

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Buah kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian nasional. Komoditas kakao merupakan komoditas ekspor tertinggi ketiga di sektor perkebunan pada tahun 2020 setelah kelapa sawit dan karet. Di tahun 2020, total produksi biji kakao kering di Indonesia mencapai 734.792 ton (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian, 2022). Saat ini Indonesia menempati posisi ketiga sebagai negara produsen kakao dunia setelah Pantai Gading dan Ghana.

Buah kakao terdiri dari kulit buah kakao dan biji kakao. Biji kakao diolah menjadi berbagai produk olahan seperti cokelat dan bubuk kakao. Salah satu hasil samping dari proses pengolahan kakao ini adalah kulit ari biji kakao, yang dikenal juga dengan *cocoa bean shell*. Kulit ari biji kakao adalah lapisan tipis luar yang menyelimuti biji kakao yang dihasilkan dari proses pemisahan kulit (*winnowing*) biji kakao yang jumlahnya 12 - 20% dari biji (Rinaldi et al., 2020) dan dalam proses pengolahan cokelat dihasilkan kulit ari sebanyak 98 gram/kg cokelat (Rojo-Poveda et al., 2020). Menurut Okiyama et al. (2017), limbah kulit ari biji kakao yang dihasilkan didunia dalam 1 tahun sebesar 700.000 ton. Akumulasi limbah ini dapat menimbulkan persoalan lingkungan jika tidak dikelola dengan baik (Rojo-Poveda et al., 2019). Akan tetapi disisi lain, kulit ari biji kakao memiliki potensi yang besar sebagai bahan pangan karena mengandung berbagai kandungan kimia dan komponen bioaktif.

Kulit ari biji kakao mengandung berbagai senyawa kimia. Kandungan proksimat kulit ari biji kakao dalam 100 g berat kering adalah 2,02 g lemak, 15,85 g protein, 7,35 g abu, dan 7,71 g air (Martínez et al., 2012). Kulit ari biji kakao memiliki profil nutrisi yang menarik dengan kandungan serat lebih dari 50% (b/b). Kandungan lainnya adalah polifenol, jumlah berkisar antara 3,12 – 94,95 mg GAE/g kulit ari biji kakao kering. Jenis polifenol tersebut adalah flavanol, yang meliputi katekin, epikatekin, dan prosianidin (Rojo-Poveda et al., 2020). Selain itu kulit ari biji kakao juga mengandung senyawa aromatik utama yang berkontribusi pada rasa kakaonya (Barbosa-Pereira et al., 2019a, 2019b). Jenis metilxantin seperti teobromin (3,7-dimetilxantin) dan kafein (1,3,7-dimetilxantin) juga ditemukan pada kulit ari biji kakao (Barbosa-Pereira et al., 2019b).

Kuantitas limbah yang besar serta kandungan senyawa kimianya yang bermanfaat menjadikan kulit ari biji kakao dapat menjadi opsi untuk dikembangkan sebagai bahan baku minuman fungsional. Minuman fungsional adalah pangan yang secara alamiah maupun telah diproses, mengandung satu atau lebih senyawa yang berdasarkan kajian – kajian ilmiah dianggap mempunyai fungsi-fungsi fisiologis tertentu yang bermanfaat bagi kesehatan (BPOM, 2005). Polifenol yang terkandung dalam kulit ari biji kakao telah terbukti memiliki beberapa efek menguntungkan bagi kesehatan manusia, antara lain sebagai antimikroba, antivirus, antiinflamasi, antikarsinogenik, dan antidiabetes (Rojo-Poveda et al.,

2020). Sejumlah penelitian terdahulu telah memanfaatkan kulit ari biji kakao sebagai bahan dasar minuman fungsional. Siow et al. (2022) membuat minuman fungsional berbahan dasar kulit ari biji kakao dari 3 negara asal berbeda (Malaysia Vietnam dan Venezuela). Rojo-Poveda et al. (2019) mengembangkan minuman serupa dengan variasi teknik penyeduhan dan ukuran partikel kulit ari biji kakao. Sementara itu, Dos Anjos Lopes et al. (2021) mengembangkan minuman fungsional kulit ari biji kakao dengan penambahan es batu sebagai bagian dari teknik penyajiannya.

