



**EKSTRAKSI POLIFENOL BIJI KAKAO SECARA
KIMIAWI SEBAGAI ANTIOKSIDAN
DAN PEWARNA ALAMI**

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat
Untuk Menyelesaikan Mata Kuliah Karya Ilmiah Tertulis
Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember

Oleh :

TRIES WAHYU BUDI PORBOWASESO
NIM. 001710101032

Dosen Pembimbing :

Ir. Sih Yuwanti, MP (DPU)

Ir. Susijahadi, MS (DPA 1)

Dr. Ir. Misnawi (DPA 2)

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PETANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2005

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN DOSEN PEMBIMBING.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
RINGKASAN.....	xii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kakao.....	4
2.2 Polifenol Kakao.....	5
2.3 Antioksidan Polifenol Kakao.....	9
2.4 Pewarna Alami pada Kakao.....	11
2.5 Hipotesis.....	14
III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Bahan dan Alat.....	15
3.1.1 Bahan.....	15
3.1.2 Alat.....	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.3 Rancangan Percobaan.....	15

3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	16
3.5 Parameter Pengamatan.....	18
3.6 Prosedur Pengamatan.....	18
3.6.1 Rendemen.....	18
3.6.2 Total Polifenol.....	18
3.6.3 Aktifitas Antioksidan.....	19
3.6.4 Warna Ekstrak Polifenol.....	19
3.6.5 Kestabilan Warna Terhadap pH.....	19
3.6.6 Kestabilan Warna Terhadap Oksidator dan Reduktor.....	20

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen.....	21
4.2 Total Polifenol.....	22
4.3 Aktifitas Antioksidan.....	24
4.4 Warna Ekstrak Polifenol.....	26
4.4.1 Lightness.....	26
4.4.2 Chroma.....	27
4.4.3 Hue.....	28
4.5 Kestabilan Warna Terhadap pH.....	29
4.6 Kestabilan Warna Terhadap Oksidator dan Reduktor.....	34

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

Tries Wahyu Budi P, NIM 001710101032, “**Ekstraksi Polifenol Biji Kakao Secara Kimiawi Sebagai Antioksidan Dan Pewarna Alami**”, Dosen Pembimbing Utama Ir. Sih Yuwanti, MP; Dosen Pembimbing Anggota 1 Ir. Susijahadi, MS; Dosen Pembimbing Anggota 2 Dr. Ir. Misnawi.

RINGKASAN

Biji kakao mengandung senyawa polifenol sebanyak 5 – 18 % dalam bubuk bebas lemak. Senyawa polifenol biji kakao yaitu katekin 33 – 42 %, leukosianidin 23 – 25 % dan antosianin 5 %. Potensi biji kakao sebagai sumber antioksidan dan pewarna alami cukup besar, mengingat kandungan polifenolnya cukup tinggi. Polifenol biji kakao berkurang melalui oksidasi selama fermentasi dan pengeringan. Mengingat potensi polifenol biji kakao sebagai sumber antioksidan dan pewarna alami, maka dilakukan ekstraksi polifenol pada biji kakao basah. Kondisi yang baik untuk ekstraksi polifenol pada biji kakao basah belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan suhu ekstraksi polifenol dari biji kakao terhadap rendemen, total polifenol dan aktifitas antioksidan yang dihasilkan, untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan suhu ekstraksi polifenol dari biji kakao terhadap stabilitas pigmen antosianin yang dihasilkan serta untuk mengetahui kondisi ekstraksi yang terbaik terhadap rendemen, total polifenol aktifitas antioksidan dan stabilitas pigmen antosianin yang dihasilkan..

Penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan dua faktor, faktor I adalah jenis pelarut dan faktor II adalah suhu. Pelarut yang digunakan adalah Methanol, Ethanol, Ethyl Acetat dan Asam Acetat. Perlakuan suhu terdiri dari suhu ruang, suhu 40°C dan suhu 55°C. Dari dua faktor tersebut dikombinasikan sehingga diperoleh 12 kombinasi perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Data yang diperoleh dianalisa anava dan apabila didapatkan hasil yang berbeda nyata, dilakukan perbandingan menggunakan uji jarak Duncan dengan bantuan perangkat lunak SAS V8.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen ekstrak polifenol tertinggi terdapat pada perlakuan A₄B₂ (pelarut asam acetat pada suhu 40°C) sebesar 9,7 %, kandungan total polifenol tertinggi terdapat pada perlakuan A₁B₁ (pelarut methanol pada suhu ruang) sebesar 84,7 % dan aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada perlakuan A₄B₃ (pelarut asam acetat pada suhu 55°C) sebesar 96,6 %. Hasil pengamatan warna ekstrak mendapatkan bahwa tingkat kecerahan tertinggi terdapat pada perlakuan A₃B₁ (pelarut ethyl acetat pada suhu ruang) dengan nilai L* sebesar 41,8, intensitas warna tertinggi terdapat pada perlakuan A₃B₁ (pelarut ethyl acetat pada suhu ruang) dengan nilai C* sebesar 41,8 dan nilai Hue tertinggi adalah A₃B₃ (pelarut ethyl acetat pada suhu 40°C) sebesar 19,0. Pada parameter kestabilan warna ekstrak pigmen antosianin, ekstraksi dengan larutan methanol dan asam asetat relatif stabil terhadap lama perlakuan pada berbagai pH. Sedangkan terhadap adanya oksidator dan reduktor, hasil ekstraksi menggunakan pelarut ethanol merupakan pigmen yang relatif stabil.

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa jenis pelarut dapat mempengaruhi ekstraksi polifenol kakao sedangkan suhu ekstraksi tidak berpengaruh terhadap hasil ekstraksi polifenol. Akan tetapi suhu ekstraksi yang terlalu tinggi dapat merusak ekstrak polifenol, sehingga aktifitas antioksidan maupun kualitas warna menurun. Pigmen antosianin hasil ekstraksi stabil pada pH rendah (pH 3 – pH 4) dan pada pH tinggi (pH 8 – pH 9), sedangkan pada pH moderat (pH 5 – pH 7) kestabilannya rendah. Ekstrak hasil pelarutan menggunakan methanol dan ethanol relatif stabil terhadap kehadiran oksidator dan reduktor. Kondisi ekstraksi terbaik yang dapat digunakan untuk mendapatkan antioksidan dan stabilitas pigmen terbaik adalah ekstraksi menggunakan pelarut ethanol karena disamping efektifitasnya yang tinggi, juga aman untuk digunakan pada produk pangan.

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang membudidayakan tanaman kakao paling luas di dunia dan komoditas perkebunan merupakan salah satu penghasil utama devisa negara. Selain itu Indonesia juga merupakan produsen kakao terbesar ketiga setelah Ivory Coast dan Ghana dengan produksi mencapai 435 ribu ton per tahun (Ed and Man, 2004).

Potensi biji kakao sebagai sumber antioksidan dan pewarna alami cukup besar, mengingat kandungan polifenolnya cukup tinggi. Biji kakao mengandung senyawa polifenol sebanyak 5 – 18 % dalam bubuk bebas lemak. Senyawa polifenol biji kakao yaitu katekin 33 – 42 %, leukosianidin 23 – 25 % dan antosianin 5 %. Polifenol biji kakao memiliki aktivitas antioksidan yang sangat bermanfaat bagi kesehatan tubuh dan dapat digunakan sebagai pewarna alami.

Keberadaan polifenol tidak hanya bertanggung jawab terhadap pembentukan rasa pahit dan sepat, tetapi juga menyebabkan karakteristik warna coklat dari biji kakao terfermentasi (William, 1971 dalam Misnawi, 2003a). Selama fermentasi berlangsung, polifenol akan mengalami modifikasi biokimia melalui oksidasi dan polimerisasi serta berikatan dengan protein, sehingga mengurangi kelarutan dan efek sepatnya (Bovenhi and Coll, 2000 dalam Misnawi, 2003a). Di saat yang sama, antosianin terhidrolisis menghasilkan antosianidin, galaktosa dan arabinosa. Di samping itu juga terjadi dimerisasi dari leukosianidin dan eksudasi flavonoid dari biji kakao. Selanjutnya, selama pengeringan jumlah polifenol berkurang terutama akibat pencoklatan enzimatik (Misnawi *et al.*, 2003a).

