

IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF ALKALOID, CATECHIN DAN GENISTEIN PADA PRODUK DARK CHOCOLATE DENGAN PENAMBAHAN GREEN TEA MATCHA DAN SOY POWDER

Habiburohman^{*)},
Dr. Ir. Yusep Ikrawan, M.Sc^{**)}, dan Ir. Hervally, M.Si^{***)}

^{*)}Mahasiswa Program Studi Teknologi Pangan Universitas Pasundan, Bandung

^{**)}Dosen Pembimbing Utama, ^{***)}Dosen Pembimbing Pendamping

ABSTRACT

Cacao is one of commodities that are quite often found in Indonesia. Almost every circle likes cacao's processed product such as chocolate bar due to its delicious taste. But its role in fulfilling consumer's nutrition needs are not fulfilled yet as not many manufacturer that care, and not many people knows the benefit of consuming chocolate. Therefore, in this research, the active compound that contained in dark chocolate will furthermore identified, that diversified by adding beneficial active compound such as catechin from matcha green tea as a polyphenol and genistein from soy powder as an antioxidant. From this research, will be expected to benefit for Indonesia in cocoa utilization. Randomized Complete Block Design is used as data analysis, by using 100% : 0%, 50% : 50%, and 0% : 100% proportion to soy powder with milk powder as factors, with 6 %, 8% and 10 % matcha green tea concentration. Response on this research is organoleptic, which is ranking test with texture, taste, flavor, and after taste attribute then continued with identifying alkaloid active compound, catechin and genistein in dark chocolate product. The result of stage - 1 research is getting selected sample from organoleptic test ranking, where the best texture attribute sample is 165 (proportion in soy powder with milk powder by 100% : 0%, green tea concentration by 6%), best taste attribute sample is 683 (proportion in soy powder with milk powder by 50% : 50%), best flavor attribute sample is 372 (proportion in soy powder with milk powder by 100% : 0%, green tea concentration by 10%) and best after taste attribute sample is 372 (proportion in soy powder with milk powder by 100% : 0%, green tea concentration by 10%). Hereafter, stage - 2 research is identifying active compound for total value of alkaloid sample with highest value of sample number 683 as much as 4,72 %. Total value of flavonoid sample with highest flavonoid value is sample number 683 as much as 1.21%, the identification result using instrument HPLC (High Performance Liquid Chromatography) got the best sample for catechin identification is sample 683 with catechin content 0,81 % and for genistein identification is sample 372 with genistein content 0,20 %.

Keyword : Alkaloid, Catechin, Dark chocolate, Flavonoid, Genistein

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris yang kaya akan sumber bahan alami. Pemanfaatan bahan baku alami yang dijadikan produk hasil olahan dalam negeri belum sepenuhnya memenuhi kualitas dan memberikan manfaat yang baik bagi konsumen. perlu dilakukan diversifikasi pangan dengan memberikan manfaat dalam setiap produk pangan yang dihasilkan. Ditinjau dari hasil pemasaran, banyak dijumpai produk pangan yang tidak memperhatikan kandungan dari masing – masing bahan bakunya seperti kandungan senyawa aktif karena keliru dalam pengolahannya, padahal manfaat dari senyawa aktif sangatlah baik bagi kesehatan.

Senyawa aktif adalah suatu senyawa kimiawi yang terdapat di dalam suatu sumber alami (umumnya tumbuhan) yang memberikan sifat khusus dan karakteristik dari tanaman sumber tersebut (Rira, 2013).

Manfaat dari senyawa aktif pada suatu komoditas dapat memiliki banyak kebaikan bagi tubuh bila dikonsumsi. Beberapa senyawa aktif seperti kandungan *alkaloid* pada cokelat dapat merangsang terbentuknya hormon *endorfin* yang menciptakan perasaan santai, senang dan bahagia. *Flavonoid* pada teh hijau memiliki manfaat yang sangat banyak dalam hal peranannya sebagai antioksidan. *Isoflavon* dalam kedelai yang terdiri atas *genistein*, *daidzein* dan *glicitein*, protein kedelai dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskuler (Spillane, 1995).

Didalam daun teh hijau mengandung senyawa aktif tertinggi adalah *catechin* yang tergolong dalam metabolit sekunder secara alami dihasilkan oleh daun teh hijau dan termasuk dalam golongan *flavonoid*, senyawa ini dapat berperan sebagai antioksidan akibat gugus fenolnya dimana dapat mencegah terhadap penyakit jantung iskemik serta menghambat kanker atau senyawa anti kanker (Adriani, 2010).

Isoflavon merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak disintesa oleh tanaman. Dari beberapa jenis tanaman, kandungan *isoflavon* yang lebih tinggi terdapat pada tanaman *Leguminoceae*, khususnya pada tanaman kedelai. Untuk mengetahui kandungan *isoflavon* maka dilakukan analisis menggunakan HPLC dengan dilakukan preparasi sampel sebelumnya (Penalpo, 2004).

Cokelat murni memiliki banyak khasiat bagi kesehatan manusia khususnya bila dikonsumsi oleh kaum wanita. Masalahnya adalah hampir sebagian besar wanita salah kaprah menilai makanan ini. Jika diolah dengan tepat maka cokelat akan menjadi makanan yang luar biasa. Cokelat jenis *dark chocolate*, sangat kaya akan *flavonoid*, yaitu jenis antioksidan yang melindungi jantung dengan mencegah keping - keping lemak (*platelets*) menempel satu sama lain dan membentuk gumpalan yang menyumbat (Misnawi, 2010).

Dua sifat utama cokelat yang perlu diperhatikan adalah *flavor* dan tekstur. Berbagai cara mengolah cokelat, salah satu diantaranya meliputi tahap-tahap : pencampuran, pelembutan, penghalusan (*conching*), *tempering*, dan pencetakan. Proses pembuatan coklat yaitu dengan cara mencampurkan coklat bubuk, gula, lemak kakao serta lesitin. Pencampuran ini bertujuan agar pasta coklat yang dihasilkan mudah untuk dicetak. (Erukainur, 2010).

Proses *conching* merupakan pencampuran dari bahan yang digunakan dalam pembuatan cokelat, dilakukan pengadukan dan pencampuran. Suhu yang digunakan pada proses *conching* tersebut mendekati atau dibawah suhu inversi cokelat yaitu 45°C untuk *milk chocolate* dan 60°C untuk *dark chocolate* (Saleh, 2006).

Menurut penelitian Zogina (2015), berdasarkan analisis aktivitas antioksidan pada bahan baku utama yaitu *cocoa powder* memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah dibanding kandungan antioksidan pada *green tea* yang sangat kuat. Produk *Dark Chocolate* terbaik dibuat dengan waktu *conching* terbaik selama 10 jam serta dari keseluruhan respon diperoleh pada sampel perbandingan *soy powder* dan susu bubuk 50% : 50% dengan aktivitas antioksidan yaitu 95,44 µg/mL, kadar protein 16,92%, kadar karbohidrat gula total 11,14 % dan kadar lemak 13,43%.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi senyawa aktif *alkaloid*, *catechin* dan *genistein* yang terkandung dalam formulasi terbaik produk *dark chocolate* yang ditambahkan *green tea matcha* dan *soy powder*.