Salah satu faktor penting dalam pembuatan minuman fungsional adalah teknik penyeduhan yang dapat memengaruhi rasa, aroma, dan kandungan senyawa bioaktif. Beberapa teknik penyeduhan yang umum digunakan adalah *hot brew*, *cold brew*, dan *hot+ice brew*. *Hot brew* adalah teknik penyeduhan dengan menggunakan air bersuhu tinggi. Pada penelitian Muller et al. (2020) melakukan penyeduhan dengan metode ini dengan cara *regular brew* dan *boiling brew*. *Cold brew* adalah teknik penyeduhan dengan menggunakan air bersuhu ruang dan cenderung menghasilkan kafein dan rasa pahit yang lebih rendah serta aroma yang lebih tinggi (Lin et al., 2014). Sedangkan teknik *hot+ice brew* merupakan metode kombinasi yang mampu mempertahankan bioaktivitas antioksidan karena paparan panas yang lebih singkat dan menghasilkan profil kimia yang menyerupai *cold brew* (Lantano et al., 2015).

Pengembangan produk minuman fungsional perlu memperhatikan preferensi konsumen, terutama terkait dengan atribut sensori minuman tersebut. Salah satu metode yang bisa digunakan adalah optimasi atribut sensori menggunakan skala *Just about right* (JAR). JAR merupakan metode analisis sensoris yang banyak digunakan dalam penelitian untuk mengidentifikasi level atribut sensori suatu produk. Metode ini membantu menentukan tingkat optimal atribut sensori dan mengidentifikasi atribut mana yang secara signifikan mempengaruhi daya terima produk (Lee et al., 2008).

Berdasarkan potensi kuantitas dan manfaat dari kandungan kimianya, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan minuman fungsional seduhan kulit ari biji kakao dengan variasi teknik penyeduhan yaitu *hot brew*, *cold brew*, dan *hot+ice brew* serta melakukan optimasi atribut sensorinya menggunakan skala JAR. Kebaruan dari penelitian ini terletak pada pemanfaatan kulit ari biji kakao sebagai bahan utama minuman fungsional dengan pendekatan variasi teknik penyeduhan dan penggunaan skala JAR untuk menentukan tingkat optimal dari atribut sensori.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao?
2. Bagaimana pengaruh variasi teknik penyeduhan terhadap atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao?
3. Bagaimana hasil optimasi dari atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao?

4. Bagaimana pengaruh pengaruh variasi teknik penyeduhan terhadap atribut kandungan kimia minuman kulit ari biji kakao?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menganalisis atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao.
2. Untuk menganalisis pengaruh variasi teknik penyeduhan terhadap atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao.
3. Untuk menganalisis hasil optimasi dari atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao.
4. Untuk menganalisis pengaruh variasi teknik penyeduhan terhadap kandungan kimia fungsional minuman kulit ari biji kakao.

1.4. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi pengaruh variasi penyeduhan terhadap atribut sensori dari minuman fungsional dari kulit ari biji kakao.
2. Meningkatkan pengetahuan masyarakat terhadap gambaran rasa minuman kulit ari biji kakao.
3. Memanfaatkan hasil samping pengolahan kakao berupa kulit ari biji kakao menjadi produk minuman.
4. Menjadi sumber informasi dan referensi ilmiah untuk penelitian selanjutnya mengenai minuman fungsional dari kulit ari biji kakao.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 – Maret 2025. Lokasi penelitian berada Teaching Factory Kakao, Laboratorium Quality Control, Laboratorium Pengolahan Produk Pangan, dan Laboratorium Organoleptik di SMK SMTI Makassar.

