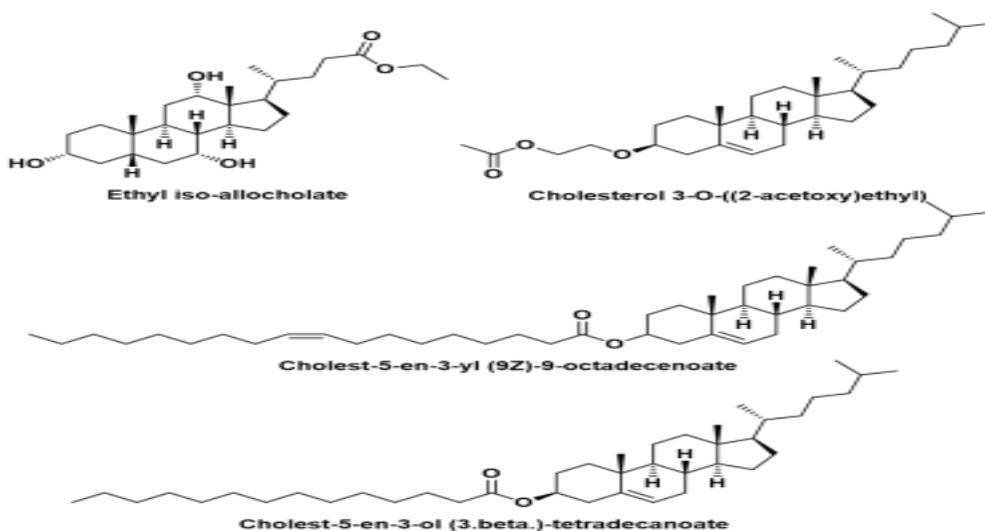
Senyawa terpenoid paling dominan yang ditemukan dalam penelitian ini adalah *butyric acid*, *2-Furancarboxaldehyde*, *Butane-1,2,3,4-Tetraol*, *Methyl 2-hydroxy-3-butenate* dengan masing-masing luas area 25,91%, 8,14%, 5,44% dan 3,67%.



Gambar 2.5. Struktur Senyawa Turunan Asam lemak dalam EKBK yang Tampak dalam Analisis GC-MS

Senyawa turunan asam lemak yang memiliki persentase paling tinggi yang

ditemukan dalam penelitian ini adalah *Hexadecanoic acid Methyl ester*, *13-Docosenoic acid Methyl ester*, dan *9,12-octadecadienoic acid methyl ester*, masing-masing luas area 24,35%, 11,05%, dan 4,71%.



Gambar 2.6. Struktur Senyawa Turunan Steroid dalam EKBK yang Tampak dalam Analisis GC-MS

Turunan steroid yang teridentifikasi dalam penelitian ini adalah *Ethyl iso-allocholelate*, *Cholesterol 3-O-((2-acetoxy)ethyl)-*, *Cholest-5-en-3-yl (9Z)-9-Octadecenoate*, dan *Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)-tetradecanoate* meskipun dengan persentase yang rendah yakni masing-masing sebesar 0,63%, 0,46%, 0,45% dan 1,15%

2.4.2. Pembahasan

1. Senyawa Polifenol, Flavonoid, dan Proksimat dalam EKBK

Jika dibandingkan dengan beberapa tanaman berkhasiat obat, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar Polifenol dan flavonoid EKBK lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia L*) (masing-masing sebesar 0,90% dan 0,0577%) yang merupakan salah satu tanaman obat karena memiliki aktifitas antioksidan yang baik (Kurniati *et al.*, 2019). Begitupula kadar polifenol EKBK lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak etanol tanaman kayu manis (*Cinnamomum burmani*) (75,685 EAG atau 1,408%), yang juga telah banyak digunakan sebagai rempah baik dalam industri pangan, maupun dalam pengobatan tradisional dan modern. Namun sebaliknya kadar flavonoid total EKBK lebih rendah dibandingkan kayu manis (60,546 Ekuivalen Kuersetin) (Antasionasti and I, 2021). Jika dibandingkan dengan daun sukun (*Artocarpus altilis*) yang juga memiliki potensi sebagai antidiabetes, flavonoid total EKBK ini lebih rendah (rata-rata sebesar 29,442 mgQE/g ekstrak) (Kusuma *et al.*, 2018), 61,4 %BB (Sitorus, 2021)

