

## Potensi Antioksidan pada Bubuk Kakao (*Theobroma cacao* L) Fermentasi Dan Non Fermentasi terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Hiperlipidemia

Antioxidant Potential of Fermented and Unfermented Cocoa Powder (*Theobroma cacao* L) on level of Malonyldialdehyde (MDA) in Hiperlipidemic Rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

Rinda Binugraheni<sup>1</sup>, Nastiti Wijayanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan D-III Analis Kesehatan, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Setia Budi, email: rinda.binugraheni@gmail.com

<sup>2</sup>Jurusan S2 Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRAK

Indonesia merupakan negara penghasil kakao terbesar ketiga di dunia. Penelitian-penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa kakao (*Theobroma cacao* L) mengandung senyawa polifenol antara lain katekin, epikatekin, proantosianidin, dan antosianin yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi antioksidan bubuk kakao (*Theobroma cacao* L) fermentasi dan non fermentasi terhadap kadar malondialdehid (MDA) tikus putih. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial dengan delapan perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan terdiri dari kelompok normal, kontrol positif, 3 kelompok uji bubuk kakao fermentasi dan 3 kelompok uji bubuk kakao non fermentasi masing-masing dengan dosis 0,2, 0,4, dan 0,8 gram /200 gram BB. Tikus diberi diet tinggi lemak selama 8 minggu, dan larutan bubuk kakao diberikan 4 minggu terakhir masa penelitian. Pengukuran kadar Malondialdehid (MDA) diukur pada minggu ke-4 dan 8 masa penelitian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan total fenol bubuk kakao fermentasi lebih besar dari pada bubuk kakao non fermentasi. Pemberian bubuk kakao fermentasi secara oral mampu menurunkan kadar MDA, sedangkan bubuk kakao non fermentasi belum dapat menurunkan kadar MDA.

Kata kunci: bubuk kakao fermentasi, bubuk kakao non fermentasi, antioksidan, Malondialdehid (MDA).

### ABSTRACT

Indonesia is the 3<sup>rd</sup> largest cacao-producing country in the world. Based on the researchs, cocoa contain polyphenols (catechin, epicatechin, proantosianidin, and antisoanin), that potentially became antioxidant. The aim of this study was to study antioxidant potential of fermented and unfermented cocoa powder on level of malonyldialdehyde in rats. Research design using RCD (Randomized Complete Design) factorial with eight treatment and three replication. Experimental rats divided into 8 group (normal group, high lipid diet group, 3 fermented cocoa-group, 3 unfermented cocoa-group dose 0,2, 0,4, and 0,8 g /200 g BB). Rats were fed with high lipid diet for 8 weeks and cocoa powder was given orally for 4 weeks from 4 weeks later in experimental days. The level of malonyldialdehyde (MDA) was measure at 4 and 8 weeks. The results showed the total phenolic content of fermented cocoa powder is greater than the unfermented cocoa powder. Fermented cocoa powder can decreased serum MDA, but unfermented of cocoa powder can't decreased that.

Keywords : unfermented cocoa powder, fermented cocoa powder, antioxidant, malonyldialdehyde (MDA).

### PENDAHULUAN

Perubahan pola kehidupan, terutama pada pola makan sehari-hari merupakan salah satu pemicu penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke. Penyakit jantung koroner adalah suatu kelainan pada jantung yang disebabkan oleh atherosklerosis atau penyumbatan pada pembuluh darah jantung. Atherosklerosis disebabkan oleh beberapa faktor yaitu hiperlipidemia, diabetes mellitus, hipertensi, merokok, obesitas, dan kebiasaan makan (Sutanty, 1994).

Hiperlipidemia merupakan gangguan metabolisme lipid yang ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol total, *Low Density Lipoprotein* (LDL), trigliserida dan penurunan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) (Price & Wilson, 2006). Ketersediaan substrat yang berupa lemak dapat memicu reaksi berantai dan radikal bebas yang lebih tinggi. Radikal bebas dapat menyerang asam lemak tidak jenuh ganda (PUFA). Oksidasi asam lemak tidak jenuh ganda menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA),

4-hidroksi noneal (HNE), trans-4-hidroksi-2-heksenal (HHE), isoproston, etan, pentan dan lain-lain. Salah satu tolok ukur yang menentukan seberapa banyak oksidan terbentuk di dalam tubuh adalah dengan diketahuinya kadar MDA di dalam tubuh. Adanya dampak negatif dari hiperlipidemia, maka perlu adanya upaya untuk mengatasinya, salah satunya yaitu dengan pengaturan pola makan dan minum antara lain dengan mengkonsumsi makanan atau minuman yang kaya akan antioksidan sehingga dapat menetralkan radikal bebas.