2.2. Bahan dan Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, ayakan, pemanas air, timbangan analitik, *tea bag*, gunting, gelas, gelas ukur, batang pengaduk, gelas arloji, beaker glass, panci, thermometer, termos, heater, cup plastik kecil, spektrofotometer UV-Vis, HPLC, dan pH meter.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu kulit ari biji kakao dari Teaching Factory SMK SMTI Makassar dan air mineral merek Vit sebagai bahan baku teh. Bahan untuk uji sensori antara lain: gula pasir, garam dapur, asam sitrat, kafein, MSG, bubuk cokelat, kulit jeruk, minyak esensial melati, minyak esensial vanilla, minyak esensial kayu manis, minyak esensial green tea, minyak esensial lemon, teh komersil, rumput segar, roti, dan biji kakao. Bahan baku untuk pengujian kimia antara lain: asam galat, kafein, reagen folin ciocalteu, asam tanat, DPPH (2,2-diphenyl-1-picylhydrazyl), Na_2CO_3 , CaCO_3 , metanol, akuabides, aquades, plastik sampel, sarung tangan, dan tisu.

2.3. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor yaitu teknik penyeduhan. Teknik penyeduhan yang digunakan terdiri atas tiga jenis yaitu *hot brew*, *cold brew*, dan *hot+ice brew* seperti yang terlihat pada **Tabel 1**. Parameter yang diamati berupa respon dari panelis yaitu intensitas atribut sensori yang ada dalam minuman kulit ari biji kakao. Adapun atribut sensori yang dimaksud adalah *sweetness*, *acidity*, *bitterness*, *astringency*, *chocolatey*, *grassiness*, *toasty*, *cocoa flavor*, dan *roasted odor*. Atribut ini ditentukan dari beberapa studi literatur (Nurrahma, 2024; Siow et al., 2022). Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali ulangan.

Tabel 1. Skema Penyeduhan Minuman Kulit Ari Biji Kakao

Teknik Penyeduhan	Kulit Ari Biji Kakao (g)	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Air (mL)	Es Batu (g) ^a
<i>Hot Brew</i>	5	95	5	250	-
<i>Cold Brew</i>	5	4	720	250	-
<i>Hot + Ice Brew</i>	5	80	5	150	100

Keterangan: ^a ditambahkan setelah waktu penyeduhan selesai; massa jenis air 1 g/mL

Persiapan Bahan Baku Kulit Ari Biji Kakao

- Bahan baku kulit ari biji kakao didapatkan dari hasil pengolahan kakao menjadi produk coklat di Teaching Factory SMK SMTI Makassar. Biji kakao yang digunakan berasal dari Kota Palopo dengan jenis lindak. Untuk mendapatkan kulit ari biji kakao yang terbaik dipilih biji kakao yang tidak berjamur sebelum proses pengolahan. Kulit ari biji kakao dihasilkan dari

tahapan *winning* dan ditampung dalam wadah. Kemudian kulit ari biji kakao dihaluskan dengan blender dengan kecepatan tertentu selama kurang lebih 2 menit. Lalu diayak untuk mendapatkan ukuran yang seragam menggunakan ayakan ukuran 20 mesh. Sediaan kulit ari biji kakao yang ukurannya sudah seragam kemudian ditimbang sebanyak 5 gram dan ditempatkan pada *tea bag*. Semua *tea bag* berisi kulit ari biji kakao disimpan pada wadah kedap udara dan diberi silica gel sebelum diseduh.

Teknik Penyeduhan:

