



EFEK KONSUMSI MINUMAN BUBUK KAKAO LINDAK BEBAS LEMAK TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FLAVONOID PADA PLASMA MANUSIA

Welli Yuliatmoko (welli@mail.ut.ac.id)
Universitas Terbuka

Fransiska Zakaria R (fzakaria@ipb.ac.id)
Feri Kusnandar (fkusnandar@ipb.ac.id)
Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

Fat free cocoa powder is a rich source of flavonoid antioxidants including epicatechin, catechin, and procyanidins, which have attracted interest regarding cardiovascular health. The aim of this research was to evaluate the effect of Indonesian fat free cocoa powder drink consumption on antioxidants activity. Healthy woman subjects were divided into cocoa group (n=9) and control group (n=9). Cocoa powder drink containing skim milk and sugar was given to the cocoa group. The control group received only water containing skim milk and sugar. The criteria of the respondents were according to health medical diagnosis and informed consent signature. Their peripheral blood was withdrawn for the analysis of antioxidants capacity. Antioxidants capacity consisted of antiradical by DPPH method, malonaldehyde (MDA) content, vitamin C, and diene conjugation. The data of cocoa group showed that there were significant increased in antiradical, vitamin C and decreased in MDA content ($p<0.05$). Cocoa consumption increased diene conjugation however was not significantly ($p<0.05$). In conclusion, the Indonesian fat free cocoa powder has increased plasma antioxidant system, which manifest good health function.

Keywords: antioxidants activity, bioavailability, cocoa powder, flavonoid, MDA.

Sistem pertahanan tubuh terhadap senyawa kimia berbahaya seperti radikal bebas terjadi melalui sistem antioksidan (Zakaria, Abidin, Pramudya, & Sanjaya, 1996). Antioksidan dapat mencegah laju kerusakan akibat radikal bebas karena mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi. Perlindungan antioksidan terhadap plasma darah merupakan gambaran dari perlindungan total terhadap tubuh, karena semua metabolit sel tubuh akan bermuara pada plasma darah. Selain itu, beberapa produk metabolit hasil oksidasi senyawa radikal seperti malonodialdehid (MDA) dan diena terkonjugasi kerap kali dijadikan model oleh para peneliti untuk menggambarkan sistem pertahanan antioksidan tubuh terhadap senyawa radikal bebas (Zakaria, Nurrahman, Prangdimurti, & Tejasari, 2003)

Biji kakao mengandung senyawa flavonoid seperti katekin, prosianidin, dan antosianidin yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Hammerstone, Lazarus, & Schmitz, 2000). Kapasitas antioksidannya lebih tinggi bila dibandingkan dengan anggur, teh hijau, dan teh hitam (Lee, Kim, Lee, & Lee, 2003). Di samping itu, beberapa peneliti juga melaporkan beberapa manfaat senyawa flavonoid di bidang kesehatan, yaitu dapat memacu peredaran darah dengan baik, sebagai agen

perlindungan terhadap kardiovaskular, dan menghambat oksidasi (Heiss, Dejam, Kleinbongard, Schewe, Sies, & Kelm, 2003; Zhu, Schramm, & Grooss, 2005).

Seperti halnya biji kakao, bubuk kakao lindak bebas lemak yang merupakan produk samping hasil produksi lemak kakao dari perkebunan Indonesia dilaporkan mengandung senyawa polifenol (flavonoid) yang cukup tinggi, yaitu sebesar 12 - 18% (Misnawi, Jamilah, & Nazamid, 2002). Sayangnya, pemanfaatan produk samping ini baru dirintis oleh Balai Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember dan masih dalam skala terbatas. Hasil penelitian secara *in vitro* terhadap bubuk kakao menunjukkan bahwa bubuk kakao mempunyai kapasitas antioksidan dan melindungi sel limfosit dari berbagai oksidator. Lebih lanjut, bubuk kakao tersebut tidak bersifat toksik terhadap sel limfosit (Zairisman, 2006).

Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruhnya terhadap antioksidan tubuh manusia perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* dengan manusia sebagai responden. Penelitian ini bertujuan menguji efek konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak dalam meningkatkan aktivitas antioksidan flavonoid plasma darah manusia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperjelas khasiat bubuk kakao lindak bebas lemak varietas lokal terhadap kesehatan. Penelitian ini diharapkan juga dapat meningkatkan citra positif kakao varietas lokal Indonesia.

METODOLOGI

Pembuatan Minuman Bubuk Kakao

Minuman bubuk kakao bebas lemak dibuat dari 4 gram bubuk kakao bebas lemak dilarutkan dalam 100 ml air panas, kemudian ditambahkan 2 gram gula dan 2 gram susu bubuk skim. Selanjutnya minuman ini disajikan dalam keadaan hangat.

Persiapan Responden

Responden penelitian ini adalah 18 orang mahasiswi IPB, berusia 22-27 tahun, dan bertempat tinggal indekos di perumahan dosen kompleks IPB II Sindang Barang. Semua responden dinyatakan sehat berdasarkan hasil pemeriksaan kesehatan oleh dokter di Klinik Farfa Kampus IPB Darmaga.

