

**PEMPROFILAN METABOLIT DAN AKTIVITAS
ANTIDIABETES EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma
cacao*) MENGGUNAKAN LC-MS/MS
(Tesis)**

M. Hanif Amrulloh



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

ABSTRACT

PROFILE OF METABOLITE AND ANTI-DIABETIC ACTIVITY OF COCOA (*Theobroma cacao*) EXTRACT USING LC-MS/MS

By

M. Hanif Amrulloh

Cocoa pod shell (*Theobroma cacao L.*) or commonly called Cocoa Pod Husk (CPH) is the main by-product of the cocoa industry. The antidiabetic properties of CPH have been extensively studied, but studies on the identification of the active compound responsible are scarce. Information about the active compounds is very important for the quality of herbal medicinal use. The purpose of this study was to identify inhibitors of α -amylase metabolites in CPH at various solubilities through the LC-MS/MS correlation and antidiabetic activity using a metabolomics approach. In the α -amylase test on *n*-hexane, ethyl acetate, ethanol, and acetone extracts. It was found that ethanol extract ($296.47 \pm 26.98 \mu\text{g/mL}$) and acetone ($362.90 \pm 45.20 \mu\text{g/mL}$) had the most active antidiabetic bioactivity. From the results of the LC-MS/MS analysis, 225 known compounds and 94 unknown compounds were obtained. In grouping variations of cocoa extract with PCA with 110 ionic mass variables, it was found that grouping with the main component (PC) was 75%. The results of the PLS analysis showed the presence of choline compounds, *n*-methylethanolamine phosphate, Phaseollidin hydrate, 2-Amino-1,3,4-octadecanetriol, Matairesinol, Altenuene, and Amorphigenin which are thought to contribute actively to anti-diabetic bioactivity with the most contributing compound being altenuene. The altenuene compound was strengthened by the results of the OPLSDA which found that altenuene is a characteristic compound in the active extract of cocoa pod shell with a VIP value of 1.497. It can be concluded that the ethanol extract of cocoa shell has potential as an antidiabetic drug and altenuene compounds are thought to have the most active role in the antidiabetic bioactivity of cocoa shell.

Keywords: *Theobroma cacao*, metabolomic, antidiabetic, LC-MS/MS, PLS, PCA, OPLSDA

ABSTRAK

PEMPROFILAN METABOLIT DAN AKTIVITAS ANTIDIABETES EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao*) MENGUNAKAN LC-MS/MS

Oleh

M. Hanif Amrulloh

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) atau biasa disebut *Cocoa Pod Husk* (CPH) merupakan hasil samping utama dari industri kakao. Sifat antidiabetes CPH telah diteliti secara ekstensif, tetapi studi tentang identifikasi senyawa aktif yang bertanggung jawab masih langka. Informasi tentang senyawa aktif sangat penting untuk kualitas penggunaan obat herbal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi metabolit penghambat α -amilase pada CPH dengan variasi pelarut melalui korelasi LC-MS/MS dan aktivitas antidiabetes menggunakan pendekatan metabolomik. Pada uji penghambatan terhadap ekstrak *n*-heksana, etil asetat, etanol, dan aseton terhadap enzim α -amilase. Didapatkan hasil ekstrak etanol (296.47 ± 26.98 $\mu\text{g/mL}$) dan aseton (362.90 ± 45.20 $\mu\text{g/mL}$) mempunyai bioaktivitas antidiabetes yang paling aktif. Dari hasil analisis LC-MS/MS didapatkan 225 senyawa *known* dan 94 senyawa *unknown*. Pada pengelompokan variasi ekstrak kakao dengan PCA dengan 110 variabel massa ion didapatkan pengelompokan dengan komponen utama (PC) 75%. Hasil analisis PLS menunjukkan adanya senyawa *choline*, *n-methylethanolamine phosphate*, *Phaseollidin hydrate*, *2-Amino-1,3,4-octadecanetriol*, *Matairesinol*, *Altenuene*, dan *Amorphigenin* yang diduga berkontribusi aktif pada bioaktivitas antidiabetes dengan senyawa yang paling berkontribusi yaitu *altenuene*. Senyawa *altenuene* diperkuat dengan hasil OPLSDA yang didapat bahwa *altenuene* sebagai senyawa pencari pada ekstrak aktif kulit buah kakao dengan nilai VIP 1.497. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol pada kulit kakao mempunyai potensi sebagai obat antidiabetes dan senyawa *altenuene* diduga mempunyai peran paling aktif pada bioaktivitas antidiabetes kulit kakao.

Kata kunci :*Theobroma cacao*, metabolomic, antidiabetes, LC-MS/MS, PLS, PCA, OPLSDA

**PEMPROFILAN METABOLIT DAN AKTIVITAS
ANTIDIABETES EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma
cacao*) MENGGUNAKAN LC-MS/MS**

Oleh

MUHAMMAD HANIF AMRULLOH

TESIS

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER KIMIA**

Pada

**Program Studi Magister Kimia
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul : **Pemprofilan Metabolit dan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao*) Menggunakan LC-MS/MS**


Nama Mahasiswa : **Muhammad Hanif Amrullah**


Nomor Pokok Mahasiswa : **2027011003**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**




Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.
NIP. 197311191998022001


Dr. Mohammad Rafi, M.Si.
NIP. 197703162006041010

2. Ketua Program Studi Magister Kimia


Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP. 197412111998022001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.

Sekretaris : Dr. Mohammad Rafi, M.Si.

Penguji Bukan Pembimbing

Anggota : Prof. Dr. Ir. Yandri, AS., M.S.

Anggota : Dr. Yuli Ambarwati, M.Si.

Anggota : Dr. Ilim, M.S.

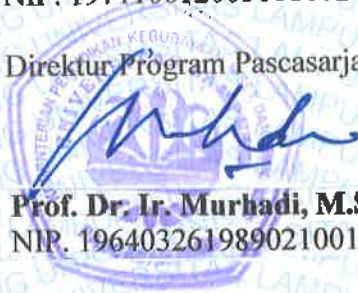
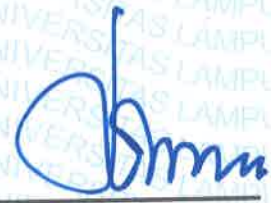
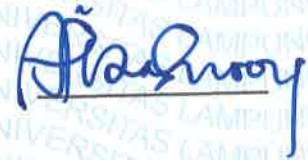
2. a.n. PLT Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 196403261989021001

Tanggal Lulus Ujian Tesis : 11 April 2023



PERYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul “Pemprofilan Metabolit dan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao*) Menggunakan LC-MS/MS” adalah karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai tata etika ilmunan yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarism.
2. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan saksi yang diberikan dan sanksi yang diberikan kepada saya; saya bersedia dan sanggup dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 2 april 2023

Pembuat pernyataan,



Muhammad Hanif Amrulloh

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Muhammad Hanif Amrulloh, dilahirkan di Bangunrejo pada tanggal 6 Januari 1997, sebagai anak pertama dari 4 bersaudara pasangan Bapak Mukiman dan Ibu Darning Tuti. Penulis mengawali Pendidikan formal pertama kali di TK Ma'arif Bangunrejo yang diselesaikan pada tahun 2002. Penulis melanjutkan pendidikan di SDN 2 Bangunrejo yang selesai pada tahun 2009, pendidikan SMP di MTs Al-Muhsin Metro yang diselesaikan pada tahun 2012 dan dilanjutkan dengan 3 tahun pendidikan SMA di MA Al-Muhsin Metro yang selesai pada tahun 2015. Penulis melanjutkan pendidikan sarja di Universitas Lampung dengan mengambil jurusan kimia dan diselesaikan pada tahun 2020. Penulis diterima sebagai mahasiswa magister di jurusan kimia fakultas MIPA Universitas Lampung.

MOTO

Kecantikan yang abadi terletak pada keelokan adat dan ketinggian

ilmu

(Buya Hamka)

SANWACANA

Alhamdulillah bi ni'matihi tatimush-shalihat. Segala puji hanya milik Allah Rabb semesta alam, dzat yang Maha Sempurna dan tidak ada sesembahan yang berhak disembah dengan benar kecuali Allah Azza wa Jalla. La hawla wala quwwata illa billah, atas berkat pertolongan dan idzin Allah yang Maha Agung, penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Shalawat serta salam penulis juga hanturkan kepada Rasulullah Muhammad Shalallahu alaihi wa sallam, beserta keluarganya, sahabatnya, para tabi'in, tabi'ut tabi'in dan para pengikut yang senantiasa istiqomah di jalan sunnahnya hingga akhir zaman. Tesis dengan judul "Pemprofilan Metabolit dan Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao) Menggunakan LC-MS/MS" ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Master Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada:

1. Insan yang paling berharga dalam hidupku dan yang kucintai karena Allah; Ayahanda Rohmanu dan Ibunda Darning Tuti Semoga Allah memberi keberkahan umur, kebahagiaan dunia akhirat dan mempersatukan kita kembali di Jannah-Nya kelak.