- **Teknik seduh *hot brew*** dilakukan dengan menyeduh 5 gram kulit ari biji kakao yang ditempatkan pada *tea bag* menggunakan 250 mL air mineral bersuhu 95°C selama 5 menit. Minuman hasil seduhan disajikan menggunakan cup plastik yang sudah diberi kode 3 digit angka secara acak dengan volume sebanyak 30 mL pada saat suhu seduhan berkisar antara 25 – 30°C. Untuk dapat mencapai suhu ini proses seduh diperlukan waktu kurang lebih 25 menit.
- **Teknik seduh *cold brew*** dilakukan dengan menyeduh 5 gram kulit ari biji kakao yang ditempatkan pada *tea bag* menggunakan 250 mL air selama 8 jam (720 menit) pada suhu 4°C. Minuman hasil seduhan disajikan menggunakan cup plastik yang sudah diberi kode 3 digit angka secara acak dengan volume sebanyak 30 mL.
- **Teknik seduh *hot+ice brew*** dilakukan dengan menyeduh 5 gram kulit ari biji kakao yang ditempatkan pada *tea bag* menggunakan 150 mL air bersuhu 80°C selama 5 menit. Setelah waktu seduh selesai kulit ari biji kakao dalam *tea bag* dikeluarkan dari wadah seduh, kemudian diakhiri dengan penambahan 100 g es batu. Minuman hasil seduhan disajikan menggunakan cup plastik yang sudah diberi kode 3 digit angka secara acak dengan volume sebanyak 30 mL.

2.4. Tahapan Penelitian

2.4.1 Seleksi Panelis

1. *Pre-Screening*

Calon panelis yang akan diseleksi adalah siswa dan karyawan SMK SMTI Makassar, tepatnya pada Jurusan Pengawasan Mutu Hasil Pertanian. Calon panelis diseleksi menggunakan kuesioner seperti pada **Lampiran 1** dan **2**. Kuesioner ini memuat beberapa pertanyaan mengenai identitas, riwayat kesehatan, kebiasaan konsumsi makanan (*food habit*), serta pengetahuan dasar terkait produk yang akan diuji. Hasil dari jawaban panelis pada kuesioner harus menunjukkan kesiapan panelis mengikuti tahapan uji dari awal hingga akhir penelitian.

2. Uji Seleksi Sensori (*Acuity Test*)

- a. Uji Pengenalan Rasa dan Aroma Dasar

Dari hasil *pre-screening* menggunakan kuesioner, seluruh calon paenelis yang bersedia akan mengikuti tahap uji pengenalan rasa dan aroma dasar. Pengujian rasa dan aroma dasar ini bertujuan untuk mengetahui keadaan sensori panelis. Uji rasa dasar yang digunakan yaitu rasa manis, asin, asam, pahit, dan umami (Purnama, 2018). Sedangkan aroma dasar yang digunakan adalah jenis aroma dasar seperti *cocoa flavor*, kulit jeruk, melati, vanilla, kayu manis, green tea dan lemon. Total tastan aroma dan rasa dasar berjumlah 16 dan dapat dilihat pada **Tabel 2**. Pada uji ini, nantinya calon panelis diminta untuk mendeskripsikan secara singkat dan menuangkan jawaban mereka pada formulir seperti pada **Lampiran 3**.

Tabel 2. Sampel Uji Rasa dan Aroma Dasar

Sampel	Bahan	Konsentrasi
Manis	Gula pasir	1%
Manis	Gula pasir	2%
Asin	Garam dapur	0,2%
Asin	Garam dapur	0,8%
Asam	Asam sitrat	0,03%
Asam	Asam sitrat	0,05%
Pahit	Ekstrak Kafein Kopi	0,03%
Pahit	Ekstrak Kafein Kopi	0,05%
Umami	MSG	0,18%
Cocoa Flavor	Bubuk cokelat	2 gram
Aroma Kulit Jeruk	Kulit jeruk	2 gram
Aroma Melati	Minyak esensial melati	2 tetes
Aroma Vanilla	Minyak esensial vanilla	2 tetes
Aroma Kayu Manis	Minyak esensial kayu manis	2 tetes
Aroma Green Tea	Minyak esensial green tea	2 tetes
Aroma Lemon	Minyak esensial lemon	2 tetes

Keterangan:

- Sampel rasa dasar disajikan kepada panelis dalam bentuk larutan dengan volume sebanyak 20 - 30 mL dan diberi kode 3 digit angka acak.
- Sampel aroma dasar disajikan kepada panelis berupa minyak esensial yang di teteskan ke kapas, kemudian dimasukkan dalam cup dan di tutup dan diberi kode 3 digit angka acak.