Selanjutnya responden dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kakao ($n = 9$ orang) dan kelompok kontrol ($n = 9$ orang). Kelompok kakao diberi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak. Sebaliknya, kelompok kontrol diberi minuman yang sama namun tanpa penambahan bubuk kakao lindak bebas lemak.

Pelaksanaan Intervensi

Intervensi dilaksanakan setiap hari pada pukul 07.00–08.00 WIB selama 25 hari di IPB Bogor. Sebelum minum minuman bubuk kakao lindak bebas lemak, responden diberi sarapan pagi yang seragam oleh peneliti. Menu yang sama, juga diberikan pada waktu makan malam. Sebelum pelaksanaan intervensi dilakukan penandatanganan kontrak persetujuan sebagai responden (*informed consent*) dan wawancara terhadap responden.

Pengukuran Status Gizi

Pengukuran status gizi responden dilakukan secara antropometri meliputi tinggi badan (TB) dan berat badan (BB). Status gizi responden digolongkan berdasarkan *body mass index* (BMI) dengan satuan kg/m^2 .

Pengambilan Darah

Pengambilan darah dilakukan sebelum dan sesudah intervensi di Klinik Farfa Kampus IPB Darmaga pada pukul 07.00-08.00 pagi oleh seorang asisten tranfusi darah. Darah diambil secara aseptis sebanyak 35 ml dengan menggunakan jarum *Precisionglide*™ steril sekali pakai. Selanjutnya darah dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* steril yang mengandung antikoagulan.

Isolasi Plasma

Plasma darah dipisahkan dari komponen seluler dengan sentrifugasi pada 1500 rpm selama 5 menit menggunakan sentrifus *rotor swing*. Plasma darah akan terpisah ke bagian atas. Sebaliknya, bagian darah yang lebih berat (sel darah merah) akan terpisah ke bagian bawah. Selanjutnya, plasma darah diambil dengan *microfifet* dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus.

Analisis Kadar Vitamin C Plasma (Zakaria et al., 1996)

Sebanyak 500 µl plasma, blanko, dan standar dicampur dengan 100 µl larutan DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin) dengan cara divortek, kemudian campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah 750 µl H₂SO₄ 65% dan didiamkan selama 1 jam di dalam ruang gelap. Berikutnya, campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Akhirnya, supernatan yang diperoleh dibaca dengan spektrofotometer pada λ 520 nm.

Analisis Kadar MDA Plasma (Modifikasi Metode Winarsi, 2003; Hong, Yeh, Chang, & Hu, 2000)

Sebanyak 75 µl plasma atau standar dimasukkan dalam tabung sentrifus, lalu ditambahkan 75 µl TCA 20% (dalam 0,6 mol/l HCl). Setelah didinginkan dalam lemari pendingin bersuhu 5–10 °C selama 20 menit, campuran tersebut disentrifus pada 4000 rpm selama 20 menit. Kemudian, 100 µl supernatannya ditambah 20 µl pereaksi TBA. Selanjutnya campuran tersebut dididihkan selama 30 menit. Setelah dingin campuran dimasukkan ke dalam lempeng mikro 96 sumur dan diukur absorbansinya menggunakan *mikroplate reader* pada λ 540 nm. Kadar MDA plasma dihitung berdasarkan kurva standar dari larutan tetra etoksipropana.

Analisis Anti Radikal Bebas Plasma (Modifikasi Turkmen, Ferda, & Velioglu, 2004)

Sebanyak 1 ml plasma ditambahkan metanol pro-analisis 1 ml dan 1 ml DPPH 0,2 mM lalu dikocok. Kemudian, campuran disimpan dalam ruang gelap selama 60 menit dan disentrifus selama 10 menit. Selanjutnya, absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer pada λ 517 nm. Kontrol yang digunakan adalah campuran larutan DPPH (2,2-Diphenil-1-pictihidrazil) dan metanol. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\%AntiRadikaBebas = \frac{AbsorbansiKontrol - AbsorbansiSampel}{AbsorbansiKontrol} \times 100\%$$

Analisis Dena Terkonjugasi Plasma (Zakaria, Septiana, & Sulistiyani, 2001)

Sampel plasma diencerkan dengan larutan NaCl 0,9%-NaHCO₃ 1 mM sampai konsentrasi protein 50 µg/ml, kemudian dioksidasi dengan penambahan 5µM CuSO₄ (konsentrasi akhir) pada suhu 37 °C. Selanjutnya, absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada λ 234 nm.

