

INTISARI

Indonesia merupakan penghasil buah kakao terbesar di dunia. Produksi buah kakao yang terus meningkat berbanding lurus dengan limbah kulit kakao yang dihasilkan. Buah kakao memiliki komposisi berupa kulit kakao (76-86%) dan biji kakao maupun pulp (13-24%). Dari komposisi buah kakao tersebut dapat diestimasi terdapat limbah kulit kakao sebesar 556.514 ton pada tahun 2022. Kulit kakao mengandung senyawa bioaktif seperti *phenolic acid*, flavonoid, dan lignin yang berpotensi sebagai senyawa antibakteri. Proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik diperlukan untuk mendapatkan senyawa bioaktif tersebut. Akan tetapi, beberapa pelarut organik memiliki sifat beracun dan tidak biodegradabel. Dalam upaya menghindari permasalahan tersebut, pelarut seperti *Deep Eutectic Solvents* (DES) dapat dipertimbangkan sebagai alternatif karena sifatnya yang ramah lingkungan. DES merupakan campuran eutektik yang umumnya dibentuk oleh pemanasan secara bersama-sama antara senyawa *Hydrogen Bond Donor* (HBD) dan *Hydrogen Bond Acceptor* (HBA) dengan titik leleh akhir yang jauh lebih rendah dari masing-masing komponen. DES dengan menggunakan kolin klorida ($C_5H_{14}ClNO$) sebagai HBA dan asam laktat ($C_3H_6O_3$) sebagai HBD dapat mengekstraksi senyawa bioaktif dari bahan alam. Tujuan dari penelitian ini mengkaji transfer massa dan optimasi dengan *Response Surface Methodology* (RSM) desain *box-behnken* pada ekstraksi senyawa bioaktif kulit kakao. Penelitian ini dapat memprediksi pengaruh parameter dari suhu (60-100°C), rasio padatan:pelarut (1:10-1:100), dan konsentrasi DES (50-100 %) terhadap respons analisa *Total Phenolic Content* (TPC) dan *Total Flavonoid Content* (TFC), dimana analisa tersebut menggambarkan jumlah senyawa bioaktif pada ekstrak kulit kakao. Karakterisasi ekstrak kulit kakao dilakukan dengan analisa gugus fungsi (FT-IR dan *Raman Spectroscopy*) dan identifikasi senyawa bioaktif (LC-HRMS). Potensi sifat antibakteri ekstrak dianalisa dengan penambatan molekuler dan uji antibakteri metode *well diffusion*. Hasil penelitian menunjukkan variabel suhu, rasio padatan:pelarut, dan konsentrasi DES memengaruhi konstanta transfer massa (k_a) dan konstanta kesetimbangan (H_s) pada ekstraksi senyawa bioaktif berdasarkan nilai TPC ekstrak kulit kakao. Rentang konstanta transfer massa dan kesetimbangan yang didapatkan yaitu $15,09 \times 10^{-3}$ - $43,64 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dan $0,46 \times 10^{-3}$ - $2,69 \times 10^{-3} \text{ g padatan/cm}^3$. Kondisi operasi optimal untuk ekstraksi senyawa bioaktif kulit kakao berdasarkan analisa RSM berada pada suhu 100°C, rasio padatan:pelarut 1:37,44, dan konsentrasi DES 70.95%. Hasil kondisi operasi tersebut menghasilkan ekstrak dengan konsentrasi TPC dan TFC yaitu $1571,02 \pm 101,59 \text{ mg GAE/g sampel}$ dan $331,04 \pm 71,77 \text{ mg RE/ g sampel}$. Karakterisasi ekstrak kulit kakao menggunakan FT-IR dan *Raman Spectroscopy* menunjukkan keberadaan senyawa bioaktif berdasarkan *peak* gugus hidroksil (-OH) dan karbonil (C=O), sedangkan analisa LC-HRMS mengkonfirmasi keberadaan senyawa flavonoid berupa *cianidanol*, *fisetin*, *quercetin*, dan *taxifolin* yang memiliki potensi menghambat aktivitas DNA *gyrase* bakteri *E. coli* berdasarkan analisa penambatan molekuler. Aktivitas antibakteri dengan metode *well diffusion* menunjukkan ekstrak senyawa bioaktif kulit kakao dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus*, dan *S. sanguinis*.