b. Uji Segitiga (*Triangle Test*)

Uji segitiga termasuk dalam salah satu pengujian sensori yang tujuannya untuk mengetahui apakah ada atau tidak perbedaan sifat sensori antara dua sampel yang diujikan. Pada penelitian ini, dilakukan uji segitiga menggunakan sampel seduhan teh dengan rasa teh hijau dari 2 merek dagang yang berbeda. Tujuan dilakukan pengujian segitiga adalah untuk mengetahui kemampuan sensori panelis lebih dalam terhadap perbedaan karakteristik pada suatu produk. Sampel uji segitiga disajikan kepada panelis dalam bentuk larutan dengan volume

sebanyak 20 - 30 mL dan diberi kode 3 digit angka acak. Formulir penilaian uji segitiga yang diberikan kepada calon panelis terdapat pada **Lampiran 4**.

c. Uji Ambang Batas (*Threshold Test*)

Uji ambang batas (*threshold test*) adalah uji berdasarkan sensitivitas panelis dalam menentukan rangsangan terendah yang mulai dapat menghasilkan rangsangan. Tujuan dari uji ini adalah untuk melatih kemampuan calon panelis terhadap berbagai rangsangan, serta untuk menentukan ambang mutlak dan ambang pengenalan pada produk yang akan diujikan dengan melihat tingkat sensitivitas dari calon panelis berdasarkan nilai BET (*best estimate threshold*). Uji *threshold* menggunakan sampel dengan lima konsentrasi yang berbeda seperti pada **Tabel 3** (Purnama, 2018). Formulir penilaian uji *threshold* yang diberikan kepada calon panelis terdapat pada **Lampiran 5**.

Tabel 3. Sampel Uji *Threshold*

Konsentrasi Sampel (g/L)			
Gula	Garam	Asam Sitrat	Ekstrak Kafein Kopi
5	0,40	0,12	0,16
10	0,80	0,24	0,32
20	1,60	0,48	0,64
40	3,20	0,96	1,28
80	6,40	1,92	2,56

Keterangan:

- Sampel uji *threshold* disajikan kepada panelis dalam bentuk larutan dengan volume sebanyak 20 - 30 mL dan diberi kode 3 digit angka acak.

2.4.2 Pelatihan Panelis

Panelis yang dilatih merupakan calon panelis yang lolos tahap seleksi panelis sebelumnya. Pelatihan bertujuan untuk meningkatkan kepekaan dan konsistensi penilaian panelis, sehingga mereka dapat dikategorikan sebagai panelis terlatih. Proses pelatihan menggunakan skala garis tak terstruktur (*unstructured scale*) untuk masing-masing atribut berdasarkan referensi standar (bukan dari sampel uji). Referensi standar diperoleh melalui karakterisasi produk uji, kemudian dianalisis untuk menentukan atribut yang relevan. Pemilihan atribut disesuaikan dengan kebutuhan penelitian. Selanjutnya, dipilih bahan yang secara spesifik dapat merepresentasikan atribut tersebut.

Jenis bahan dan konsentrasi referensi standar ditentukan berdasarkan studi literatur yang disajikan pada **Tabel 4**. Sampel referensi standar kategori disajikan kepada panelis pada cup plastik dengan volume sebanyak 20 - 30 mL. Sampel referensi standar kategori aroma disajikan kepada panelis dalam cup plastik dengan berat kurang lebih 2 gram dan ditutup. Sampel referensi standar diberi kode 3 digit angka acak. Formulir pelatihan panelis yang diberikan kepada calon

panelis terdapat pada **Lampiran 6**. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3x pengulangan.