Masalah yang dapat dirumuskan dari penelitian ini adalah apakah penambahan *green tea matcha* dan *soy powder* dapat menghasilkan senyawa aktif *alkaloid*, *catechin* dan *genistein* dari produk *Dark Chocolate*.

Manfaat yang diperoleh antara lain untuk mengetahui adanya senyawa aktif *alkaloid*, *catechin* dan *genistein* yang merupakan sifat fungsional produk *dark chocolate* yang ditambahkan *green tea matcha* dan *soy powder* sebagai sumber senyawa aktif yang baik bagi kesehatan .

2. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cocoa powder* 3136,05 gram, *cocoa butter* 2889 gram, gula tepung 2759,4 gram, *milk powder* 1379,7 gram, mentega putih 675 gram, *soy powder* 1379,7 gram, *green tea matcha* 180 gram, aquadest, standar *alkaloid*, standar *flavonoid*, standar *catechin*, standar *genistein*, N-Hexan 450 mL, kloroform 450 mL, metanol *liquid chromatography gradd mass* 60 mL, metanol 40%, asetonitril 60 %, dapar asetat 10 %.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan digital, *mixer*, *concher*, panci *stainless steel*, *aluminium foil*, spatula, sendok, cetakan, kain waring, *freezer*. Spektrofotometri UV-Vis, *Micropore Filter* 0,45 µL (*Sartorius Minisart Non Sterilrc*), HPLC *LiCrosper®* 5µm 100 RP-18e *column* (125 x 4 mm), *flowrate* 1 mL/min, volume injeksi 20 µL, *syringe* 50µL dan *loop* 20 µL, HPLC *Simadzu* dengan kolom *Lichrospher®* (Non Polar), *syringe* 50µL dan *loop* 20 µL, kolom *Supel Cocil LC-18-DB* (250 x 4,1 mm, i.d.54 µm), *flowrate* 1mL/min, volume injeksi 20 µL, Detektor sinar UV pada panjang gelombang 263 nm dengan suhu oven menggunakan suhu kamar, *rotary evaporator*, sentrifugator, gelas kimia, gelas ukur, timbangan, pisau, kertas saring, corong, cawan penguap, *waterbath*, batang pengaduk, vial, pipet filler, pipet volum, pipet mikron, pipet tetes dan neraca digital.

2.2. Rancangan Penelitian

2.2.1. Tahap Pertama

Penelitian tahap 1 meliputi pembuatan produk *dark chocolate* dengan formulasi yang telah dilakukan dalam penelitian sebelumnya menggunakan waktu *conching* selama 6 jam dengan tekstur yang dihasilkan paling baik dari penambahan *green tea matcha* dan perbandingan

antara *soy powder* dengan *milk powder*. Rancangan perlakuan terdiri dari dua faktor, yaitu perbandingan antara *soy powder* dengan *milk powder* a1 (100% : 0%), a2 (50% : 50%), a3 (0% : 100%) serta konsentrasi *green tea matcha* b1 (6%), b2 (8%), b3 (10%). Rancangan respon yang digunakan yakni respon organoleptik yang menggunakan uji ranking.

2.2.2. Tahap Kedua

Penelitian tahap 2 meliputi pembuatan preparasi sampel *dark chocolate*, pembuatan larutan blanko serta identifikasi senyawa aktif *alkaloid* total dan *flavonoid* total menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis sedangkan untuk menentukan identifikasi *catechin* dan *genistein* menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

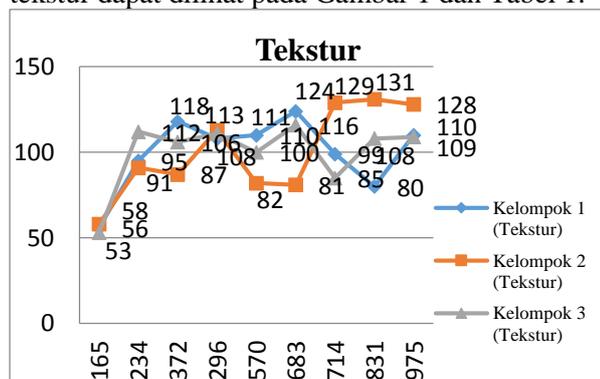
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Tahap Pertama

3.1.1. Respon Organoleptik

3.1.1.1. Tekstur

Hasil analisis respon organoleptik atribut tekstur dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 1. Grafik Uji Ranking Atribut Tekstur

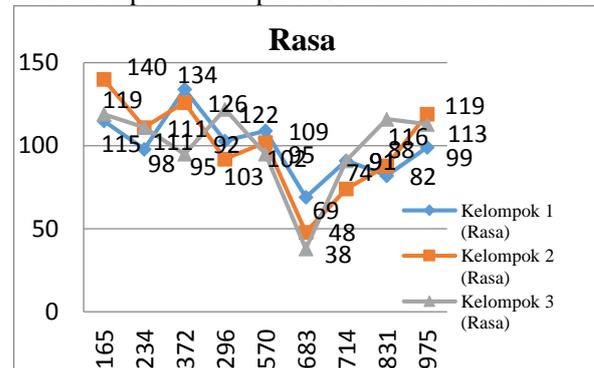
Tabel 1. Sampel terpilih atribut tekstur

Kelompok	Jumlah terkecil	Sampel Terpilih
1	56	165
2	58	165
3	53	165

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dari 3 kelompok ulangan, perbandingan antara *soy powder* dan susu bubuk dengan konsentrasi *green tea matcha* yang berbeda – beda menggunakan uji ranking pada atribut tekstur dengan jumlah DA (Data Asli) terkecil atau ranking terbaik (superior) pada sampel 165 untuk dilanjutkan ke penelitian tahap 2.

3.1.1.2. Rasa

Hasil analisis respon organoleptik atribut tekstur dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2.



Gambar 2. Grafik Uji Ranking Atribut Rasa

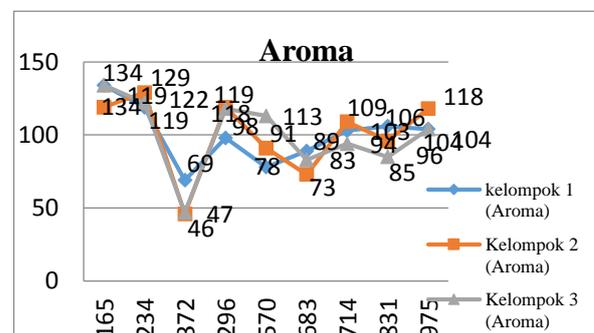
Tabel 2. Sampel terpilih atribut rasa

Kelompok	Jumlah terkecil	Sampel Terpilih
1	69	683
2	48	683
3	38	683

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dari 3 kelompok ulangan, perbandingan antara *soy powder* dan susu bubuk dengan konsentrasi *green tea matcha* yang berbeda – beda menggunakan uji ranking pada atribut rasa dengan jumlah DA (Data Asli) terkecil atau ranking terbaik (superior) pada sampel 683 untuk dilanjutkan ke penelitian tahap 2.