Keberadaan polifenol pada konsentrasi yang tinggi dalam coklat memberi pengaruh negatif terhadap citarasa dan menghambat pembentukan komponen-komponen aroma selama penyangraian (Misnawi *et al.*, 2004).

Antioksidan adalah bahan tambahan yang digunakan untuk melindungi komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol adalah dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Medikasari, 2000).

Antosianin biji kakao memiliki aktifitas antioksidan yang kuat (Wiyono, 2002 dalam Nuciferani, 2004). Antosianin tergolong senyawa flavonoid dengan rangka senyawa C6-C3-C6. Sifat antioksidan tersebut memungkinkan antosianin untuk ditambahkan pada produk olahan yang mudah mengalami oksidasi untuk menahan laju oksidasinya.

Pewarna alami pada tanaman kakao bisa didapatkan dengan cara mengekstrak pigmen anthosianin. Konsentrasi pigmen anthosianin banyak terdapat pada biji kakao dan sebagian besar pigmen anthosianin hilang selama fermentasi karena reaksi oksidasi. Antosianin merupakan salah satu pewarna alami yang dapat berwarna merah, biru dan violet (Medikasari, 2000).

Terkait dengan konsentrasi polifenol dalam biji kakao yang tinggi, manfaat polifenol biji kakao yang baik bagi tubuh sebagai antioksidan, dan warna antosianin yang menarik maka perlu dikaji cara ekstraksi polifenol dari biji kakao. Ekstrak polifenol yang diperoleh perlu dikaji penggunaannya sebagai sumber antioksidan dan pewarna alami.

1.2 Rumusan Masalah

Polifenol biji kakao dihilangkan melalui oksidasi selama fermentasi untuk membentuk aroma dan flavour biji kakao kering yang bermutu baik. Mengingat potensi polifenol biji kakao sebagai sumber antioksidan dan pewarna alami, maka dilakukan ekstraksi polifenol pada biji kakao basah. Kondisi yang baik untuk ekstraksi polifenol pada biji kakao basah belum diketahui maka perlu dilakukan penelitian.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan suhu ekstraksi polifenol dari biji kakao terhadap rendemen, total polifenol dan aktifitas antioksidan yang dihasilkan.
2. Untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan suhu ekstraksi polifenol dari biji kakao terhadap stabilitas pigmen antosianin yang dihasilkan.
3. Untuk mengetahui kondisi ekstraksi yang terbaik terhadap rendemen, total polifenol aktifitas antioksidan dan stabilitas pigmen antosianin yang dihasilkan.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang potensi pemanfaatan polifenol biji kakao sebagai antioksidan dan pewarna alami.
2. Memberikan informasi teknologi proses ekstraksi polifenol biji kakao yang baik.
3. Mengetahui sifat-sifat antosianin dalam polifenol kakao sebagai pewarna alami.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao

Tanaman kakao merupakan keturunan dari genus *Theobroma*, salah satu kelompok kecil tanaman yang berasal dari hulu sungai Amazon dan daerah-daerah tropika lain di Amerika Tengah serta Amerika Selatan. Terdapat lebih dari 20 species dalam genus ini, tetapi hanya *Theobroma Cacao* yang dibudidayakan dan memberikan nilai ekonomis (Wood, 1975).

Secara genetis, ada dua jenis kakao yaitu *Criollo* (Mulia / Edel) dan *Forastero* (Lindak/*Bulk*) dan hasil persilangan antara kedua jenis tersebut menghasilkan jenis *Trinitario*. *Criollo* adalah tipe kakao yang bermutu (*Choiced cacao*), hampir seluruhnya berbiji putih dan fermentasinya cepat. Kulit buahnya tipis dan mudah diiris. Varietas *Criollo* murni berasal dari Venezuela dan Colombo yang merupakan 1 % dari produksi dunia. *Forastero* merupakan tipe yang lebih kuat dalam hal produksi tapi mutunya rendah, oleh sebab itu sering disebut *Bulk cacao / Lindak*. Bijinya gepeng dan selalu berwarna ungu, kulit buahnya keras dan sulit diiris (Anonim, 1976).

