



**AKTIVITAS EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO
SUPERIOR DAN INFERIOR DARI PTPN XII KEBUN
KALIKEMPIT-BANYUWANGI SEBAGAI SUMBER
ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

oleh

**Ernawati
NIM 101710101042**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**AKTIVITAS EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO
SUPERIOR DAN INFERIOR DARI PTPN XII KEBUN
KALIKEMPIT-BANYUWANGI SEBAGAI SUMBER
ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

oleh
Ernawati
NIM 101710101042

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Keluargaku di Jenggawah dan di Pemali, terima kasih atas segala ketulusan cinta dan kasih sayang, dukungan, pengorbanandan doanya selama ini.
2. Dosen Pembimbing Utama Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc dan Dosen Pembimbing Anggota Dr. Ir. SihYuwanti, MP yang telah dengan tulus memberikan ilmu pengetahuan dan bimbingannya dengan penuh kesabaran.
3. Jajaran pimpinan PTPNXII Kebun Kalikempit, Ir. Arief Budiyanto, M.M selaku manajer, Achmad Hendy J, S.TP. dan Juni, S.P. selaku wakil manajer, bapak Afid Tri Prasetyo, S.TP. selaku Astekpol, dan bapak Satrio Supriyadi selaku mandor besar serta staf karyawan di PTPN XII Kebun Kalikempit, Banyuwangi atas bimbingan, bantuan dan kesabaran selama pengerjaan skripsi ini.
4. Almamater yang kubanggakan, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
5. Guru-guru SD, SMP, SMA dan semua Dosen di FTP UNEJ
6. Sahabat-sahabatku semuanya yang tidak dapat aku sebutkan satu-persatu.

MOTO

Akan kuberikan ilmu yang kumiliki kepada siapapun asal mereka mau
memanfaatkan ilmu yang telah kuberikan
(HR Imam Syafi'i).

Keberhasilan tidak pernah mendatangimu tapi kamu sendiri yang harus
mendatanginya
(Marva Collins)

"I've failed over and over and over again in my life, and that is why I succeed"
(Michael Jordan)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Ernawati

NIM : 101710101042

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“AKTIVITAS EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO SUPERIOR DAN INFERIOR DARI PTPN XII KEBUN KALIKEMPIT-BANYUWANGI SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI“** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 Mei 2015

Yang menyatakan,

Ernawati

NIM. 101710101042

SKRIPSI

**AKTIVITAS EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO SUPERIOR DAN
INFERIOR DARI PTPN XII KEBUN KALIKEMPIT-BANYUWANGI
SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI**

Oleh:

Ernawati

NIM 101710101042

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc
NIP. 196411091989021002

Dr. Ir. Sih Yuwanti, MP
NIP. 196507081994032002

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “**Aktivitas Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior dari PTPN XII Kebun Kalikempit-Banyuwangi Sebagai Sumber Antioksidan dan Antibakteri**” karya Ernawati, NIM 101710101042, telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Kamis, 2 April 2015

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

Anggota,

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.
NIP 19630701 198903 1 004

Puspita Sari, S.TP, M.Agr.
NIP 197203011998022001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Jember,

Dr. Yuli Witono, S.TP, MP.
NIP 19691212 199802 1 001

RINGKASAN

Aktivitas Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior dari PTPN XII Kebun Kalikempit-Banyuwangi Sebagai Sumber Antioksidan dan Antibakteri; Ernawati, 101710101042; 2015; 81 Halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Indonesia merupakan negara penghasil kakao (*Theobroma cacao* L.) terbesar ketiga setelah Ghana dan Pantai Gading. Kakao merupakan salah satu komoditi perkebunan utama di Indonesia. Kakao merupakan tanaman yang rentan terserang hama dan penyakit. Salah satu penyakit yang menghambat perkembangan kakao di Indonesia adalah penyakit busuk buah (*Phytophthora palmivora*) serta hama Pengerek Buah Kakao (*Conopomorpha cramerella*). Buah kakao yang terserang hama dan penyakit busuk buah dapat menurunkan mutu apabila diolah menjadi suatu produk karena dapat merusak cita rasa dan aroma khas coklat, sehingga perlu upaya untuk meningkatkan nilai dari buah kakao yang terserang hama dan penyakit yaitu dengan memanfaatkan kandungan polifenol yang terdapat dalam biji kakao tersebut. Kandungan polifenol yang terdapat dalam biji kakao diduga berpotensi sebagai sumber antioksidan dan antibakteri alami.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik kimia biji kakao inferior dibandingkan dengan biji kakao superior. Setelah itu dilakukan ekstraksi polifenol biji kakao untuk mengetahui karakteristik ekstrak bubuk polifenol biji kakao superior yang didapatkan dan kemudian dilakukan uji penghambatan terhadap bakteri *E.coli* dan *B.subtilis* dengan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum dan Inhibition Concentration 50% atau IC₅₀ sehingga dapat diketahui potensi polifenol sebagai antibakteri.

Proses penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap yaitu (1) Tahap analisis kimia biji kakao superior dan inferior yang meliputi indeks fermentasi, kadar air dan kadar lemak; (2) Tahap ekstraksi polifenol biji kakao superior dan inferior yang nantinya didapatkan bubuk polifenol kasar dan dianalisis randemen, warna,

total polifenol dan aktivitas antioksidan; dan (3) Tahap pengujian ekstrak senyawa polifenol sebagai sumber antioksidan dan senyawa antibakteri.

Secara umum hasil pengamatan karakteristik kimia biji kakao yang didapatkan yaitu indeks fermentasi biji inferior lebih tinggi daripada sampel H0 karena terjadi fermentasi pada saat penumpukan; nilai kadar air biji kakao tertinggi adalah sampel terserang PBK 6,20% dan terendah sampel terserang busuk buah 5,50%; nilai kadar lemak tertinggi pada sampel H4 56,43% dan terendah sampel terserang PBK 36,41%. Hasil pengamatan karakteristik bubuk polifenol kasar yaitu pada randemen nilai yang tertinggi adalah sampel H0 8,19% dan terendah sampel H4 7,59%; untuk warna semua sampel rata-rata menunjukkan pada warna ungu; total polifenol tertinggi adalah sampel H0 284,56 mg/g dan terendah adalah sampel H4 177,63 mg/g; dan untuk aktivitas antioksidan tertinggi adalah sampel H0 73,03% dan terendah sampel H4 47,19%. Berdasarkan hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa biji kakao inferior terserang PBK dan busuk buah karakteristiknya tidak berbeda jauh dengan biji kakao superior non fermentasi.

Hasil uji polifenol biji kakao superior terhadap bakteri *E.coli* sampel H0 menunjukkan KHM 0,157% dan IC50 0,083%; H4 menunjukkan KHM 1,801% dan IC50 0,62%; dan terhadap *B.subtilis* sampel H0 menunjukkan KHM 0,14% dan IC50 0,08%; H4 menunjukkan KHM 0,31% dan IC50 0,13%. Sedangkan untuk polifenol biji kakao inferior terhadap *E.coli* sampel terserang *Phytophthora* menunjukkan KHM 0,327% dan IC50 0,172%; sampel terserang PBK menunjukkan KHM 0,342% dan IC50 0,180%; dan terhadap *B.subtilis* sampel terserang *Phytophthora* menunjukkan KHM 0,34% dan IC50 0,18%; sampel terserang PBK menunjukkan KHM 0,40% dan IC50 0,21%. Secara umum hasil pengamatan menunjukkan bahwa polifenol biji kakao superior dan inferior dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *B.subtilis* secara optimal pada konsentrasi yang berbeda-beda.

SUMMARY

Activity of Polyphenol-Rich Extract from Superior and Inferior Cocoa Beans in PTPN XII Kalikempit-Banyuwangi as Antioxidant and Antibacterial Source; Ernawati, 101710101042; 2015; 81 pages; Department of Agricultural Product Technology Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Indonesia is the third largest producing countries for cocoa (*Theobroma cacao* L.) after Ghana and the Ivory Coast. The diseases that inhibit the development of cocoa in Indonesia are a rotten fruit disease caused by *Phytophthora palmivora* and cocoa pod borer caused by *Conopomorpha cramerella*. These infested cocoa may decrease the quality of cocoa beans affecting abnormal cocoa taste and flavor of chocolate products. Therefore, it is necessary to increase the value of infested cocoa beans by extracting its polyphenol that can be used as a natural antioxidant and antibacterial substances.

The purpose of this research was to observe the characteristics of superior cocoa beans as non fermented and fermented, and inferior cocoa beans as infested by *Phytophthora palmivora* and *Conopomorpha cramerella*, then determine the characteristics of polyphenol-rich extract from superior and inferior cocoa beans, and examine the potential of polyphenol-rich extract as antioxidant and antibacterial substances. This research consisted of three stages which initially was characterisation of superior and inferior of cocoa beans (index fermentation, moisture content, and fat content), the second stages was extraction and characterisation of polyphenol-rich extract (colour, yield, total polyphenol, and antioxidant activity), and the last stage was determination of antibacterial activity of polyphenol-rich extract as a minimum inhibition concentration (MIC) and an inhibition concentration 50 % (IC₅₀) on the growth of bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