2. Adiku Aisyah Az-Zahra, Naura Ahmaturahmah yang shalihah dan M. Faiz An-Nufail (alm) terimakasih atas segala bentuk motivasinya kepadaku. Semoga kelak kita akan menjadi anak yang bermanfaat.
3. Ibu Dr. Noviany, M. Si selaku Pembimbing 1 yang begitu sabar dalam membimbing, mendidik, mengarahkan, dan memotivasi serta memberikan banyak pelajaran baru yang begitu berharga kepada penulis sejak awal penelitian hingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah membalas segala bentuk kebaikan beliau dengan kebaikan di dunia maupun di akhirat, serta diberikan kesehatan dan kebahagiaan selalu.
4. Bapak Dr. Mohamad Rafi, M.Si. selaku Pembimbing II yang begitu baik dalam mengajarkan hal baru dalam penelitian ini dan sabar dalam membimbing penyelesaian skripsi ini, serta terimakasih atas segala bentuk motivasi berharga yang diberikan kepada penulis. Semoga Allah membalas segala bentuk kebaikan beliau dengan kebaikan di dunia maupun di akhirat, serta senantiasa diberikan kesehatan dan kebahagiaan selalu.
5. Kepada bapak dan ibu Pembahas saya; Prof. Dr. Ir. Yandri AS., M.S., Dr. Yuli Ambarwati, M.Si. dan Ibu Dr. Ilim, M.S. yang telah memberi ilmu yang banyak terhadap saya.
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria , M.Si. selalu Dekan FMIPA Universitas Lampung.
7. Bapak dan Ibu Dosen Kimia FMIPA, terimakasih penulis ucapkan atas ilmuilmu yang telah diberikan dan pelajaran hidup beserta keteladanan yang

telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung

8. Para Staff dan Laboran yang ada di Jurusan Kimia, terimakasih penulis ucapkan atas segala bentuk bantuan yang telah diberikan.
9. Kepada kekasihku Yunita S.Si. yang selalu mensupport selama ini.
10. Rekan-rekan Noviany Research Group (NRG); Kak Arif, Wulan, Devi, jihan, ofri, dan rista. Terimakasih atas segala bentuk kebaikan dan dukungannya. Tetap semangat, karena kita adalah pemenang atas waktu kita masing-masing.
11. Keluarga penghuni Laboratorium Kimia Organik yang tidak bisa kusebutkan satu-satu terimakasih telah mengisi hari-hariku selama penelitian di Laboratorium Kimia Organik tercinta.
12. Keluargaku kimia 2016. Terimakasih atas segala kenangan indah yang telah kita lakukan bersama-sama. Semoga kita menjadi orang-orang sukses di kemudian hari.
13. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Mohon maaf jika penulis tidak bisa sebutkan satu-satu. Semoga Allah membalas semua kebaikan mereka, Amiin.
14. Last but not least, I want to thank me, I wanna thank me for believing in me, I want to thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for, for never quitting

Dalam penulisan tesis ini, tentu penulis menyadari banyak sekali kekurangan, sehingga kritik dan saran sangat diharapkan penulis untuk perbaikan dalam penelitian

selanjutnya. Penulis juga berharap semoga tesis ini dapat memberi manfaat, serta dapat menjadi acuan bagi peneliti selanjutnya yang berfokus pada bidang yang sama.

Aamin

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR.....	iii
DAFTAR TABEL	iii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian	2
1.3. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Kakao	4
2.2. Kandungan Metabolit Sekunder Kakao	5
2.3. Efek Farmakologi Tanaman kakao	7
2.4. Diabetes.....	7
2.5. Enzim α -Amilase	9
2.6. Uji α -Amilase	9
2.7. Metabolomik.....	10
2.8. <i>Principal Component Analysis</i>	11
2.9. <i>Partial Least Square</i>	12
2.10. <i>Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA)</i>	13
2.11. Ekstraksi	14
2.12. Spektrofotometer UV-Vis	15
2.13. Spektrofotometri LC-MS/MS.....	15
III. METODE PENELITIAN.....	17
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2. Alat dan Bahan	17
3.2.1. Alat alat yang digunakan.....	17
3.2.2. Bahan yang digunakan	17
3.3. Prosedur Penelitian	18
3.3.1. Persiapan sampel	18
3.3.2. Ekstraksi sampel	18
3.3.3. Uji Penghambatan α -Amilase.....	18
3.3.4. Analisis LC-MS/MS	19
3.3.5. Analisis multivariat.....	20

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1. Ekstrak Kulit Kakao.....	22
4.2. Pengujian Antidiabetes.....	23
4.3. Analisis LC-MS/MS	25
4.4. Analisis Multivariat <i>Principal Component Analysis</i>	27
4.5. Analisis Multivariat <i>Partial Least Square</i>	29
4.6. Analisis <i>Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis</i>	33
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
5.1. Kesimpulan.....	37
5.2. Saran	37
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	45
Lampiran 1. Bagan Alir Penelitian	46
Lampiran 2. Hasil Determinasi kakao	47
Lampiran 3. Tabel absorbansi ekstrak CA, CH, CE, CET, CA, dan akarbosa.....	48
Lampiran 4. Perhitungan persen inhibisi	52
Lampiran 5. Tabel Persen Inhibisi ekstrak kulit buah kakao	52
Lampiran 6. Perhitungan Nilai IC ₅₀ dan Grafik.....	54
Lampiran 7. Tabel IC ₅₀ ekstrak CA, CH, CE, CET, CA, dan akarbosa	56
Lampiran 8. Tabel senyawa hasil analisis metabolomik.....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagian buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>).....	4
2. Struktur <i>procyaidin</i> (1) <i>procyanidin B2</i> (2), <i>epicatechin</i> (3), <i>3'-O-methyl epicatechin</i> (4), and <i>eatechin</i> (5)	6
3. Struktur senyawa-senyawa hasil isolasi dari kulit buah kakao sikloartana (24-hidroksi-9,19- cycloanost-25-en-3-one) (6) dan steroid (7) (stigmast-5-en-3 β -ol)	7
4. Pola proses PCA	12
5. Teknik kompresi data dengan PLS	13
6. Demonstrasi perbedaan utama antara PLS-DA dan OPLS-DA.	14
7. Ekstrak kulit kakao	22
8. Bagan Persen inhibisi dari ekstrak aseton (CA), <i>N</i> -heksan (CH), etil asetat (CEA), dan etanol (CET) dan akarbosa	24
9. Kromatogram LC-MS/MS ekstrak heksan, etil asetat, etanol, dan aseton.....	27
10. Hasil preprocessing data menggunakan <i>corellation optimized warping</i>	27
11. Hasil pengelompokkan ekstrak berdasarkan pelarut dengan metode PCA.....	28
12. Plot skor <i>regression coefficients Theobroma cacao</i>	29
13. Struktur senyawa <i>choline</i> (A), <i>n-methylethanolamine phosphate</i> (B), <i>Phaseollidin hydrate</i> (C), <i>2-Amino-1,3,4-octadecanetriol</i> (D), <i>Matairesinol I</i> , <i>Altenuene</i> (F), <i>Amorphigenin</i> (G)	31
14. Pengelompokkan ekstrak aktif dan non aktif aktifitas antidiabetes serta nilai permutasi dengan metode OPLS-DA.....	32
15. Grafik S-plot dari metode OPLS-DA.....	33

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil ekstraksi kulit kakao.....	22
2. Nilai IC ₅₀ ekstrak kulit kakao.....	23
3. Dugaan senyawa aktif antidiabetes hasil analisis PLS.....	29
4. Senyawa biomarker potensial dari grafik S-plot.....	33
5. Senyawa biomarker potensial dari grafik S-plot menggunakan <i>base peak Intensity</i>	33

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu penyakit yang disebabkan terjadinya gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein karena kurangnya sekresi insulin. DM menjadi penyakit terbesar di Indonesia, hal ini dibuktikan dengan adanya data dari *International Diabetes Federation* (IDF, 2021) yang menyatakan Indonesia menempati peringkat ke-5 di dunia pada jumlah penderita diabetesnya. Penderita diabetes bisa meningkat karena diperburuk dengan adanya pandemi COVID 19. Resiko kematian pada penderita COVID 19 yang memiliki penyakit diabetes dua kali lebih besar dari pada pasien COVID 19 non diabetes (Harbuwono *et al.* 2022). Kecenderungan peningkatan kasus dan tingkat kematian akibat DM perlu mendapatkan perhatian khusus dengan adanya penemuan obat yang efektif.

Selama ini antihiperqlikemik oral yang digunakan untuk pengobatan diabetes dapat menyebabkan banyak efek samping. Kombinasi berbagai fitokimia tanaman herbal dengan obat sintesis dapat digunakan untuk mengatasi efek samping pada pengobatan sintesis. Terapi obat herbal dan *nutraceuticals* dan penggunaan probiotik dan prebiotik merupakan terapi yang lebih holistik (Mohammed *et al.* 2013). Beberapa obat bioaktif baru yang diisolasi dari tanaman menunjukkan aktivitas antidiabetes yang lebih efektif dan minim efek samping daripada agen hipoglikemik oral yang digunakan dalam terapi klinis (Tran *et al.* 2020). Salah satu tanaman yang mempunyai bioaktivitas antidiabetes yaitu kakao khususnya pada bagian kulit buah.