3.1.1.3. Aroma

Hasil analisis respon organoleptik atribut tekstur dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 3. Grafik Uji Ranking Atribut Aroma

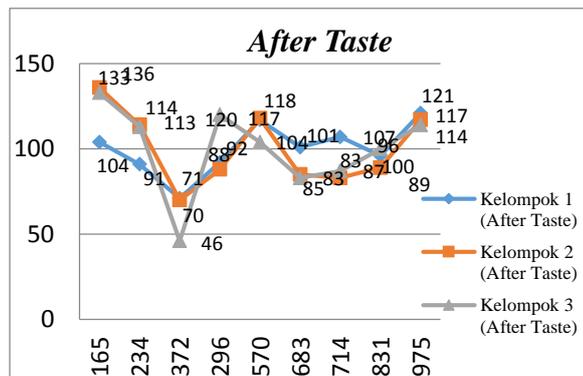
Tabel 3. Sampel terpilih atribut aroma

Kelompok	Jumlah Terkecil	Sampel Terpilih
1	69	372
2	46	372
3	47	372

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dari 3 kelompok ulangan, perbandingan antara *soy powder* dan susu bubuk dengan konsentrasi *green tea matcha* yang berbeda – beda menggunakan uji ranking pada atribut rasa dengan jumlah DA (Data Asli) terkecil atau ranking terbaik (superior) pada sampel 372 untuk dilanjutkan ke penelitian tahap 2.

3.1.1.4. After Taste

Hasil analisis respon organoleptik atribut tekstur dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 4. Grafik Uji Ranking Atribut After Taste

Tabel 4. Sampel terpilih atribut after taste

Kelompok	Jumlah terkecil	Sampel Terpilih
1	71	372
2	70	372
3	46	372

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dari 3 kelompok ulangan, perbandingan antara *soy powder* dan susu bubuk dengan konsentrasi *green tea matcha* yang berbeda – beda menggunakan uji ranking pada atribut rasa dengan jumlah DA (Data Asli) terkecil atau ranking terbaik (superior) pada sampel 372 untuk dilanjutkan ke penelitian tahap 2.

3.2. Tahap Kedua

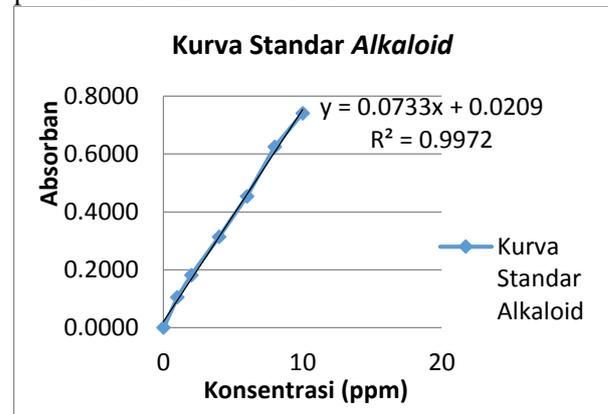
3.2.1. Preparasi sampel

Penelitian tahap 2 diawali dengan preparasi sampel terpilih dengan metode maserasi. Sampel 165, 372 dan 683 masing – masing ditimbang 5 gram lalu dipotong halus dan dimasukkan kedalam kertas saring. Selanjutnya dimaserasi dengan N-Hexan selama 2 jam lalu kloroform selama 2 jam, tujuannya untuk menghilangkan lemak pada sampel *dark chocolate*. Selanjutnya dilakukan maserasi kembali dengan pelarut organik *methanol liquid chromatography grade mass* untuk mengekstrak senyawa aktif yang terkandung dalam

produk *dark chocolate* dan dipekatkan dengan alat *rotary evaporator*.

3.2.2. Analisis Kadar Total Alkaloid

Hasil analisis standar *alkaloid* dapat dilihat pada Gambar 5 dan Tabel 5.



Gambar 5. Kurva Standar Alkaloid

Tabel 5. Standar Alkaloid

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1	0	0,0000
2	1	0,1046
3	2	0,1816
4	4	0,3136
5	6	0,4541
6	8	0,6246
7	10	0,7409

Berdasarkan kurva standar *alkaloid* diatas semakin tinggi konsentrasi standar *alkaloid* maka semakin besar pula absorbansinya. Nilai R yang didapat 0,9972 ini menunjukkan terbentuk garis lurus linear pada rentang konsentrasi yang dibuat karena standar terbentuknya garis lurus linear pada rentang 0,7 sampai 1,0 sehingga dapat disimpulkan bahwa tingkat kesalahannya kecil. Pengukuran kadar total *alkaloid* dilakukan duplo untuk setiap sampelnya karena dibutuhkan pembandingan untuk mengukur absorbansi agar data hasil pengamatan valid. Setelah dilakukan perhitungan absorbansi dari masing – masing sampel duplo hasilnya hampir sama untuk setiap sampelnya.

Hasil pengamatan analisis kadar total *alkaloid* didapat bahwa kadar total *alkaloid* tertinggi pada sampel 683 sebanyak 4,73 %, sampel 165 sebanyak 4,61 % dan sampel 372 sebanyak 4,66 %. Analisis kadar total *alkaloid* diawali dengan membuat grafik standar *alkaloid* dengan berbagai konsentrasi, sehingga dapat diketahui

absorbansinya serta panjang gelombang maksimum *alkaloid* 352 dengan nilai $y = 0,0733x + 0,0209$ dan

$R^2 = 0,9972$. Hasil perhitungan kadar total *alkaloid* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Tabel Hasil Perhitungan Kadar *Alkaloid*

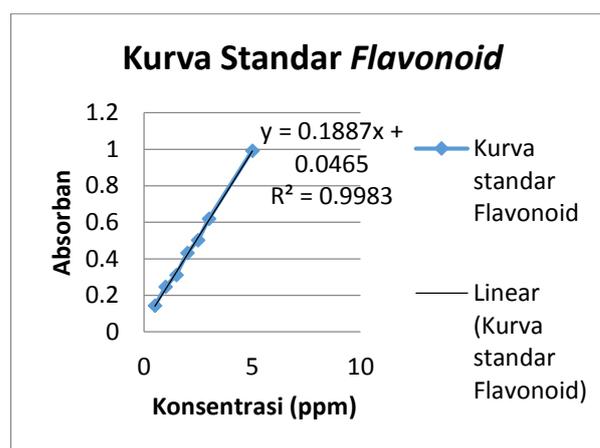
No	Nama sampel	Berat sampel (Gram)	Absorban	Pengenceran	Kadar (ppm)	Kadar (%)
1	683	5,0214	0,3686	100	237,18	4,72
2	683	5,0214	0,3688	100	237,31	4,73
3	165	5,1006	0,3653	100	234,92	4,61
4	165	5,1006	0,3654	100	234,99	4,61
5	372	5,0031	0,363	100	233,36	4,66
6	373	5,0031	0,3629	100	233,29	4,66

Sumber *alkaloid* terbesar terdapat pada bahan baku *cocoa powder*. Jika dilihat dari formulasi ketiga sampel terpilih tersebut seharusnya yang memiliki kadar *alkaloid* tertinggi pada sampel 165 karena menggunakan *cocoa powder* lebih banyak sebesar 25,23 %, namun setelah dilakukan penelitian dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis ternyata kadar *alkaloid* tertinggi adalah sampel 683 dengan formulasi *cocoa powder* 21,23 % dengan kadar *alkaloid* 4,73 % dibandingkan dengan sampel 165 sebesar 4,61 %. Tingginya kadar *alkaloid* pada sampel 683 kemungkinan karena terjadi interaksi antara senyawa aktif pada *soy powder* dan *milk powder* dengan perbandingan (50%:50%) dan *green tea matcha* sebanyak 10 %.