Jenis kakao yang menghasilkan cita rasa coklat yang lembut dengan warna yang cerah adalah *Criollo* sedangkan jenis *Forastero* memiliki cita rasa coklat yang kuat dan warna yang gelap, karena banyak mengandung polifenol dan antosianin (Siregar *et al.*, 2002).

Penyerbukan bunga kakao 75% dilakukan oleh serangga *Forsipomia* dan 25% oleh penyerbuk lain. Empat belas hari setelah penyerbukan bunga, buah telah terbentuk. Buah mencapai pertumbuhan maksimal dan mulai masak setelah 143 hari dan masak betul setelah 170 hari dengan ditandai dinding buah yang berwarna kekuningan / oranye (Subagiyo, 1991).

Buah kakao memiliki bagian-bagian antara lain kulit buah, pulp, plasenta dan biji. Pulp merupakan salah satu bagian dari buah kakao yang mengandung beberapa komponen kimia seperti air, albuminoid dan *astringent*, besi oksida, garam potas dan garam Cu. Komposisi keping biji kakao dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia Keping Biji Kakao.

Komponen	Menurut		
	Knapp & Charchum	Finche	Jeason
Air	2.1	5.0	3.9
Lemak	54.1	53.3	53.2
Abu	2.7	± 2.8	3.1
Nitrogen :			
Total N	2.2	2.1	-
Protein	1.3	1.7	-
Theobromin	1.4	1.5	1.3
Kafein	0.7	0.2	-
Karbohidrat :			
Glukosa	0.1	0.1	-
Sukrosa	0	1.0	-
Pati	6.1	6.0	-
Pektin	4.1	-	-
Serat kasar	2.1	2.6	2.7
Selulosa	1.9	9.0	-
Pentosa	1.2	1.5	1.4
Mucilage	1.8	-	-
Tanin (asam tanat)	2.0	-	-
Cocoa			
Brown/Purple	4.2	-	-
Asam organik	-	2.5	

Sumber : Menifie (1982)

2.2 Polifenol Kakao

Polifenol yang juga dikenal dengan nama *soluble tanin*, merupakan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun, biji dan buah dari tumbuhan tingkat tinggi. Keberadaannya dalam bidang pangan menjadi penting setelah ia dijadikan bagian diet manusia dan menyumbang terhadap citarasa makanan (Baxter *et al.*, 1997 dalam Misnawi, 2003b). Polifenol dalam produk coklat bertanggung jawab atas pembentukan rasa sepat melalui mekanisme pengendapan protein-protein yang kaya prolin dalam air ludah dan menyumbang rasa pahit khas coklat bersama alkaloid, beberapa amino, peptida dan pirazin (Misnawi, 2003a).

William (1997), Forsyth and Quesnel (1957) dalam Misnawi (2003) mengidentifikasi senyawa utama flavonoid dalam biji kakao yaitu antosianin, leukosianidin dan (-)-epikatekin.

Penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa polifenol biji kakao memiliki antioksidan yang mampu menekan hidrogen peroksida dan anion superoksida, melindungi lemak dari kerusakan oksidasi, bertindak sebagai antiulserik, antimikrobia, antikarsinogenik, antimutagenik, menghambat pertumbuhan tumor dan kanker, dan mengurangi penyakit-penyakit karena oksidasi *low density lipoprotein* (LDL) (Kattenberg, 2000; Osakabe *et al.*, 2000, 1998a, 1998b; Sanbogi *et al.*, 1998).

Berdasarkan percobaan kromatografi, Kim and Keeney (1983) dalam Misnawi (2003) dapat diidentifikasi dan diperkirakan konsentrasi polifenol utama dalam kakao Forastero seperti pada Tabel 2. Delapan senyawa dalam tiga fraksi utama yaitu katekin, leukosianidin dan antosianin telah teridentifikasi; fraksi lain yang bergerak sangat lambat dalam kromatografi kertas diduga sebagai tanin kompleks.