Analisis Statistik

Data yang diperoleh diolah menggunakan analisis statistik uji t (t-test) perbandingan dua sampel untuk melihat adanya pengaruh nyata konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak sebelum dan sesudah intervensi antara kelompok kakao dan kelompok kontrol terhadap parameter yang diukur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keadaan Umum Responden

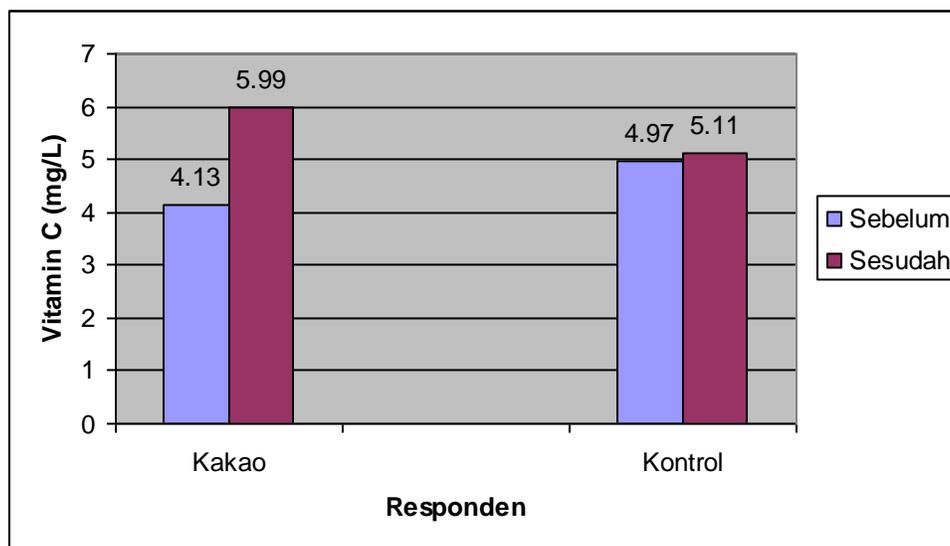
Semua responden penelitian dinyatakan sehat oleh dokter, baik sebelum maupun sesudah intervensi. Hasil pengukuran antropometri terhadap responden menunjukkan adanya kenaikan berat badan pada kedua kelompok. Namun secara statistik, kenaikan tersebut tidak nyata. Dengan demikian, minuman bubuk kakao lindak bebas lemak bukanlah penyebab kenaikan berat badan responden. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Murphy *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa konsumsi flavanol kakao selama 28 hari tidak menyebabkan perubahan berat badan secara nyata. Sependapat dengannya, Van Heerden (2006) juga menyatakan bahwa coklat bukan penyebab obesitas.

Kadar Vitamin C

Pengukuran vitamin C (asam askorbat) plasma bertujuan menguji kapasitas antioksidan minuman bubuk kakao lindak bebas lemak dalam melindungi antioksidan gizi plasma yaitu vitamin C. Prinsip analisis dalam pengukuran ini adalah mereaksikan asam askorbat dengan 2,4 DNPH dalam suasana asam hingga terbentuk warna kuning merah, lalu intensitas warnanya dibaca dengan spektrofotometer.

Asam askorbat merupakan antioksidan larut air dan menjadi bagian dari pertahanan terhadap ROS (*Reactive oxygen spesies*) di dalam plasma dan sel. Asam askorbat dapat memutus reaksi radikal yang dihasilkan melalui peroksidasi lipid. Bahkan pada konsentrasi rendah asam askorbat dapat bereaksi langsung dengan radikal peroksil (LOO^*) (Zakaria *et al.*, 2003). Di samping itu, vitamin C juga berfungsi sebagai antioksidan yang bekerja secara sinergis dengan vitamin E. Vitamin C dapat memulihkan kembali vitamin E yang teroksidasi oleh radikal bebas dengan cara memberikan ion hidrogennya (Zakaria *et al.*, 2003).

Hasil pengukuran menunjukkan kadar rata-rata vitamin C plasma kelompok kakao dan kelompok kontrol sesudah intervensi mengalami peningkatan. Kadar rata-rata vitamin C plasma kelompok kakao meningkat secara nyata ($p < 0,05$) dari 4,13 mg/l menjadi 5,99 mg/l dengan selisih peningkatan rata-rata sebesar 1,86 mg/l. Sebaliknya kelompok kontrol juga mengalami peningkatan dari 4,97 mg/l menjadi 5,11 mg/l dengan selisih peningkatan sebesar 0,13 mg/l namun tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) (Gambar 1).



Gambar 1. Rata-rata kadar vitamin C sebelum dan sesudah intervensi.

Peningkatan kadar vitamin C plasma kelompok kakao diduga karena efek konsumsi bubuk kakao lindak bebas lemak selama 25 hari. Hal ini disebabkan bubuk kakao lindak bebas lemak yang dipakai dalam penelitian ini mengandung senyawa polifenol yang tinggi (Zairisman, 2006). Senyawa polifenol memiliki kapasitas sebagai antioksidan (Sanbongi, Osakabe, Natsume, Takizawa, Gomi, & Osawa, 1998). Senyawa polifenol kakao dari golongan flavonoid ini dapat berfungsi sebagai antioksidan primer karena mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas yang terjadi di dalam sel (Kochhar & Rossell, 1990). Polifenol dalam bubuk kakao lindak bebas lemak diduga dapat bereaksi langsung dengan senyawa peroksida radikal yang terdapat pada membran atau di dalam sel, sehingga dapat melindungi vitamin C plasma sebagai antioksidan gizi. Mekanisme antioksidan flavonoid dalam melindungi vitamin C dapat dilukiskan sebagai berikut: (1) beberapa senyawa flavonoid bertindak sebagai antioksidan bagi vitamin C, (2) memperlambat konversi asam askorbat menjadi asam dehidroaskorbat, dan (3) mengkelat tembaga dan metal lainnya sehingga dapat mengurangi oksidasi terhadap asam askorbat (Middleton, Kandaswami, & Theoharis, 2000).