Pengukuran serapan cahaya di daerah ultraviolet (200-400 nm) dan sinar tampak (400-800 nm) oleh suatu senyawa. Serapan cahaya UV atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron - elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Panjang gelombang cahaya UV atau cahaya tampak bergantung pada mudahnya promosi elektron. Molekul- molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya dalam daerah tampak (senyawa berwarna) mempunyai elektron yang lebih mudah dipromosikan dari pada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang lebih pendek (Herliani, 2015).

3.2.3. Analisis Kadar Total *Flavonoid*

Hasil analisis standar *alkaloid* dapat dilihat pada Gambar 6 dan Tabel 7.



Gambar 6. Standar *Flavonoid*

Tabel 7. Standar *Flavonoid*

No	Konsentrasi (ppm)	Absorban
1	0,5	0,1432
2	1	0,2472
3	1,5	0,3122
4	2	0,4327
5	2,5	0,5032
6	3	0,6195
7	5	0,9926

Berdasarkan kurva standar *flavonoid* diatas semakin tinggi konsentrasi standar *flavonoid* maka semakin besar pula absorbansinya. Nilai R yang didapat 0,9961 ini menunjukkan terbentuk garis lurus linear pada rentang konsentrasi yang dibuat karena standar terbentuknya garis lurus linear pada rentang 0,7 sampai 1,0 sehingga dapat disimpulkan bahwa tingkat kesalahannya kecil. Pengukuran kadar total *flavonoid* dilakukan duplo untuk setiap sampelnya karena dibutuhkan pembandingan untuk mengukur absorbansi agar data hasil pengamatan valid. Setelah dilakukan perhitungan absorbansi

dari masing – masing sampel duplo hasilnya hampir sama untuk setiap sampelnya.

Berdasarkan hasil pengamatan analisis kadar total *flavonoid* didapat bahwa kadar total *flavonoid* tertinggi pada sampel 683 sebanyak 1,21%, sampel 165 sebanyak 1,17 % dan sampel 372 sebanyak 1,18 %. Hasil ini sesuai dengan perkiraan karena sumber *flavonoid* berasal dari *green tea matcha* dan *soy powder* dimana sampel

683 memiliki formulasi *soy powder* dengan susu bubuk (50%:50%) serta *green tea matcha* 10 %. Analisis kadar total *flavonoid* diawali dengan membuat grafik standar *flavonoid* dengan berbagai konsentrasi, sehingga dapat diketahui absorbansinya serta panjang gelombang maksimum *flavonoid* 432,5 nm dengan $y = 2,9481x + 14,842$ $R^2 = 0,9961$. Hasil perhitungan kadar total *flavonoid* dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Perhitungan Kadar *flavonoid*

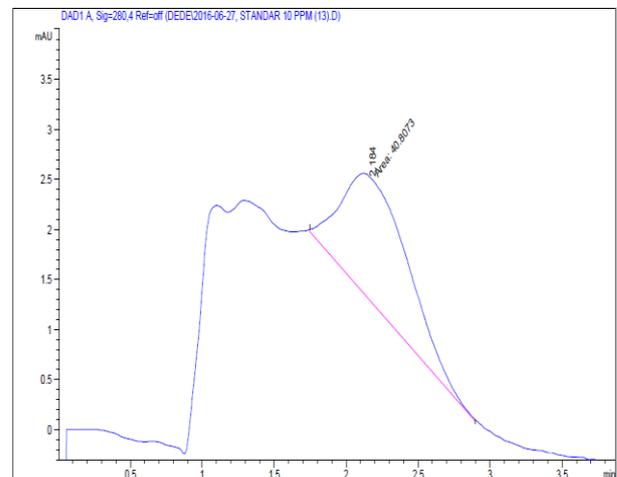
No	Nama sampel	Berat sampel (Gram)	Absorban	Pengenceran	Kadar (ppm)	Kadar (%)
1	683	5,0214	0,2754	50	60,65	1,21
2	683	5,0214	0,2756	50	60,70	1,21
3	165	5,1006	0,2721	50	59,78	1,17
4	165	5,1006	0,2722	50	59,80	1,17
5	372	5,0031	0,2698	50	59,17	1,18
6	373	5,0031	0,2697	50	59,14	1,18

Sumber *flavonoid* terbesar terdapat pada bahan baku *green tea matcha*. Jika dilihat dari formulasi ketiga sampel terpilih tersebut seharusnya yang memiliki kadar *flavonoid* tertinggi pada sampel 683 karena menggunakan *green tea matcha* lebih banyak sebesar 10 % dan setelah dilakukan penelitian dengan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis ternyata terbukti kadar *flavonoid* tertinggi adalah sampel 683 dengan kadar *flavonoid* 1,21 %.

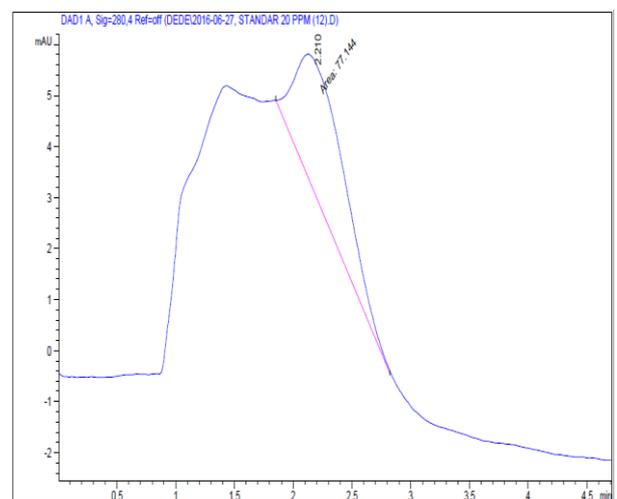
3.2.4. Analisis Kadar Catechin Metode HPLC

Berdasarkan hasil pengamatan analisis kadar *catechin* didapat bahwa kadar *catechin* pada sampel terpilih 165 sebanyak 0,40%, sampel 372 sebanyak 0,65% dan sampel 683 sebanyak 0,81%. Analisis senyawa aktif kadar *catechin* dengan metode HPLC diawali dengan membuat kurva kalibrasi dengan berbagai konsentrasi *catechin* murni yang dibuat sebagai standar atau acuan untuk menentukan *peak* dari senyawa aktif *catechin*. HPLC yang digunakan adalah *LiCrosper* 5 μ m 100 RP-18e *column* (125 x 4 mm), menggunakan *syringe* 50 μ L dan *loop* 20 μ L. Eluen yang digunakan adalah H₂O 60% dan Metanol 40% dengan panjang gelombang maksimumnya 280 nm. Setelah didapat kurva kalibrasi selanjutnya sampel yang telah dipreparasi dapat langsung diukur kadar *catechin* nya menggunakan HPLC.