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) atau biasa disebut *Cocoa Pod Husk* (CPH) merupakan hasil samping utama dari industri kakao yang mempunyai kadar 67–76%

dari bobot buah kakao dan saat ini hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak (Vega *et al.*, 2018). Analisis fitokimia metabolit sekunder yang terkandung dalam kulit buah kakao pada ekstrak metanol, etil asetat, dan *n*-heksana telah diidentifikasi sebagai senyawa-senyawa yang termasuk dalam golongan alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, saponin dan fenolat (Ginting *et al.*, 2019). Kulit buah kakao diketahui mempunyai bioaktivitas antibakteri, antioksidan, dan antidiabetes (Indrianingsih *et al.*, 2021). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dengan menguji berbagai bioaktivitas kulit kakao, maka perlu dilakukan penelitian interaksi metabolit yang terkandung pada kulit kakao dengan bioaktivitas antidiabetes. Pada penelitian ini digunakan teknik analisis yang dapat mengevaluasi serta mengidentifikasi keragaman profil metabolit dan perbedaan bioaktivitas dari kulit kakao untuk mendapatkan aktivitas biologis konsisten yang berkontribusi pada keaktifannya.

Pada penelitian ini, pendekatan metabolomik digunakan karena dapat menganalisis metabolit primer maupun sekunder dengan data kuantitatif dari sampel dan memprediksi data guna mengetahui senyawa yang memiliki bioaktivitas dengan menggunakan berbagai metode analisis kemometrik (Warsito, 2018). Metode kemometrik merupakan metode yang efektif dan menghemat waktu dalam menganalisis dan mengidentifikasi metabolit yang memiliki bioaktivitas tertentu (Demarque *et al.*, 2020). Metode kemometrik telah digunakan pada daun yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp)) dan berhasil diidentifikasi 2 senyawa yang mempunyai bioaktivitas antidiabetes (Aziz *et al.*, 2021). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan analisis lebih lanjut pada kulit kakao menggunakan pendekatan metabolomik guna mengetahui senyawa yang berpotensi sebagai antidiabetes.

1.2. Tujuan Penelitian

1. Menentukan nilai aktivitas antidiabetes ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) dengan variasi pelarut.

2. Menentukan senyawa aktif yang berkontribusi dalam aktivitas antidiabetes ekstrak CPH yang dihasilkan melalui korelasi LC-MS/MS dan aktivitas antidiabetes menggunakan pendekatan metabolomik.

1.3. Manfaat Penelitian

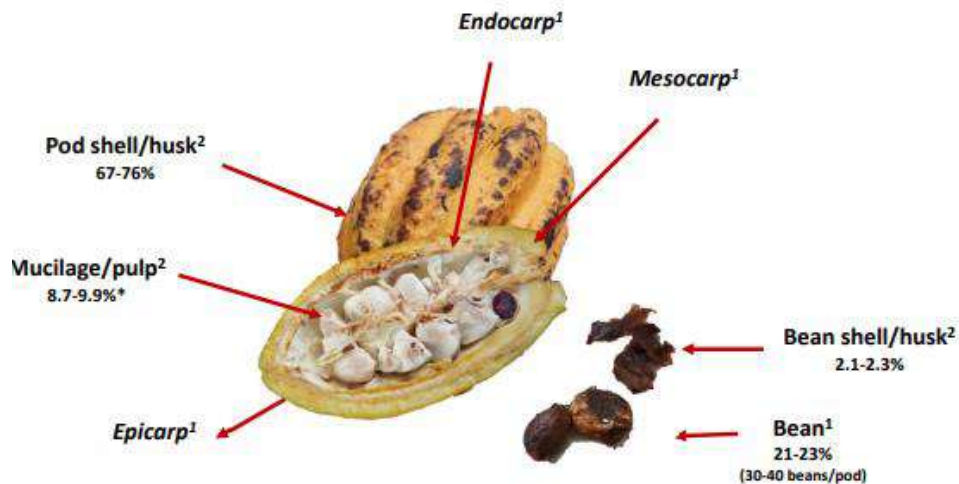
Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi tentang senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antidiabetes dalam kulit buah kakao.
2. Memberikan penjelasan kandungan metabolit dalam kulit buah kakao berdasarkan variasi pelarut dan aktivitas antidiabetes sehingga dapat digunakan dalam kontrol kualitas bahan baku obat herbal.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kakao

Theobroma cacao L. adalah spesies buah pohon diploid endemik di hutan hujan Amerika Selatan. Kakao ditemukan sekitar 3.000 tahun yang lalu di Amerika Tengah (Argout *et al.*, 2011). Tanaman kakao dapat mencapai tinggi 5-8 m dan diameter batang 4-6 m dengan daun lonjong, meruncing, dan rusuk tengah yang menonjol bijinya besar, dengan bagian dalam berwarna putih atau ungu pucat. Tanaman ini memiliki buah yang mempunyai variasi bentuk dari ellipsoid sampai ovoid serta memiliki warna hijau dan kuning saat matang dan berkembang di iklim panas dan lembab. Periode antara penyerbukan dan buah pematangan bervariasi dari 140 hingga 205 hari (De souza *et al.* 2018). Bagian-bagian yang terdapat pada buah kakao dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Bagian buah kakao (*Theobroma cacao* L.) (Vega *et al.*, 2018)

Kulit buah kakao masih menjadi hasil samping utama dari industri kakao dengan berat 67–76% dari berat buah kakao perbandingannya adalah 10 ton *cacao pod husk* (CPH) basah dihasilkan 1 ton biji kakao kering. Limbah ini pun biasanya hanya

dimanfaatkan untuk campuran pakan ternak (Vega *et al.*, 2018). Kulit kakao biasanya dibiarkan membusuk di perkebunan kakao, dan dapat menyebabkan masalah lingkungan. Kulit kakao sering kali menimbulkan bau busuk, kulit buah kakao yang membusuk juga dapat menyebarkan penyakit seperti bintik hitam pada buah kakao (Vriesmann *et al.* 2011).

Adapun klasifikasi dari tanaman kakao adalah :

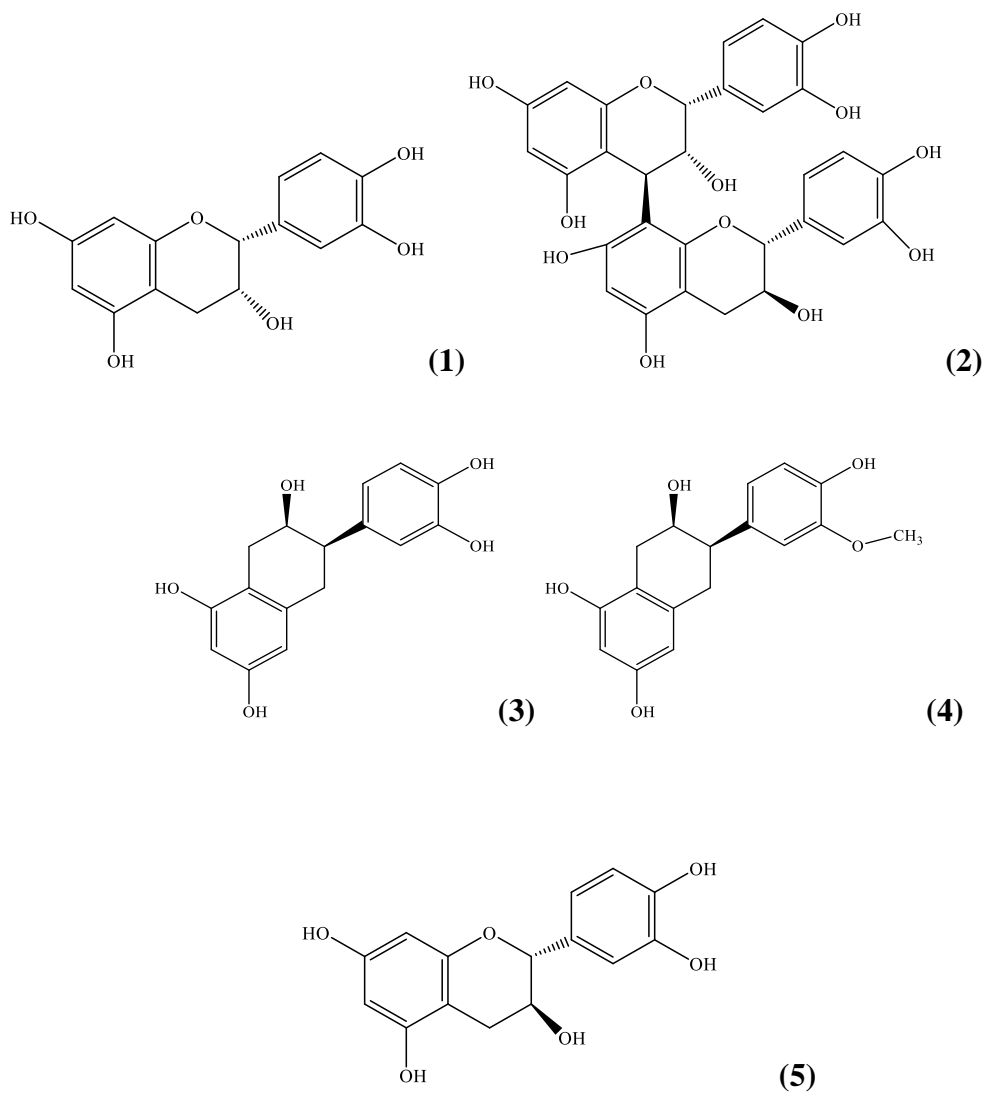
Kingdom : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Sub Divisi : Angiospermae
 Kelas : Dikotyledonae
 Ordo : Malvales
 Famili : Sterculiaceae
 Genus : Theobroma
 Spesies : *Theobroma cacao* L.