Menurut Fraga *et al.* (2005) konsumsi coklat yang kaya dengan kandungan senyawa flavanol dapat meningkatkan kadar vitamin E responden pemain sepak bola junior sebesar 12%. Sementara itu, vitamin C diketahui memiliki efek sinergis dengan vitamin E yaitu dapat memulihkan vitamin E yang terserang oleh radikal bebas. Adanya peningkatan vitamin E diduga juga dapat meningkatkan vitamin C. Hasil pengukuran vitamin C dalam penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar vitamin C plasma kelompok kakao secara nyata ($p < 0,05$) setelah intervensi.

Peningkatan kadar vitamin C kelompok kakao dan kelompok kontrol setelah menjalani intervensi diduga juga karena pola makan dan pengetahuan gizi responden yang membaik. Selama intervensi berlangsung setiap makan pagi dan makan malam responden selalu mengkonsumsi sayur dan buah yang disediakan. Sebaliknya sebelum intervensi, konsumsi sayur responden kurang teratur. Zakaria *et al.* (1996) mengemukakan bahwa sayuran dan buah-buahan yang kaya vitamin E dan C dapat berfungsi sebagai antioksidan tubuh. Di samping itu, selama intervensi berlangsung responden mengurangi konsumsi makanan jajanan karena sebagian kebutuhan makannya telah disediakan oleh peneliti. Menurut Fardiaz dan Fardiaz (1993) makanan jajanan mengandung bahan-

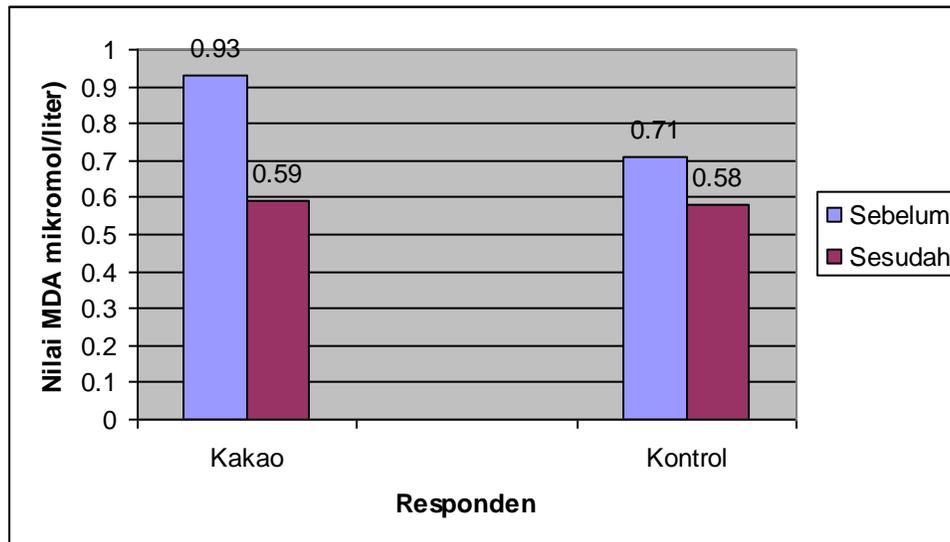
bahan pencemar seperti mikroorganisme, pestisida, logam berat, zat pewarna, dan zat pengawet. Makanan jajanan yang tercemar bahan kimia berpotensi meningkatkan pembentukan senyawa radikal dalam tubuh (Zakaria, *et al*, 1996).

Kadar MDA

MDA merupakan produk peroksidasi lipid. Oleh sebab itu, analisis kadar MDA sering digunakan sebagai salah satu parameter untuk mengevaluasi sejauh mana terjadi kerusakan sel karena reaksi radikal bebas. Kadar MDA yang rendah menunjukkan adanya penghambatan oleh suatu antioksidan.

Prinsip analisis pada pengukuran ini adalah MDA dapat melakukan reaksi penambahan nukleofilik dengan asam tiobarbiturat (TBA) membentuk senyawa MDA-TBA. Senyawa ini berwarna merah jambu yang dapat diukur intensitas warnanya dengan menggunakan spektrofotometer. Senyawa 1,1,3,3-tetrotoksipropan merupakan prekursor MDA sehingga dapat digunakan sebagai larutan standar.