Kadar Polifenol dan flavonoid serta proksimat antar KBK dari wilayah yang berbeda juga tidak sama. Hasil penelitian ini menunjukkan kadar polifenol dan flavonoid berbeda dengan ekstrak methanol dari KBK yang berasal dari Pujapitiya, Sri Lanka yang memiliki kandungan polifenol dan flavonoid total masing-masing berada pada kisaran 3-17 fraksi GAE/g dan 117-725 QE/g (Abeywansa and Karunaratne, 2014). EKBK campuran asal Kosta Rika dan Madagaskar menunjukkan kandungan total Phenolik sebesar 7105 mg GAE/100g FW (Felice *et al.*, 2020). Namun, temuan ini juga masih sejalan dengan laporan (Pratyaksa, Putra and Suhendra, 2020), yang menunjukkan kadar polifenol ekstrak etanol KBK asal Bali Indonesia, dengan lama maserasi 24-48 jam menunjukkan kadar antara 67,99 – 148,09 mg/GAE/g). Kadar Flavonoid ekstrak methanol KBK yang berasal dari Jawa Barat menunjukkan nilai 0,2371% (Azizah, Kumolowati and Faramayuda, 2014).

Berdasarkan kandungan proksimat, jika dibandingkan dengan tanaman kelor (*Moringa oleifera*) yang juga telah digunakan dalam treatment Diabetes (Watanabe *et al.*, 2021), kadar abu, karbohidrat termasuk serat pada EKBK lebih tinggi. Kadar protein pada tanaman kelor ada yang lebih rendah juga ada yang lebih tinggi dibandingkan EKBK, meski tidak diberikan gambaran kadar lemak pada kelor, namun kandungan minyak pada tanaman kelor berkisar antara 17,8 – 58,0%. Sebaliknya kadar air pada EKBK lebih tinggi dibandingkan tanaman kelor (Özcan, 2020), hal ini dikarenakan sampel EKBK dalam penelitian ini menggunakan ekstrak kental.

Kadar proksimat dari penelitian meliputi ; kadar air, KBK dalam bentuk ekstrak etanol lebih tinggi jika dibandingkan KBK yang di iris lalu dikeringkan dan digiling menjadi pellet dan kemudian dikeringkan dapat menurunkan kadar air hingga 10% dari total 90% kadar air KBK segar (Figueroa, Garcia and Vega, 2020). Beberapa metode pengeringan dengan menggunakan microwave, forced-air drying dan forced-air-drying-extrusion memiliki kadar air yang lebih rendah lagi masing-masing secara berurutan 8,3%, 6,4% dan 6,6% (Niето-Figueroa *et al.*, 2020). Masih tingginya kadar kadar air ini dapat diakibatkan oleh metode maserasi dalam ekstraksi KBK. Pada proses maserasi diperlukan pelarut yang bersifat polar seperti etanol, aseton ataupun akuades untuk melarutkan zat aktif dalam bahan (Kurniawati, Maftuch and Hariati, 2016). Sebaliknya kadar abu yang ditemukan dalam penelitian ini lebih rendah dari KBK yang berasal dari perkebunan Perak Malaysia menunjukkan abu 9,02% (Chun, Husseinayah and Yeng, 2016), namun berada dalam kisaran yang dilaporkan (Delgado-Ospina *et al.*, 2021) untuk KBK yang berasal dari Valle del Cauca, Colombia yang dibuat dalam bentuk tepung dan dibekukan memiliki kandungan abu 8,9%. Kadar abu KBK asal Dak Lak province, Vietnam dalam berat segar juga lebih rendah sebesar 1,48%, namun KBK dalam berat kering memiliki kandungan abu yang lebih tinggi sebesar 11,44% (Nguyen and Nguyen, 2017). Abu pada KBK telah banyak diteliti terutama potensinya sebagai pengganti ataupun kombinasi pupuk, biofuel (Dias, 2014). Hampir tiga perempat dari total berat abu dalam KBK yang ditanam di Ghana merupakan mineral kalium (Donkoh *et al.*, 1991).

Kandungan lemak KBK yang ditemukan dalam penelitian ini lebih rendah dari KBK asal Malaysia sebesar 1,53%, (Chun, Husseinayah and Yeng, 2016). Namun, sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya, kandungan lemak tepung KBK asal Ekona, Kamerun sebesar 0,6% (Esong *et al.*, 2015b), KBK berat segar dan kering

masing-masing 0,12% dan 0,93% (Nguyen and Nguyen, 2017), pengeringan dengan menggunakan microwave, forced-air drying dan forced-air-drying-extrusion memiliki kandungan lemak berturut-turut sebesar 0,2%, 0,6% dan 0,7% (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020), tetapi kandungan lemak lebih tinggi sebesar 4,7% dan sebesar 8,83% pada tepung KBK (Ozung *et al.*, 2017) (A Lateef *et al.*, 2008). Kadar lemak dalam kakao dipengaruhi oleh jenis tanaman kakao dan faktor musim. Kakao yang mengalami pembuahan dimusim hujan umumnya mempunyai kadar lemak yang tinggi dibandingkan pembuahan di musim kering. Selain itu juga komponen pembentuk lemak dan komposisi asam lemak dipengaruhi oleh ketinggian tempat wilayah penanaman dari kakao (Lipp, M., & Enklam, 1998).

