

PENGARUH SEDUHAN BUBUK KAKAO LINDAK TERHADAP STRES OKSIDATIF TIKUS WISTAR JANTAN AKIBAT PEMBERIAN MINYAK JELANTAH

Antioxidant Effects of Dissolved Cocoa Powder on Oxidative Stress Prevention in Wistar Rats.

Mustika Rohma Wardhani^{1*}, Teti Estiasih¹

1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang
Jl. Veteran, Malang 65145

*Penulis Korespondensi, Email: dhannii_keccil@yahoo.com

ABSTRAK

Kakao memberikan efek antioksidan yang dapat meningkatkan aktivitas SOD dan menurunkan kadar MDA darah karena kandungan polifenolnya yang tinggi. Kandungan polifenol tinggi ini didukung oleh penyangraian vakum yang digunakan, sehingga polifenol tidak hilang selama proses penyangraian. Tujuan dari penelitian ini mengetahui efek antioksidan seduhan bubuk kakao terhadap kadar MDA dan SOD darah pada kondisi stres oksidatif akibat minyak jelantah. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan tersarang (*nested design*) dengan dua faktor dan lima ulangan, dimana antara kedua faktor tidak ada interaksi. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) diikuti uji lanjut BNT dan DMRT ($\alpha=0.05$).

Berdasarkan hasil penelitian, seduhan bubuk kakao 0.25 g/ml memiliki efek antioksidan yang paling baik dengan aktivitas antioksidan sebesar 64.27% dan total fenol sebesar 14582.20 mg/kg, seduhan bubuk kakao 0.15 g/ml memiliki nilai aktivitas antioksidan sebesar 56.7% dan total fenol sebesar 12339.94 mg/kg. Kedua perlakuan memberikan perbedaan signifikan dibanding kelompok stres oksidatif.

Kata kunci : Antioksidan, Bubuk Kakao, Kakao Lindak, Radikal Bebas, Stres Oksidatif

ABSTRACT

Cocoa antioxidant effect that can improve blood SOD activity and lower MDA blood because it has a high content of polyphenols. Polyphenol content is supported by roasted vacuum is used. The aim of this study to know the effect of antioxidant infusion of cocoa powder on the blood levels of MDA and SOD. The factors that influence the type treatment significantly ($\alpha = 0.05$) to the levels of MDA and SOD activity of blood. Factors significant treatment effect ($\alpha = 0.05$) to the levels of MDA, SOD activity of blood serum and MDA/SOD ratio. Infusion dose of cocoa powder 0.25 g/ml had the best antioxidant effect with antioxidant activity of 64.27%, total phenols 14582.20 mg/kg, infusion dose of cocoa powder 0.15 g/ml had a value of 56.7% antioxidant activity and total phenols of 12339.94 mg/kg. Both treatments gave significant differences compared to the other.

Keywords : Antioxidants, Cacao Powder, Cocoa Lindak, Free Radical, Stress Oxidative

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara ketiga penghasil kakao terbesar dunia, ada dua jenis kakao yang umum dikenal di Indonesia, yaitu kakao mulia atau edel kakao (*fine/flavour cocoa*) yang berasal dari varietas *criollo* dan kakao lindak (*bulk kakao*) berasal dari varietas *forastero* dan *trinitro*. Kakao lindak merupakan kakao kualitas kedua dan digunakan sebagai bahan komplementer dalam pengolahan kakao mulia. Meskipun termasuk kualitas kedua

dan digunakan sebagai bahan komplementer, jenis kakao lindak mendominasi seluruh perkebunan di Indonesia.

Akhir-akhir ini produk kakao banyak mendapat perhatian karena mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. Polifenol golongan flavonoid terutama katekin dan epikatekin adalah komponen utama dalam produk kakao yang berperan sebagai antioksidan[1]. Polifenol kakao dapat mencegah terbentuknya radikal bebas, dapat melindungi oksidasi LDL darah, berpengaruh terhadap antimutagenik, dan dapat menghambat tumor [2].