The results showed that the highest index fermentation was from fermented cocoa beans (0,98), the highest moisture content was from cocoa beans infested by *C. cramerella* (6,20%), and the highest fat content was from fermented cocoa beans (56,43%). The highest yield of polyphenol-rich extract was from cocoa beans infested by *P.palmivora* (5,84%), colour for all samples

were purple, the highest total polyphenol was from nonfermented cocoa beans (284,56 mg/g), and the highest antioxidant activity of polyphenols extract was from nonfermented beans (73,03%). Polyphenol-rich extract from non fermented beans had a value of MIC and IC₅₀ for *E. coli* were 0,157% and 0,083% respectively; and then for *B. subtilis* were 0,14% and 0,08%, respectively. For polyphenol extract from beans infested by *P. palmivora* showed a value of MIC and IC₅₀ for *E. coli* were 0,327% and 0,172%, respectively, and then for *B. subtilis* were 0,34% and 0,18%, respectively. For polyphenol extract from beans infested by *C. cramerella* had a value of MIC and IC₅₀ for *E. coli* were 0,342% and 0,18%, and then for *B. subtilis* were 0,40% and 0,21.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior dari PTP N XII Kebun Kalikempit-Banyuwangi sebagai Sumber Antioksidan dan Antibakteri”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Yuli Witono, S.TP, MP, selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian;
2. Bapak Ir. Giyarto, M.Si, selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian;
3. Bapak Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc, selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Ir. Sih Yuwanti, MP, selaku Dosen Pembimbing Anggotayang telah sabar memberikan bimbingan, nasehat dan arahan selama penelitian berlangsung hingga terselesaikannya skripsi ini;
4. Bapak Ir. Arief Budiyanto, MM selaku Manager PTPN XII Kebun Kalikempit dan Bapak Juni, SP selaku Wamen PTPN XII Kebun Kalikempit, serta pihak pabrik PTPN XII Kebun Kalikempit Bapak Afid Tri Prasetyo Hadi Utomo, STP, Sadtriyo S, Sugiyanto, Supanto, Imam Hanafi, Awok Efendi, ibu Ponirah, Rizal, Asmuni, ibu Ulfi, Yusuf dan pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Terima kasih atas dukungannya terhadap penelitian ini;
5. Keluargaku yang selalu menyiramiku dengan kasih dan sayangnya melalui doa, nasihat, dan dorongan semangat dalam pelaksanaan penelitian hingga skripsi ini selesai;

6. Segenap teknisi Laboratorium Jurusan Teknologi Hasil Pertanian yakni Neni Novita Y,S.Si., Akhmad Mistar,S.P., Ni Ketut Leseni, AMd., dan Subekah Nawa K., SP.;
7. Sahabatku anggota cerybell yang selalu ada saat suka dan duka, yang selalu menjadi penyamangatku selama ini. Terima kasih sudah mau menjadi sahabatku dan terima kasih atas dukungannya
8. Temen penelitianku: SayiHatiningsih, JatuDyahP, Arsita Zeinka D.
9. Untuk someone terima kasih atas doa dan dukungannya selama ini.
10. Teman-teman teknologi hasil pertanian angkatan 2010 yang selama ini telah banyak memberikan aku pelajaran hidup selama masa kuliah.
11. Semuapihak yang membantuterselesaikannyapenulisanskripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan karya ilmiah ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan alam dan teknologi di bidang pangan.

Jember, 28 Mei 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Buah Kakao	4
2.2 Penggerek Buah Kakao (<i>Conopomorpha cramerella</i>).....	5
2.3 Penyakit Busuk Buah (<i>Phytophthora palmivora</i>)	6
2.4 Polifenol Biji Kakao.....	7
2.5 Antioksidan	11
2.6 Bakteri.....	12
2.6.1 <i>Escherichia coli</i>	13
2.6.2 <i>Bacillus subtilis</i>	14

2.7 Antimikroba	15
2.8 Hipotesis.....	16
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	17
3.2.1 Bahan Penelitian	17
3.2.2 Alat Penelitian	17
3.3 Metode Penelitian	18
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	18
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian.....	18
3.4 Parameter Pengamatan.....	23
3.5 Prosedur Pengamatan dan Analisis	24
3.5.1 Analisis Indeks Fermentasi Biji Kakao Kering	24
3.5.2 Analisis Kadar Air Biji Kakao Kering.....	24
3.5.3 Analisis Kadar Lemak Biji Kakao Kering.....	25
3.5.4 Penentuan Randemen Bubuk Polifenol	26
3.5.5 Penentuan Warna Bubuk Polifenol.....	26
3.5.6 Penentuan Total Polifenol (Metode Singelton)	26
3.5.7 Penentuan Aktivitas Antioksidan	27
3.5.8 Uji KHM dan IC50 (Metode Agar Tuang).....	28
BAB 4. PEMBAHASAN	31
4.1 Karakteristik Biji Kakao Kering Superior dan Inferior	31
4.1.1 Indeks Fermentasi Biji Kakao Kering	32
4.1.2 Kadar Air Biji Kakao Kering.....	33
4.1.3 Kadar Lemak Biji Kakao Kering.....	44
4.2 Karakteristik Bubuk Polifenol Superior dan Inferior	35
4.2.1 Randemen Ekstrak Bubuk Polifenol.....	36
4.2.2 Warna Ekstrak Bubuk Polifenol	37
4.2.3 Total Polifenol Bubuk Polifenol.....	40
4.2.4 Aktivitas Antioksidan Bubuk Polifenol	41

4.3 Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum dan IC50 pada	
Bakteri <i>Eschericia coli</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>	42
4.3.1 Penentuan KHM dan IC50 Pada Bakteri <i>E.coli</i>	43
4.3.2 Penentuan KHM dan IC50 Pada Bakteri <i>B.subtilis</i>	45
4.4 Mekanisme Penghambatan Polifenol terhadap Bakteri <i>E. Coli</i>	
dan <i>B. Subtilis</i>	47
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	49
5.1 Kesimpulan.....	50
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil Perhitungan KHM dan IC50 Pada Bakteri <i>E.Coli</i>	44
4.2 Hasil Perhitungan KHM dan IC50 Pada Bakteri <i>B.subtilis</i>	46



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Polifenol Biji Kakao	8
2.2 Struktur Katekin.....	9
2.3 Struktur Tanin	10
2.4 Struktur Antosianin	11
2.5 Morfologi bakteri <i>Escherichia coli</i>	14
2.6 Morfologi bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	15
3.1 Diagram Alir Pembuatan Bubuk Kakao Rendah Lemak 1	19
3.2 Diagram Alir Pembuatan Bubuk Kakao Rendah Lemak 2.....	20
3.3 Diagram Alir Pembuatan Bubuk Polifenol Kasar.....	21
3.4 Diagram Alir Uji Konsentrasi Hambat Minimum dan IC50.....	23
4.1 Penampakan Biji Kakao Superior dan Inferior	31
4.2 Diagram Rata-rata Nilai Indeks Fermentasi Biji Kakao Kering	32
4.3 Diagram Rata-rata Nilai Kadar Air Biji Kakao Kering.	33
4.4 Diagram Rata-rata Nilai Kadar Lemak Biji Kakao Kering.	34
4.5 Bubuk Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior.....	36
4.6 Diagram Rata-rata Nilai Randemen Bubuk Polifenol	36
4.7 Plot Data Warna Bubuk Polifenol.	38
4.8 Diagram Rata-rata Nilai Chroma Bubuk Polifenol	39
4.9 Diagram Rata-rata Derajat Hue Bubuk Polifenol.....	39
4.10 Diagram Rata-rata Total Polifenol Bubuk Polifenol	41
4.11 Diagram Rata-rata Aktivitas Antioksidan Bubuk Polifenol.....	42
4.12 Grafik Rata-rata Penghambatan Superior Terhadap Bakteri <i>E. coli</i>	43
4.13 Grafik Rata-rata Penghambatan Inferior Terhadap Bakteri <i>E. coli</i>	43
4.14 Grafik Rata-rata Penghambatan Superior Terhadap Bakteri <i>B. subtilis</i>	45
4.15 Grafik Rata-rata Penghambatan Inferior Terhadap Bakteri <i>B. subtilis</i>	46

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Analisis Karakteristik Kimia Biji Kakao Superior dan Inferior	56
A.1 Data Hasil Analisis Indeks Fermentasi Biji Kakao Superior dan Inferior ...	56
A.2 Data Hasil Analisis Kadar Air Biji Kakao Superior dan Inferior	57
A.3 Data Hasil Analisis Kadar Lemak Biji Kakao Superior dan Inferior.....	58
B. Analisis Bubuk Polifenol Kasar Superior dan Inferior	59
B.1 Data Hasil Analisis Rendemen Bubuk Polifenol Kasar	59
B.2 Data Hasil Analisis Warna Bubuk Polifenol Kasar.....	60
B.3 Data Hasil Analisis Total Polifenol.....	62
B.4 Data Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan.....	64
C. Uji KHM dan IC ₅₀ Terhadap Bakteri <i>E.coli</i> dan <i>B.subtilis</i>	65
C.1 Pembuatan Larutan Uji.....	65
C.2 Data Hasil Penentuan Nilai KHM dan IC ₅₀ Terhadap Bakteri <i>E.Coli</i>	66
C.3 Penentuan Log Jumlah log Koloni pada bakteri <i>E.coli</i> pada sampel Superior	68
C.4 Penentuan Jumlah Log Koloni Bakteri <i>E.coli</i> pada Sampel Inferior	69
C.5 Data Hasil Perhitungan KHM terhadap Bakteri <i>B.subtilis</i>	70
C.6 Data perhitungan Log jumlah koloni Bakteri <i>B.subtilis</i> sampel Superior	72
C.7 Data perhitungan Log jumlah koloni Bakteri <i>B.subtilis</i> sampel Inferior.....	73
D. Foto Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri <i>E.coli</i> dan <i>B.subtilis</i> ..	74
D.1. Foto Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri <i>E.coli</i>	74
D.2. Foto Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri <i>B.subtilis</i>	78

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara penghasil kakao (*Theobroma cacao* L.) terbesar ketiga setelah Ghana dan Pantai Gading (Dirjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian, 2013). Kakao merupakan salah satu komoditi perkebunan utama di Indonesia. Menurut Kementerian Perindustrian (2013), area perkebunan kakao di Indonesia mencapai 1,732,641 ha dengan tingkat produksi 803,585 ton biji kering. Penyakit dan hama tanaman kakao merupakan gangguan yang dapat terjadi pada setiap perkebunan kakao, baik perkebunan besar atau perkebunan rakyat, sehingga dapat menjadi penghambat dalam peningkatan produksi kakao.