Kandungan protein dalam temuan ini masih sejalan dengan kandungan protein KBK pada umumnya yang berkisar 10-15% (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020), tetapi hasil temuan ini jauh lebih tinggi dari KBK berasal dari Perak, Malaysia sebesar 2,09% (Chun, Husseinsyah and Yeng, 2016). Sedangkan tepung KBK yang dibekukan, dimasukkan ke dalam air mendidih, dan dalam suhu ruang selama 3 jam mengandung protein masing-masing sebesar 5,71%, 4,85% dan 6,48%.(Delgado-Ospina *et al.*, 2021).

Kandungan karbohidrat termasuk serat kasar yang ditemukan dalam penelitian ini masih lebih tinggi dibandingkan KBK dalam bentuk basah sebaliknya lebih rendah daripada KBK kering. (Nguyen and Nguyen, 2017). Kandungan karbohidrat dalam tepung KBK baik tanpa perlakuan pemanasan maupun dengan pemanasan masing-masing sebesar 49,3% dan 50% (Delgado-Ospina *et al.*, 2021), kandungan karbohidrat total KBK tanpa perlakuan sebesar 20,6% (Laconi and Jayanegara, 2015).

KBK merupakan sumber serat makanan yang baik karena mengandung serat yang lebih tinggi dibandingkan sumber serat lainnya seperti jeruk, apel, pisang meskipun lebih rendah dari sabut kelapa, kulit kacang polong dan kulit buah markisa. Serat kasar seperti lignin, selulosa dan hemiselulosa yang terdapat di dalam KBK yang dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C dan digiling menjadi bubuk, secara berurutan sebesar 24,2%, 26,4% dan 8,7% (Figueroa, Garcia and Vega, 2020).

Kadar yang berbeda-beda ini dapat dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya asal sampel, varietas, kondisi tanah, cuaca, suhu, kadar air pengolahan seperti metode pengeringan, pemanggangan, penyimpanan, yang dapat mengubah kandungan fitokimia dan nilai fungsional KBK (Valadez-carmona *et al.*, 2017; Figueroa, Garcia and Vega, 2020)(Upadhyay *et al.*, 2022). Selain itu komposisi dan kandungan senyawa kakao juga dapat dipengaruhi oleh genotype kakao (Anita-Sari *et al.*, 2023). Genotype inilah yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim, jumlah protein, karbohidrat dan polifenol (Caligiani *et al.*, 2007; De Vuyst and Weckx, 2016).

4. Senyawa yang teridentifikasi dalam EKBK dengan menggunakan GC-MS.

Jumlah senyawa yang teridentifikasi dalam penelitian ini lebih sedikit dari senyawa teridentifikasi pada KBK asal Peru sebanyak 49 senyawa (De La Luz Cádiz-Gurrea *et al.*, 2020). Puncak dengan waktu retensi yang berbeda menunjukkan banyaknya komponen yang terkandung dalam ekstrak kulit buah kakao, sedangkan luas menunjukkan kelimpahan suatu komposisi pada setiap waktu retensi (Yodha *et al.*, 2023).

Senyawa turunan terpenoid dominan dalam temuan ini yakni Butyric acid atau butanoic acid memiliki peran penting dalam industri kimia, makanan, farmasi dan pakan ternak (J. Bradle, K.J. Domig and W. Kneifel, 2016). Butyric acid memiliki potensi untuk menggantikan peran antibiotik. (Andoh, Bamba and Sasaki, 1999) melaporkan bahwa asam butirrat telah terbukti memberikan efek antiinflamasi yang kuat baik secara in vitro maupun in vivo. Aktivitas imunoregulasi dan anti inflamasinya didasarkan pada penghambatan mediator inflamasi topical di epitel, dan kemampuannya untuk menurunkan konsentrasi sitokin pro-inflamasi seperti IL-8 dan TNF- α . 2-*Furancarboxaldehyde (methylfurfural)* merupakan anggota furan dan aldehida yang memiliki peran dalam produk reaksi maillard, metabolit manusia dan inhibitor EC 2,2,1,6 (*acetolactate synthase*) serta sebagai zat penyedap (NIH National Library of Medicine, 2023). *Furancarboxaldehyde* juga sebagai senyawa dengan konsentrasi ke-3 tertinggi pada limbah kulit buah kelapa sawit (4,44%) (Majid, Rahmawati and Riyani, 2022).