Hasil pengukuran menunjukkan kadar rata-rata MDA plasma kelompok kakao dan kelompok kontrol sesudah intervensi mengalami penurunan. Kadar rata-rata MDA plasma kelompok kakao menurun secara nyata ($p < 0,05$) dari $0,93 \mu\text{mol/l}$ menjadi $0,59 \mu\text{mol/l}$ dengan selisih penurunan rata-rata sebesar $0,33 \mu\text{mol/l}$ (Gambar 2). Kelompok kontrol juga mengalami penurunan dari $0,71 \mu\text{mol/l}$ menjadi $0,58 \mu\text{mol/l}$ dengan selisih penurunan sebesar $0,12 \mu\text{mol/l}$ tetapi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).



Gambar 2. Rata-rata kadar MDA plasma sebelum dan sesudah intervensi.

Penurunan kadar MDA plasma kelompok kakao diduga karena efek dari konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak selama 25 hari. Hal ini dimungkinkan karena bubuk kakao lindak bebas lemak yang dikonsumsi oleh kelompok kakao mengandung senyawa polifenol yang tinggi (Zairisman, 2006). Dalam penelitian lain disebutkan bahwa kandungan polifenol total dalam bubuk kakao lebih tinggi bila dibandingkan dengan anggur, teh hitam, dan teh hijau (Lee *et al.*, 2003). Sependapat dengannya, Sanbongi *et al.* (1998) juga menyatakan bahwa senyawa polifenol memiliki

kapasitas antioksidan. Dalam hal ini senyawa polifenol kakao yaitu dari golongan senyawa flavonoid dapat berfungsi sebagai antioksidan primer. Menurut Kochhar dan Rossell (1990), senyawa polifenol dapat bertindak sebagai antioksidan primer karena mampu menghentikan reaksi berantai radikal bebas yang terjadi di dalam sel. Polifenol dalam bubuk kakao lindak bebas lemak 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.

Hasil penelitian ini mendukung hasil penelitian Erniati (2007) yang menyebutkan bahwa konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak setelah 25 hari secara nyata dapat menurunkan kadar MDA sel limfosit. Di samping itu, hasil pengukuran ini memperkuat hasil temuan Fraga, *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa konsumsi coklat yang mengandung senyawa flavanol dapat menurunkan kadar MDA responden pemain sepak bola junior sebesar 12%.

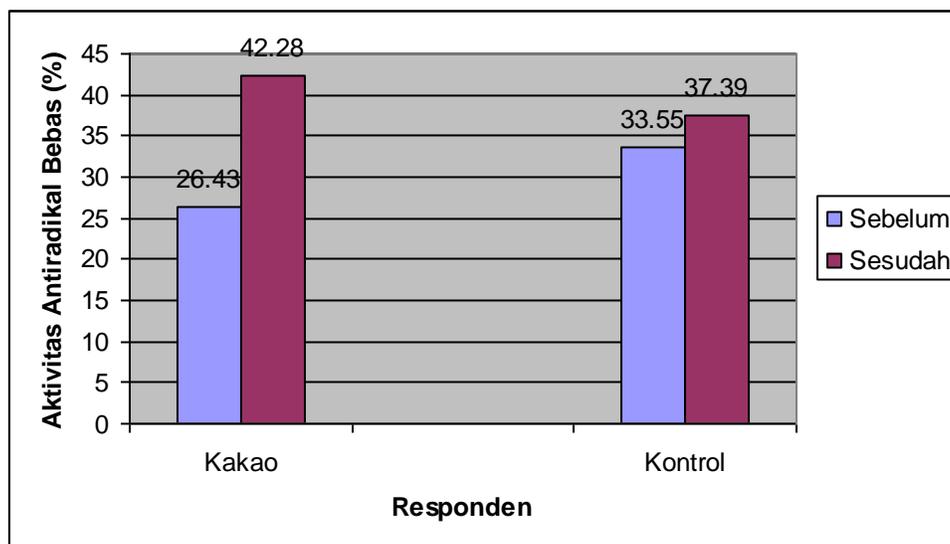
Sementara itu, penurunan kadar MDA pada kelompok kontrol (yang tidak mengonsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak) secara statistik dengan uji t tidak berbeda nyata. Hal ini diduga karena pola makan responden menjadi lebih teratur dan pengetahuan gizi responden menjadi lebih baik, seperti yang telah dibahas pada bab vitamin C di atas.

Aktivitas Anti Radikal Bebas Plasma

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat melindungi sistem biologis tubuh dari reaksi yang dapat menyebabkan oksidasi berlebihan (Papas, 1991).

Pengujian ini bertujuan menguji pengaruh konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak terhadap aktivitas antiradikal bebas plasma menggunakan radikal bebas stabil DPPH. Prinsip pengujian ini adalah mereaksikan radikal bebas DPPH dengan antioksidan plasma dimana hasil reaksinya dapat diukur dari perubahan warna ungu DPPH menjadi warna kuning (Mello, Alves, Macedo, & Kubota, 2005). Oleh karena itu, semakin tinggi kapasitas antioksidan plasma semakin pudar pula warna ungu yang dihasilkan.