Tabel 4. Atribut Pelatihan dan Referensi Standar

Atribut	Deskripsi	Referensi
Sweetness ^a	Rasa manis yang ditimbulkan oleh gula	Larutan gula 2%
Acidity ^a	Rasa asam yang ditimbulkan oleh asam sitrat	Larutan asam sitrat 0,05%
Bitterness ^a	Rasa pahit yang ditimbulkan oleh kafein	Larutan ekstrak kafein kopi 0,08%
Astringency ^a	Rasa kelat di mulut akibat senyawa polifenol	Larutan teh hitam pekat
Chocolatey ^b	Rasa khas cokelat	Larutan bubuk cokelat
Grassiness ^c	Rasa atau aroma menyerupai daun/rerumputan	Rumput segar
Toasty ^b	Aroma panggang ringan	Roti panggang medium
Cocoa Flavor ^b	Aroma khas cokelat	Bubuk cokelat
Roasted Odor ^b	Aroma hasil pemanggangan yang ditimbulkan oleh pirazin	Biji kakao panggang medium

Keterangan:

^a Referensi dari (Du Preez et al., 2020).

^b Referensi dari (Liu et al., 2017).

^c Referensi dari (Krasner, 1995).

2.4.3 Penentuan Atribut Sensori Minuman Hasil Seduhan Kulit Ari Biji Kakao dengan Metode *Spectrum Descriptive Analysis*

Penentuan atribut sensori minuman hasil seduhan kulit ari biji kakao dilakukan dengan metode *spectrum descriptive analysis*. Analisis kuantitatif dilakukan untuk mengetahui intensitas atribut-atribut sensori pada setiap seduhan yang diujikan. Penilaian intensitas sampel-sampel yang diujikan dilakukan menggunakan skala garis tidak terstruktur (*unstructured scale*). Formulir uji utama dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Pengujian ini menggunakan sampel 3 seduhan kulit ari biji kakao yang diseduh dengan 3 teknik seduh yaitu *hot brew*, *cold brew*, *hot+ice brew*. Tata cara persiapan kulit ari biji kakao, penyeduhan dan penyajian seduhan kulit ari biji kakao kepada panelis dijelaskan pada subbab desain penelitian. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

2.4.4 Optimasi Atribut Sensori Minuman Hasil Seduhan Kulit Ari Biji Kakao

Pada tahap sebelumnya telah dilakukan penentuan intensitas atribut sensori menggunakan metode *spectrum descriptive analysis*, langkah selanjutnya adalah menentukan atribut sensori yang dianggap belum berada pada tingkat kesukaan optimal. Atribut sensori yang berbeda nyata ($p\text{-value} < 0,05$) hasil pengujian dengan metode *spectrum descriptive analysis* kemudian dioptimasi menggunakan metode *penalty analysis*, yaitu suatu metode analisis

sensori yang diaplikasikan untuk mengukur seberapa preferensi konsumen berkurang dikarenakan adanya atribut yang tidak berada pada titik optimal dengan skala JAR (*Just About Right*) sehingga mempengaruhi performansi produk. Formulir penilaian uji untuk optimasi atribut sensori ini terdapat pada **Lampiran 8**.

2.4.5 Pengujian Kimia

1. Analisa Tingkat Keasaman (pH) (Modifikasi (Rosyada et al., 2023).

Analisa tingkat keasaman dilakukan menggunakan pH meter yang terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan buffer pH 4, 7, dan 10.00 untuk memastikan akurasi pengukuran. Sampel yang akan dianalisis disiapkan dalam gelas beaker bersih dan dijaga pada suhu ruang ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Elektroda kemudian dicelupkan ke dalam sampel hingga sensor terendam seluruhnya, dan pembacaan pH dilakukan setelah nilai yang ditampilkan stabil. Setelah pengukuran selesai, elektroda dibersihkan dan disimpan kembali sesuai prosedur untuk menjaga keakuratannya. Untuk detail prosedur pengujian total fenol terdapat pada **Lampiran 9**.