Terpenoid secara luas telah diakui baik secara konseptual maupun empiris memiliki peran penting dalam pengobatan herbal, biomaterial dan biofuel (Tong, 2013). Terpenoid menunjukkan aktivitas anti diabetes dan memperbaiki kondisi diabetes melalui regenerasi sel β pancreas (Jasmine, Ganesh Kumar and Rajaram, 2018; Singh *et al.*, 2022), anti inflamasi (Hortelano *et al.*, 2020; Truong *et al.*, 2021), efek anti Kanker melalui modulasi system kekebalan tubuh seperti pensinyalan NF-KB, merupakan agen kemopreventif serta potensial dalam terapi berbagai penyakit (Huang *et al.*, 2012).

Penelitian ini juga menunjukkan adanya senyawa aromatic yang terkandung dalam KBK asal Pulau Sulawesi. Meskipun KBK asal Sulawesi digolongkan sebagai kakao genotype non aromatic, namun tidak ada perbedaan signifikan terpenoid kakao kelompok aromatic maupun non aromatic (Anita-Sari *et al.*, 2023). Terbentuknya aromatic tidak hanya ditentukan oleh satu senyawa tetapi terdiri dari beberapa senyawa secara bersamaan membentuk aroma yang khas. Gugus aromatic mengandung beberapa senyawa diantaranya aldehida, asam, ester, furan yang umumnya lebih tinggi dibandingkan non aromatic, sebaliknya gugus non aromatic mengandung senyawa alkaloid yang tidak terdapat pada aromatik.

Senyawa turunan asam lemak seperti : Hexadecanoic acid, Methyl ester (asam palmitat) merupakan asam lemak jenuh rantai panjang, yang memiliki fungsi sebagai antibiotic. memiliki efek antimikroba tertinggi terhadap bakteri patogen klinis, (Shaaban, Ghaly and Fahmi, 2021), sifat bakterisida terhadap *Salmonella thypi* dan bersifat fungistatik terhadap *Aspergillus flavus*. (Sjafaraenan, Johannes and Tuwo, 2021). 13-Docosenoic acid, Methyl ester, (Z)-(CAS) sebagaimana yang disebutkan oleh (NIST Chemistry WebBook, 2023) memiliki nama-nama lain seperti Methyl erucate atau Erucic acid methyl ester merupakan metil ester asam lemak terutama sebagai komponen triasilgliserol. *Erucic acid* (EA) banyak terdapat dalam minyak dan tumbuhan biji utamanya biji spesies *Brassicaceae* seperti biji lobak, biji sawi, kubis, juga terdapat dalam ikan meski dalam konsentrasi yang rendah (Knutsen *et al.*, 2016). EA dan analog erucamida nya dilaporkan memodulasi molekul pensinyalan terkait memori dan jalur kolinerjik untuk meningkatkan fungsi kognitif pada hewan. Apalagi erucamida juga menunjukkan fungsi seperti antidepresan dan ansiolitik pada hewan. Namun masih

memerlukan penyelidikan praklinis lebih lanjut untuk memverifikasi manfaatnya dalam memperbaiki gangguan kognitif (Kumar and Sharma, 2020). Sedangkan senyawa 9,12-octadecadienoic acid methyl ester (E,E) yang memiliki nama lain linolelaidic acid merupakan asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat secara luas dalam glikosida tumbuhan. Ini adalah asam lemak esensial dalam nutrisi mamalia dan digunakan dalam biosintesis prostaglandin dan membrane sel.

Senyawa turunan Steroid dalam temuan ini sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa dalam limbah kakao (*Theobroma cacao L. sweatings*) mengandung kelompok senyawa steroid (Balladares *et al.*, 2016). Steroid merupakan lipid terpenoid yang ditandai dengan perbedaan kerangka karbon dengan empat cincin basal. Sebagian besar senyawa turunan Steroid dalam temuan ini merupakan kelompok kolesterol atau sterol yang paling banyak ditemukan pada membrane sel hewan dan sel darah merah, meskipun steroid juga ada yang berasal dari tanaman. Fungsi fisiologisnya terutama pada hormon seksual, kortikosteroid (kortisol, aldosterone), dan neurosteroid. Senyawa ini merupakan obat yang meningkatkan sintesis protein, mengontrol androgenik pada pria dan virilisasi pada wanita, meningkatkan sintesis otot dan tulang (Tong, 2013).

2. 5. Kesimpulan

EKBK berpotensi sebagai alternatif baru dalam pangan fungsional yang dapat memberikan manfaat kesehatan dan gizi di masa yang akan datang, baik sebagai upaya pencegahan penyakit (preventif) maupun pengobatan (kuratif) karena mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti flavonoid, polifenol, senyawa-senyawa terpenoid, asam lemak, steroid asam lemak dan steroid serta zat gizi seperti mineral (abu), protein, lemak serta karbohidrat dan serat.