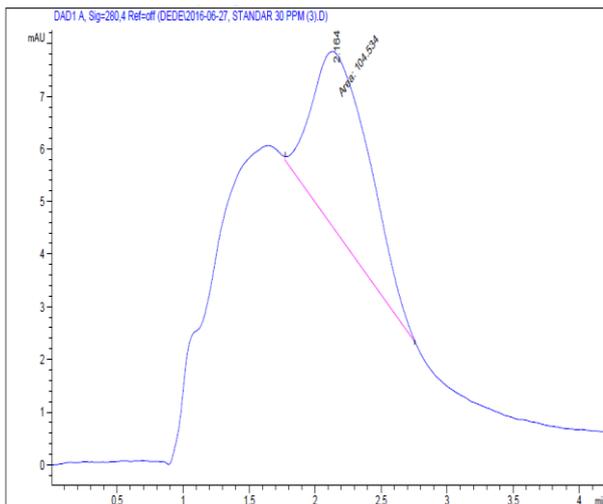
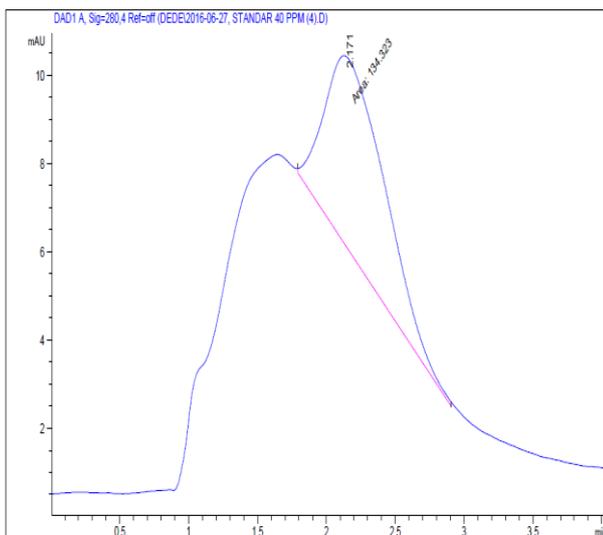
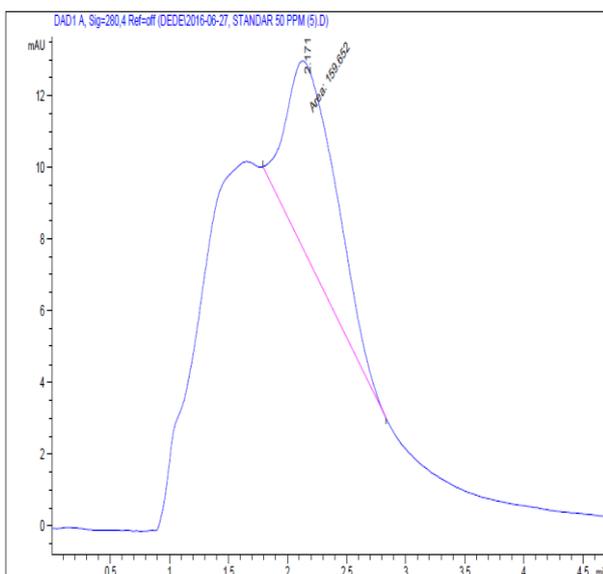
Hasil analisis standar *catechin* konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm dapat dilihat pada Gambar 7, 8, 9, 10, 11 dan Tabel 9.



Gambar 7. Standar *Catechin* konsentrasi 10 ppm

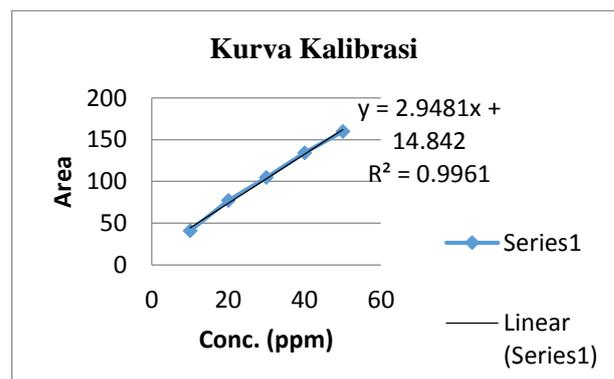


Gambar 8. Standar *Catechin* Konsentrasi 20 ppm

Gambar 9. Standar *Catechin* Konsentrasi 30 ppmGambar 10. Standar *Catechin* Konsentrasi 40 ppmGambar 11. Standar *Catechin* Konsentrasi 50 ppmTabel 9. Standar *Catechin*

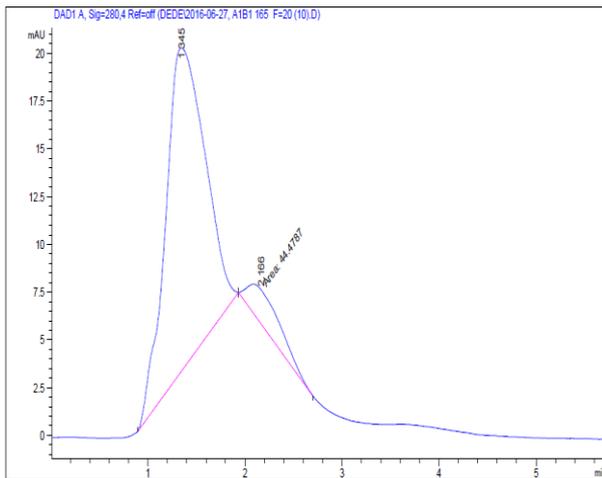
Konsentrasi (ppm)	Area (mAU)
10	40,8073
20	77,144
30	104,534
40	134,323
50	159,625

Hasil pengamatan dari kelima konsentrasi standar *catechin* diantaranya pada konsentrasi 10 ppm *retention time* 2,184 dan *area* 40,8073 mAU, konsentrasi 20 ppm *retention time* 2,210 menit dan *area* 77,144 mAU, konsentrasi 30 ppm *retention time* 2,164 menit dan *area* 104,534 mAU, konsentrasi 40 ppm *retention time* 2,171 menit dan *area* 134,323 mAU, serta konsentrasi 50 ppm *retention time* 2,171 menit dan *area* 159,652 mAU. Dilihat dari hasil *peak* pada masing - masing konsentrasi memiliki perbedaan AUC (*Area Under The Curve*) yang sangat terlihat jelas sesuai dengan kepekatan konsentrasi standar *catechin* sementara untuk hasil *retention time* dari masing – masing konsentrasi relatif sama maka dari itu dapat disimpulkan bahwa standar *peak* dari *catechin* berada pada kisaran *retention time* 2,18 menit. Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 12.