Tabel 2. Konsentrasi Polifenol dalam Biji Kakao Forastero

Fraksi	Presentase dalam	
	Berat kering	Total polifenol
Katekin		
(-)-Epikatekin	2,75	35
(+)-Katekin		
(+)-Gallokatekin	0,25	3
(-)-Epigallokatekin		33 – 42
Leukosianidin		
Leukosianidin 1	1,6	21
Leukosianidin 2,3	0,8	10
		23 – 25
Anthosianin		
3- α -L-Arabinosidil-sianidin	0,3	2,5
3- α -L-Arabinosidil-sianidin	0,3	2,5
		5
Tanin Kompleks	2,0	24 – 40

Sumber : Kim and Keeney (1983)

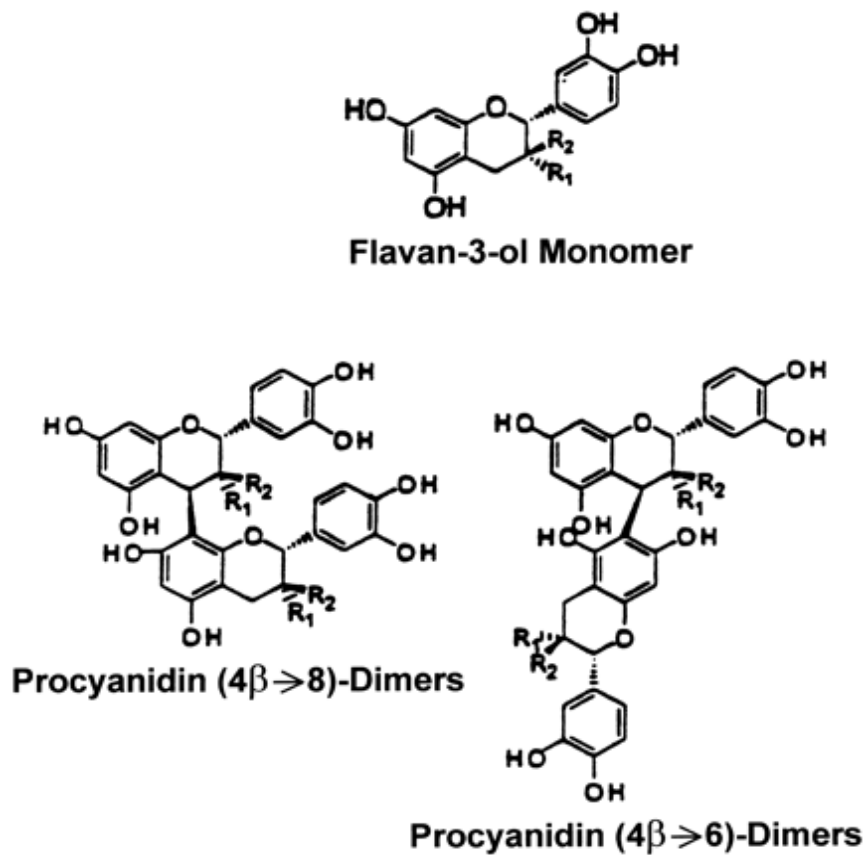
Sementara itu Wollgast and Anklam (2000) menyatakan bahwa polifenol kakao terutama adalah monomer dan oligomer dari flavan-3-ol sebagai komponen dasar. Mereka juga mengklasifikasikan polifenol kakao dalam tiga kelompok yaitu katekin (flavan-3-ols) 37 %, antosianin 4 %, dan proantosianidin 58 %. Tabel 3 menunjukkan konstituen polifenol yang telah teridentifikasi dari biji kakao.

Tabel 3. Konstituen Polifenol yang Teridentifikasi dari Biji Kakao.