Menurut Goenadi *et al* (2005), agribisnis kakao di Indonesia masih menghadapi berbagai masalah kompleks antara lain produktivitas rendah akibat serangan hama penggerek buah kakao dan penyakit busuk buah. Secara umum tingkat kerugian hasil di beberapa kebun di Indonesia mampu mencapai 40% pertahunnya (Sulistyowati *et al*, 2003). Buah kakao yang terserang penyakit busuk buah (*Phytophthora palmivora*) dapat menurunkan mutu apabila diproduksi menjadi suatu produk. Penyakit tersebut dapat merusak cita rasa dan aroma khas coklat. Sedangkan buah kakao yang terserang *Conopomorpha cramerella* mengakibatkan kerugian yang besar, yaitu menurunkan berat biji basah, rendemen dan mutu biji, terutama mutu fisik biji kakao yaitu biji saling menempel, keriput dan berwarna hitam. Upaya untuk meningkatkan potensi biji kakao inferior yang terserang hama dan penyakit adalah dengan cara mengekstrak polifenolnya.

Eksplorasi polifenol biji kakao inferior di Indonesia telah dilakukan di berbagai daerah. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian polifenol biji kakao inferior di daerah dataran rendah dengan ketinggian 50-100 m dpl yaitu daerah Blater dan Banjarsari kabupaten Jember. Penelitian sebelumnya telah dilakukan uji penghambatan ekstrak polifenol biji kakao inferior campuran terserang *Conopomorpha cramerella* dan *Phytophthora palmivora* dari kebun

Banjarsari yang menunjukkan bahwa ekstrak polifenol berpengaruh nyata dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis* (Kusuma, 2013). Wahyudin (2013) menyatakan bahwa biji kakao inferior terserang penyakit busuk buah (*Phytophthora palmivora*) menghasilkan rendemen bubuk polifenol tertinggi yaitu 6,85% dan total polifenol tertinggi 30,126% serta menghambat pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis* sebesar 15,44 mm dan 14,12 mm dan menurut hasil penelitian Harmawan (2010) konsentrasi paling efektif untuk menghambat bakteri *E.coli* dan *B.subtilis* yaitu 2500 ppm dengan DDH > 1 cm. Penelitian yang dilakukan Reyhan (2014) didesa Sawur, kecamatan Pojong, kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta dengan ketinggian 150-200 m dpl rendemen bubuk polifenol tertinggi yang dihasilkan sampel fermentasi yaitu 7,11% dan terendah adalah sampel non fermentasi 7,02%, sedangkan total polifenol tertinggi yaitu sampel non fermentasi 19,52% dan terendah sampel fermentasi 9,98%.

Pada penelitian di daerah Blater dan Banjarsari sampel yang digunakan adalah sampel dari pabrik PTPN XII dengan penanganan pasca panen yang tepat, sedangkan sampel yang digunakan pada penelitian di Yogyakarta adalah milik perkebunan rakyat dengan penanganan pasca panen yang kurang tepat. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ketinggian tempat diduga berpengaruh terhadap rendemen bubuk polifenol dan total polifenol. Pada penelitian ini peneliti ingin mempelajari profil ekstrak polifenol biji kakao yang diambil dari PTPN XII kebun Kalikempit-Banyuwangi dengan ketinggian 340 m dpl.

1.2 Perumusan Masalah

Buah kakao yang terserang penyakit busuk buah dan hama penggerek buah kakao memiliki kualitas dan nilai jual yang rendah. Oleh karena itu, alternatif pemanfaatan potensi biji kakao terserang penyakit busuk buah dan penggerek buah kakao adalah dengan memanfaatkan senyawa aktifnya yaitu senyawa polifenol. Kandungan senyawa polifenol pada kakao inferior terserang penyakit busuk buah dan hama penggerek buah kakao di Kebun Kalikempit PTPN

XII- Banyuwangi belum diketahui dibandingkan dengan biji kakao superior *non* fermentasi dan fermentasi serta belum diketahui sifatnya sebagai senyawa antibakteri alami. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kakao superior dan inferior dari kebun Kalikempit sebagai sumber antioksidan dan senyawa antibakteri.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui karakteristik kimia biji kakao inferior dibandingkan dengan biji kakao superior.
2. Mengetahui karakteristik ekstrak polifenol biji kakao inferior dibandingkan dengan biji kakao superior.
3. Mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kakao superior dan inferior sebagai sumber antioksidan dan senyawa antibakteri.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Meningkatkan nilai ekonomi biji kakao inferior terserang penyakit busuk buah dan penggerak buah kakao dengan mengekstrak senyawa polifenol yang terkandung didalamnya.
2. Mendapatkan ekstrak senyawa polifenol biji kakao inferior yang berfungsi sebagai sumber antioksidan dan senyawa antibakteri alami.
3. Memberikan informasi kandungan senyawa polifenol biji kakao inferior dibandingkan dengan biji kakao superior.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Buah Kakao

Buah kakao terdiri atas tiga komponen penyusun utama, yaitu kulit buah, plasenta dan biji. Kulit buah merupakan komponen terbesar dari buah kakao, yaitu lebih dari 70% berat buah masak. Presentase biji kakao didalam buah hanya sekitar 27-29%, sedangkan sisanya adalah plasenta yang merupakan pengikat dari 30-40 biji. Biji kakao terdiri atas 2 bagian utama, yaitu kulit biji (10 - 14 %) dan keping biji atau kotiledon (86 – 90 %) dari berat biji kering (Mulato *et al*, 2005). Buah kakao yang masak memiliki kulit tebal dan berisi air sekitar 30-40 biji yang diselimuti oleh *pulp* yang berwarna putih dan berlendir. *Pulp* yang menyelimuti inti biji kakao sebagian besar adalah air dan sebagian kecil gula. Pada buah kakao biji tersusun dalam 5 baris yang melekat pada plasenta, jumlahnya beragam antara 20-50 biji perbuah (Nasution,1976).

Kakao forastero banyak diusahakan di berbagai negara produsen kakao dan menghasilkan biji kakao yang mutunya sedang atau *bulk cocoa*, atau lebih dikenal juga sebagai *ordinary cocoa*. Kakao jenis ini memiliki ciri-ciri antara lain buahnya berwarna hijau, kulitnya tebal, biji buahnya tipis/gepeng dan kotiledon berwarna ungu pada waktu basah. Jumlah dari kakao forastero sekitar 93% dari produksi kakao dunia dan merupakan jenis bulk yang dihasilkan Afrika Barat, Brazil dan Dominika (Sunanto, 1992).

2.2 Hama Penggerek Buah Kakao (*Conopomorpha cramerella*)

Hama penggerek buah kakao merupakan hama yang sangat merugikan bisnis kakao di Indonesia. Hama ini menyerang buah kakao mulai dari yang masih muda (panjang \pm 8 cm) sampai buah menjelang masak. Stadium yang menimbulkan kerusakan pada tanaman kakao adalah stadium larva. Larva PBK cenderung memakan daging buah dan saluran makanan yang menuju biji, walaupun tidak sampai menyerang biji. Gejala serangan baru biasanya tampak dari luar, yaitu pada saat buah mulai dewasa. Serangan ditandai dengan

memudarnya warna kulit buah, munculnya belang berwarna hijau kuning atau merah jingga, dan bila dikocok tidak berbunyi. Gejala serangan akan semakin terlihat saat buah dibelah, yaitu ditandai dengan daging buah yang tampak berwarna hitam dengan biji-biji melekat satu sama lain, keriput, dan bobotnya sangat ringan (Wahyudi *et al*, 2008).

Serangan PBK yang terjadi pada saat buah masih muda mengakibatkan kerusakan yang cukup berat karena biji saling melekat dan akan melekat kuat pada kulit buah sehingga berpengaruh terhadap kuantitas dan kualitas biji kakao. Serangan PBK pada tingkat ringan sudah mengakibatkan kerugian yang cukup besar, yaitu menurunkan berat biji basah, hasil rendemen dan mutu. Penurunan mutu biji kakao meliputi penurunan ukuran biji, kadar kulit meningkat, biji saling melekat dan penampakan biji yang kurang baik. Pada tingkat serangan sedang, biji hanya dapat diolah dengan cara dikeringkan sehingga mutu biji rendah (tanpa fermentasi), persen biji yang pecah tinggi, kadar keping biji rendah, kadar kulit biji tinggi, kadar keping biji rendah, serta penampakan biji kotor. Pada serangan berat, biji kakao sudah tidak dapat dimanfaatkan lagi karena sulit dipisahkan dari kulit buah (Wahyudi *et al*, 2008).

Buah kakao yang paling disukai untuk tempat meletakkan telur adalah yang memiliki alur dalam pada permukaannya serta berukuran lebih dari 8 cm. Lama hidup ngengat betina adalah 5- 8 hari dan setiap serangga betina mampu menghasilkan telur sebanyak 100-200 butir. Telur ngengat penggerek buah kakao berbentuk oval dengan panjang 0,45-0,50 mm dan lebar 0,25-0,30 mm, pipih, berwarna orange pada saat baru diletakkan, dan kemudian berubah menjadi abu-abu kehitaman apabila akan menetas. Telur penggerek buah kakao lebih banyak diletakkan pada buah-buah yang berukuran panjang lebih dari 10 cm. Lama stadium telur berkisar antara 2-7 hari. Larva yang baru menetas dari telur berwarna putih transparan dengan panjang kurang lebih 1 mm. Larva tersebut langsung menggerek ke dalam buah dan memakan permukaan dalam kulit buah, daging buah, dan saluran makanan ke biji (plasenta). Lama stadium larva sekitar 14-18 hari, terdiri atas 4 instar. Pada pertumbuhan penuh, panjangnya 12 mm dan berwarna putih kotor sampai hijau muda. Menjelang pembentukan kepompong

(pupa), larva membuat lubang keluar pada kulit buah dengan diameter 1 mm. Setelah berada diluar buah, larva tersebut akan segera merayap pada permukaan buah atau menjatuhkan diri dengan pertolongan benang sutra untuk mencari tempat membuat kepompong. Sebelum menjadi kepompong, larva terlebih dahulu memintal benang sutra untuk membuat rumah kepompong (kokon) (Wahyudi *et al*, 2008).