2.6. Daftar Pustaka

- Abeywansha, T. S. and Karunaratne, D. N. (2014) 'Antioxidant Capacity of Cocoa (*Theobroma Cacao*) Pod', in *International Research Sessions*. Sri Lanka: Peradeniya University, p. 2014.
- Alam, N., Salim, M. and Siswo, G. (2010) 'Cacao Fruit Characteristics Harvesting at Various Growth Location Above Sea Level and Maturity Classes.', *J.Agroland*, 17(2), pp. 123–130.
- Andoh, A., Bamba, T. and Sasaki, M. (1999) 'Journal of Parenteral and Enteral Nutrition', *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.*, 23(5), pp. S70–S73. doi: 10.1177/014860719902300518.
- Anita-Sari, I. *et al.* (2023) 'Cocoa volatile compounds affect aroma but not taste.', *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 35(5), pp. 461–467. doi: 10.9755/ejfa.2023.v35.i5.3092.
- Antasionasti, I. and I, J. (2021) 'Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Manis (*Cinnamomum burmani*) Secara In Vitro / Antioxidant Activities Of Cinnamon (*Cinnamomum burmani*) In Vitro', *Jurnal Farmasi Udayana*, 10(1), pp. 38–47. doi: 10.24843/jfu.2021.v10.i01.p05.
- Arlorio, M., Coisson, J.D., Restani, P., and Martelli, A. (2001) 'Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls.', *Journal of Food Science.*, 66(5), pp. 653–656.

- Arlorio, M. *et al.* (2005) 'Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO₂', *Food Research International*, 38, pp. 1009–1014. doi: 10.1016/j.foodres.2005.03.012.
- Awolu, O. and Oyeyemi, S. O. (2015) 'Optimization of bioethanol production from cocoa (Theobroma cacao) bean shell.', *International Journal of Current Microbiology Applications*, 4(4), pp. 506–514.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E. and Faramayuda, F. (2014) 'Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.)', *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), pp. 45–49. doi: 10.26874/kjif.v2i2.14.
- Balladares, C. *et al.* (2016) 'Physicochemical characterization of Theobroma cacao L. sweatings in Ecuadorian coast', *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(10), pp. 741–745. doi: 10.9755/ejfa.2016-02-187.
- BPS, S. I. (2018) *Indonesian Cocoa Statistics 2018*. Jakarta: BPS - Statistics Indonesia.
- Caligiani, A. *et al.* (2007) 'GC-MS Detection of Chiral Markers in Cocoa Beans of Different Quality and Geographic Origin', *Chirality*, 19, pp. 329–334. doi: 10.1002/chir.
- Campos-vega, R., Nieto-figueroa, K. H. and Oomah, B. D. (2018) 'Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds Trends in Food Science & Technology Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds', *Trends in Food Science & Technology*, 81(January 2019), pp. 172–184. doi: 10.1016/j.tifs.2018.09.022.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H. and Oomah, B. D. (2018) 'Cocoa (Theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds', *Trends in Food Science and Technology*, 81(January 2019), pp. 172–184. doi: 10.1016/j.tifs.2018.09.022.
- Chun, K. S., Husseinsyah, S. and Yeng, C. M. (2016) 'Effect of green coupling agent from waste oil fatty acid on the properties of polypropylene/cocoa pod husk composites', *Polymer Bulletin*, 73(12), pp. 1–20. doi: 10.1007/s00289-016-1682-7.
- Delgado-Ospina, J. *et al.* (2021) 'Bioactive compounds and techno-functional properties of high-fiber co-products of the cacao agro-industrial chain', *Heliyon*, 7(4). doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06799.
- Dias, D. . (2014) *Agro-industrial uses of cocoa by-products*. In R. F. Schwan, & G. H. Fleet (Eds.). *Cocoa and coffee fermentations*. Boca Raton: FL: CRC Press.
- Djaenudin, D., Sulaeman, Y. and Abdurachman, A. (2002) 'Pendekatan Pewilayahan Komoditas Pertanian Menurut Pedo-Agroklimat Di Kawasan Timur Indonesia', *Jurnal Litbang Pertanian*, 21(1), pp. 1–10.
- Donkoh, A. *et al.* (1991) 'Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks', *Animal Feed Science and Technology*, 35(1–2), pp. 161–169. doi: 10.1016/0377-8401(91)90107-4.
- Endriyani, V. *et al.* (2017) 'Total Phenolics and Antioxidant Capacity of Cocoa Pulp: Processing and Storage Study', *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), pp. 1–6. doi: 10.1111/jfpp.13029.
- Esong, R. N. *et al.* (2015a) 'Effects of the dietary replacement of maize with sun-dried cocoa pods on the performance of growing rabbits', *Tropical Animal Health and Production*, 47, pp. 1411–1416. doi: 10.1007/s11250-015-0879-3.
- Esong, R. N. *et al.* (2015b) 'Effects of the dietary replacement of maize with sun-dried cocoa pods on the performance of growing rabbits', *Tropical Animal Health and Production*, 47(7), pp. 1411–1416. doi: 10.1007/s11250-015-0879-3.
- Felice, F. *et al.* (2020) 'Antioxidant effect of cocoa by-product and cherry polyphenol extracts: A comparative study', *Antioxidants*, 9(2), pp. 1–14. doi: 10.3390/antiox9020132.