Pada bubuk kakao yang digunakan terdapat banyak senyawa menguntungkan bagi tubuh, di dalam bubuk kakao terdapat total fenol sebesar 9.35%, katekin 3.37%, dan terdapat kandungan lain yang berupa protein 10.82%, lemak 6.03%, gula reduksi 1.98%, pati 15.01% dan kadar air 5.03%. Hasil tersebut didapatkan dengan menggunakan penyangraian vakum. Penyangraian vakum digunakan untuk mempertahankan komponen gizi yang ada pada produk. Total polifenol yang didapatkan bisa digunakan sebagai parameter aktivitas antioksidan yang terdapat pada bahan tersebut. Semakin tinggi nilai total fenol bahan tersebut, maka bisa dikatakan aktivitas antioksidan bahan tersebut akan meningkat [3]. Antioksidan pada kakao dipercaya dapat menjadi penghambat stres oksidatif yang berasal dari radikal bebas. Stres oksidatif merupakan suatu keadaan ketidakseimbangan antara produksi senyawa turunan oksigen dan sistem antioksidan tubuh. Stres oksidatif akibat radikal bebas dapat terjadi salah satunya karena mengkonsumsi makanan dengan jumlah asam lemak tak jenuh tinggi, seperti makanan yang menggunakan penggorengan dengan minyak jelantah [4].

SOD dan MDA merupakan parameter dari mekanisme antioksidan dalam darah. Aktivitas *Superoxide Dismutase* (SOD) merupakan indikator dari status antioksidan, sedangkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) adalah indikator dari peroksidasi lipid. Rasio antara MDA/SOD merupakan indeks stres oksidatif yang diukur dari serum. Dimana jika rasio MDA/SOD meningkat mengindikasikan tingginya kondisi stres oksidatif [5].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh antioksidan dari seduhan bubuk kakao terhadap kadar MDA dan aktivitas SOD darah pada kondisi stres oksidatif akibat pemberian minyak jelantah.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Analisis kimia menggunakan bahan-bahan antara lain H_2O_2 , aquades, Amonium tiosianat, $BaCl_2$, $FeSO_4$, HCl 37%, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, benzena, metanol, TCA 100%, Na-Thio 1%, HCl 10 N, PBS, *xantine*, *xantine oxidase*, NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), DPPH, Folin C, Na_2CO_3 .

Bubuk Kakao Jenis Forastero (Lindak), sampel untuk *in vivo* adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus* strain wistar jantan dewasa usia 100-120 hari dengan berat badan 150-200 gram. Minyak jelantah yang akan pemberian pada tikus didapat dari pedagang lalapan di kota Malang. Bahan yang digunakan untuk pakan tikus adalah Comfeed PARS (BR1) diperoleh dari gudang ternak Sawahan Malang, tepung terigu kunci 'Prima Rasa', air dan bubuk kakao hasil penelitian [3].

Alat

Alat yang digunakan untuk perawatan tikus antara lain kandang tikus, tempat makan tikus, tempat minum tikus, serbuk gergaji, sonde. Peralatan untuk membuat pakan tikus adalah timbangan digital, baskom, spatula, gelas ukur, *meat grinder*, loyang, pengering kabinet.

Alat yang digunakan untuk analisis antara lain timbangan analitik merk Denver Instrument tipe M310, perangkat gelas, spektrofotometer 20D Plus merk LaboMed, spektrofotometer UV mini-1240 merk Shimadzu, kuvet, *microcentrifuge* merk Jovan tipe A14, mikropipet merk Soccorex, tip, vortex, *tube* 2 ml, mikrohematokrit, inkubator merk WTB Binder, spektrofotometer UV-1601 merk Shimadzu.

Desain Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Tersarang (*nested design*) dengan dua faktor dan lima ulangan, dimana antara kedua faktor tidak ada interaksi. Terdapat 2 faktor dengan faktor pertama terdiri dari 4 level dan faktor kedua terdiri dari 6 level yang diulang sebanyak 5 kali.