Menurut Goenadi *et al* (2005) *Conopomorpha cramerella* mempunyai kemampuan berkembang biak relatif sangat cepat, serangga ini hanya memerlukan waktu sekitar 26-33 hari untuk melengkapi siklus hidupnya. Stadium yang merusak dari hama ini adalah stadium ulat yang dapat menyerang hampir semua fase buah kakao, mulai saat buah berukuran 3-8 cm. Ulat merusak buah kakao dengan cara menggerak buah, memakan kulit buah, daging buah dan saluran ke biji sehingga biji-biji saling melekat, berwarna kehitaman, sulit dipisahkan dan berukuran lebih kecil.

2.3 Penyakit Busuk Buah (*Phytophthora palmivora*)

Penyakit busuk buah adalah salah satu penyakit pada buah kakao yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* Bult ciri-cirinya adalah timbulnya bercak coklat kehitaman yang biasanya dimulai dari ujung atau pangkal buah. Bila keadaan lingkungan mendukung maka jamur akan cepat menyebar ke seluruh bagian buah dan buah berwarna hitam (Susanto,1994). Apabila gejala busuk buah muncul pada buah yang masih muda, pada waktu biji masih menempel pada daging buah, maka biji akan mengkerut dan menghambat pertumbuhan biji. Akan tetapi, jika penyakit ini muncul pada waktu biji sudah masak secara fisiologis biasanya tidak banyak terganggu, walaupun biji yang terserang tetap harus dipisahkan dari biji yang sehat agar tidak terjadi kontaminasi (Sunanto, 1992).

Penyakit buah disebarkan melalui sporangium atau kladospora yang terbawa air hujan atau dapat melalui perantara serangga seperti semut, bekicot, tupai, tikus, dan terjadi kontak antara buah yang sehat dengan buah yang terserang penyakit. Buah kakao yang terserang penyakit busuk buah akan menimbulkan kehilangan keseluruhan biji yang dikandungnya (Sukanto, 2002). Penyakit busuk

buah dapat berkembang biak dengan cara aseksual dan seksual. Secara aseksual yaitu dengan cara membentuk sporangium. Keadaan lingkungan yang lembab dengan suhu sekitar 25⁰C, sporangium yang telah masak langsung berkecambah membentuk tabung kecambah atau membentuk zoospore yang berflagella sehingga dapat bergerak. Apabila lingkungan menguntungkan akan terjadi perkecambahan setelah tiga puluh menit pada saat zoospore berhenti bergerak, tetapi jika keadaan lingkungan tidak menguntungkan, maka akan terbentuk *chlamydospore* atau kista (Manohara *et al*, 2005).

2.4 Polifenol Biji Kakao

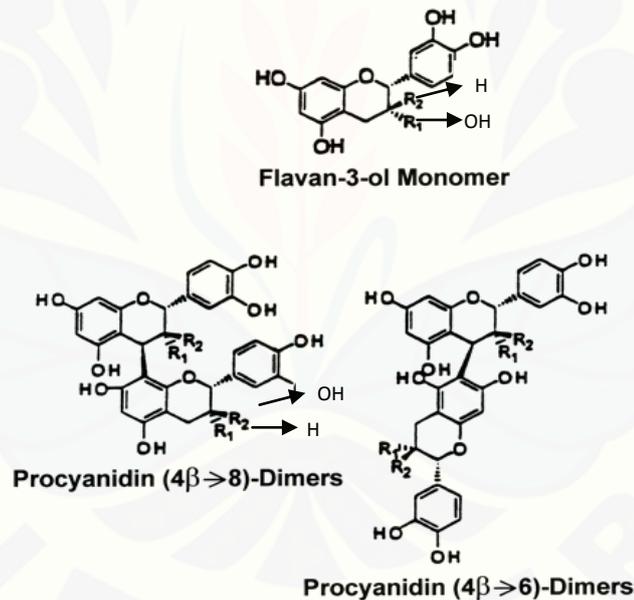
Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yaitu memiliki banyak gugus phenol dalam molekulnya. Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar (Hosttetman *et al*, 1985). Biji kakao tergolong bahan pangan penghasil senyawa polifenol paling tinggi di antara jenis bahan pangan yang lain. Biji kakao hasil panen mempunyai warna ungu dominan yang mengindikasikan kandungan senyawa polifenol yang tinggi. Flavonoid biji kakao merupakan senyawa polifenol, yang terdiri atas 37% monomer flavanol [- epikatekin dan +katekin], 4% antosianin dan 58% polimer flavanol prosianidin. Selama fermentasi, 60-70% senyawa polifenol dalam biji kakao terurai secara enzimatis sehingga kandungan polifenolnya menurun menjadi tinggal 3-5% dari biji kakao kering (Mulato dan Suharyanto, 2011)

Biji kakao segar mengandung total polifenol 12-18% (b/b), atau dalam bentuk flavonoid katekin sekitar 34,65 sampai 43,27 mg/g biji kakao bebas lemak, dan tergantung varietas kakao dan daerah asal (Kim dan Keeney,1983; Shahidi dan Naczk, 1995). Selama pengolahan sejak dari fermentasi biji kakao sampai dengan produk olahan siap saji kandungan total polifenol berkurang, dan pada bubuk kakao instant kandungan polifenolnya 6,46 mg/g (Bonvehi dan Coll, 1997).

Senyawa polifenol mudah mengalami kerusakan terutama karena oksidasi, dan akibat oksidasi dapat menyebabkan kerangka dasar molekul polifenol mengalami degradasi, selanjutnya gugus fungsional OH dan ikatan C=C

berkurang dan dapat membentuk ikatan C=O. Degradasi kerangka dasar molekul polifenol flavonoid menghasilkan dua molekul baru masing-masing mempunyai gugus asam karboksilat. Oksidasi polifenol dipengaruhi oleh suhu dan lama senyawa tersebut terpapar pada oksigen dari udara (Heywood, 1972; Markis dan Rossiter, 2001).

Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh adanya gugus hidroksil pada senyawa tersebut yang berbeda jumlah dan posisinya. Dengan demikian, ekstraksi menggunakan berbagai pelarut akan menghasilkan komponen polifenol yang berbeda pula. Sifat antibakteri yang dimiliki oleh setiap senyawa yang diperoleh dari ekstraksi tersebut juga berbeda. Sebesar 1% dari komponen polifenol tersebut adalah flavono glikosida. Susunan dasar monomer flavan-3-ol dan prosianidin ditunjukkan pada **Gambar 2.1**



Gambar 2.1 Struktur Polifenol Biji Kakao

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

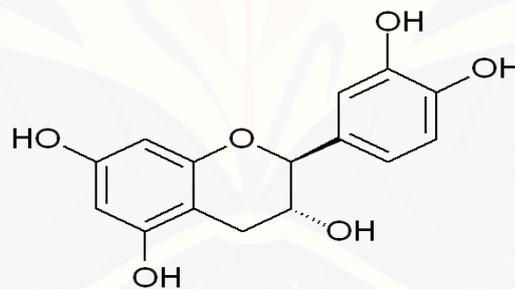
(Weisburger,2005). Komponen polifenol pada biji kakao dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Kompenen polifenol biji kakao

No	Nama Senyawa	Persentase
1	Katekin	37%
2	Antosianin	4%
3	Prosianidin	58%

a. Katekin

Katekin merupakan senyawa polifenol alami, metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tanin. Katekin mempunyai rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$, tidak berwarna, dan dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, larut dalam alkohol dan *etil asetat*, hampir tidak larut dalam *kloroform*, *benzen* dan *eter*. Katekin merupakan senyawa fenolik yang kompleks (polifenol). Struktur senyawa katekin dapat dilihat pada **Gambar 2.2**



Gambar 2.2 Struktur Katekin

b. Tanin

Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan yang terpisah dari protein dan enzim sitoplasma. Tanin tidak larut dalam pelarut non polar, seperti eter, kloroform dan benzena tetapi mudah larut dalam air, dioksan, aseton, dan alkohol serta sedikit larut dalam etil asetat (Harborne, 1987).

Tanin terbentuk dari senyawa fenol yang berikatan atau bergabung dengan senyawa fenol-fenol yang lain sehingga membentuk polifenol dan pada akhirnya membentuk senyawa tanin (Pansera, 2004). Menurut Lingawati (2002) monomer

tanin adalah digallic acid dan D-glukosa, ekstrak tannin terdiri dari campuran senyawa polifenol yang sangat kompleks dan biasanya bergabung dengan karbohidrat, dengan adanya gugus fenol maka tanin akan dapat berkondensasi dengan formaldehid

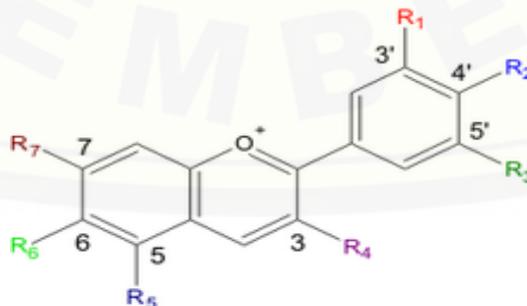


Gambar 2.3 Struktur Tanin (Weisburger, 2005)

c. Antosianin

Antosianin merupakan salah satu senyawa polifenol yang terdapat pada biji kakao sehingga biji kakao memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Wiyono, 2002 dalam Nuciferani, 2004). Antosianin tergolong pigmen yang disebut flavonoid. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987). Menurut Meskin *et al* (2002), aktivitas antioksidan dari senyawa fenol berhubungan dengan struktur senyawa fenol. Keberadaan gugus hidroksil atau metoksi pada posisi orto atau para dari turunan asam benzoat, penil propanoid atau flavonoid (isoflavon) diketahui dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari senyawa fenol.

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, dan air (Markham, 1988).