- Figueroa, K. H. N., García, N. V. M. and Vega, R. C. (2020) *Cocoa By-products*. First Edit, ... *-products: Nutraceutical* First Edit. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9781119534167.ch13.
- Figueroa, K. H. N., García, N. V. M. and Vega, R. C. (2020) *Cocoa By-products, Food Wastes and By-products*. doi: 10.1002/9781119534167.ch13.
- Forero-Nuñez, C. A. . b, Jochum, J. . d and Vargas, F. E. S. . f g (2015) 'Effect of particle size and addition of cocoa pod husk on the properties of sawdust and coal pellets.', *Ingenieria e Investigacion*, 35(1), pp. 17–23. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84929393184&partnerID=40&md5=d6aa814e511af0ceb2ab2ec288093139>.
- Grillo, G. *et al.* (2019) 'Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors', *Food Research International*, 115, pp. 200–208. doi: 10.1016/j.foodres.2018.08.057.
- Hale, S.E., Alling, V., Martinsen, V. *et al.* (2013) 'The sorption and desorption of phosphate-P, ammonium-N and nitrate-N in cacao shell and corn cob biochars.', *Chemosphere*, 91(11), pp. 1612–1619.
- Hernández-Hernández, C. *et al.* (2018) 'Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk', *Food Chemistry*, 240, pp. 1–32. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.018.
- HJ., S. (2018) *Theobromine and the pharmacology of cocoa*. In: *Methylxanthines Handbook of Experimental Pharmacology*.: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_7.
- Hortelano, S. *et al.* (2020) 'Current status of terpenoids as inflammasome inhibitors', *Biochemical Pharmacology*, 172, p. 113739. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113739>.
- Huang, M. *et al.* (2012) 'Terpenoids: natural products for cancer therapy', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), pp. 1801–1818. doi: 10.1517/13543784.2012.727395.
- International Cocoa Organization (ICCO) (2022) 'World cocoa beans production, grindings and stocks', *ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, XLIX(2). Available at: https://www.icco.org/wp-content/uploads/Supply-Demand_QBCS-XLVIII-No.-1.pdf.
- J. Bradle, K.J. Domig and W. Kneifel (2016) 'Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese', *Food Control*, 67, pp. 96–113. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.02.038.
- Jasmine, R., Ganesh Kumar, A. and Rajaram, R. (2018) 'Probing the mechanism of the anti-diabetic potential of a terpenoid from elephantopus scaber L., an Indian ethnomedicinal plant in STZ diabetic rats- in vivo and in silico analysis', *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 55, pp. 384–388.
- Kementerian Kesehatan RI. (2013) *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi Pert. Jakarta.
- Kementerian Pertanian (2020) *Outlook Komoditas Perkebunan Kakao*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekjen Kementerian Pertanian.
- Knutsen, H. K. *et al.* (2016) 'Erucic acid in feed and food', *EFSA Journal*, 14(11). doi: 10.2903/j.efsa.2016.4593.
- Kumar, J. B. S. and Sharma, B. (2020) 'A review on neuropharmacological role of erucic acid: an omega-9 fatty acid from edible oils', *Nutritional Neuroscience*, pp. 1–14. doi: 10.1080/1028415X.2020.1831262.
- Kurniati, D. *et al.* (2019) 'Kajian Pengaruh Pemanasan terhadap Aktivitas Antioksidan Buah Mengkudu (Morinda Citrifolia) sebagai Alternatif Sumber Pangan Fungsional Study of Heating Effect on Antioxidant Activity of Noni Fruit (Morinda citrifolia) as an Alternative of Functional Food', *Jurnal Teknologi Pangan*, 3(1), pp. 20–25.