Faktor pertama merupakan jenis perlakuan pemberian seduhan bubuk kakao. Faktor pertama merupakan kelompok pada tikus yang akan diberi perlakuan dan tidak diberi perlakuan.

- A1 = Tikus dengan pemberian diet normal (kontrol normal), tikus ini tidak akan mendapat perlakuan, karena tikus kontrol akan digunakan sebagai parameter tikus dalam keadaan normal (tanpa perlakuan).
- A2 = Tikus dengan pemberian diet normal + minyak jelantah 2 ml (kontrol stres oksidatif). Tikus pada kelompok ini akan diberi perlakuan minyak jelantah dan akan digunakan sebagai parameter tikus dengan kadar MOD tinggi.
- A3 = Tikus dengan pemberian seduhan bubuk kakao 2 ml konsentrasi 0,15 g/ml + minyak jelantah 2 ml (stres oksidatif + konsentrasi 0,15 g/ml). Tikus pada kelompok ini akan diberikan minyak jelantah dan bubuk kakao, untuk mengetahui seberapa efektifkah takaran bubuk kakao dengan takaran minyak jelantah tersebut.
- A4 = Tikus dengan pemberian seduhan bubuk kakao 2 ml konsentrasi 0,25 g/ml + minyak jelantah 2 ml (stres oksidatif + konsentrasi 0,25 g/ml). Tikus pada kelompok ini akan diberikan minyak jelantah dan bubuk kakao, untuk mengetahui seberapa efektifkah takaran bubuk kakao dengan takaran minyak jelantah tersebut.

Faktor kedua merupakan waktu pengambilan sampel.

- B1 = Minggu ke-1, minggu ini adalah minggu adaptasi tikus
- B2 = Minggu ke-2, minggu ini adalah minggu perlakuan dengan minyak jelantah pada masing-masing tikus, terkecuali pada kelompok normal (A1).
- B3 = Minggu ke-3, minggu ini kelompok tikus memasuki perlakuan minyak jelantah dan bubuk kakao.
- B4 = Minggu ke-4, minggu ini kelompok tikus memasuki perlakuan minyak jelantah dan bubuk kakao.
- B5 = Minggu ke-5, minggu ini kelompok tikus memasuki perlakuan minyak jelantah dan bubuk kakao.
- B6 = Minggu ke-6, minggu ini kelompok tikus memasuki perlakuan minyak jelantah dan bubuk kakao.

Pelaksanaan Penelitian

Tahap Penelitian dimulai dari tahapan *in vivo*, pada tahap ini meliputi aklimatisasi (masa adaptasi) selama 1 minggu, adaptasi dengan pemberian minyak jelantah selama 1 minggu, dan 4 minggu (28 hari) kemudian pengujian *bio-assay* terhadap profil serum darah untuk menentukan kadar MDA dan SOD.

Tikus dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan dengan masing-masing 5 kali ulangan. Kelompok tersebut adalah sebagai berikut:

- Kelompok 1 : Kontrol normal, yaitu tikus diberi pakan *Comfeed* PARS tanpa pemberian minyak jelantah.
- Kelompok 2 : Kontrol stres oksidatif, yaitu tikus diberi standar *Comfeed* PARS serta pemberian minyak jelantah.
- Kelompok 3 : Tikus diberi pakan dengan seduhan bubuk kakao 2 ml konsentrasi 0,15 g/ml serta pemberian minyak jelantah 2 ml.
- Kelompok 4 : Tikus diberi pakan dengan seduhan bubuk kakao 2 ml konsentrasi 1,25 g/ml serta pemberian minyak jelantah 2 ml.