(Steenis, 2008).

Produk sampingan utama pada kakao adalah kulit kayu, pulp dan madu kakao. Kulit kakao mengandung mineral seperti K, Ca, P, dan Mg. Pulp mempunyai pH 3,32, keasaman 1,84%, padatan terlarut 14,81% Brix, dan sukrosa 7,42%. “Madu kakao” terdiri dari air, gula yang dapat difermentasi (10%-18%), asam non volatil (0,77% - 1,52%), pektin (0,9%-2,5%), dan serat (0%-7%). Bijinya memiliki kadar glukosa yang tinggi (41,51 mg g⁻¹), senyawa fenolik (148,5 mg 100 gr⁻¹) dan keasaman rendah. Biji kakao setelah fermentasi, menghasilkan tingkat lipid yang tinggi (31%), protein (8,4%), polifenol (5,2%), dan karbohidrat (13,7%) (Kayaputri *et al.*, 2014).

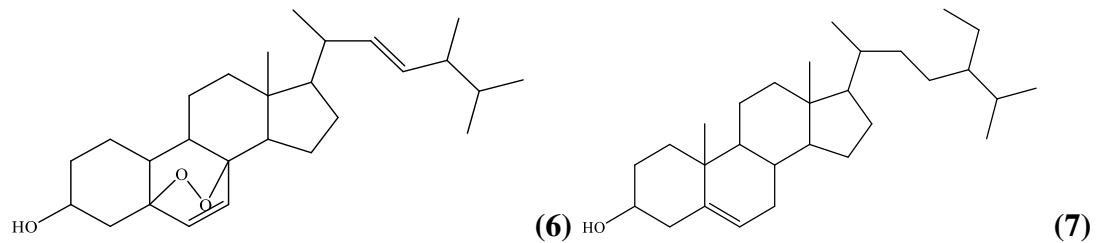
2.2. Kandungan Metabolit Sekunder Kakao

Beberapa senyawa pun berhasil diisolasi dari buah kakao antara lain *procyaidin* (1), *prosianidin B2* (2), *epicatechin* (3), *3'-O-methyl epicatechin* (4), dan *catechin* (5) yang struktrnya bisa dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Senyawa hasil isolasi dari kulit kakao procyaidin (1), procyanidin B2 (2), epicatechin (3), 3'-O-methyl epicatechin (4), dan eatechin (5) (Esatbeyoglu *et al.* 2015)

Kulit buah kakao menghasilkan beberapa metabolit sekunder yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, antosianin, steroid, glikosida dan antrakuinon (Ginting *et al.*, 2019). Pada penelitian sebelumnya dua senyawa dari kulit buah kakao yang berhasil diisolasi yaitu sikloartana (24-hidroksi-9,19- cycloanost-25-en-3-one) (6) dan steroid (Stigmast-5-en-3 β -ol) (7) (Fatiamah, 2016). Strukturnya senyawa dapat dilihat pada **Gambar 3.**



Gambar 3. Struktur senyawa-senyawa hasil isolasi dari kulit buah kakao.

2.3. Efek Farmakologi Tanaman kakao

Buah kakao sudah pernah diteliti efek farmakologisnya, kulit buah kakao diketahui memiliki bioaktivitas sebagai antidiabetes, antibakteri, antijamur dan sitotoksik . Pada uji antioksidan dengan metode DPPH pada varian buah warna kuning dan varian ungu didapatkan nilai IC_{50} sebesar 41,3 dan 44,5 $\mu\text{g/mL}$. Pengujian antidiabetes kakao menggunakan uji α -glukosidase didapatkan nilai sebesar IC_{50} 27.7 $\mu\text{g/mL}$ (Indrianingsih *et al.*, 2021). Kulit kakao juga terbukti memiliki bioaktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. choleraesuis* dengan nilai MIC 1,0 mg/mL dan *S. epidermidis* dengan nilai MIC 2,5 mg/mL (Santos *et al.*, 2014). Kulit kakao memiliki potensi sebagai antijamur yang telah di uji terhadap bakteri *Fusarium oxysporum* (jamur patogen pada tomat). Hal ini dibuktikan dengan nilai KHTM ekstrak aseton: air (7:3) terhadap jamur *F. oxysporum* pada 0,02%, 0,2% dan 2% dengan masing-masing zona hambat 0,09 cm, 0,43 cm dan 0,68 cm. Nilai ini pun lebih besar 0,2 % dibandingkan dengan kontrol positifnya (Rachmawaty *et al.*, 2018). Sitotoksitas pada kulit buah kakao pada fraksi *n*-heksana dan etil asetat dengan IC_{50} yang relatif rendah antara 0,29-2,37 ppm, berdasarkan nilai tersebut kulit buah kakao mempunyai nilai toksisitas yang kuat (Mustanir *et al.*, 2020).

2.4. Diabetes

Diabetes merupakan penyakit kronis yang serius, penyakit ini terjadi baik ketika pankreas tidak menghasilkan insulin yang cukup (hormon yang mengatur glukosa darah), atau ketika tubuh tidak dapat menggunakan secara efektif insulin yang

dihasilkan. Banyaknya glukosa darah merupakan efek umum dari diabetes yang tidak terkontrol, dan dalam jangka waktu yang panjang memungkinkan menyebabkan kerusakan serius pada jantung, pembuluh darah, mata, ginjal, dan saraf (Chan, 2016). Penyakit diabetes dibagi menjadi 2 tipe:

2.4.1. Tipe I

Diabetes tipe 1 adalah penyakit autoimun kronis yang ditandai dengan defisiensi insulin dan hiperglikemia yang dihasilkan pada tubuh. Salah satu pengobatan paling potensial saat ini untuk diabetes tipe 1 adalah dengan menggantikan sel β dari sumber eksternal (Dimeglio, 2018).

2.4.2. Tipe II

Diabetes tipe 2 merupakan hasil dari penggunaan insulin yang tidak efektif oleh tubuh. Diabetes tipe 2 menyumbang sebagian besar penderita diabetes di seluruh dunia. Gejalanya mungkin mirip dengan diabetes tipe 1, tetapi seringkali tidak ada gejala. Akibatnya penyakit mungkin tidak terdiagnosis selama beberapa tahun, sampai terjadi komplikasi. Selama bertahun-tahun tipe 2 diabetes hanya terjadi pada orang dewasa tetapi saat ini sudah mulai terjadi pada anak-anak (Chan, 2016).

Kriteria diagnostik untuk diabetes digunakan dengan pengukuran glukosa setelah puasa atau 2 jam pasca beban, tetapi baru-baru ini telah terjadi perdebatan tentang apakah hemoglobin terglikasi (HbA1c) harus digunakan untuk mendiagnosis diabetes. Klasifikasi etiologi diabetes sekarang telah diterima secara luas, dengan diabetes tipe 1 dan tipe 2 menjadi dua tipe utama diabetes, dan diabetes tipe 2 menyumbang >85% dari total prevalensi diabetes (Forouhi and Wareham, 2010).

Tanaman obat juga bisa digunakan sebagai pengobatan diabetes. Hal ini dilakukan dengan menggunakan berbagai fitokimia yang terkandung di dalamnya dengan menghambat enzim hidrolisis karbohidrat dalam saluran pencernaan, seperti enzim

glukosidase yang merupakan salah satu strategi pengobatan paling sukses untuk *diabetes mellitus*, terutama *diabetes mellitus* yang tidak tergantung insulin, untuk menurunkan hiperglikemia postprandial (Aziz *et al.* 2021).

2.5. Enzim α -Amilase

Enzim α -amilase masuk dalam klasifikasi jenis enzim saccharidase (enzim yang memotong polisakarida). Enzim α -amilase merupakan enzim pencernaan, yang terdapat pada pankreas dan kelenjar ludah. Fungsi utama dari enzim α -amilase adalah untuk memecah pati dalam makanan sehingga dapat diserap oleh tubuh. α -amilase juga biasa disintesis pada buah dan tanaman selama proses pematangan, dan hal ini yang menyebabkan buah menjadi terasa lebih manis (Ariandi, 2016).

Mekanisme kerja dari enzim α -amilase terdiri dari dua tahap, tahap pertama degradasi amilosa menjadi dextrin dan maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat. Tahap kedua terjadi pembentukan glukosa dan maltosa sebagai hasil akhir dan tidak terjadi secara acak. Keduanya merupakan kerja enzim α -amilase pada molekul amilosa. Pada molekul amilopektin enzim α -amilase akan menghasilkan glukosa, maltosa dan satu seri α -limit dekstrin, serta oligosakarida yang terdiri dari empat atau lebih glukosa yang mengandung ikatan α -1,6-glikosidik (Winarno, 2010).

2.6. Uji α -Amilase

Menurut Dastjerdi *et al.* (2015) Uji penghambatan enzim dilakukan berdasarkan pada pemecahan substrat untuk menghasilkan produk berwarna yang diukur dengan metode spektrofotometri. Uji α -amilase dapat diamati dari warna larutan, semakin bening larutan maka aktivitas penghambatan enzim α -amilase semakin besar (Riyanti *et al.*, 2019). Nilai absorbansinya diukur dengan spektrofotometri UV-Vis.