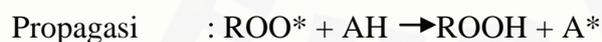
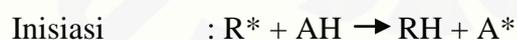


Gambar 2.4 Struktur Antosianin (Weisburger, 2005)

2.5 Antioksidan

Menurut Winarsi (2011), antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Reaktifitas senyawa antioksidan tergantung pada jumlah gugus hidroksil [-OH] yang terikat dalam gugus flavanol. Semakin banyak gugus hidroksinya, kekuatan antioksidannya semakin tinggi. Senyawa flavonoid biji kakao termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat aktif dalam melindungi sel-sel tubuh dari serangan radikal bebas dan juga mudah diserap oleh tubuh (Mulato dan Suharyanto, 2011). Produk kakao mempunyai aktivitas antioksidatif cukup besar, lebih besar daripada teh dan beberapa buah-buahan yang telah dikenal sebagai sumber antioksidanalami (Wilkinson, 1999). Pada biji kakao senyawa polifenol golongan flavonoid, katekin adalah paling berperan dalam aktivitas antioksidasi (Hamid dan Mustafa, 1998; Osakabe dkk., 1997; Sanbongi *et al.*, 1998).

Senyawa antioksidan alami polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat beraksi sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, dan peredam terbentuknya singlet oksigen. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dikategorikan menjadi 2, yaitu antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer merupakan antioksidan yang berfungsi sebagai pemberi atom hidrogen. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil. Sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida mengikuti persamaan reaksi berikut (Aulia, 2009).



Mekanisme kerjanya mengikuti tahapan pemberian hidrogen dan pemberian elektro, penambahan lipida pada cincin aromatik antioksidan, selanjutnya pembentukan kompleks antara lipida dan cincin aromatik antioksidan. Antioksidan sekunder merupakan antioksidan yang berfungsi memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

Antioksidan sekunder ini bekerja dengan satu atau lebih mekanisme berikut: (a) memberikan suasana asam pada medium (sistem makanan), (b) meregenerasi antioksidan utama, (c) mengkelat atau mendeaktifkan kontaminan logam prooksidan, (d) menangkap oksigen dan (e) mengikat singlet oksigen dan mengubahnya ke bentuk triplet oksigen (Aulia, 2009).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami merupakan hasil ekstraksi bahan alami seperti buah anggur, jeruk, apel, dan kakao. Sedangkan antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia dalam laboratorium.

2.6 Bakteri

Bakteri berasal dari kata "bakterion" (bahasa Yunani) yang berarti tongkat atau batang. Istilah bakteri ini sekarang banyak dipakai untuk tiap mikroba yang bersel satu. Bakteri ditemukan pertama kali oleh ilmuwan Belanda bernama Anthony van Leewenhoek. Bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang berkembang biak dengan cara membelah diri dan hanya dapat dilihat dengan mikroskop. Bakteri termasuk golongan organisme prokariotik, yaitu tubuhnya terdiri atas sel yang tidak mempunyai selaput pembungkus inti (Fardiaz, 1989).

Beberapa bakteri dikenal sebagai penyebab infeksi dan penyakit pada manusia. Berdasarkan bentuk dasarnya, bakteri dibagi menjadi 3 yaitu: batang (basil), bulat (kokus), dan lengkung (koma/vibrion, dan spiral). Umumnya sel-sel bakteri yang berbentuk batang dan bulat seringkali membentuk kumpulan sel. Kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel berbentuk batang antara lain diplobasil (berpasangan dua-dua) dan streptobasil (seperti rantai). Sedangkan kumpulan sel yang mungkin dibentuk oleh sel-sel yang berbentuk bulat antara lain diplokokus (berpasangan dua-dua), streptokokus (seperti rantai), stafilokokus (bergerombol), tetrakokus (seperti bujur sangkar dengan empat sel) dan sarkina (seperti kubus delapan sel). Umumnya sel bakteri berbentuk bulat mempunyai diameter sekitar 0,7 – 1,3 mikron, sedangkan sel bakteri yang berbentuk batang lebarnya sekitar 0,2 – 2,0 mikron dan panjangnya 0,7 – 3,7 mikron. Berdasarkan

pewarnaan gram, bakteri dapat dibedakan menjadi dua golongan yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif yang umum dikenal adalah *Bacillus*, *Streptococcus*, dan *Staphylococcus*. Sedangkan bakteri gram negatif yang umum dikenal adalah *Escherichia coli* dan *Salmonella*. Kedua golongan tersebut mempunyai dinding sel yang berbeda-beda susunan kimianya. Dinding sel bakteri gram negatif lebih rumit susunannya daripada bakteri gram positif. Ukuran sel bakteri sering kali dipengaruhi oleh umur bakteri, perubahan lingkungan dan cara pewarnaan sel bakteri (Timotius, 1982).

Adapun bagian-bagian sel bakteri dibagi menjadi tiga golongan yaitu: dinding sel, protoplasma (membran sel, mesosom, ribosom, nukleoid, endospora, dan lain-lain) dan bagian sel yang terletak di luar dinding sel (kapsul, flagel) (Volk, 1993).

2.6.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli tersebar luas di alam dan lazim ditemukan dalam sel pencernaan manusia dan hewan. Spesies *Escherichia coli* tidak menghasilkan pigmen, tetapi terkadang menghasilkan pigmen berwarna kuning. *Escherichia coli* tersebar diseluruh dunia dan ditularkan bersama air atau makanan yang terkontaminasi oleh feses. *Escherichia coli* berbentuk batang, tebal 0,5 μ m, panjang antara 1,0-3,0 μ m, bervariasi dari bentuk koloid sampai berbentuk seperti filament yang panjang; tidak berbentuk spora; motil dan filament perithin beberapa galur tidak memiliki flagella, bersifat gram negatif. *Escherichia coli* bersifat aerob atau kualitatif anaerob, dapat tumbuh pada media buatan. Beberapa sifat *E.coli* antara lain pertumbuhan optimum pada suhu 37°C, dapat tumbuh pada suhu 15°C-45°C, tumbuh baik pada pH 7,0 tapi tumbuh juga pada pH yang lebih tinggi (Fardiaz, 1989). Morfologi sel bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada **Gambar 2.5**

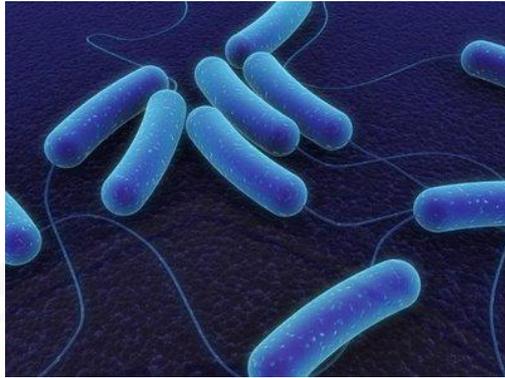


Gambar 2.5 *Escherichiacoli* (Sumber : <http://www.wikilinks.fr/escherichia-coli-en-photo/>)

Bakteri *Escherichia coli* relative sangat sensitive terhadap panas dan dapat diinaktifkan pada suhu pasteurisasi makanan atau selama pemasakan makanan. *Escherichia coli* disebut juga koliform fekal karena ditemukan pada saluran usus hewan dan manusia. Bakteri *Escherichia coli* sering digunakan sebagai indikator kontaminasi kotoran. *Escherichia coli* yang termasuk jenis Entero patogenik (EEC) mampu memproduksi toksin yang dapat menyebabkan penyakit. Enteropatogenik *Escherichia coli* (EEC) menghasilkan dua enterotoksin, yaitu toksin yang tidak tahan panas yang hancur oleh pemanasan 60°C selama 15 menit serta toksin yang tahan panas dan tetap aktif meskipun dipanaskan selama 30 menit pada suhu 100°C. Makanan yang sering terkontaminasi adalah daging ayam, daging sapi, ikan, telur dan produk telur, sayuran, buah-buahan dan sari buah (Fardiaz, 1989).

2.6.2 *Bacillus subtilis*

Bakteri *Bacillus subtilis* biasanya ditemukan di dalam tanah, berbentuk batang, *B. subtilis* bukanlah patogen manusia, dapat mencemari makanan, tetapi jarang menyebabkan keracunan makanan. *B. subtilis* dapat memproduksi enzim proteolitik subtilisin. Spora *B. subtilis* dapat bertahan pada panas yang ekstrim saat memasak. Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan golongan bakteri Gram positif, berbentuk batang lurus yang tersusun dalam bentuk rantai dan bergerak. Bakteri ini berukuran 1,5 μ x 4,5 μ (Gupte, 1990). Morfologi sel bakteri *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada **Gambar 2.6**



Gambar 2.6 *Bacillus subtilis* (Sumber: <http://www.agarratealamata.com>)

2.7 Antimikroba

Antimikroba adalah zat yang berfungsi untuk membunuh dan menghambat pertumbuhan mikroba. Berdasarkan jenis antimikrobanya dapat digolongkan menjadi dua golongan, yaitu bakteriostatik, yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dan bakterisida yang dapat membunuh bakteri.

Suatu senyawa antimikroba dapat bersifat bakteriostatik atau bakterisida tergantung dari beberapa faktor, yaitu jenis mikroba, konsentrasi, waktu dan jumlah mikroba, temperatur, bahan organik asing, keasaman, dan kebasaaan. Mekanisme kerja dari zat antimikroba dapat meliputi: (1) Penghambatan sintesis dinding sel, (2) Penghambatan fungsi membran sel, (3) Penghambatan sintesis protein, (4) Penghambatan sintesis asam nukleat, dan (5) Penghambatan reaksi enzimatik (Jawetz, 1996).