Tikus diberi minyak jelantah sebanyak 2 ml secara oral (*force feeding*) menggunakan sonde atau *gastrointestinal tube* (tidak melebihi kapasitas maksimal lambung tikus yaitu 5 ml). Minyak jelantah yang dipakai dalam penelitian ini adalah minyak jelantah yang diperoleh dari pedagang-pedagang gorengan dan lalapan di sekitar wilayah Dinoyo kota Malang, dan pemberian kepada tikus sebagai sumber radikal bebas yang bertujuan untuk menciptakan kondisi stres oksidatif. Pemberian minyak jelantah secara oral dilakukan pada pagi hari (pukul 08.00). Sedangkan pemberian pakan dilakukan pada sore hari (pukul 15.00). Hal ini dilakukan untuk memaksimalkan metabolisme hewan uji terhadap minyak jelantah dan pakan.

Prosedur Analisis

Prosedur analisis meliputi analisis bilangan peroksida yang dilakukan dengan menimbang 1 tetes sampel minyak, kemudian dilarutkan dengan benzena : metanol 70 :30 (v/v) sampai volum 10 ml. Lalu ditambahkan amonium tiosianat dan 1 tetes ferro klorid, divortex. Larutan dipanaskan 50°C selama 2 menit dan didinginkan sampai suhu 25°C. Diabsorbansi dengan λ 510 nm [6].

Prosedur selanjutnya adalah analisis aktivitas antioksidan seduhan bubuk kakao dilakukan dengan metode DPPH. Sampel diekstrak dengan metanol, kemudian diambil 4 ml supernatan, kemudian ditambahkan 1 ml DPPH 0.2 M, kemudian didiamkan selama 10 menit. Data absorbansi pada panjang gelombang λ 517nm, kemudian dikonversi menjadi % aktivitas antioksidan [7]. Analisis total fenol dilakukan dengan menyiapkan seduhan bubuk kakao sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan 5 ml aquadest dan 1 ml Folin C, kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit. Setelah didiamkan, ditambahkan 2 mml Na_2CO_2 jenuh, kemudian didiamkan selama 1 jam. Kemudian diabsorbansi dengan λ 646 nm [7].

Analisis SOD dan MDA dilakukan dengan cara mengambil serum darah untuk dianalisis. Pengambilan serum secara *retro orbital plexus* dari mata. Analisis dilakukan sebanyak 6 kali, yaitu minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga, minggu keempat, minggu kelima, dan minggu keenam. Analisis darah minggu 1 merupakan analisis darah awal, yaitu setelah tikus mengalami masa adaptasi dan belum mengalami perlakuan apapun. Analisis darah minggu kedua merupakan analisis darah setelah tikus diadaptasi dengan pemberian minyak jelantah. Analisis darah pada minggu ketiga hingga minggu keenam merupakan analisis darah setelah tikus diberi perlakuan utama. Sampel darah dianalisis kadar MDA dan SOD [8].

Pada penelitian ini dilakukan analisis data (ANOVA) metode Rancangan Tersarang (*nested design*) dengan tingkat ketelitian percobaan 95% dan selang kepercayaan $\alpha = 0.05$, sehingga diharapkan memperoleh hasil yang nyata. Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji beda jarak Duncan (DMRT) dan BNT menggunakan selang kepercayaan 5%. Kemudian dilakukan uji korelasi *Pearson* menggunakan program *SPSS 15 for Windows* untuk mengetahui hubungan antara SOD dan MDA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kakao

Uji aktivitas antioksidan didasarkan pada prinsip bahwa antioksidan dalam produk akan mereduksi radikal bebas dalam DPPH yang menimbulkan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kekuningan yang intensitasnya terukur secara spektrofotometri. Pengurangan intensitas warna ungu DPPH disebabkan oleh bereaksinya molekul 1-1-*diphenyl-2-picryl-hydrazil* dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen sampel sehingga menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Tabel 1. Rerata Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kakao