Biji kakao kaya akan senyawa-senyawa fenolik, antara lain katekin, epikatekin, proantosianidin, asam fenolat, tannin, dan flavonoid lainnya (Othman *et al.*, 2005). Penelitian-penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa flavanol yang terdapat pada bubuk kakao fermentasi maupun non fermentasi berperan sebagai antioksidan dalam tubuh dan membantu mencegah kerusakan akibat radikal bebas. Namun sampai saat ini belum ada perbandingan potensi antioksidan dalam kedua jenis bubuk kakao serta pengaruhnya terhadap kadar malondialdehid (MDA) tikus putih.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 32 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) jantan galur Spargue Dawley, umur 3 - 4 bulan dengan berat badan 200-300 gram yang dibeli dari Unit Pra klinik LPPT UGM. Bubuk kakao Varietas Forastero bebas lemak fermentasi diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Jember dan bubuk kakao non fermentasi diperoleh dari PT. Teja Sekawan Cocoa Industries Surabaya. Akuades untuk melarutkan bubuk kakao. Pakan AD II, minyak babi dan kuning telur puyuh yang diperoleh dari Pasar Kranggan, Yogyakarta.

Bahan kimia yang digunakan untuk pengukuran kadar MDA adalah TBA 0,67% dan TCA 20%. Pengukuran kadar total fenol dengan metode *Folin Ciocalteau* menggunakan reagen *Folin Ciocalteau*, aseton, n-heksan teknis,

methanol, asam galat, larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

### Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yang dimulai dari pengujian kandungan fenolik yang terdapat pada bubuk, persiapan hewan uji, persiapan diet tinggi lemak, persiapan larutan bubuk kakao fermentasi dan non fermentasi dengan berbagai dosis perlakuan.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan delapan perlakuan dan tiga ulangan. Perlakuan terdiri dari kelompok kontrol, kontrol positif, perlakuan bubuk kakao fermentasi (0,2, 0,4 dan 0,8 gram/200 gram BB/hari) dan perlakuan bubuk kakao non-fermentasi (0,2, 0,4 dan 0,8 gram/200 gram BB/hari). Pemberian diberi diet tinggi lemak dilakukan selama 8 minggu, dan larutan bubuk kakao diberikan 4 minggu terakhir masa penelitian.

Kadar malondialdehid (MDA) dihitung dengan metode TBARS yaitu setelah 4 minggu diet tinggi lemak dan diakhir masa penelitian setelah perlakuan dengan bubuk kakao.

### Pengukuran Kadar Total Fenol

Prosedur pengukuran kandungan fenol menggunakan metode Folin Ciocalteau (Chien & Yen, 2002). Sampel (bubuk kakao) sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 20 mL metanol, dan diambil 1 ml larutan sampel, ditambahkan 1 ml akuades dan 0,5 ml 50% (v/v) reagen folin, kemudiandihomogenkan dengan vorteks selama 3 menit. Setelah itu ditambahkan 5 mL larutan 2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Campuran disimpan selama 30 menit pada suhu kamar di ruang gelap, kemudian diukur pada panjang gelombang 750 nm dengan *spektrofotometer*.

### Kadar Malondialdehid (MDA)

Kadar MDA serum diukur dengan menggunakan metode TBARS yaitu mengukur konsentrasi *Thiobarbituric Acid Raeactive Substances*. Lipid peroksida serum dihitung dengan rumus sebagai berikut (Mahmood *et al.*, 2010):

$$\text{Lipid peroksida} = \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi Blanko}}{E \text{ MDA} (1,56 \times 10^5)}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Total fenol bubuk kakao

Nilai total fenol yang dimiliki oleh ekstrak bubuk kakao fermentasi dan non fermentasi disajikan pada Tabel 1.