Membran sel bakteri terbentuk dari susunan fosfolipid yang termasuk dalam fosfolipid antara lain *fosfatidylcholine*, *sphingomyelin*, dan fosfolipid lainnya. Rusaknya keutuhan membran sel bakteri disebabkan oleh *catechin* yang merusak *fosfatidylcholine* sehingga terjadi kebocoran dari 5,6 *carboxyfluorescein* yang terkandung didalamnya. Selain itu *catechin* juga mempunyai aktivitas antitoksin terhadap verotoksin. *Escherichia coli* jenis yang lainnya, para peneliti menduga bahwa *catechin* dapat berperan sebagai antimikroba disebabkan karena *catechin* mudah melekat pada protein bakteri sehingga mencegah bakteri melekat pada dinding sel inang, yang menyebabkan bakteri tidak dapat merusak sel-sel tubuh.

Menurut Fardiaz (1989), zat antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal, fungistatik atau menghambat germinasi spora bakteri. Kemampuan suatu zat antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh berbagai faktor, yaitu : (1) konsentrasi zat antimikroba, (2) suhu lingkungan, (3) waktu penyimpanan, (4) sifat-sifat mikroba, meliputi jenis, jumlah, umur, dan keadaan mikroba, (5) sifat-sifat fisik dan kimia makanan termasuk kadar air, pH, jenis, dan jumlah senyawa di dalamnya (Frazier dan Westhoff, 1988).

Ray (2001) menyatakan bahwa kriteria ideal suatu senyawa antimikroba antara lain harus memiliki sifat-sifat sebagai berikut : aman, ekonomis, tidak menyebabkan perubahan flavor, citarasa dan aroma makanan, tidak mengalami penurunan aktivitas karena adanya komponen makanan, tidak menyebabkan timbulnya galur resisten, sebaiknya bersifat membunuh daripada hanya menghambat pertumbuhan mikroba.

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah

1. Biji kakao inferior terserang penyakit busuh buah (*Phytophthora palmivora*) dan Penggerek Buah Kakao (*Conopomorpha cramerella*) dapat menjadi sumber polifenol alami.
2. Ekstrak polifenol biji kakao inferior terserang penyakit busuh buah (*Phytophthora palmivora*) dan Penggerek Buah Kakao (*Conopomorpha cramerella*) mampu menghambat laju pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Laboratorium Rekayasa Penelitian dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari 2014 sampai Desember 2014.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah biji kakao jenis bulk atau forastero superior *non* fermentasi dan fermentasi serta biji kakao inferior terserang *Phytophthora palmivora* dan biji kakao terserang *Conopomorpha cramerella* dari PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi, petroleum benzena, pereaksi Follin-Ciocalteu, larutan Na_2CO_3 , aseton, larutan katekin, reagen DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidroksil), akuades, benang wol, kertas saring, aluminium foil, larutan IF (metanol dan HCl), spirtus, NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), alkohol 70%, DMSO 2%, kultur bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah Cutter, Soxhlet apparatus, oven merk selecta, eksikator, spektrofotometer UV-Vis, kuvet, neraca analitik merk Ohaus Pioneer, pH meter, blender, pengepres hidrolis, Lab –line Duo-Vac oven Melrose Park made in USA, toples kaca, alat-alat gelas, penangas air, *colour reader* CR-10 merk Minolta, shaker waterbath “Unitronic-OR-Selecta”, pipet mikro, *blue tip*, magnetig stirrer, cawan petri, *yellow tip*, bunsen, vortex, eppendorf, pemanas listrik, *laminar air flow* merk CRUMAIR 9005-FL, incubator Merk Heraeus instrument made in Germany, sentrifuge merk Centronic-selecta, Stuart scientific

colony counter made in UK, Buchi Rotavapor R-124 dan Buchi waterbath B-480, autoklaf merk Hirayama dan ose.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan biji kakao jenis superior dan inferior. Biji kakao superior yang digunakan terdiri dari dua macam yaitu biji kakao *non* fermentasi (H0) dan fermentasi (H4), sedangkan biji kakao inferior terdiri dari biji kakao terserang *P. palmivora* (PYT) dan biji kakao terserang *C.cramerella* (PBK). Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu tahap pertama analisis karakteristik kimia biji kakao superior dan inferior. Tahap kedua adalah ekstraksi dan karakterisasi ekstrak polifenol kasar, dan tahap ketiga adalah pengujian ekstrak polifenol biji kakao sebagai senyawa antibakteri dan antioksidan.

Penelitian ini bersifat deskripsi. Data hasil penelitian disusun dalam bentuk tabel, kemudian dirata – rata dan dibuat grafik untuk selanjutnya diinterpretasikan sehingga didapat kesimpulan.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap, yaitu :

1. Tahap Pertama

Karakterisasi kimia biji kakao superior dan inferior yang meliputi indeks fermentasi, kadar air, dan kadar lemak.

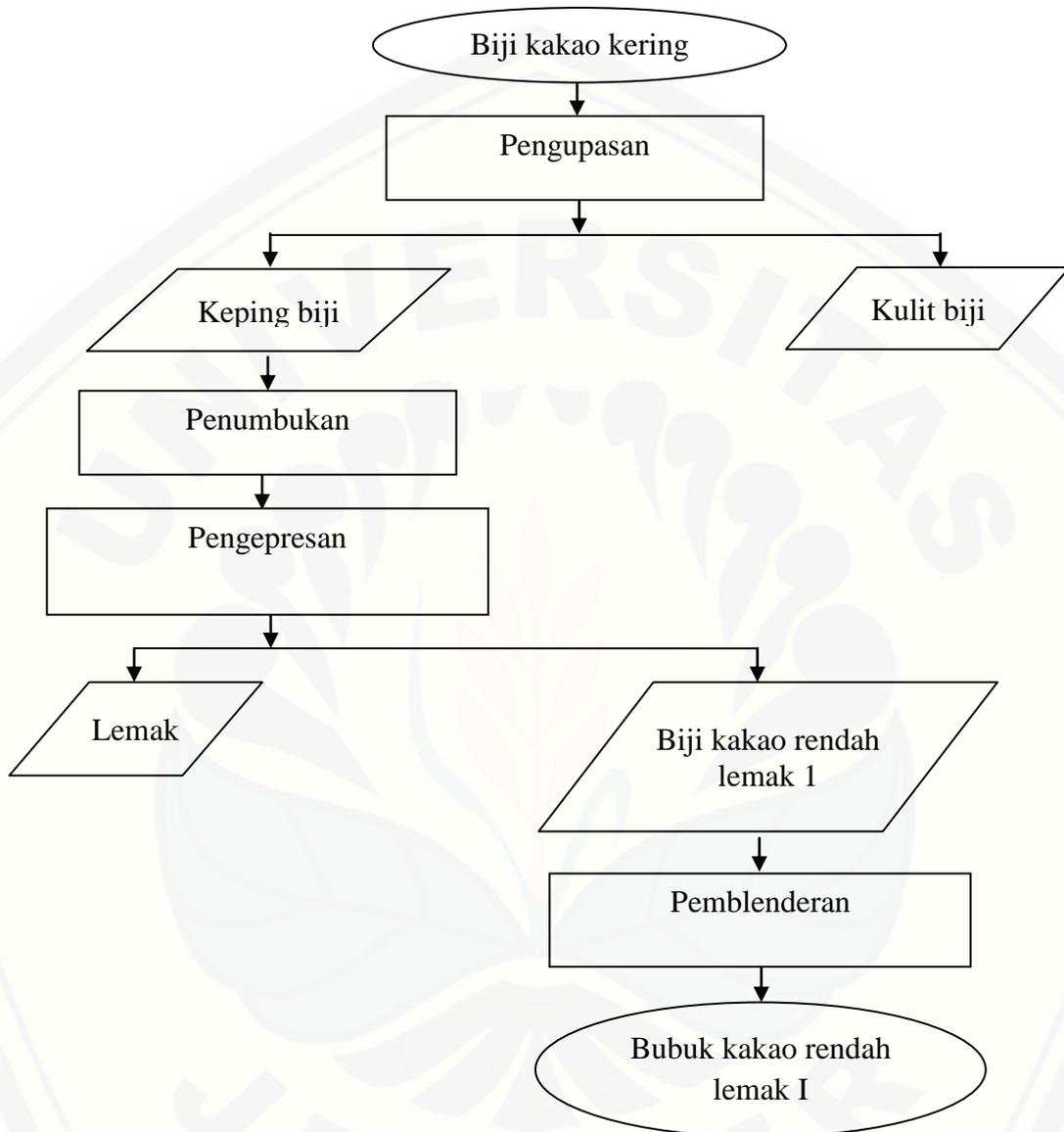
2. Tahap Kedua

Pada tahap ini dilakukan ekstraksi dan karakterisasi ekstrak bubuk polifenol kasar biji kakao superior dan inferior. Karakterisasi bubuk polifenol meliputi rendemen, warna, total polifenol, dan aktivitas antioksidan. Pembuatan ekstrak polifenol adalah sebagai berikut :

a.. Pembuatan bubuk kakao rendah lemak I

Biji kakao kering yang diperoleh dikupas yaitu untuk memisahkan antara keping biji dan kulit biji, kemudian ditumbuk kasar untuk mempermudah pengepresan. Setelah itu pemisahan lemak (*defating*) dari padatannya (bubuk kasar rendah lemak I). Selanjutnya diblender sehingga diperoleh bubuk kakao

rendah lemak I lebih halus. Proses pembuatan bubuk kakao rendah lemak I dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.