Jenis Sampel	% Aktivitas Antioksidan
Dosis 0.15 g/ml	56.67
Dosis 0.25 g/ml	64.27

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa peningkatan (%) antioksidan sebanding dengan bertambahnya konsentrasi yakni semakin besar konsentrasi sampel maka semakin tinggi (%) aktivitas antioksidannya. Aktivitas antioksidan yang didapatkan adalah 30.64% dalam 100 ppm, hasil tersebut didapatkan jauh lebih rendah dibandingkan dengan hasil aktivitas antioksidan dengan dosis 0.15 g/ml yaitu 56.67% dan dosis 0.25 g/ml yaitu 64.27% [3]. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan dalam metode analisis yang dilakukan, efektivitas suatu antioksidan sangat bergantung dengan spesifikasi metode analisis yang digunakan. Pada saat analisis aktivitas antioksidan dilakukan, faktor jenis pelarut juga memegang peranan yang penting dimana kesesuaian polaritas dari pelarut dan senyawa antioksidan mempengaruhi kerja senyawa tersebut dalam mereduksi radikal bebas [10].

2. Total Fenol Seduhan Bubuk Kakao

Hasil pengujian total fenol menunjukkan semakin tinggi konsentrasi, maka semakin tinggi pula total fenol yang terkandung dalam seduhan bubuk kakao. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa kandungan polifenol golongan flavonoid yang terkandung dalam kakao, yaitu katekin, epikatekin dan antosianin [10].

Tabel 2. Total Fenol Seduhan Bubuk Kakao

Jenis sampel	Total Fenol (mg/kg)
Dosis 0.15 g/ml	12339.94
Dosis 0.25 g/ml	14582.20

Hasil penelitian berbeda dengan literatur, yaitu dalam penelitian sebelumnya [3], dengan bubuk kakao yang sama menunjukkan total fenol sebesar 935000 mg/kg, hasil penelitian tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan seduhan bubuk kakao yang digunakan. Hal ini diduga karena perbedaan sampel yang digunakan. Diduga, seduhan bubuk kakao yang digunakan, sudah mengalami penurunan kadar fenol karena pada sampel yang digunakan telah mengalami pengenceran karena sudah diseduh, sehingga hasil yang didapatkan lebih rendah [11]. Beberapa peneliti menyatakan polifenol kakao dapat mencegah terbentuknya radikal bebas. literatur lain juga menambahkan polifenol juga dapat melindungi oksidasi LDL darah, berpengaruh terhadap antimutagenik dan dapat menghambat tumor [2].

3. Bilangan Peroksida Minyak Jelantah

Hasil pengukuran terhadap bilangan peroksida menunjukkan kecenderungan meningkat dengan semakin banyaknya pengulangan penggorengan.

Tabel 3. Data Hasil Analisis Bilangan Peroksida Minyak Jelantah

Minyak Jelantah	Nilai Bilangan Peroksida (mek/kg)
Sampel I	101.04
Sampel II	106.39

Hasil pengukuran bilangan peroksida minyak jelantah yang diinduksi di atas 100 mek/kg, hal ini berkaitan dengan pernyataan literatur, bahwa jika jumlah peroksida lebih dari

100 mek/kg minyak akan bersifat sangat beracun dan mempunyai bau yang tidak enak. Bilangan peroksida yang tinggi ini, menjadi indikator kerusakan terhadap minyak goreng yang diberikan sehingga dapat menimbulkan stres oksidatif. Oleh karena itu, minyak jelantah menjadi sumber radikal bebas yang digunakan, karena pada minyak yang digunakan telah mengalami proses pemanasan dan penggorengan yang dilakukan secara berulang-ulang [12].

Minyak goreng mempunyai sifat sangat mudah mengalami oksidasi. Pada umumnya, masyarakat menggunakan minyak goreng yang berasal dari kelapa sawit dimana kandungan asam lemak tak jenuhnya sangat tinggi. Proses penggorengan *deep frying* yang banyak digunakan menjadikan minyak kelapa sawit mudah rusak [13].