Hasil pengukuran menunjukkan kadar rata-rata aktivitas anti radikal bebas plasma kelompok kakao dan kelompok kontrol sesudah intervensi mengalami peningkatan. Kadar rata-rata aktivitas anti radikal bebas plasma kelompok kakao meningkat secara nyata ($p < 0,05$) dari 26,43% menjadi 42,28% dengan selisih peningkatan sebesar 15,85% (Gambar 3). Kelompok kontrol juga mengalami peningkatan dari 33,55% menjadi 37,39% dengan selisih peningkatan sebesar 3,84% tetapi tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).



Gambar 3. Rata-rata aktivitas antiradikal bebas plasma sebelum dan sesudah intervensi.

Peningkatan aktivitas antiradikal bebas plasma kelompok kakao sesudah mengonsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak selama 25 hari diduga karena adanya aktivitas antioksidan dari bubuk kakao yang digunakan. Bubuk kakao lindak bebas lemak dari Balai Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember mengandung senyawa polifenol yang tinggi (Zairisman, 2006). Senyawa polifenol ini akan bertindak sebagai antioksidan primer yang mampu menahan serangan radikal bebas DPPH. Hal ini ditunjukkan oleh adanya peningkatan anti radikal bebas kelompok kakao dibandingkan kelompok kontrol. Adanya peningkatan aktivitas antiradikal bebas plasma pada kelompok kakao dimungkinkan karena senyawa polifenol yang terkandung dalam minuman bubuk kakao lindak bebas lemak dapat masuk ke dalam sirkulasi darah dan selanjutnya masuk ke dalam plasma. Pada tubuh kita flavonoid (bagian dari senyawa polifenol) akan bersirkulasi dalam plasma (Grassi, 2006).

Hasil penelitian ini sejalan dengan temuan Erniati (2007) yang menyebutkan bahwa konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak setelah 25 hari dapat meningkatkan aktivitas antiradikal bebas sel limfosit.

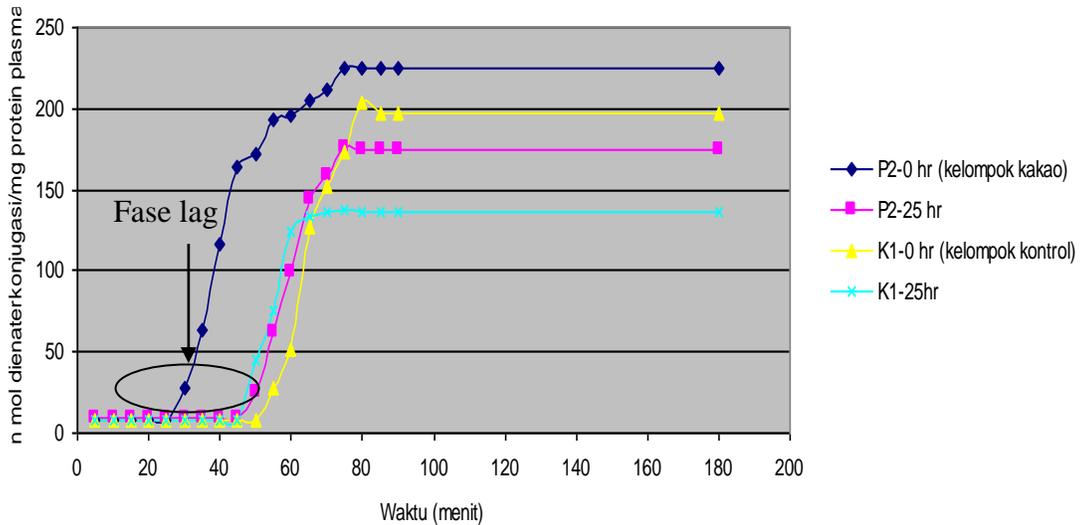
Hasil penelitian ini juga memperkuat temuan Osman, Nasarudin, dan Lee (2003) yang menyebutkan bahwa ekstrak kakao yang telah berkecambah mempunyai aktivitas antioksidan yang sama dengan teh hijau. Selain itu, hasil penelitian ini juga memperkuat simpulan Wollgast dan Anklam (2000) yang mengemukakan bahwa polifenol biji kakao memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik dalam menangkal radikal bebas.

Diena Terkonjugasi Plasma

Diena terkonjugasi adalah produk antara dari lipid yang teroksidasi. Adanya diena terkonjugasi dalam plasma mengindikasikan adanya kerusakan lipid. Tujuan analisis diena terkonjugasi adalah menguji kapasitas antioksidan minuman bubuk kakao lindak bebas lemak dalam menahan oksidasi LDL (*low density lipoprotein*) plasma. Diena terkonjugasi menyerap sinar pada panjang gelombang UV 234 nm, sehingga dapat dibuat kurva oksidasi antara lamanya waktu