- Available at:
<https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/tekpangan/article/download/22562/21781>.
- Kurniawati, I., Maftuch and Hariati, A. M. (2016) 'Determination of the best Solvent and extrcat duration on the technique of Gracilaria sp. Maceration as well as its Influence on Moisture Content and Yield.', *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*, 7(2), pp. 72–77. Available at:
<http://www.samakia.aperiki.ac.id/index.php/JSAPI/article/view/106>.
- Kusuma, A. T. *et al.* (2018) 'Determination of Flavonoid Content of Ethyl Acetate Extract of Breadfruit Leaves (*Artocarpus altilis*).', *ad-Dawaa' Jour.Pharm.Sci*, 1(1), pp. 25–31.
- De La Luz Cádiz-Gurrea, M. *et al.* (2020) 'LC-MS and spectrophotometric approaches for evaluation of bioactive compounds from Peru cocoa by-products for commercial applications.', *Molecules*, 25(3177), pp. 1–16. doi: 10.3390/molecules25143177.
- Laconi, E. B. and Jayanegara, A. (2015) 'Improving nutritional quality of cocoa pod (*Theobroma cacao*) through chemical and biological treatments for ruminant feeding: In vitro and in vivo evaluation', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28(3), pp. 343–350. doi: 10.5713/ajas.13.0798.
- Lateef, A *et al.* (2008) 'Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), pp. 2369–2374. doi: 10.1007/s11274-008-9749-8.
- Lateef, A. *et al.* (2008) 'Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: Enhanced antioxidant activities and nutritional qualities', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, pp. 2369–2374. doi: 10.1007/s11274-008-9749-8.
- Lipp, M., & Enklam, E. (1998) 'Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate part A. Composition data.', *Food Chemistry*, 62, pp. 73–97.
- Lu, F. *et al.* (2018) 'Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions', *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, pp. 80–88. doi: 10.1016/j.cogsc.2018.07.007.
- Majid, Z. A. N. M., Rahmawati, L. and Riyani, C. (2022) 'Identification of bio-oil chemical compounds from pyrolysis process of oil palm empty fruit bunches.', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1063(1), pp. 1–5. doi: 10.1088/1755-1315/1063/1/012001.
- Mansur, D. *et al.* (2014) 'Conversion of cacao pod husks by pyrolysis and catalytic reaction to produce useful chemicals', *Biomass and Bioenergy*, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.03.065.
- Martín-Cabrejas, M. A. *et al.* (1994) 'Cocoa hull: A potential source of dietary fibre', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(3), pp. 307–311. doi: 10.1002/jsfa.2740660307.
- Martínez, R. *et al.* (2012) 'Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products', *Food Research International*, 49, pp. 39–45. doi: 10.1016/j.foodres.2012.08.005.
- Nguyen, V. T. and Nguyen, N. H. (2017) 'Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.)', *Technologies*, 5(14), pp. 1–10. doi: 10.3390/technologies5020014.
- Nieto-Figueroa, K. H. *et al.* (2020) 'Effect of drying methods on the gastrointestinal fate and bioactivity of phytochemicals from cocoa pod husk: In vitro and in silico approaches', *Food Research International*, 137(May), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109725.

- NIH National Library of Medicine (2023) *5-Methylfurfural*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Methylfurfural> (Accessed: 26 July 2023).
- NIST Chemistry WebBook (2023) *13-Docosenoic acid, Methyl ester, (Z)-, National Institutes of Standards and Technology U.S of Departement Commerce*. Available at: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1120349&Mask=200> (Accessed: 26 July 2023).
- Oloruntola, O.D., and Agbede, J. O. (2017) 'Growth performance of pigs on dietary cocoa bean shell meal.', *Livestock Research Rural Development*, 29(1).
- Ouattara, L. Y. *et al.* (2020) 'Cocoa pod husks as potential sources of renewable high-value-added products: A review of current valorizations and future prospects', *BioResources*, 16(1), pp. 1988–2020. doi: 10.15376/biores.16.1.ouattara.
- Özcan, M. M. (2020) 'Moringa spp: Composition and bioactive properties', *South African Journal of Botany*, 129, pp. 25–31. doi: 10.1016/j.sajb.2018.11.017.
- Ozung, P. O. *et al.* (2017) 'Growth Performance and Apparent Nutrient Digestibility Coefficients of Weaned Rabbits Fed Diets Containing Different Forms of Cocoa Pod Husk Meal', *Agriculture and Food Sciences Research*, 4(1), pp. 8–19. doi: 10.20448/journal.512.2017.41.8.19.
- Pallawagau, M. *et al.* (2019) 'Penentuan Kandungan Fenolik Total Liquid Volatile Matter dari Pirolisis Kulit Buah Kakao dan Uji Aktivitas Antifungi terhadap *Fusarium oxysporum*', *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 15(1), pp. 165–176. doi: 10.20961/alchemy.15.1.24678.165-176.
- Pandey, J. *et al.* (2020) 'Estimation of Total Quercetin and Rutin Content in *Malus domestica* of Nepalese Origin by HPLC Method and Determination of Their Antioxidative Activity', *Journal of Food Quality*, 2020, pp. 1–13.
- Pappa, S., Jamaluddin, A. W. and Ris, A. (2019) 'Kadar Tanin Pada Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Kabupaten Poliwalimandar dan Toraja Utara', *Cakra Kimia*, 7(2), pp. 92–101.
- Pratyaksa, I. P. L., Putra, G. P. G. and Suhendra, L. (2020) 'Karakteristik Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Sumber Antioksidan pada Perlakuan Ukuran Partikel dan Waktu Maserasi.', *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 8(1), pp. 139–149. doi: 10.24843/jrma.2021.v09.i01.p01.
- Redgwell, R. *et al.* (2003) 'Dietary fibre in cocoa shell: Characterisation of component polysaccharides', *Food Chemistry*, 81(1), pp. 103–112. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00385-0.
- Sa, S. and Adamson, A. (2017) 'Tapping in to the good use of cocoa (*Theobroma cacao*) pod husks: towards finding alternative sources of nutrients for animals in Nigeria.', *Journal of Food Technology and Preservation*, 1(1), pp. 42–46.
- Serra Bonvehí, J. and Aragay Benería, M. (1998) 'Composition of dietary fibre in cocoa husk', *European Food Research and Technology*, 207(2), pp. 105–109. doi: 10.1007/s002170050303.
- Shaaban, M. T., Ghaly, M. F. and Fahmi, S. M. (2021) 'Antibacterial activities of hexadecanoic acid methyl ester and green - synthesized silver nanoparticles against multidrug - resistant bacteria.', *Journal of Basic Microbiolog*, (March), pp. 1–12. doi: 10.1002/jobm.202100061.
- Da Silva, E. N. *et al.* (2015) 'Nutritional value and antioxidant capacity of "cocoa honey" (*Theobroma cacao* L.)', *Food Science and Technology*, 34(4), pp. 755–759. doi: 10.1590/1678-457X.6447.
- Singh, S. *et al.* (2022) 'Flavonoids, alkaloids and terpenoids: a new hope for the treatment of diabetes mellitus', *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 21(1), pp. 941–950. doi: 10.1007/s40200-021-00943-8.