Hasil pengukuran total fenolik ekstrak bubuk kakao menunjukkan bahwa kadar rerata total fenol pada bubuk kakao fermentasi lebih besar daripada bubuk kakao non fermentasi (Tabel 1). Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian Misnawi *et al.* (2002) yang menyatakan bahwa biji kakao yang difermentasi mengandung senyawa polifenol yang lebih rendah dari pada biji kakao yang tidak difermentasi. Perbedaan hasil ini diduga disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah cuaca (iklim), jenis tanah, tingkat kematangan, dan proses pengolahan yang dilakukan pada masing-masing biji kakao. Walaupun varietas biji kakao yang digunakan dalam penelitian ini sama yaitu Varietas Forastero, namun tempat produksi dan asal biji kakaonya berbeda. Hal inilah diduga menjadi

penyebab perbedaan kandungan polifenol pada masing-masing bubuk. Erniati (2007) menyatakan bahwa kandungan polifenol bubuk kakao sangat tergantung pada kualitas biji kakao dan proses pengolahannya.

### Kadar Malondialdehid (MDA)

Pada penelitian ini, masa induksi 4 minggu dengan diet pakan tinggi lemak, mampu meningkatkan kadar MDA dalam darah tikus penelitian. Hal ini dapat dilihat dari kadar MDA kelompok kontrol yaitu sebesar 205,13 nmol/L sedangkan kelompok perlakuan dengan pakan tinggi lemak mempunyai rerata kadar MDA sebesar 271,06 nmol/L (Tabel 2). Peningkatan kadar MDA ini diduga karena pada kondisi hiperlipidemia terjadi peningkatan substrat lemak yang tinggi yang dapat memicu reaksi berantai dan radikal bebas yang lebih tinggi.

Berdasarkan hasil penelitian, kadar MDA tikus hiperlipidemia setelah pemberian bubuk kakao selama 4 minggu menunjukkan terjadinya peningkatan dan penurunan kadar MDA dengan tingkat yang bervariasi diantara kelompok perlakuan. Penurunan kadar MDA terjadi pada semua kelompok bubuk kakao fermentasi dari

Tabel 1. Rerata total fenol ekstrak bubuk kakao

Jenis Bubuk	Total Fenolik (mg GA/ g ekstrak kering )
Non fermentasi	18,45± 1,00 <sup>a</sup>
Fermentasi	26,40± 0,16 <sup>a</sup>

Tabel 2. Kadar MDA tikus pada minggu ke4 dan 8

KELOMPOK	MDA (nmol/L)		Peningkatan (+) atau Penurunan (-) (%)
	Awal Minggu ke-4	Akhir Minggu ke-8	
Kontrol	205,13±11,70 <sup>a</sup>	220,09±8,22 <sup>a</sup>	+7,22±4,96 <sup>a,b,c</sup>
Kontrol positif	326,92±11,70 <sup>b,c</sup>	333,98±8,51 <sup>c</sup>	+2,17±4,07 <sup>b,c</sup>
Fermentasi 0,2 g	226,50±26,77 <sup>a</sup>	260,68±40,59 <sup>a,b</sup>	+15,64±12,61 <sup>a,b</sup>
Fermentasi 0,4 g	228,63±14,01 <sup>a</sup>	299,15±31,48 <sup>b,c</sup>	+30,56±9,50 <sup>a</sup>
Fermentasi 0,8 g	232,91±9,31 <sup>a</sup>	233,97±20,36 <sup>a</sup>	+0,40±5,36 <sup>b,c</sup>
Non Fermentasi 0,2 g	292,74±20,38 <sup>a,b,c</sup>	211,54±20,61 <sup>a</sup>	26,18±11,43 <sup>d</sup>
Non Fermentasi 0,4 g	243,59±7,40 <sup>a,b</sup>	215,81±11,89 <sup>a</sup>	11,75±3,89 <sup>c,d</sup>
Non Fermentasi 0,8 g	346,15±73,92 <sup>c</sup>	245,73±20,28 <sup>a,b</sup>	29,13±9,34 <sup>d</sup>

yang terendah hingga tertinggi berturut-turut adalah 11,75% (0,4 g/200 g BB), 26, 18% (0,2 g/200 g BB) dan 29,13% (0,8 g/200 g BB). Sedangkan peningkatan kadar MDA terjadi pada kelompok bubuk kakao non fermentasi pada berbagai dosis perlakuan.