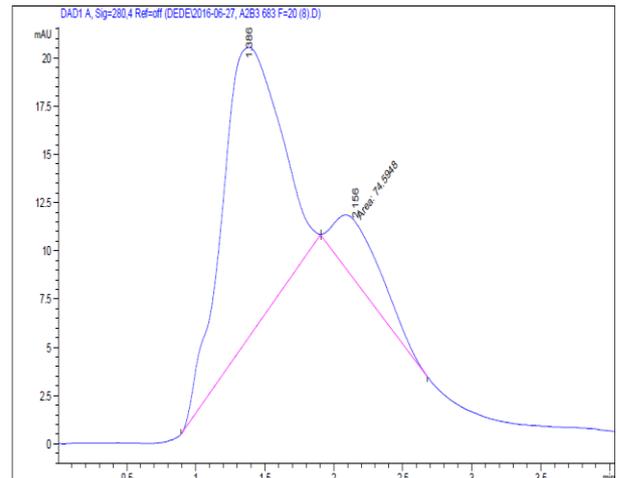


Gambar 12. Kurva Kalibrasi

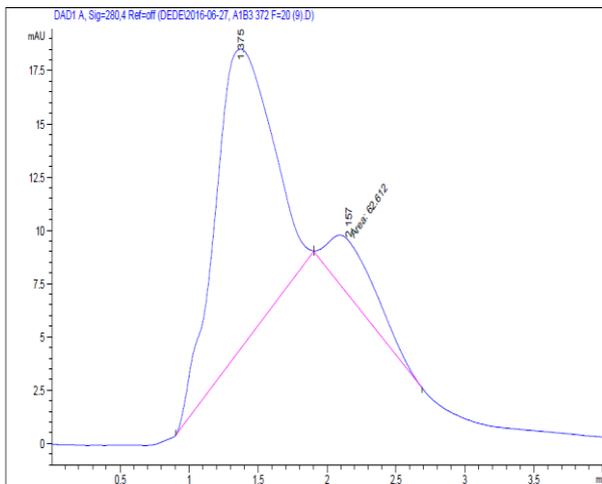
Setelah didapat kurva standar *catechin* pada *retention time* kisaran 2 menit maka dapat dilakukan pengukuran sampel kadar *catechin*, dimana pada sampel 165 *retention time* pada 2,166 menit dan *area* (AUC) pada 44,4787 mAU, sampel 372 *retention time* pada 2,157 menit dan *area* (AUC) pada 62,612 mAU serta sampel 683 *retention time* pada 2,156 menit dan *area* (AUC) pada 74,5948 mAU. *Peak* dari *catechin* dapat dilihat pada gambar 13, 14 dan 15 serta hasil perhitungannya kadar *catechin* pada Tabel 10.



Gambar 13. Peak Catechin Pada Dark Chocolate Sampel 165



Gambar 15. Peak Catechin Pada Dark Chocolate Sampel 683



Gambar 14. Peak Catechin Pada Dark Chocolate Sampel 372

Berdasarkan hasil pengamatan analisis kadar *catechin* dari ketiga sampel terpilih menggunakan metode HPLC didapat bahwa sampel dengan kadar *catechin* tertinggi pada sampel 683 dengan formulasi a2b3 (perbandingan *soy powder* dan *milk powder* 50% : 50%, dengan konsentrasi *green tea* sebanyak 10%), dikarenakan formulasi pada sampel 683 menggunakan 10 % *green tea matcha* maka sangat jelas terlihat dari luas area (mAU) pada sampel 683 adalah 74,5948 mAU dimana area ini merupakan area terluas yang terdeteksi kadar senyawa aktif *catechin*. Adapun hasil perhitungan kadar *catechin* metode HPLC dapat dilihat pada Tabel 19.

Tabel 10. Hasil Perhitungan Kadar *Catechin* metoda HPLC

No.	Sampel	Berat di timbang (gr)	Area (mAU)	Conc. (ppm)	fp	Conc. (ppm)	(%) w/w
1	165	0,5002	44,4787	10,05	20	201,08	0,40%
2	372	0,4992	62,612	16,20	20	324,10	0,65%
3	683	0,5008	74,5948	20,27	20	405,39	0,81%

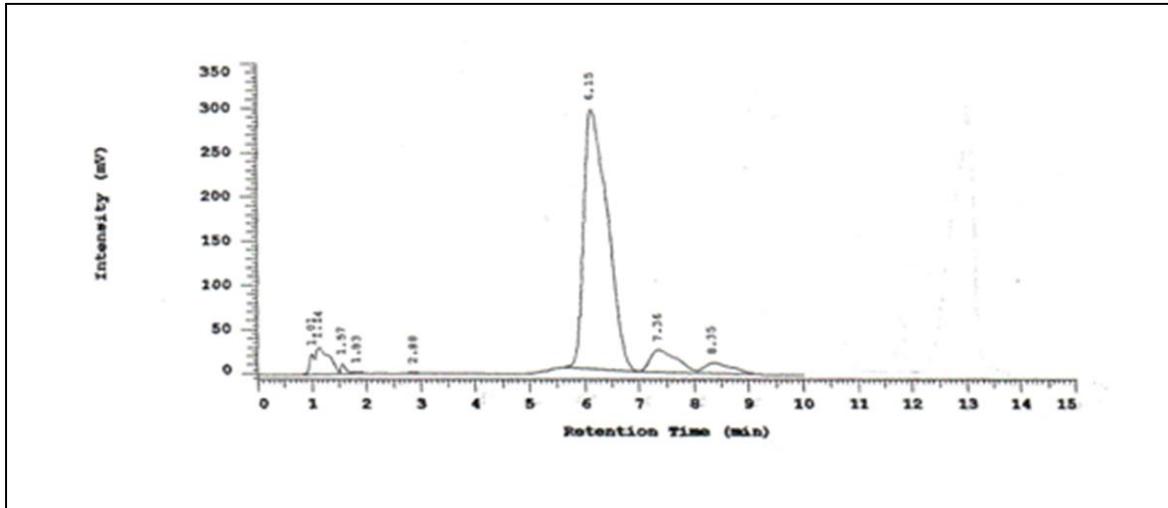
3.2.5. Analisis Kadar *Genistein* Metode HPLC

Berdasarkan hasil pengamatan analisis kadar *genistein* didapat bahwa kadar *genistein* pada sampel 165 sebanyak 0,18 %, sampel 372 sebanyak 0,17 % dan sampel 683 sebanyak 0,20 %. Analisis senyawa aktif kadar *genistein* dengan metode HPLC diawali dengan menentukan kurva standar *genistein* dengan *one point method* yakni hanya menggunakan 1 kurva standar dari konsentrasi 10

ppm standar *genistein* maka didapat hasil *retention time* 6,15 menit dan area (AUC) pada 8703607 mAU. Pengukuran standar dengan metode *one point method* dikarenakan standar senyawa aktif *genistein* yang digunakan memiliki tingkat kemurniannya yang sangat tinggi sehingga untuk menentukan *peak* standar dari *genistein* dapat menghasilkan data yang valid cukup dengan 1 konsentrasi. HPLC yang digunakan adalah *Simadzu*