Polifenol	Konstituen	Prosentase dalam Total Polifenol
Katekin	(-)-Epikatekin	37
	(+)-Katekin	
	(+)-Gallokatekin	
	(-)-Epigallokatekin	
Prosianidin	Prosianidin B1 = epikatekin-(4 β -8)-katekin	58
	Prosianidin B2 = epikatekin-(4 β -8)-epikatekin	
	Prosianidin B3 = katekin-(4 α -8)-katekin	
	Prosianidin B4 = katekin-(4 α -8)-epikatekin	
	Prosianidin B5 = epikatekin-(4 β -6)-epikatekin	
	Prosianidin C1 = epikatekin-(4 β -8)-epikatekin-(4 β -8)-epikatekin	
	Prosianidin D = epikatekin-(4 β -8)-epikatekin-(4 β -8)- epikatekin-(4 β -8)-epikatekin	
Bentuk oligomer dan polimer kebanyakan dari epikatekin		
Antosianin	Sianidin-3- α -L-arabinosa	4
	Sianidin-3- β -D-galaktosida	
Flavono glikosida	Quersetin-3-O- β -D-glukopuranosid	1
	Quersetin-3-O- α -D-arabinosid	

Sumber : Wollgast dan Anklam (2000)

Monomer flavan-3-ol adalah struktur dasar dari polifenol kakao dimana R1 adalah H dan R2 adalah OH yang menggambarkan (+)-katekin, sedangkan apabila R1 adalah OH dan R2 adalah H maka menggambarkan (-)-epikatekin yang merupakan komponen penyusun prosiyanidin utama dalam biji kakao. Gambar 1 menunjukkan susunan struktur dasar monomer flavan-3-ol dan prosiyanidin.



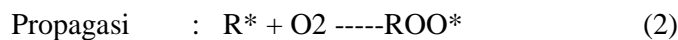
Gambar 1. Struktur polifenol yang banyak ditemukan dalam kakao (Weisburger, 2005)

Keberadaan polifenol tidak hanya bertanggung jawab terhadap pembentukan rasa pahit dan sepat, tetapi juga menyebabkan karakteristik warna coklat dari biji kakao terfermentasi (William, 1971 dalam Misnawi, 2003a).

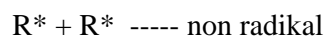
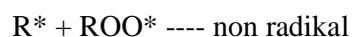
2.3 Aktifitas Antioksidan Kakao.

Antioksidan adalah bahan tambahan yang digunakan untuk melindungi komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Meskipun demikian antioksidan dapat pula digunakan untuk melindungi komponen lain seperti vitamin dan pigmen, yang juga banyak mengandung ikatan rangkap di dalam strukturnya

Mekanisme kerja antioksidan secara umum adalah menghambat oksidasi lemak. Oksidasi lemak terdiri atas tiga tahap utama yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen (reaksi 1). Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (reaksi 2). Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru (reaksi 3).



Hidroperoksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi lebih lanjut menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton yang bertanggung jawab atas flavor makanan berlemak. Tanpa adanya antioksidan, reaksi oksidasi lemak akan mengalami terminasi melalui reaksi antar radikal bebas membentuk kompleks bukan radikal (reaksi 4)



Antioksidan yang baik akan bereaksi dengan radikal asam lemak segera setelah senyawa tersebut terbentuk. Dari berbagai antioksidan yang ada, mekanisme kerja serta kemampuannya sebagai antioksidan sangat bervariasi. Seringkali, kombinasi beberapa jenis antioksidan memberikan perlindungan yang lebih baik (sinergisme) terhadap oksidasi dibanding dengan satu jenis antioksidan saja (Medikasari, 2000).

Menurut temuan terbaru, kakao adalah sumber zat bio-aktif antioksidan, khususnya senyawa flavonoid yang banyak bermanfaat bagi kesehatan. Biji kakao sebagai sumber yang kaya akan flavonoid, mengandung banyak monomer epikatekin (flavan-3-ol) dan molekul prosianidin (bentuk polimer). Dalam hal ini prosianidin merupakan penangkap radikal bebas yang efektif (Karyadi, 2005).