2. Analisa Kadar Tanin (Modifikasi (Hasyati, 2022).

Analisa total tanin dilakukan dengan metode folin ciocalteu dengan asam tanat sebagai standar. Sampel yang telah diencerkan direaksikan dengan reagen folin ciocalteu 10% (v/v) dan natrium karbonat (Na_2CO_3) 15% (b/v), kemudian diinkubasi selama 30 menit untuk menghasilkan kompleks berwarna yang menandakan keberadaan senyawa tanin. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 733 nm. Kadar tanin dihitung berdasarkan kurva standar asam tanat yang diperoleh dari persamaan regresi linear Untuk detail prosedur pengujian total fenol terdapat pada **Lampiran 11**.

3. Analisa Total Fenol (Modifikasi (Rosyada et al., 2023).

Analisa total fenol dilakukan dengan metode folin ciocalteau dengan asam galat sebagai standar. Sampel yang telah disiapkan akan direaksikan dengan reagen folin ciocalteau 10% (v/v) dan reagen natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% (b/v). Reaksi ini akan menghasilkan kompleks warna biru yang menandakan sampel mengandung senyawa fenol. Pengukuran kandungan total fenol menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Untuk detail prosedur pengujian total fenol terdapat pada **Lampiran 13**.

4. Analisa Kadar Kafein (Modifikasi (Quijano-Aviles et al., 2016).

Analisa kadar kafein dilakukan dengan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC) menggunakan campuran metanol dan akuabides (40:60) sebagai fase gerak. Sampel diencerkan dan disaring menggunakan filter membran 0,45 μm sebelum dimasukkan ke dalam vial HPLC. Pengukuran dilakukan secara isokratik dengan laju alir 1 mL/menit, waktu pemisahan sekitar 4 menit, dan detektor UV-Vis pada panjang gelombang

272 nm. Larutan standar kafein dengan berbagai konsentrasi disiapkan untuk membuat kurva standar, yang digunakan sebagai dasar perhitungan kadar kafein dalam sampel menggunakan persamaan regresi linear. Untuk detail prosedur pengujian kafein terdapat pada **Lampiran 15**.

5. Analisa Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (Modifikasi (S. Wang et al., 2022)).

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Prinsip kerjanya adalah berdasarkan kemampuan sampel yang digunakan dalam mereduksi radikal bebas stabil DPPH. Aktivitas penghambatan radikal bebas oleh antioksidan dari sampel akan terlihat jika larutan DPPH yang berwarna biru berubah menjadi warna kuning. Persentase penghambatan aktivitas radikal bebas diperoleh dari nilai absorbansi sampel yang diukur menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Kemudian nilai aktivitas antioksidan diekspresikan dengan nilai IC_{50} . IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi sampel yang akan mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin besar nilai IC_{50} maka nilai aktivitas antioksidan akan semakin kecil artinya nilai aktivitas antioksidan yang baik adalah ketika nilai IC_{50} rendah. Untuk detail prosedur pengujian aktivitas antioksidan terdapat pada **Lampiran 17**.

2.4.6 Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasikan dan dianalisis menggunakan aplikasi Microsoft Excel dan SPSS. Data seleksi panelis, pelatihan panelis dan pengujian kimia diolah secara statistik dengan beberapa analisis sebagai berikut:

1. Data uji segitiga (*triangle test*) dianalisis menggunakan *one proportion test* dengan bantuan aplikasi SPSS Versi 29.0.2.0 (20).
2. Data uji ambang batas (*threshold test*) dianalisis menggunakan nilai BET (*best estimate threshold*) melalui aplikasi Microsoft Excel.
3. Data uji pelatihan atribut sensori dianalisis menggunakan *pearson correlation* dan *paired t-test* dengan bantuan aplikasi SPSS Versi 29.0.2.0 (20).
4. Data penentuan atribut sensori dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) general linear model (GLM) dan dilanjutkan dengan uji Fisher LSD dengan bantuan aplikasi SPSS Versi 29.0.2.0 (20).
5. Data optimasi atribut sensori dianalisis menggunakan *penalty analysis* dengan bantuan aplikasi XLSTAT 2019.
6. Data pengujian kimia dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) general linear model (GLM) dan dilanjutkan dengan uji Fisher LSD dengan bantuan aplikasi SPSS Versi 29.0.2.0 (20).