Kata Kunci: Kulit Kakao; Senyawa bioaktif ; *Deep Eutectic Solvent*; *Response Surface Methodology*; Antibakteri

ABSTRACT

*Indonesia is the world's largest producer of cacao fruits. The increasing production of cacao fruit is directly proportional to the cacao shell waste produced. Cacao fruit has a composition of cacao shell (76-86%) and cacao beans or pulp (13-24%). From the composition of the cacao fruit, it can be estimated that there will be a cacao shell waste of 556,514 tons in 2022. Cacao shells contain bioactive compounds such as phenolic acid, flavonoids, and lignin, which can be antibacterials. Extraction using organic solvents is necessary to obtain these bioactive compounds. However, some organic solvents are toxic and non-biodegradable. To avoid this, solvents such as Deep Eutectic Solvents (DES) can be an alternative due to their being environmentally friendly. DES is an eutectic mixture generally formed by heating Hydrogen Bond Donor (HBD) and Hydrogen Bond Acceptor (HBA) compounds with a much lower final melting point for each component. DES with choline chloride ($C_5H_{14}ClNO$) as HBA and lactic acid ($C_3H_6O_3$) as HBD can extract bioactive compounds from natural raw materials. The purpose of this study is to examine mass transfer and optimization with Response Surface Methodology (RSM) box-behnken design in the extraction of cacao shell bioactive compounds. This study can predict the effect of temperature (60-100°C), solids: solvent ratio (1:10-1:100), and DES concentration (50-100 %) on the response of Total Phenolic Content (TPC) and Total Flavonoid Content (TFC) analysis, which describes the amount of bioactive compounds in cacao shell extract. The optimum results of cacao shell extract were characterized by analyzing the functional groups (FT-IR and Raman Spectroscopy) and identifying bioactive compounds (LC-HRMS). The antibacterial potential of the extract will be analyzed using molecular docking and a well diffusion method antibacterial test. The results showed that the variables of temperature, solids:solvent ratio, and DES concentration affect the mass transfer constant (k_a) and equilibrium constant (H_s) in the extraction of bioactive compounds based on the TPC concentration of cacao shell extract. The range of mass transfer and equilibrium constants obtained were 15.09×10^{-3} - $43.64 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and 0.46×10^{-3} - $2.69 \times 10^{-3} \text{ g solid/cm}^3$, respectively. The optimal operating conditions for extracting cacao shell bioactive compounds based on TPC and TFC were at 100°C, solids:solvent ratio of 1:37.44, and DES concentration of 70.95%. The results of these operating conditions produce extracts with TPC and TFC concentrations, $1571.02 \pm 101.59 \text{ mg GAE/g sample}$ and $331.04 \pm 71.77 \text{ mg RE/ g sample}$, respectively. Characterization of cacao shell extract using FT-IR and Raman Spectroscopy showed the presence of bioactive compounds based on peaks of hydroxyl (-OH) and carbonyl (C=O) groups, while LC-HRMS analysis confirmed the presence of flavonoid compounds such as cianidanol, fisetin, quercetin, and taxifolin, which have the potential to inhibit the DNA gyrase activity of *E. coli* bacteria based on molecular docking analysis. Antibacterial activity using the well diffusion method showed that the extracts of cacao shell bioactive compounds can inhibit the growth of *E. coli*, *S. aureus*, and *S. sanguinis* bacteria.*

Keywords: Cacao Shell; Bioactive Compounds; Deep Eutectic Solvent; Response Surface Methodology; Antibacterial