Selanjutnya, sampel dihitung % inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = 1 - \frac{(A_2 - A_1)}{(A_4 - A_3)} \times 100\% \quad (1)$$

A_1 = Absorbansi sampel yang mengandung substrat dan enzim

A_2 = Absorbansi sampel yang mengandung substrat tanpa enzim

A_3 = Absorbansi kontrol yang mengandung substrat dan enzim

A_4 = Absorbansi control yang mengandung substrat tanpa enzim.

Nilai % inhibisi didefinisikan sebagai konsentrasi inhibitor yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas α -amilase. Semakin besar persen inhibisi yang didapatkan maka semakin bagus bioaktivitas antidiabetesnya (Mwakalukwa *et al.*2020)

2.7. Metabolomik

Profil metabolit adalah teknologi yang berkembang pesat saat ini dan berguna untuk analisis fenotip dan diagnostik tanaman. Hal ini juga dengan cepat menjadi kunci dalam anotasi fungsional gen dan dalam pemahaman komprehensif tentang respons seluler terhadap kondisi biologis. Pendekatan metabolomik baru-baru ini digunakan untuk menilai varian alami dalam kandungan metabolit antar individu tanaman, sehingga berpotensi sebagai peningkatan kualitas komposisi tanaman (Weston *et al.*, 2015).

Metabolomik dapat memberikan data stres pada tanaman. Stres pada tanaman didefinisikan sebagai setiap perubahan kondisi pertumbuhan yang mengganggu homeostasis metabolik dan memerlukan penyesuaian jalur metabolisme dalam proses yang biasanya disebut sebagai aklimatisasi. Hal ini dapat dilakukan dengan mengidentifikasi senyawa yang berbeda, seperti produk sampingan dari metabolisme stres. Molekul transduksi sinyal stres atau bisa disebut molekul yang merupakan bagian dari respons aklimatisasi tanaman. Molekul ini dapat diuji lebih lanjut dengan pengukuran langsung, dan berkorelasi dengan perubahan transkriptom dan ekspresi proteom dan dikonfirmasi dengan analisis mutan (Shulaev *et al.*, 2008).

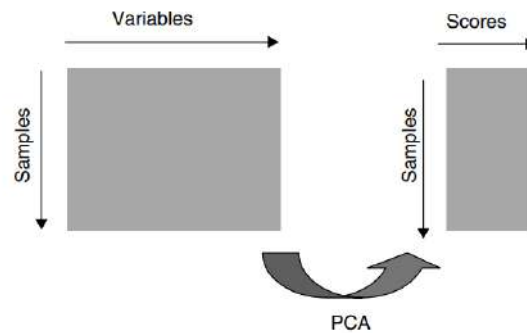
Kromatografi sidik jari atau *fingerprint* bisa dikombinasikan dengan kemometrik. Metode ini sering digunakan untuk mengevaluasi kualitas tumbuhan obat dengan mengolah informasi dan menyediakan berbagai metode pengolahan data. Ada berbagai teknik analisis atau kromatografi yang digunakan seperti kromatografi lapis tipis (KLT), *Gas Chromatography* (GC), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Capillary Electrophoresis* (CE), *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS), *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS / MS) *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detection* (HPLC-DAD), *Capillary Electrophoresis - Diode Array Detecon* (CE -DAD), HPLC-MS dan HPLC-NMR dapat memberikan informasi spektrum tambahan secara struktural yang berguna untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Shafirany *et al.*, 2018). *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LCMS) memainkan peran dalam identifikasi kimia kompleks dan memastikan toksisitas dari obat-obatan herbal (Ganzera *et al.*, 2002).

Kekuatan metabolomik terletak pada perolehan data analitik dimana metabolit dalam sistem seluler dihitung secara keseluruhan, dan ekstraksi elemen data yang paling berperan pada sampel dengan menggunakan berbagai jenis analisis data menggunakan pendekatan statistika multivariat (Putri *et al.* 2017).

2.8. Principal Component Analysis

Principal Component Analysis (PCA) merupakan suatu teknik yang baik untuk mengekstraksi struktur dari suatu set data dengan dimensi yang cukup banyak (Firdausi *et al.*, 2008). Metode PCA yang digunakan pada penelitian ini bertujuan untuk mengklasifikasi sampel menjadi grup yang umum, mendeteksi adanya pencilan (*outliers*), melakukan pemodelan data, serta menseleksi variabel untuk klasifikasi maupun untuk pemodelan (Brereton, 2003).

Sebelum dilakukan analisis PCA ini pun perlu dilakukan adanya preprosesing untuk menghilangkan noise pada data tanpa mempengaruhi hasil PCA. Berikut merupakan pola pengolahan PCA dengan mengolah kumpulan data asli yang besar menjadi kumpulan data yang jauh lebih kecil dan lebih mudah dikelola (misalnya terdiri dari tiga komponen utama) yang dapat diinterpretasikan dengan lebih mudah. Pola dari metode ini dapat dilihat pada **Gambar 4**.



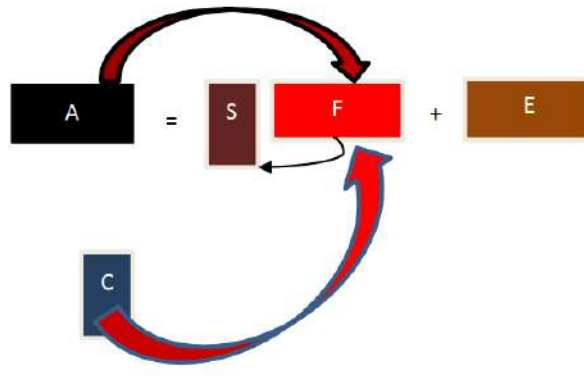
Gambar 4. Pola proses PCA (Gao and Yang, 2003).

2.9. *Partial Least Square*

Metode PLS merupakan salah satu metode kemometrik yang sering digunakan untuk memprediksi pengaruh bioaktivitas suatu molekul. Metode PLS ini akan membentuk peubah baru yang disebut sebagai faktor peubah laten atau komponen, karena masing-masing komponen merupakan kombinasi linear dari peubah bebas. Tujuan dari metode ini adalah membentuk komponen yang bisa menangkap informasi peubah untuk menduga peubah respon (Inayah, 2018).

Metode PLS mereduksi data dengan mencari faktor-faktor yang paling relevan dalam memprediksi dan menginterpretasikan sebuah data. Metode PLS ini menggunakan kombinasi linier untuk menduga variabel bebas dari variabel asli. Kombinasi ini dipilih dengan mengasumsikan bahwa variabel yang menunjukkan korelasi yang sangat tinggi dan variabel bebas diberi bobot yang sama besar karena variabel

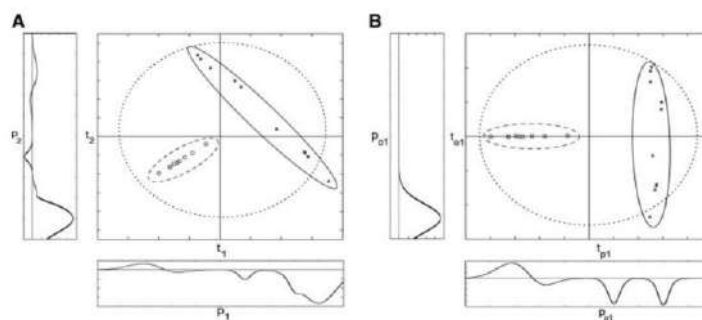
tersebut akan lebih efektif dalam pendugaan variabel. Teknik kompresi data PLS ditunjukkan pada **Gambar 5**.



Gambar 5. Teknik kompresi data dengan PLS (Ayu, 2017).

2.10. Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA)

OPLS-DA diperkenalkan sebagai penyempurnaan dari metode PLS-DA. Metode ini digunakan untuk membedakan dua atau lebih kelompok (kelas) menggunakan data multivariat (Bylesjo *et al.* 2006; Trygg and Wold, 2002). Dalam OPLS-DA model regresi dihitung antara data multivariat dan variabel respon yang hanya berisi informasi kelas. Keunggulan OPLS-DA dibandingkan dengan PLS-DA adalah komponen tunggal digunakan sebagai prediktor untuk kelas, sedangkan komponen lainnya menjelaskan variasi ortogonal ke komponen prediktif pertama. Pola perbedaan dari kedua metode OPLS-DA dan PLS-DA dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Demonstrasi perbedaan utama antara PLS-DA dan OPLS-DA.

Secara sederhana, OPLSDA menggunakan informasi dalam matriks Y untuk menguraikan matriks X menjadi blok-blok variasi terstruktur yang berkorelasi dengan ortogonal ke Y. Blok yang berisi variasi berkorelasi, biasa disebut sebagai prediksi variasi, juga dapat diturunkan dari PLS yang dinormalisasi dengan vektor regresi diikuti dengan prosedur yang disebut 'target rotasi' yang dikembangkan oleh Kvalheim dan Karstang.

2.11. Ekstraksi

Salah satu metode yang digunakan sebagai penemuan obat tradisional adalah metode ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi ini bergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan didapat. Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut :

1. Pengelompokkan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
2. Pemilihan pelarut
3. Pelarut polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
4. Pelarut semipolar: etil asetat, diklorometana, dan sebagainya.
5. Pelarut nonpolar: *n*-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya (Mukhriani, 2011).