Sejumlah penelitian tentang flavonoid kakao telah dimulai pada dekade 1990-an, namun dalam dua tahun terakhir ini merupakan perkembangan yang amat pesat. Pada tahun 1999 para peneliti dari National Institute of Public Health and Environment di Bilthoven, Netherlands telah menguji kandungan katekin dalam kakao. Katekin dalam kakao berasal dari golongan flavonoid, dimana merupakan salah satu antioksidan terkuat. Mereka menemukan bahwa *dark chocolate* mengandung 53,5 mg/100 g, yaitu 4 kali lebih banyak dari yang terdapat dalam teh (Beckett, 2000).

Harold Schmitz, dari Analytical and Applied Sciences Group di M&M/MARS, menemukan bahwa tidak hanya prosianidin yang mempunyai aktivitas antioksidan, tetapi fraksi-fraksi dari oligomer prosianidin (dimer, trimer, tetramer, dan lain-lain) mempunyai potensi antioksidan yang berbeda dan mungkin juga memiliki potensi biologis (Ryan, 1999).

Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh flavonoid adalah dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hidrogen ini menyebabkan radikal bebas menjadi stabil dan berhenti melakukan gerakan ekstrim, sehingga tidak merusak lipida, protein dan DNA (materi genetik) yang menjadi target kerusakan seluler. Flavonoid menghentikan tahap awal reaksi dengan melepaskan satu atom hidrogen kemudian berikatan dengan satu radikal bebas. Selanjutnya dengan mekanisme seperti itu, radikal peroksi dapat dihancurkan atau distabilkan dengan resonansi dari gugus hidroksil yang membuat energi aktivasinya berkurang (Anonim, 2005b).

Aktivitas antioksidan polifenol kakao menjadi kekuatan yang ampuh dari coklat untuk menghalangi reaksi oksidasi kolesterol jahat (LDL), yang menyebabkan darah bisa mengental. Selanjutnya dapat mencegah pengendapan lemak pada dinding pembuluh darah.

Peranan polifenol sebagai antioksidan dapat menghalangi terjadinya tahapan inisiasi penyempitan pembuluh darah atau aterosklerosis. Pada akhirnya dapat mengurangi risiko serangan jantung koroner dan stroke.

Hasil penelitian *in vitro* Carl Keen di Universitas California mendapatkan bahwa flavonoid kakao memiliki kekuatan sebagai antioksidan untuk mencegah reaksi berantai radikal bebas yang dapat menyebabkan kanker. Produk olahan cokelat yang mengandung katekin hampir 65% dari total polifenol, terdiri atas DL-katekin, epikatekin, teogallin, epigallokatekin dan prosianidin (komponen yang diyakini dapat meningkatkan sistem perbaikan DNA) jika dikonsumsi secara teratur, dapat mencegah timbulnya penyakit kanker. Pakar kanker dari *American Health Foundation*, Weisburger, menegaskan bahwa kemampuan katekin dan senyawa sejenisnya dalam melindungi tubuh dari kanker jauh di atas antioksidan lainnya. Kemampuan katekin sebagai antioksidan hampir 100 kali lebih efektif dari vitamin C dan 25 kali lebih ampuh dari vitamin E (Anonim, 2005a).

2.4 Pewarna Alami pada Kakao

Pewarna alami diperoleh dari alam/tumbuhan baik secara langsung maupun tidak langsung dengan ekstraksi/perebusan secara tradisional, tanaman yang ada disekitarnya. Zat pewarna alami mempunyai efek warna yang indah dan khas yang sulit ditiru zat pewarna sintetis, sehingga masih banyak orang yang menyukainya dan merupakan pendukung produk-produk eksklusif dan bernilai seni tinggi, namun pewarnaan ini melalui proses yang lama, sehingga produksinya tidak banyak dalam kurun waktu tertentu.

Pewarna alami pada tanaman kakao bisa didapatkan dengan cara mengekstrak pigmen anthosianin. Konsentrasi pigmen anthosianin banyak terdapat pada biji kakao dan sebagian besar pigmen anthosianin hilang selama fermentasi karena reaksi oksidasi. Anthosianin merupakan salah satu pewarna alami yang dapat berwarna merah, biru dan violet. Anthosianin tersusun oleh sebuah aglikon yang berupa anthosianidin yang teresterifikasi dengan molekul gula. Anthosianin yang mengandung satu molekul gula disebut monosida, dua