Hasil pengukuran kadar MDA menunjukkan bahwa pemberian bubuk kakao fermentasi pada tikus penelitian dapat menurunkan rata-rata kadar MDA serum bila dibandingkan dengan pemberian bubuk kakao non fermentasi. Hal ini diduga karena perbedaan kandungan polifenol yang terdapat dalam bubuk. Sanbongi *et al.* (1998) menyatakan bahwa senyawa polifenol memiliki kapasitas antioksidan. Polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan ini mampu mengurangi atau menghilangkan radikal bebas yang meningkat pada kondisi hiperlipidemia. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Yuliatmoko (2007) yang menyatakan bahwa konsumsi minuman bubuk bebas lemak pada 18 wanita sehat berpengaruh nyata dalam meningkatkan aktivitas antioksidan plasma dan menurunkan kadar malondialdehid (MDA) plasma.

Kochhar & Rossell (1990) dalam Erniati (2007) mengemukakan bahwa senyawa polifenol dapat berfungsi sebagai antioksidan karena mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas yang terjadi di dalam sel. Polifenol dalam bubuk kakao akan bereaksi langsung dengan senyawa peroksida radikal yang terdapat pada membran atau di dalam sel. Dengan demikian dapat menurunkan kadar MDA yang merupakan produk oksidasi asam lemak karena radikal bebas. Menurut Charpentier & Cateora (1996) dalam Kusumaningtyas (2008) mekanisme antioksidan flavonoid dalam melindungi tubuh adalah melalui penghambatan terbentuknya radikal beba menjadi perantara dalam netralisasi radikal bebas

yang telah terbentuk (*scavenger*), menurunkan kemampuan radikal bebas dalam reaksi oksidasi, dan menghambat enzim oksidatif, misalnya sitokrom P450.

## KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Kadar total fenol bubuk kakao fermentasi lebih besar daripada kadar total fenol bubuk kakao non fermentasi.
2. Bubuk kakao fermentasi mampu menurunkan kadar MDA tikus putih hiperlipidemia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chien, Y.H. & Yen, G.C. 2002. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Isolated from *Mesona Procumbens* Hemsl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(10): 2993-2997
- Erniati. 2007. Efek Konsumsi Minuman Bubuk Kakao Bebas Lemak Terhadap Sifat Antioksidatif dan Proliferasi Limfosit Manusia. Progam studi ilmu pangan. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Kusumaningtyas, R.W. 2008. Pengaruh Pemberian Minuman Bubuk Kakao Bebas Lemak (*Theobroma cacao* linneaus) terhadap Profil Darah Beberapa Manusia. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Mahmood, N. A. 2010. Glutathion S transferase Enzyme and Malondialdehyde (MDA) in Colorectal Cancer and in Healthy Control. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics*. 3(1): 2126.
- Misnawi, Selamat J, Bakar J, & Saari N. 2002. Oxidation of Polyphenols in Unfermented and Partly Fermented Cocoa Beans by Cocoa Polyphenol Oxidase and Tyrosinase. *Journal Science Food Agriculture*. 82: 559-566.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A., & Adenan, I. 2007. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cacao Bean : *Food Chemistry*. 152: 315-330.
- Price, S.A. & Wilson, L.M. 2006. *Patofisiologi, Konsep Klinis, Proses Penyakit*. Edisi 6. EGC. Jakarta.
- Sanbongi, C., Osakabe N, Natsume M, Takizawa T, Gomi S, & Osawa T. 1998. Antioxidative Polyphenols Isolated from *Theobroma Cacao*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 46: 452-457
- Sutantyo, E. 1994. The Effect of Palm Oil, Peanut Oil, and Margarin on The Serum Lipoprotein and Atherosclerosis in Rat. *Majalah Gizi Indonesia*. 19: 12.
- Yuliatmoko, W. 2007. Efek Konsumsi Minuman Bubuk Kakao Bebas Lemak terhadap Aktivitas Antioksidan dan Bioavailabilitas Flavonoid Plasma Manusia. Tesis. Institut Pertanian Bogor.