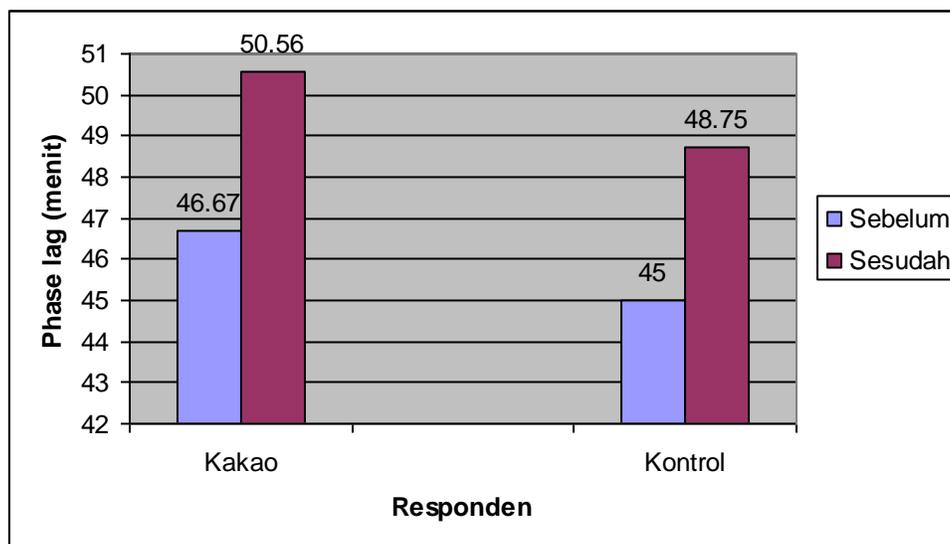
oksidasi dengan kadar diena terkonjugasi yang terbentuk. Sampel yang mengandung antioksidan biasanya memiliki fase lag sebelum terjadinya lonjakan diena terkonjugasi. Sehingga semakin lama fase lag mengindikasikan semakin tingginya kapasitas antioksidan sampel tersebut.

Dalam analisis ini, plasma dioksidasi menggunakan CuSO_4 . Perhitungan fase lag dimulai sejak penambahan CuSO_4 sampai titik perpotongan fase propagasi terhadap sumbu absis/waktu (Gambar 4).



Gambar 4. Kurva oksidasi plasma seorang subjek dari kelompok kakao (P2) dan kelompok kontrol (K1) sebelum dan sesudah intervensi.

Sesudah intervensi rata-rata fase lag plasma kelompok kakao (Gambar 4) mengalami peningkatan dari 46,67 menit menjadi 50,56 menit dengan selisih peningkatan sebesar 3,89 menit, begitu pula kelompok kontrol juga mengalami peningkatan dari 45 menit menjadi 48,75 menit dengan selisih peningkatan sebesar 3,75 menit. Tetapi kelompok kakao memperlihatkan selisih yang lebih besar dibandingkan kelompok kontrol.



Gambar 5. Rata-rata nilai fase lag oksidasi diena terkonjugasi plasma sebelum dan sesudah intervensi.

Peningkatan fase lag pada kelompok kakao yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol diduga karena aktivitas antioksidan plasma yang berasal dari flavonoid bubuk kakao bebas lemak. Hal ini dimungkinkan mengingat bubuk kakao lindak bebas lemak yang digunakan pada percobaan ini mengandung senyawa polifenol yang tinggi (Zairisman, 2006). Senyawa polifenol ini akan bertindak sebagai antioksidan dalam melindungi LDL plasma dari kerusakan oksidasi. Hasil temuan ini memperkuat simpulan Mathur, Devaraj, Grundy, dan Jialal (2002) yang mengungkapkan bahwa produk kakao dapat menurunkan LDL dari berbagai oksidator dengan memperpanjang waktu lagnya. Dalam penelitian lain Fraga *et al.* (2005) menyebutkan bahwa konsumsi flavanol yang terkandung dalam coklat susu telah terbukti mampu mengurangi kolesterol plasma, LDL, MDA serta meningkatkan vitamin E dan plasma darah responden yang berprofesi sebagai pemain sepak bola.

Peningkatan fase lag oksidasi diena terkonjugasi plasma oleh flavonoid kakao diduga karena senyawa flavonoid yang terkandung dalam minuman bubuk kakao lindak bebas lemak dapat masuk dalam sirkulasi darah dan selanjutnya berada dalam plasma. Dengan demikian, selama berada dalam plasma flavonoid diduga melindungi LDL dari berbagai kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas.

KESIMPULAN

Konsumsi minuman bubuk kakao lindak bebas lemak setiap hari selama 25 hari berpengaruh nyata dalam meningkatkan aktivitas antioksidan plasma manusia yang meliputi meningkatnya kadar vitamin C plasma (1,86 mg/l), meningkatnya antiradikal bebas plasma (15,85%), menurunnya nilai MDA plasma (0,33 $\mu\text{mol/l}$), dan cenderung memperpanjang fase lag diena terkonjugasi (3,89 menit). Dengan meningkatnya sistem antioksidan plasma, maka dapat disimpulkan bahwa minuman bubuk kakao lindak bebas lemak varietas lokal berkhasiat bagi kesehatan karena sistem antioksidan plasma dapat menggambarkan sistem pertahanan tubuh secara keseluruhan.