- Sitorus, J. (2021) *The Effect of Artocarpus Altilis Leaf Extract on Fasting Blood Glucose and Lipid Profile of Prediabetes in Maros District*. Hasanuddin University.
- Sjafaraenan, Johannes, E. and Tuwo, M. (2021) 'The Effectiveness of Hexadecanoic Acid Compounds and Cytosterol Isolate from Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux as an Antimicrobial Agent in *Salmonella thypi* Bacteria and *Aspergillus flavus* Fungi.', *Bioma : Jurnal Biologi Makassar*, 6(1), pp. 99–106.
- Tjahjana, B. E., Supriadi, H. and Rokhmah, D. N. (2008) 'The Effect of Environment on Production and Quality of Cocoa.', *Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar*, pp. 69–78.
- Tong, W.-Y. (2013) *Biotransformation of Terpenoids and Steroids., Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. doi: 10.1007/978-3-642-22144-6.
- Truong, D. H. et al. (2021) 'Effects of solvent—solvent fractionation on the total terpenoid content and in vitro anti-inflammatory activity of *Serevenia buxifolia* bark extract', *Food Science and Nutrition*, 9(3), pp. 1720–1735. doi: 10.1002/fsn3.2149.
- Upadhyay, H. et al. (2022) 'Exploration of Crucial Factors Involved in Plants Development Using the Fuzzy AHP Method', *Mathematical Problems in Engineering*, 2022, pp. 1–9. doi: 10.1155/2022/4279694.
- Valadez-carmona, L. et al. (2017) 'Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.)', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 71(June), pp. 378–386. doi: 10.1016/j.ifset.2017.04.012.
- Vásquez, Z. S. et al. (2019) 'Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review', *Waste Management*, 90, pp. 72–83. doi: 10.1016/j.wasman.2019.04.030.
- Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D. and De Oliveira Petkowicz, C. L. (2011) 'Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins', *Industrial Crops and Products*, 34, pp. 1173–1181. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.04.004.
- De Vuyst, L. and Weckx, S. (2016) 'The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development.', *Journal of Applied Microbiology*, 121, pp. 5–17. doi: 10.1111/jam.13045.
- Watanabe, S. et al. (2021) 'Moringa oleifera lam. In diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis', *Molecules*, 26(3513), pp. 1–18. doi: 10.3390/molecules26123513.
- Waterhouse, A. L. (2022) *Determination of total 523 phenolics*. In: R.E. W. New York: John Wiley and Sons.
- Yapo, B. M. et al. (2013) 'Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source', *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), pp. 38–46. doi: 10.12691/ajfn-1-3-4.
- Yodha, A. W. M. et al. (2023) 'Essential Oils of *Alpinia monopoleura* and Their Antibacterial and Antioxidant Activity', *Molekul*, 18(1), pp. 80–88. doi: 10.20884/1.jm.2023.18.1.6265.