Ekstraksi merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan suatu zat dengan pelarut. Adapun teknik ekstraksi dan pemilihan pelarut akan mempengaruhi hasil dari suatu ekstraksi karena adanya perbedaan dan karakteristik yang berbeda-beda dari tumbuhan obat. Hal ini pun menjadi penting dalam penelitian pada tanaman obat untuk memberikan hasil yang optimum baik kuantitatif maupun kualitatif (Rafi dkk., 2013).

2.12. Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis mempunyai fungsi dalam hal penentuan struktur yang mana menentukan kromofor apa yang terdapat dalam molekul yang dianalisis. Hal-hal yang perlu diperhatikan pada spektrum UV-Vis adalah absorpsi panjang gelombang maksimum, bila absorpsi panjang gelombang maksimum melebar sampai menuju ke daerah sinar tampak menunjukkan bahwa kromofor mengandung ikatan rangkap terkonjugasi panjang atau kromofor merupakan aromatik polisiklik; sedangkan bila panjang gelombang maksimum lebih kecil dari 300 nm dan hanya satu pita atau beberapa pita, maka kromofor memiliki dua atau tiga ikatan rangkap terkonjugasi. Intensitas pita/ekstinsi molar (ϵ) juga harus diperhatikan, yang mempunyai ϵ 10.000 – 20.000 berasal dari kromofor diena/keton tak jenuh λ , β ; ϵ 100 – 10.000 berasal dari kromofor aromatik, bila aromatik tersubstitusi maka ekstinsi molar akan bertambah besar; ϵ 10 -100 berasal dari eksitasi elektron $n \rightarrow \pi^*$ dan panjang gelombang maksimumnya 270 – 350 nm (Suhartati, 2017).

Aplikasi spektrofotometri UV-Vis ini dalam analisis antidiabetes dengan menggunakan metode α -glukosidase digunakan untuk memonitor hidrolisis enzimatis dari suatu substrat dengan melihat jumlah *P-nitrophenol* didalam reaksi yang dideteksi pada panjang gelombang 410 nm (Early dkk., 2013). Sedangkan pada uji α -amilase maka panjang gelombang yang digunakan 540 nm.

2.13. Spektrofotometri LC-MS/MS

Kemampuan spektrofotometri MS ketika digabungkan spektrofotometri LC dinyatakan baik oleh laboratorium klinis di seluruh dunia karna keserbagunaan yang berkembang. Karena alat ini dapat memberikan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dalam banyak kasus dibandingkan dengan teknik analitik lainnya. Selain spesifisitas dan sensitivitas, kemampuan teknik ini untuk mengukur banyak analit secara bersamaan adalah manfaat luar biasa dari LC yang digabungkan dengan metode MS karena banyak teknik lain terbatas untuk menentukan analit pada suatu waktu. Aplikasi untuk LC-MS/MS di laboratorium klinis digunakan untuk

pemantauan obat terapeutik, skrining neonatal, metode referensi, dan toksikologi (Himmelsbach, 2012).

Analisis LC-MS akan menghasilkan data spektrum atau kromatogram yang besar. Maka, kemometrik dapat digunakan untuk meringkas dan mengekstrak informasi dari data LC-MS, pengenalan pola serta untuk memprediksi sifat sampel, seperti kualitas atau sifat bioaktivitas sampel. Analisis LC-MS dalam kaitannya dengan bioaktivitas suatu sampel dapat diprediksi menggunakan kemometrik dengan metode *Principal Component Analysis* (PCA) dan teknik *Partial Least Square* (PLS). Seperti yang dilakukan dalam analisis PCA dan PLS pada tanaman temu ireng (*Curcuma aeruginosa*) hasil metode PCA dapat menganalisis profil metabolit yang dapat memilah sampel berdasarkan daerah asalnya. Sedangkan pada PLS dapat menunjukkan hubungan antara komposisi metabolit terhadap antioksidan dipengaruhi oleh keberadaan senyawa dengan massa ion 312,28 dan 248,15 yang memiliki potensi antioksidan dan toksisitas paling tinggi. (Septaningsih dkk., 2018).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Juni 2022 – februari 2023, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Adapun analisis spektroskopi meliputi spektroskopi ultraungu-tampak (UV-Vis) di Laboratorium Biokimia Universitas Lampung dan LC-MS/MS dilakukan di Unit Laboratorium Riset Unggulan Insitut Pertanian Bogor (IPB).

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat alat yang digunakan

Alat-alat yang akan digunakan meliputi alat-alat gelas dengan berbagai macam jenis dan ukuran, destilasi, *Rotary Evaporator*, inkubator, oven, neraca analitik, spatula dan pipet tetes, spektrofotometer ultraungu-tampak (UV-Vis) Agilent Carry 50, kromatografi LC-MS/MS ultimate 3000 RSLCnano, perangkat keras komputer, serta perangkat lunak *The Unscrambler X* versi 10.1 (CAMO, Oslo, Norwegia).

3.2.2. Bahan yang digunakan

Bahan utama yang digunakan adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) yang didapat dari desa Bangunrejo, Kec. Bangunrejo Lampung Tengah diambil pada tanggal 17 Februari 2021 yang telah dikeringkan dan dihaluskan. Bahan kimia yang digunakan adalah enzim α -amilase (sigma alderich USA), pati 1%, HCl 1N, pereaksi iodin, etanol (EtOH) (Smart Lab Indonesia), etil asetat (EtOAc), *n*-heksan ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$), aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$), akuades (H_2O), kertas saring.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Persiapan sampel

Sampel kakao yang akan digunakan terlebih dahulu dideterminasi di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat. Bagan alir untuk penelitian ini dapat dilihat pada **Lampiran 1**. Kulit buah kakao dipotong kecil-kecil kemudian dijemur pada sinar matahari. Setelah sampel kering lalu dihaluskan menjadi serbuk guna mendapatkan hasil yang maksimal dari maserasi.

3.3.2. Ekstraksi sampel

Pada penelitian ini sampel dimaserasi dengan 4 variasi pelarut yang digunakan sebagai data analisis metabolomik. Variasi pelarut yang digunakan untuk mengestrak sampel kulit buah kakao tersebut adalah *n*-heksan, etil asetat, etanol, dan aseton.

Sampel yang digunakan pada masing-masing pelarut yaitu 100 gr dengan 5 kali pengulangan untuk diekstrak dengan 4 variasi pelarut selama 24 jam. Sedangkan perbandingan antara pelarut dan sampel yaitu 1:10. Filtrat yang didapatkan disaring dengan kertas saring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 40°C lalu ditimbang. Ekstrak pekat yang diperoleh lalu ditimbang dan digunakan untuk uji aktivitas antidiabetes dan analisis LC-MS/MS.

3.3.3. Uji Penghambatan α -Amilase

Pengujian menggunakan metode enzim α -amilase dilakukan berdasarkan seperti yang dilakukan oleh Andini (2020) dengan sedikit modifikasi. Pada uji penghambatan α -amilase variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 250, 500, 750, dan 1000 ppm kemudian ditambahkan 250 μ L larutan enzim α -amilase, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah diinkubasi ditambahkan 250 μ L larutan pati 1% kemudian dikocok dan diinkubasi selama 30 menit dengan menggunakan watterbath. Larutan ditambahkan 250 μ L HCl 1N untuk menghentikan

reaksi enzimatik. Selanjutnya ditambahkan 250 μ L pereaksi iodin dan diamati perubahan warnanya.

Nilai absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis, dengan cara sebanyak 1 mL campuran larutan ditambahkan 2 mL aquades dan dimasukkan dalam kuvet lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Kemudian dihitung % inhibisinya menggunakan rumus.

$$\% \text{ inhibisi} = 1 - \frac{(A_2 - A_1)}{(A_4 - A_3)} \times 100\% \quad (1)$$

A_1 = Absorbansi sampel yang mengandung substrat dan enzim

A_2 = Absorbansi sampel yang mengandung substrat tanpa enzim

A_3 = Absorbansi kontrol yang mengandung substrat dan enzim

A_4 = Absorbansi control yang mengandung substrat tanpa enzim.

(Mwakalukwa *et al.* 2020).

3.3.4. Analisis LC-MS/MS

Sampel dengan massa 0.1 gr ditimbang dan dianalisis menggunakan instrumen LC-MS/MS selama 15 menit, dan laju aliran 3 mL/menit. Metode fragmentasi LC-MS/MS kromatografi fase terbalik (*reverse-phase chromatography*), digunakan untuk memisahkan senyawa dalam sampel berdasarkan sifat kimianya sebelum dideteksi menggunakan MS/MS. Fragmen-fragmen yang terionisasi di dalam inlet massa akan dipecah menjadi fragmen-fragmen kecil yang kemudian dideteksi dan diidentifikasi suatu senyawa (Farak, 2012).

Anotasi metabolit dilakukan dengan identifikasi senyawa dalam data LC-MS/MS dilakukan dengan membandingkan pola spektrum massa dari senyawa yang diukur dengan basis data referensi, seperti basis data metabolomik, untuk mencocokkan senyawa yang terdeteksi dengan senyawa yang dikenal. *Software* yang digunakan untuk analisis metabolomik adalah *MZ mine*.