Lichrospher® (Non Polar), menggunakan *syringe* 50 μ L dan *loop* 20 μ L, eluennya asetonitril 60 %, dapar asetat 10 % dan aquadest 30 % dengan kolom *Supel Cocil LC-18-DB* (250 x 4,1 mm, i.d.54 μ m), *flowrate* 1mL/min, volume injeksi 20 μ L, Detektor sinar UV pada panjang gelombang 263 nm. Untuk lebih jelasnya *peak* dari standar *genistein* dapat

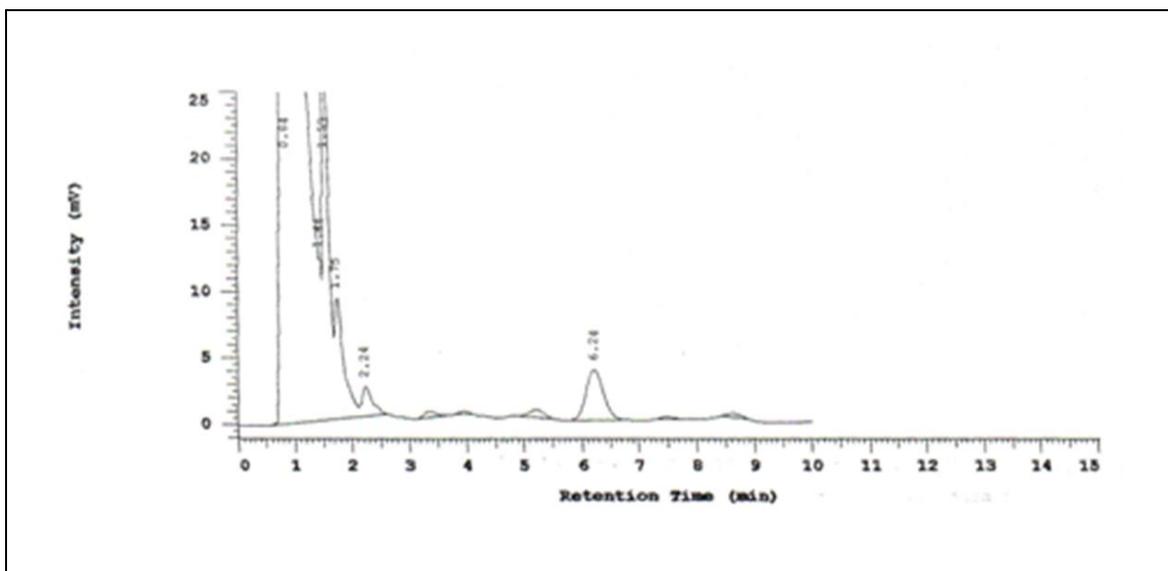
dilihat pada Gambar 16 dan Tabel 11. Selanjutnya dilakukan pengukuran kadar *genistein* dari setiap sampel terpilih dimana *peak* dari *genistein* untuk ketiga sampel tersebut dapat dilihat pada Gambar 17, 18 dan 19 serta untuk hasil perhitungan kadar *genistein* pada sampel *dark chocolate* dapat dilihat pada Tabel 12.



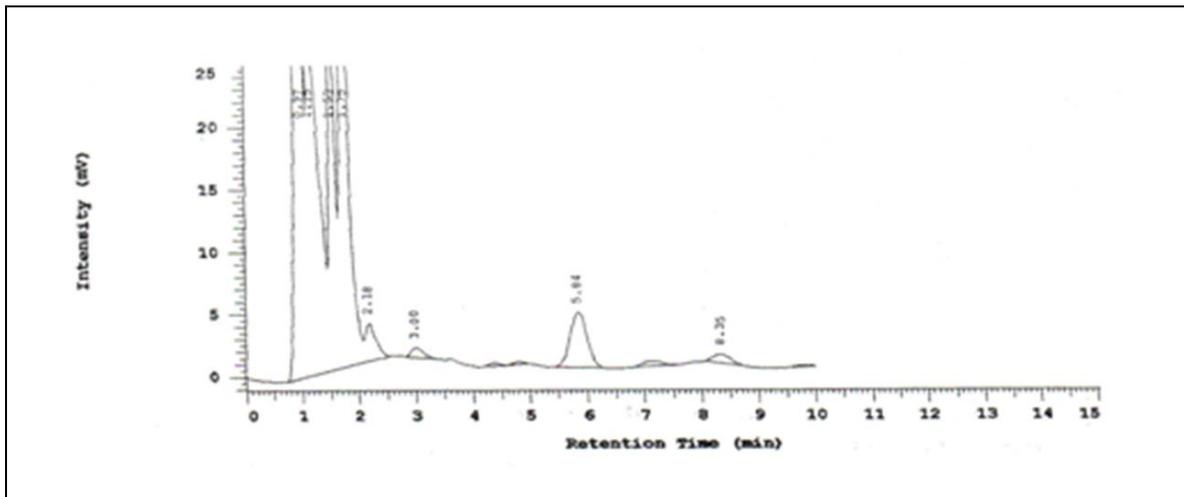
Gambar 16. Standar *Genistein*

Tabel 11. Standar *Genistein*

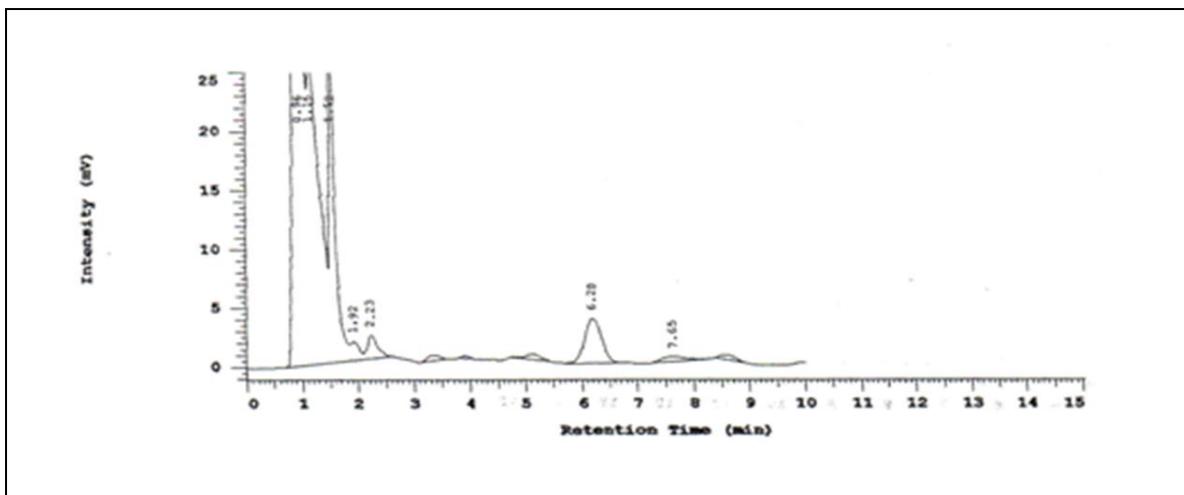
No	Konsentrasi	Nama File	RT (Retating Time)	AUC (Area Under The Curve)
1	10 ppm	0100	6.15	8703607