SIMPULAN

Seduhan bubuk kakao dapat memberikan perlindungan terhadap tikus dengan kondisi stres oksidatif. Pemberian seduhan bubuk kakao dosis 0.25 g/ml memberikan efek antioksidan yang nyata terhadap kenaikan aktivitas SOD dan kadar MDA darah. Pemberian dosis 0.25 g/ml mampu meningkatkan aktivitas SOD dari 3.46 unit/ml menjadi 5.67 unit/ml dan menurunkan kadar MDA dari 45.67 ng/ml menjadi 34.83 ng/ml. Begitu pula dengan rasio MDA/SOD, dosis 0.25 g/ml, mampu menurunkan rasio MDA/SOD sebesar 10.48. Seduhan bubuk kakao dosis 0.15 g/ml mampu meningkatkan aktivitas SOD dari 2.81 unit/ml menjadi 5.29 unit/ml dan mampu menurunkan kadar MDA dari 48.17 ng/ml menjadi 34 ng/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- 1) Osakabe, N., M. Yamagishi, C. Sanbongi, M. Natsume, T. Takizawa, T. Osawa, 1997. Antioxidative Substance in Cacao Liquor. *Journal Nutrisi Science Vitaminol.* 44-2 : 313-321
- 2) Yamagishi, S., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., Yamamoto, H., Takeuchi, M. and Makita, Z. 2002. Advanced glycation and products induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290-2: 973-978.
- 3) Tamrin, Harijiono, S.Y., Sudarminto, Estiasih, T., Umar, S. 2012. Various Temperature of Vacuum and Conventional Roasting on Color Alteration and Polyphenols Content of Cocoa Powder. *Journal of Food Science and Engineering* 2(2012), 642-651
- 4) Robbins, R.L., R.S. Cotran., Vinay K. 1999. Basic Pathologic of Disease. W.B.Saunders Company. Toronto.
- 5) Jyothi, P., Riyaz, N., Nandakumar, G., Binitha M.P. 2008. A Study of Oxidative Stres in Paucibacillary and Multibacillary Leprosy. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology* 74:1, 80
- 6) Kim, O.S. 2005. Radical Scavenging Capacity and Antioxidants Activity of The E Vitamin Fraction in Rice Bran. *Journal of Food Science* 70: 208-213
- 7) Salamah, E., Ayuningrat, S., Purwaningsih. 2008. Penapisan Awal Komponen Bioaktif dari Kijing Taiwan (*Anondota Woodiana* Lea) sebagai Senyawa Antioksidan. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* XI-2: 119-128
- 8) Mahdi, C., Aulaniam, Sumarno., M.A. Widodo. 2008. Suplementasi Yoghurt pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Formaldehid dalam Makanan terhadap Aktivitas Antioksidan Kerusakan Oksidatif Jaringan Hepar. *Veterinaria Medika.* 1: 149-155.
- 9) Gutteridge, J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine Fourth edition. Oxford University Press. New York.
- 10) Retno, K. 2008. Pengaruh Pemberian Minuman Kakao Bebas Lemak (*Theobroma cacao*) terhadap Profil Darah Manusia. IPB. Bogor
- 11) Anugrawati, Cintya. 2013. Pengaruh Pemberian Bubuk Kakao (*Theobroma Cacao* L) Hasil Penyangraian Vakum sebagai Preventif terhadap Kondisi Stres Oksidatif Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Akibat Asupan Minyak Jelantah. Skripsi THP. UB. Malang.

- 12) Aminah, E. 2010. Bilangan Peroksida Minyak Goreng Curah dan Sifat Organoleptik Tempe pada Pengulangan Penggorengan. *Jurnal Pangan dan Gizi* 01: 7-11
- 13) Kartika, C. 2012. Efek Antioksidan Ekstrak Mikroalga (*Tetraselmis chuii*) Terhadap Kondisi Stres Oksidatif Dan Gambaran Histopatologi Hati Pada Tikuswistar (*Rattus norvegicus*) Yang Diberi minyak Jelantah. Skripsi THP. UB. Malang.