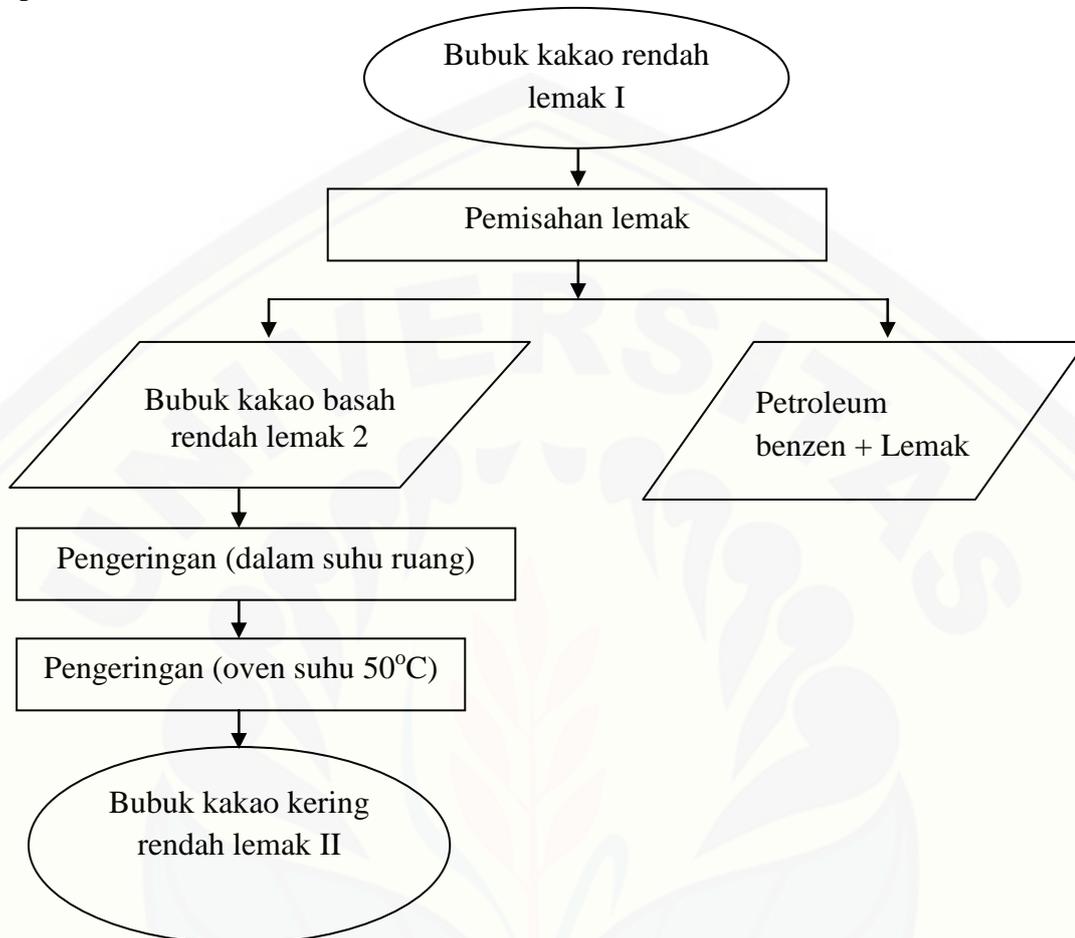


Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan Bubuk Kakao Rendah Lemak I

b. Pembuatan bubuk kakao rendah lemak II

Bubuk kakao rendah lemak I yang dihasilkan dibungkus dengan kertas saring dan diikat dengan benang wol, kemudian direndam dengan petroleum benzen dalam toples kaca dan digojog selama 5 jam dengan shaker pada kecepatan 103 rpm. Kemudian bubuk diangkat dan dikeringkandioven selama ± 2

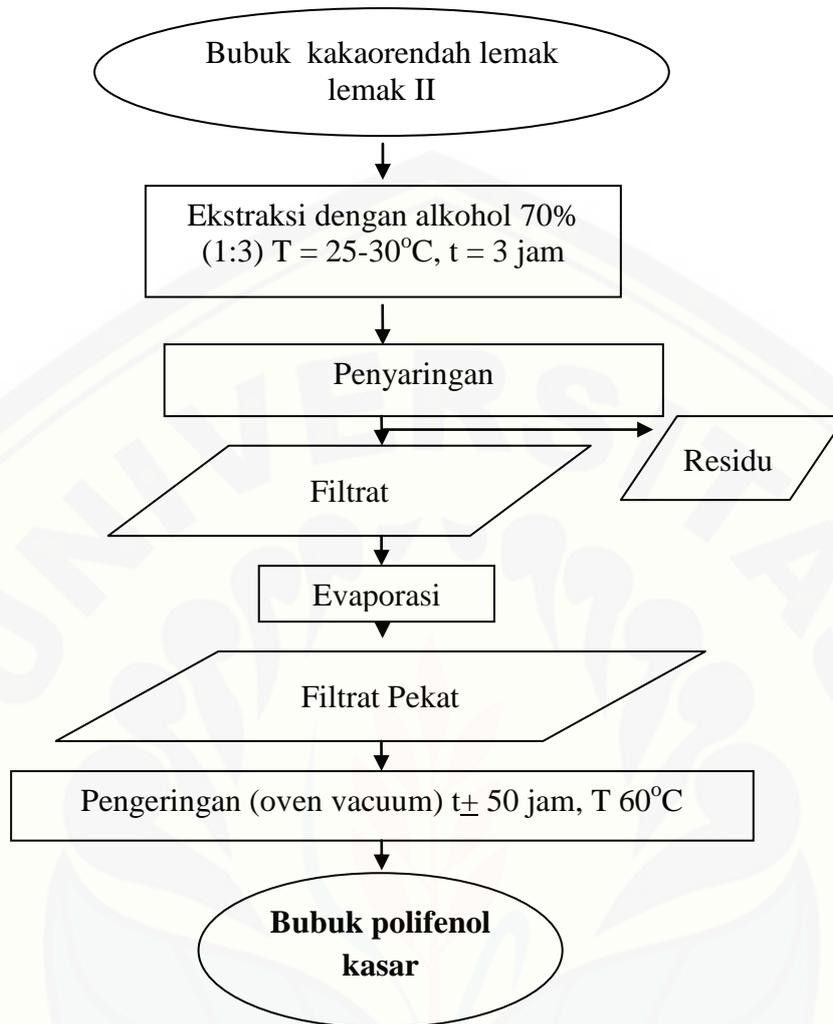
jam pada suhu 50°C. Proses pembuatan bubuk kakao rendah lemak II dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



Gambar 3.2. Diagram Alir Pembuatan Bubuk Kakao Rendah Lemak II

c. Pembuatan bubuk polifenol kasar

Bubuk kakao rendah lemak II diekstrak polifenolnya dengan alkohol 70% selama 3 jam dengan perbandingan 1:3 (bahan : pelarut) pada suhu 25-30°C dengan shaker waterbath selama 3 jam. Kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat mengandung polifenol dievaporasi dengan evaporator berputar vakum pada suhu 45°C. Selanjutnya filtrat pekat dikeringkan dengan oven vakum selama ± 50 jam pada suhu 60°C. Proses pembuatan bubuk polifenol kasar dapat dilihat pada **Gambar 3.3**.



Gambar 3.3.Diagram Alir Pembuatan Bubuk Polifenol Kasar dengan Pelarut Alkohol 70%

3. Tahap Ketiga

Pada tahap ini dilakukan uji penghambatan dengan penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum dan IC₅₀. Menurut Cosentio *et al* (1999) KHM atau MIC adalah konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lebih dari 90%. Bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Diagram alir uji KHM dan IC₅₀ dapat dilihat pada **Gambar 3.4**.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua peralatan yang akan digunakan dibungkus kertas koran dan bahan-bahan yang akan digunakan (kecuali ekstrak) disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Dwidjoseputro, 1990).

b. Media Nutrient Agar (NA)

Agar NA sebanyak 4 g ditambah 200 ml aquades yang telah dihangatkan kedalam tabung erlenmeyer. Campuran dididihkan diatas *hot plate* sampai NA benar - benar larut. Media NA disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

c. Media Nutrient Broth (NB)

Sebanyak 0,08 g serbuk NB dilarutkan dengan 10 ml aquades tanpa pemanasan, diaduk sampai benar-benar larut. Larutan media NB disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

d. Pembuatan Larutan Fisiologis NaCl 0,9%

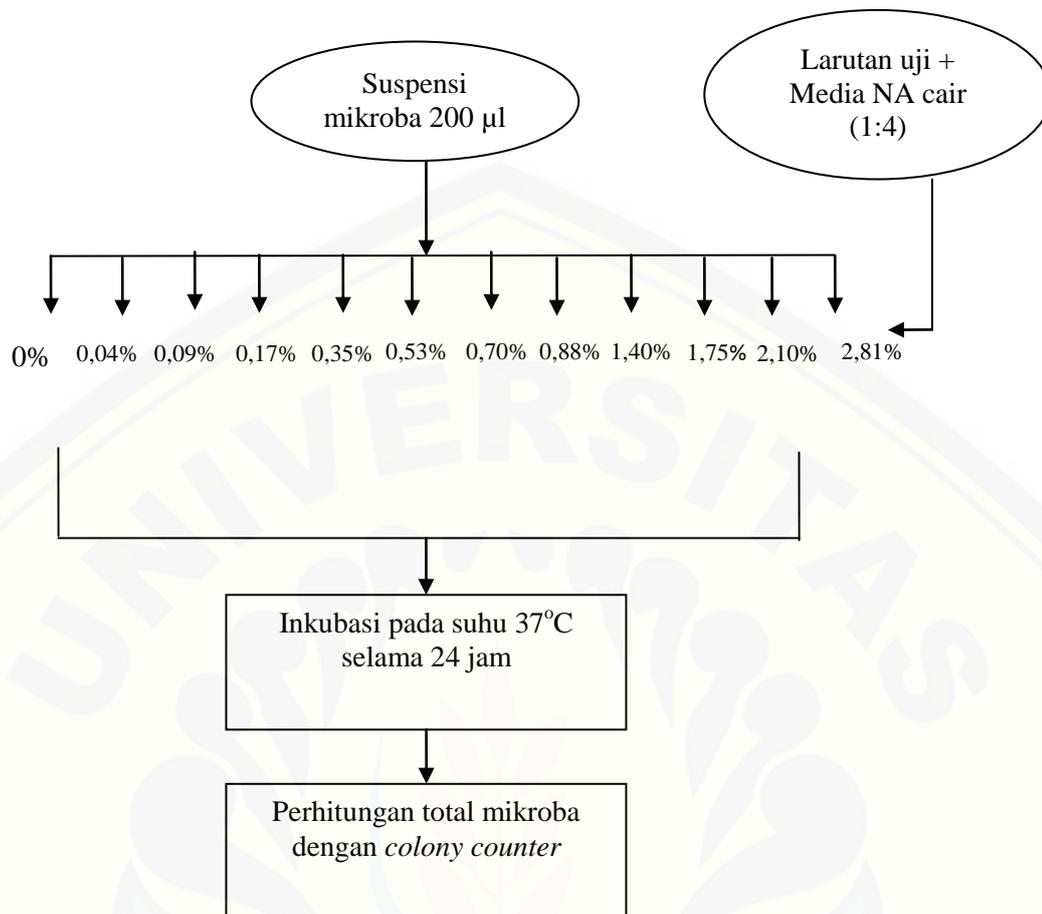
Sebanyak 0,85 g serbuk NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

e. Pembuatan suspensi bakteri

Sebanyak 1 ose bakteri dari kultur stok agar miring NA diambil dengan ose steril dan dimasukkan ependorf yang berisi 1 ml media NB, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml media NB yang telah diinkubasi kedalam 9 ml NaCl 0,85%.