Gambar 17. *Peak Genistein* Pada *Dark Chocolate* Sampel 165



Gambar 18. Peak Genistein Pada Dark Chocolate Sampel 372



Gambar 19. Peak Genistein Pada Dark Chocolate Sampel 683

Tabel 12. Hasil Perhitungan Kadar Genistein metoda HPLC

No	Sampel	Berat sampel	Nama File	RT	AUC (Mau)	Kadar ppm	Kadar (%)	Kadar setelah pengenceran (%)
1	165	5,0431	0101	6.24	77178	0,0887	0,0018	0,18
2	372	5,0274	0102	5.84	87308	0,1003	0,0020	0,20
3	683	5,0184	0103	6.20	75369	0,0866	0,0017	0,17

Berdasarkan hasil pengamatan analisis kadar *genistein* dari ketiga sampel terpilih dengan metode HPLC maka akan muncul banyak *peak* dari senyawa senyawa yang terkandung dalam produk *dark chocolate*. Untuk membedakan senyawa aktif *genistein* dapat dilihat dari *retention time peak standard* yang telah dilakukan sebelumnya yakni pada waktu sekitar 6,15 menit. Hasil pengukuran pada sampel 165 didapat hasil *retention time* 6,24

menit dan area (AUC) 77178 mAU, pada sampel 372 didapat hasil *retention time* 5,84 menit dan area (AUC) 87308 mAU, pada sampel 683 didapat hasil *retention time* 6,20 menit dan area (AUC) 75369 mAU. Dari hasil pengamatan ketiga sampel diatas menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif *genistein* dalam produk *dark chocolate*. Semakin luas permukaan area *peak* dari *genistein* maka berbanding lurus dengan kadar dari *genistein*.

Hasil perhitungan ini menunjukkan kadar *genistein* terbaik pada sampel 372 dengan konsentrasi 20 %. Jika dilihat dari formulasinya, sampel 372 menggunakan perbandingan *soy powder* dengan *milk powder* (100% : 0%) dan *green tea matcha* 10 %, dimana penggunaan *soy powder* nya sebanyak 100% sehingga dapat dilihat dari hasil analisa bahwa pada sampel 372 merupakan sampel tertinggi kadar *genisten* sebanyak 20 %.

Genistein standar yang dipilih harus memiliki tingkat kemurnian yang tinggi tanpa ada pengotor selain dari senyawa aktif *genistein*. Jika dilihat dari hasil pengamatan standar dari *genistein* ternyata hasilnya tidak 100 % murni senyawa *genistein* karena masih banyak *peak* lain yang muncul pada detektor. Untuk menentukan standar dari *genistein* maka dilihat dari intensitas *peak* yang memiliki luas area (AUC) terluas maka dapat disimpulkan sebagai standar dari senyawa yang akan diuji kadarnya menggunakan metode HPLC (*High Performance liquid Chromatography*). Kesulitan biasanya dihadapi ketika akan dengan suatu kromatogram yang terdiri atas banyak *peak*. Cara yang paling umum untuk mengidentifikasi adalah dengan melihat *retention time* (RT).

Peak (puncak) yang mempunyai *retention time* (RT) sama dengan standar umumnya akan langsung disebut sebagai *peak* milik analat. Senyawa atau zat yang sama akan mempunyai *retention time* (RT) yang sama juga, dengan catatan sampel dan standar dijalankan dengan kondisi dan sistem HPLC yang sama. Sama halnya dengan analisis yang dilakukan pada kadar *genistein*, dimana *peak* yang dipilih akan menjadi dasar perhitungan kadar *genistein* pada setiap sampel yang diuji. Dengan munculnya *peak genistein* dari ketiga sampel maka produk *dark chocolate* yang diuji mengandung *genistein* yang termasuk kedalam senyawa aktif *isoflavan*.

Berdasarkan hasil penelitian tahap 1 dengan uji organoleptik ranking didapat sampel dengan jumlah data asli (DA) terkecil terbaik (superior) atau pada atribut tekstur sampel 165 (perbandingan *soy powder* dan *milk powder* 100% : 0%, konsentrasi *green tea* 6%), pada atribut rasa sampel 683 dengan formulasi a2b3 (perbandingan *soy powder* dan *milk powder* 50% : 50%, konsentrasi *green tea* 10%), pada atribut aroma sampel 372 dengan formulasi a1b3 (perbandingan *soy powder* dan *milk powder* 100% : 0%, konsentrasi *green tea* 10 %) dan pada atribut *after*

taste sampel 372 dengan formulasi a1b3 formulasi (perbandingan *soy powder* dan *milk powder* 100% : 0%, konsentrasi *green tea* 10%). Berdasarkan hasil penelitian tahap 2, yakni identifikasi senyawa aktif untuk kadar *alkaloid* sampel dengan sampel 683 sebanyak 4,73%. Kadar total *flavonoid* tertinggi adalah sampel 683 sebanyak 1,21%. Hasil identifikasi menggunakan HPLC didapat sampel terbaik yakni 683 dengan kadar *catechin* 0,81 % dan hasil identifikasi *genistein* terbaik yakni pada sampel 372 dengan kadar *genistein* 0,20 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Adriani. 2010. Identifikasi Ekstrak Teh Hijau Mengandung Senyawa Aktif dan Antioksidan Yang Baik Bagi Tubuh. Pasca Sarjana Universitas Udayana. Denpasar.
- Erukainure, 2010. *Development and Quality Assessment of Date Chocolate Products*. *American Journal Of Food Technology Vol 5 no 5*.
- Herliani, 2015. Penggunaan Spektrofotometri UV - Visible. <http://www.landasanteori.com/2015/09/pengertian-spektrofotometri-uv-vis.html>. Diakses : 15 Mei 2016
- Misnawi, 2010, Pengaruh Fruktosa dan Tepung Tapioka Terhadap Sifat Fisik dan Organoleptik Cokelat Batangan, PELITA PERKEBUNAN, Vol 27, No 3, Jember.
- Penalvo et all, 2004. *A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products*. *Food Chem.*, 87: 297-305.
- Rira, 2013. Senyawa Aktif. <http://rirac-robertus.blogspot.co.id/2013/10/zat-aktif-serial-alkaloida.html>. Diakses : 1 Maret 2016
- Saleh, 2006. Pengaruh Penambahan Inulin dan Waktu *Conching* terhadap Karakteristik Produk Cokelat. Tugas Akhir. UNPAS. Bandung.
- Spillane, J., 1995, Komoditi Kakao dan Peranan Dalam Perekonomian Indonesia. Kanisius. Yogyakarta.
- Zogina, Nurul., 2015. Pengaruh Substitusi *Soy Powder* dan *Green Tea Matcha* Terhadap Karakteristik *Dark Chocolate*. Tugas Akhir. UNPAS. Bandung.