3.3.5. Analisis multivariat

3.3.5.1. *Principal Component Analysis (PCA)*

Data LC-MS/MS dari ekstrak kulit buah kakao yang telah diuji berupa *mass array* yang selanjutnya digunakan analisis multivariat dengan teknik PCA dengan menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler*. Analisis multivariat dengan metode PCA secara umum dilakukan untuk mengetahui pengelompokan metabolit pada kulit buah kakao berdasarkan perbedaan pelarut pengestrak (Rachmawati, 2012). Data *mass array* yang didapatkan dari pengolahan perangkat lunak *MZmine* yang berfungsi untuk penanganan kompleksitas data, data *mass array* tersebut dianalisis lebih lanjut dengan analisis multivariat PCA menggunakan perangkat lunak *The Unscrambler*. PCA ini bertujuan mengelompokkan sampel kulit buah kakao berdasarkan variasi konsentrasi pelarutnya serta menentukan metabolit penciri yang berkaitan erat dengan sifat bioaktivitas senyawa antidiabetesnya (Chew *et al.*, 2004).

3.3.5.2. *Partial Least Square*

Data LC-MS/MS selanjutnya dianalisis dengan menggabungkannya dengan data hasil uji α -amilase dengan menggunakan *software The Unscrambler*. Analisis PLS ini digunakan guna untuk menentukan senyawa yang paling berperan dalam bioaktivitas antidiabetes. Pembentukan model PLSR dilakukan dengan dua set data, yaitu *retention time variable* (RT) dari spektrum LC-MS sebagai variabel bebas (X) dan nilai IC_{50} antidiabetes sebagai variabel respon (Y). Tujuan akhir pada proses ini adalah untuk mengidentifikasi *important variable* dari komponen sampel penelitian yang menjadi *biomarker* penyebab antidiabetes serta dapat memberi informasi terkait pelarut pengestrak antidiabetes terbaik yang akan mejadi fokus penelitian untuk tahap isolasi senyawa bioaktif antidiabetes (Theodoridis *et al.*, 2008).

3.3.5.3. *Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis (OPLS-DA)*

Data hasil kromatografi LC-MS/MS dianalisis menggunakan situs web <https://www.metaboanalyst.ca/>. Data yang digunakan analisis OPLS-DA ini adalah

base peak intensity dan luas pita dan variable respon yang digunakan hanya 2 yaitu variable aktif dan non-aktif antidiabetes. Pada analisis OPLS-DA didapatkan nilai permutasi R²Y yang menjelaskan adanya % variasi dalam sampel dalam kedua komponen dan nilai Q² yang mengindikasikan kekuatan dari pada model yang didapatkan, nilai Q² > 0,5 dapat diterima secara umum sebagai indikasi model yang kuat (D'Ambrosio,2010).

Dari analisis diketahui variable potensial sebagai antidiabetes atau non-antidiabetes dengan melihat diagram s-plot dan nilai variable important (VIP) dari senyawa yang didapat. Plot yang mempunyai nilai VIP >1 merupakan senyawa biomarker paling potensial.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Dari hasil pengujian antidiabetes, nilai rata-rata IC_{50} yang diperoleh dari masing-masing variasi pelarut pengekstrak kulit buah kakao menggunakan *n*-heksan, etil asetat, etanol, dan aseton mempunyai nilai IC_{50} berturut turut sebesar 459,48, 206,41, 271,29, dan 269,67 $\mu\text{g/mL}$.
2. Nilai IC_{50} yang diperoleh dari masing-masing variasi pelarut pengekstrak mengindikasikan bahwa ekstrak etil asetat memiliki tingkat antidiabetes tinggi ekstrak *n*-heksan memiliki tingkat antidiabetes paling lemah.
3. Hasil analisis PCA menunjukkan bahwa ekstrak dari 4 variasi pelarut pengekstrak dapat mengelompok dengan baik dengan total PC sebesar 75%.
4. Hasil analisis PLS melalui *coefficient regression* diperoleh informasi senyawa metabolit penciri yang diduga berkontribusi aktif terhadap antidiabetes yaitu senyawa A (*Choline*), B (*n-methylethanolamine phosphate*), C (*Phaseollidin hydrate*), D (*2-Amino-1,3,4-octadecanetriol*), E (*Matairesinol*), F (*Altenuene*), dan G (*Amorphigenin*).
5. Hasil analisis OPLS-DA didapatkan senyawa yang menjadi biomarker potensial untuk kelompok ekstrak aktif antidiabetes dengan luas pita dan *base peak* adalah *altenuene* dan *unknown 213*. *Altenuene* merupakan senyawa yang diduga paling berpengaruh terhadap antidiabetes dari kulit buah kakao.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, didapatkan saran untuk penelitian selanjutnya yaitu:

1. Perlu dilakukan identifikasi senyawa aktif yang berperan aktif terhadap aktivitas antidiabetes dengan instrumen lain seperti GCMS atau NMR.

2. Perlu dilakukannya uji bioaktivitas lain menggunakan pendekatan metabolomik, seperti antikanker atau uji toksisitas.
3. Perlu dilakukan variasi lokasi pengambilan sampel, guna mendapatkan metabolit yang maksimal.
4. Perlu dilakukan uji *in silico* dan juga isolasi senyawa prediksi yang didapatkan untuk membuktikan keakuratan dari prediksi metabolomik

DAFTAR PUSTAKA

- Andini, V., Anwar, C., dan Swasono, R. T. 2020. Sintesis Turunan Eugenol dan Uji Inhibisinya Terhadap α - Amilase. *Prosiding Seminar Nasional Kimia (SNK) 2020*, 242–248.
- Alqahtani, Ali S., Riaz Ullah, and Abdelaaty A. Shahat. 2022. Bioactive Constituents and Toxicological Evaluation of Selected Antidiabetic Medicinal Plants of Saudi Arabia. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2022:23.
- Argout, X., Salse, J., Aury, J. M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., Allegre, M., Chaparro, C., Legavre, T., Maximova, S. N., Abrouk, M., Murat, F., Fouet, O., Poulain, J., Ruiz, M., Roguet, Y., Rodier-Goud, M., Barbosa-Neto, J. F., Sabot, F.Lanaud, C. 2011. The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 43(2), 101–108.
- Ariandi. 2016. Pengenalan Enzim Amilase (alpha-amylase) dan Reaksi Enzimatiknya Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa. *Jurnal Dinamika*, 7(1), 274–282.
- Ayu, P. C. 2017. Pengembang Model Penentuan Kandungan Kimia Utama Pembentuk Flavor Biji Kopi Java Preanger Menggunakan FT-NIRS. *Tesis*. Insitut Pertanian Bogor.
- Aziz, Z., Dewi, N., Partomuan, Y., Mohamad, S., dan Esti, R. 2021. Investigation of Yacon Leaves (*Smallanthus sonchifolius*) for α - Glucosidase Inhibitors Using Metabolomics and *In Silico Approach*. *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00926-3>.
- Brereton, Richard, G. 2003. Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and. In *University of Bristol* (Vol. 24, Issue 5).
- Bylesjo, M., Rantalainen, M., & Cloarec, O. 2006. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, 20(8–10), 341–351.
- Chan, M. 2016. Global Report on Diabetes. *Isbn*, 978(April), 6–86. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257>. Diakses pada 7 Januari 2023.

- Chew, O. S., Hamdan, M. R., Ismail, Z., and Ahmad, M. N. 2004. Assessment of herbal medicine by chemometrics: Assisted Interpretation of FTIR Spectra. *Analytica chimica acta*, 1-14 hlm.
- Dastjerdi, Z. M., Namjoyan, F., and Ebrahim, A. M. 2015. Alpha Amylase Inhibition Activity of Some Plants Extract of Teucrium Species. *European Journal of Biological Sciences*, 7(1), 26–31.
- D'Ambrosio, R., and Miller, J.W. 2010. What is an epileptic seizure? Unifying definitions in clinical practice and animal research to develop novel treatments. *Epilepsy Curr*, 10: 61–66.
- De Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H. A., and da Costa, F. B. 2018. Cacao *Theobroma cacao*. *Exotic Fruits*, 3(2001), 69–76.
- Demarque, D. P., Dusi, R. G., de Sousa, F. D. M., Grossi, S. M., Silvério, M. R. S., Lopes, N. P., and Espindola, L. S. 2020. Mass Spectrometry-Based Metabolomics Approach in The Isolation of Bioactive Natural Products. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9.
- DiMeglio, Linda A., Carmella E. M., and Richard A. O. 2018. Type 1 Diabetes.” *The Lancet*. 391(10138), 2449-62.
- Early F. A., Astawan, M., Wresdiyati, T., dan Dewi Yuliana, N. 2013. Kapasitas Antioksidan dan Inhibitor α -Glukosidase Ekstrak Umbi Bawang Dayak. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, 24(2), 161–167.
- Esatbeyoglu, T., Wray, V., and Winterhalter, P. 2015. Isolation of Dimeric, Trimeric, Tetrameric and Pentameric Procyanidins from Unroasted Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.) Using Countercurrent Chromatography. *Food Chemistry*, 179: 278–289.
- Fatimah, T. I. 2016. *Chemical Composition Of The Essential Oils Of Five Fruit Tress and Non-Volatile Constituents Of Theobroma cacao L. Pod-Husk*. (Thesis). University of Ibadan.
- Farag, M.A., Porzel, A., and Wessjohann, L.A.2012. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques. *Phytochemistry*. 76, 60–72.
- Firdausi, N., Wessiani, N. A., dan Santosa, W. 2008. Analisis Financial Distress Dengan Pendekatan Data Mining Pada Industri Manufaktur Go-Public Di Indonesia. *Jurnal ITS*, July 2015: 1–12.