REFERENSI

- Erniati. (2007). *Efek konsumsi minuman bubuk kakao bebas lemak terhadap sifat antioksidatif dan proliferasi limfosit manusia [tesis]*. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Fardiaz, D & Fardiaz, S. (1993). *Keamanan makanan jajanan. Penyuluhan Keamanan Makanan Jajanan pada Konsumen*. Proyek Makanan Jajanan IPB. Bogor. 16-17 Februari.
- Fraga, C.G., Goretta L.A., Ottaviani, J., Carrasquedo, F., Lotito, S., Lazarus, S., et al (2005). Regular consumption of flavanol rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Journal of Clinic & Dev. Immun*, 12 (1); 11-17.
- Grassi, D. (2006). Cocoa and cardiovascular health. The sweet heart protection. *Agronomy Food Industrize Hi Technology*, 17 (1).
- Hammerstone, J.F., Lazarus, S.A., & Schmitz, H.H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *Journal Nutrition*, 130; 2086S-2092S.
- Heiss, C., Dejam, A., Kleinbongard, T., Schewe, T., Sies, H. & Kelm, M. (2003). Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *Journal of American Medical Association*, 290: 1030-1031.
- Hong, Y.L., Yeh, S.I., Chang, C.Y., & Hu, M.L. (2000). Total plasma malonaldehyde level in 16 Taiwanese College Students determined by various thiobarbituric acid test and improved high performance liquid chromatography based method. *Clinical Biochemistry* 33: 619-625.
- Kochhar, S.P., & Rossell, J.B. (1990). Detection, estimation, and evaluation of antioxidants in food system. Di dalam: Hudson, B.J.F. *Food Antioxidants*. London: Elsevier Applied Science.
- Lee Kw, Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y., (2003). Cocoa has more phenolic phytochemical and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51; 7292-7295.
- Mathur, S., Devaraj, S., Grundy, S.M., & Jialal. (2002). Cocoa product decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not effect biomarkers of inflammation in human. *Journal Nutrition*, 132; 3663-3667.
- Misnawi, J.S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2002). Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase tyrosinase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 559-566.
- Middleton, J.r., Chithan, K.E., & Theoharis, C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology. Rev.* 52; 673-751.
- Mello, L.D., Alves, A.A., Macedo, D.V., & Kubota, L.T. (2005). Peroxides-based biosensor as a tool for fast evaluation of antioxidant capacity of tea. *Food Chemistry*, 92; 515-519.
- Murphy, K.J., Kronopoulus, A.K., Singh, I., Francis, M.A., Moriarty, H., Pike, M.J., et al. (2003). Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *American Journal Clinic Nutrition*, 77; 1466-73.
- Osman, H.R., Nasarudin R., & Lee, S.S. (2003). Extracts of cocoa (*Theobroma L cacao*) leaves and their antioxidant potentials. *Journal Food Chemistry*, 86; 41-46.
- Papas, A.M., (1991). Determinant of antioxidant in humans. Di dalam : Papas, A.M., Editor. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*. USA: CRC Press. P.21-23.
- Peterson., J, & Johanna, D. (2000). An Informatics approach to flavonoid database development. *Journal Food Composition Analysis*, 13; 441-454.
- Sanbongi, C., Osakabe, N., Natsume, M., Takizawa, T., Gomi, S., & Osawa, T.(1998). Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao* *Journal Agricultural Food Chemistry*, 46; 452-457.

- Turkmen, N., Ferda, S., & Velioglu, Y.S. (2004). The Effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93 (2005) 713 – 718.
- Van Heerden IV. (2006). *Chocolate update for easter*. Diambil 29 Juli 2007 dari http://www.health24.com/dietnfood/weiht_Centre/15-51-736,21867.
- Winarsi, H. (2003). Respon imunitas dan hormonal wanita premenopause terhadap minuman susu fungsional yang disuplementasi dengan isoflavon kedelai dan difortifikasi dengan seng [desertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health? *Journal Food Res International*, 33; 449-459.
- Zhu, Q.Y., Schramm, D.D., & Grooss, H.B. (2005). Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical in human erythrocyte hemolysis. *Clinical & Devellopment Immunology*, 12 (1); 27-34.
- Zairisman, S.Z., (2006). *Potensi imunomodulator bubuk kakao bebas lemak sebagai produk sub standar secara in vitro pada sel limfosit manusia*. [Skripsi]. Bogor.: Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, IPB.
- Zakaria, F.R., Abidin, Z., Pramudya, S.M., & Sanjaya. (1996). Kadar malonaldehida dan zat gizi antioksidan plasma pada populasi remaja rentan pencemaran makanan. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, 7 (3); 56-64.
- Zakaria, R.F, Septiana, A.T., & Sulistiyani. (2001). Ginger (*Zingiber officinale* Roescoe) extracts increase human LDL resistance to oxidation and prevent cholesterol accumulation in macrophage. Abstract presented at *the Second Intl Symp on Natural Antioxidant: Molecular Mechanism and Health Affects*, Beijing, China.
- Zakaria, F.R., Nurrahman, Prangdimurti, E., & Tejasari. (2003). Antioxidant and immunoenhancement activities of ginger (*Zingeber officinale* Roscoe) extracts and compounds in vitro and in vivo mouse and human system. *Nutraceuticals and Food*, 8 (1); 96-104.