- Forouhi, N. G., and Wareham, N. J. 2010. Epidemiology of Diabetes. *Medicine*, 38(11), 602–606.
- Ganzera, M., Zhao, J., and Khan, I. A. 2002. Hypericum Perforatum Chemical Profiling and Quantitative Results of St. John's Wort Products by an Improved High-Performance Liquid Chromatography Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(3), 623–630.
- Gao, X. G., and Yang, Y. L. 2003. Initial Path Planning for Unmanned Combat Air Vehicles Based-on Different Threats. *Journal Acta Aeronautica et Astronautica Sinica*. 24 (5).
- Ginting, B., Maulana, I., Saidi, N., dan Astryna, S. Y. 2019. Isolation and Activity Antioxidant Test Of Cocoa Pod Husk Ethyl Asetat Extracts (*Theobroma cacao* L). *Jurnal Natural*, 19 (2), 49–53.
- Hanum, F., dan Amalia, R. 2013. Aktivitas dan Efektivitas Antidiabetes Pada Beberapa Tanaman Herbal. *Farmaka*, 18 (1), 1–15.
- Harbuwono, D. S., Handayani, D. O. T. L., Wahyuningsih, E. S., Suprptowati, N., Ananda, Kurniawan, F., Wafa, S., Kristanti, M., Pantoro, N. I., Sinto, R., Kurniawan, H., Rebekka, dan Tahapary, D. L. 2022. Impact of Diabetes Mellitus on COVID-19 Clinical Symptoms and Mortality: Jakarta's COVID-19 Epidemiological Registry. *Primary Care Diabetes*, 16 (1), 65–68.
- Himmelsbach, M. 2012. 10years of MS Instrumental Developments - Impact on LC-MS/MS in Clinical Chemistry. *Journal of Chromatography*, 883–884 (2012), 3–17.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. 1986. Cara Kromatografi Preparatif Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam. (Alih bahasa : Kosasih Padmawinata). Bandung : Penerbit ITB.
- Hussain, A. I., Rathore, H. A., Sattar, M. Z. A., Chatha, S. A. S., Sarker, S. D., and Gilani, A. H. 2014. *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 155 (1), 54–66.
- IDF (International Diabetes Federation). 2020. *IDF Diabetes Atlas (9th ed.)*, International Diabetes federation; 2019.
- Inayah, A. 2018. Analisis Kemometrik Menggunakan LDA (Linear Discriminant Analysis) dan PLS (Partial Least Square) dari Sampel Minyak Babi dan Minyak

Sawit Berbasis Data FTIR. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

- Indrianingsih, A. W., Wulanjati, M. P., Windarsih, A., Bhattacharjya, D. K., Suzuki, T., dan Katayama, T. 2021. *In Vitro* Studies of Antioxidant, Antidiabetic, and Antibacterial Activities of *Theobroma cacao*, *Annona Muricata* and *Clitoria ternatea*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33 (2021) 101995.
- Jenie, U. A., Kardono, L. B. S., Hanafi, M., Rumampuk, R. J., dan Darmawan, A. 2014. Teknik Modern Spektroskopi NMR : Teori dan Aplikasi dalam Elusidasi Struktur Molekul Organik. In *LIPI Press*.
- Kayaputri, I. L., Sumanti, D. M., Djali, M., Indiarso, R., dan Dewi, D. L. 2014. Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Chimica et Natura Acta*, 2 (1), 83–90.
- Lebart, L., Morineau, A. and Warwick, K.M. 1984. *Multivariate Descriptive Statistical Analysis; Correspondence Analysis and Related Techniques for Large Matrices*. Translated by Elisabeth Moraillon Berry. John Wiley and sons, New York.
- Mashiane, P. ., Manhivi, Vimbainashe, E., Shoko, T., Slabbert, R. M., Sultanbawa, Y., and Sivakumar, D. 2021. Cooking African Pumpkin Leaves (*Momordica balsamina* L.) by Stir-Frying Improved Bioactivity and Bioaccessibility of Metabolites—Metabolomic and Chemometric Approaches. *Foods*, 10 (2021), 2890.
- Mukhriani. 2011. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2), 361–367.
- Mohammed, S. A., Yaqub, A. G., Sanda, A., Nicholas, A. O., Arastus1, W., Muhammad, M., dan Abdullahi, S. 2013. Review on Diabetes, Synthetic Drugs and Glycemic Effects of Medicinal Plants. *Academic*, 7(36), 2628–2637.
- Mustanir, Nurdin, Ginting, B., dan Purnama, A. 2020. Chemical Composition and Cytotoxic Activities of n-Hexane Extract from Cacao Pod usk (*Theobroma cacao* L.). *Chemical Data Collections*, 30 (2020), 100553.
- Mwakalukwa, R., Yhiya, A., Maki, N., and Shimizu, K. 2020. Postprandial Hyperglycemia Lowering Effect of the Isolated Compounds from Olive Mill Wastes - An Inhibitory Activity and Kinetics Studies on α -Glucosidase and α -Amylase Enzymes. *ACS Omega*, 32 (2020), 20070–79.
- Putri, S. P., Sastia, Nusantara, F. J. P., dan Putri, S. E. 2017. Aplikasi Pendekatan

Metabolomik untuk Ilmu Pangan dan Mikrobiologi. *Review Article*.

- Rachmawati, Mu'Nisa, A., Hasri, Pagarra, H., Hartati, dan Maulana, Z. 2018. Active Compounds Extraction of Cocoa Pod Husk (*Thebroma Cacao* l.) and Potential as Fungicides. *Journal of Physics: Conference Series*, 1028 (1).
- Rafi, M., Rudi, H., dan Dewi, A. S. 2013. Atlas Kromatografi Lapis Tipis Tumbuhan Obat Indonesia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53 (9).
- Riyanti, S., Ratnawati, J., dan Aprilianti, S. 2019. Potensi Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) Sebagai Inhibitor α -Glukosidase. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 6 (1), 6.
- Santos, R. X., Oliveira, D. A., Sodré, G. A., Gosmann, G., Brendel, M., and Pungartnik, C. 2014. Antimicrobial Activity of Fermented *Theobroma cacao* Pod Husk Extract. *Genetics and Molecular Research*, 13 (3), 7725–7735.
- Septaningsih, D. A., Darusman, L. K., Afendi, F. M., dan Heryanto, R. 2018. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Fingerprint Combined with Chemometrics for Identification of Metabolites Content and Biological Activities of *Curcuma aeruginosa*. Indones. *Journal Chemistry* .18 (1), 43–52.
- Shafirany, M. Z., Susilawati, Y., dan Musfiroh, I. 2018. Aplikasi Kemometrik dalam Penentuan Mutu Tumbuhan Obat. *Farmasi Sains dan Kesehatan*, 4 (2).
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., and Mittler, R. 2008. Metabolomics for Plant Stress Response. *Physiologia Plantarum*, 132 (2), 199–208.
- Steenis, V. 2008. *Flora*. Cetakan ke-12. Jakarta : PT. Pradnya Paramita.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-dasar Spektrofotometri Uv-Vis dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Bandar Lampung: CV. Anugrah Utama Creative.
- Sumarlin, L. O., Suprayogi, A., Rahminiwati, M., Satyaningtijas, A., Nugraha, A. T., Sukandar, D., Pangestika, H., dan Pratiwi, L. 2020. Identification of Compounds Flavonoids Namnam Leaf Extract (*Cynometra Cauliflora*) As Inhibiting α -Glucosidase. *Journal of Physics: Conference Series*, 1594(1).
- Theodoridis, G., Helen, G. G., and Wilson. I. D. 2008. LC-MS-Based Methodology for Global Metabolite Profiling in Metabonomics/metabolomics. *Trends in Anal Chem*. 27: 251-260.

- Tran, N., Pham, B., and Le, L. 2020. Bioactive Compounds in Anti-Diabetic Plants: From Herbal Medicine to Modern Drug Discovery. *Biology*, 9 (9), 1–31.
- Trygg, J., and Wold, S. 2002. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16 (3), 119–128.
- Vega, R. C., Karen, H., Figueroa, N., and Oomah, B. D. 2018. Cocoa (*Theobroma Cacao* L.) Pod Husk: Renewable Source of Bioactive Compounds. *Food Science & Technology*, 81 (2018), 172-184.
- Vriesmann, L. C., Amboni, R. D. de M. C., and Petkowicz, C. L. D. O. 2011. Cacao Pod Husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and Hot-Water-Soluble Pectins. *Industrial Crops and Products*, 34 (1), 1173–1181.
- Warsito, M. F. 2018. Analisis Metabolomik : Metode Modern Dalam Pengujian Kualitas Produk Herbal. *Bio Trends*, 9 (2).
- Wishart, D. S. 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science and Technology*, 19(9), 482-493.
- Winarno, F. G. 2010. Enzim Pangan (edisi revisi). Jakarta: *M-Brio Press*.
- Weston, P. A., White, J. D. M., Skoneczny, D., and Weidenhamer, J. D. 2015. Metabolic profiling: An overview - New approaches for the detection and functional analysis of biologically active secondary plant products. *J. Allelochem. Interact*, 1(2), 15–27.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: *Taman Kampus Presindo*.
- Yang, Liu, and Chunlian, W. 2022. Lignan Matairesinol Illustrates an Antidiabetic Effect Via Inhibition of Dpp-4 and Hepato-Protective Effect Via Inhibition of Apoptosis in Diabetic Rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 79(3): 393–400.