f. Pembuatan larutan uji

Pada pengujian KHM digunakan ekstrak polifenol dengan konsentrasi uji 0%, 0,04%, 0,09%, 0,17%, 0,35%, 0,53%, 0,70%, 0,88%, 1,40%, 1,75%, 2,10% dan 2,81%. Sebelumnya dibuat larutan stok polifenol yang akan dibuat larutan uji, setelah itu dicampur dengan bahan lainnya seperti DMSO 2%, laris dan media NA yang masih hangat. Perhitungan larutan Uji dapat dilihat pada **lampiran C.1**.



Gambar 3.4 Diagram Alir Uji Konsentrasi Hambat Minimum dan IC50

3.4 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Analisis karakteristik biji kakao kering superior dan inferior meliputi :
 - 1) Index fermentasi (IF) (Misnawi *et al*, 2003);
 - 2) Kadar air (SNI 2323:2008); dan
 - 3) Kadar lemak (SNI 2323:2008).
- b. Analisis karakteristik bubuk polifenol kasar biji kakao superior dan inferior meliputi :
 - 1) Rendemen bubuk polifenol kasar (Misnawi *et al*, 2003);
 - 2) Total polifenol (Metode Follin-Ciocalteu);

- 3) Warna Ekstrak Polifenol
 - 4) Aktivitas antioksidan (Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidroksil))
- c. Uji penghambatan bubuk polifenol kasar terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* dengan penentuan nilai KHM dan IC50 (Hostettmann, 1991).

3.5 Prosedur Pengamatan dan Analisis

- a. Karakteristik biji kakao superior dan inferior meliputi :

- i. Index Fermentasi (IF) (Misnawi *et al*, 2003)

Biji kakao kering diblender dan diayak dengan ukuran 35 mesh kemudian ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambah larutan IF sebanyak 50 ml (Larutan IF diperoleh dari 3 ml HCl diencerkan sampai volume 100 ml dengan meanol). Tabung reaksi yang berisi sampel dan larutan IF ditutup rapat dengan alumunium foil dan disimpan dalam lemari es selama 20 jam. Setelah 20 jam dikeluarkan lalu disaring dengan kertas saring. Selanjutnya filtrat di ukur ODnya dengan spektrofotometer pada λ 460 nm dan λ 530 nm. Nilai IF (indeks fermentasi) dihitung dengan cara membagi hasil absorbansi pada panjang gelombang 460 nm untuk warna coklat dengan hasil absorbansi pada panjang gelombang 530 nm untuk warna merah, dengan rumus sebagai berikut :

$$IF = \frac{\lambda 460}{\lambda 530}$$

- ii. Kadar Air (Metode Oven) (SNI 2323:2008)

Contoh uji yang telah halus ditimbang sebanyak 10 g ke dalam cawan petri yang terlebih dahulu telah ditetapkan bobotnya (M0). Cawan dan tutupnya beserta isinya (M1) dimasukkan dalam oven pada suhu 103°C selama 16 jam. Cawan dalam keadaan terbuka selama 16 jam. Setelah 16 jam, cawan ditutup dengan penutupnya dan dikeluarkan dengan segera dan dimasukkan dalam eksikator selama 15 menit. Kemudian timbang cawan

bertutup beserta isinya (M2). Kadar air dinyatakan dalam persentase bobot seperti berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100\%$$

iii. Kadar Lemak (Metode soxhlet) (SNI 2323:2008)

a. Hidrolisis :

Timbang 3-5 g sampel ke dalam beaker glass 250 ml. Tambahkan 45 ml aquades mendidih dan 55 ml HCl. Selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan dikocok lalu didihkan perlahan-lahan selama 15 menit. Kemudian saring endapan dengan kertas saring dan bilas beaker glass dengan 100 ml aquades dan masukkan air pencucian tersebut ke dalam erlenmeyer. Bilas beaker glass tersebut 3 kali dengan aquades melalui kertas saring dan pencucian diteruskan sehingga bebas Cl (tidak memberikan endapan putih AgCl dengan penambahan 1 tetes sampai 3 tetes AgNO₃). Selanjutnya kertas saring dan residu penyaringan dikeringkan selama 6-18 jam pada suhu 100-101°C.

b. Ekstraksi lemak :

Keringkan selama 1 jam labu didih dan timbang, kemudian sambungkan dengan alat ekstraksi soxhlet. Masukkan kertas saring yang berisi sampel ke dalam soxhlet. Selanjutnya refluks selama 4 jam dengan kecepatan ekstraksi kira-kira 3 tetes per detik. Setelah ekstraksi selesai, keluarkan sampel kemudian uapkan pelarut petroleum benzen dengan memanaskan labu di atas penangas air. Keringkan labu beserta lemak didalam oven pada suhu 100-101°C selama 16 jam. Setelah itu masukkan kedalam eksikator selama 15 menit dan timbang. Cara menyatakan hasil kadar lemak dinyatakan dalam presentase bobot per bobot dan dihitung dalam bobot kering dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{100 (M_2 - M_1)}{M_0} \times \frac{100}{(100 - KA)}$$

Keterangan :

Mo adalah bobot contoh uji, dinyatakan dalam gram

M1 adalah bobot labu didih dan batu didih, dinyatakan dalam gram

M2 adalah bobot labu didih, batu didih dan lemak, dinyatakan dalam gram

Ka adalah kadar air contoh uji

b. Karakterisasi bubuk polifenol kasar biji kakao superior dan inferior meliputi :

i. Rendemen Bubuk Polifenol (Misnawi *et al*,2003b)

Bubuk Polifenol kasar yang dihasilkan dihitung rendemennya menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen Bubuk Polifenol (\%)} = \frac{\text{Berat Bubuk Polifenol}}{\text{Berat kakao kering}} \times 100\%$$

ii. Warna Ekstrak Polifenol

Penentuan warna pada ekstrak polifenol biji kakao dilakukan menggunakan *Colour Reader* Minolta CR-300. *Colour reader* distandarkan dengan cara mengukur nilai dL, da dan db pada keramik putih yang telah diketahui standar nilai L, a+, dan b+. Setelah itu sampel diletakkan dalam tempat yang disediakan kemudian pengukuran dilakukan pada empat titik yang berbeda sehingga diperoleh nilai dL, da dan db secara tegak lurus. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

iii. Total Polifenol (Metode Follin-ciocalteu)

Analisa total polifenol ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode Follin-Ciocalteu (Singelton dan Rossi, 1965). Sebanyak 0,125 gram sampel ekstrak polifenol dilarutkan dengan 20 ml aseton 80%, kemudian dimasukkan dalam beaker glass dan ditutup alumunium foil selanjutnya distirer selama 30 menit. Kemudian dilakukan penyaringan dengan kertas saring pada labu ukur 25 ml. Semua alat gelas yang digunakan dibilas dengan aseton 80% untuk melepaskan aseton yang mengandung ekstrak polifenol, kemudian ditera. Sebanyak 125 µl ekstrak diambil dan dimasukkan dalam

tabung reaksi, kemudian ditambah 8750 µl aquades. Setelah itu ditambah 625µl reagen Follin-Ciocalteu 2N dan divortex selama 2 menit, didiamkan selama 2 menit. Kemudian ditambah 1875 µl larutan Na₂CO₃ jenuh untuk menginisiasi pembentukan warna, didiamkan selama 2 jam untuk pengembangan warna biru yang terbentuk. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm.

Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara yang sama yaitu menggunakan larutan standard (+)-katekin (3000 ppm), kemudian dibuat larutan pada konsentrasi (0;150;300;450;600;750 ppm) sebanyak 1000 µl dengan ditambah aseton 80%, kemudian ambil 125 µl dan ditambah dengan 8750 µl aquadest, selanjutnya ditambah 625 µl reagen Follin-Ciocalteu 2N dan divortex selama 2 menit, didiamkan selama 2 menit, selanjutnya tambahkan 1875 µl Na₂CO₃ jenuh, didiamkan selama 2 jam, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standar katekin yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standard katekin, sehingga diperoleh nilai X dari persamaan kurva standart yang kemudian dikali volume total, lalu hasil perhitungan dibagi dengan berat sampel yang digunakan untuk analisa.

$$\text{Total Polifenol (mg/g)} = \frac{X \times \text{Volume total}}{\text{berat sampel}}$$

iv. Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidroksil))

DPPH adalah radikal bebas yang memiliki nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada panjang gelombang maksimal 517 nm dan berwarna ungu gelap. Aktifitas antioksidan dianalisa berdasarkan kemampuannya menangkap radikal bebas menurut metode yang dikembangkan Gadow (1996). Sebanyak 0.1 gram sampel dilarutkan dalam 10 ml etanol pada beaker glass 50 ml, kemudian ditutup dengan alumunium foil dan distirer selama 30 menit. Selanjutnya disentrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Filtrat yang dihasilkan diambil 0,5 ml dan ditambah 0.25 ml reagen DPPH 0,001M

(1,1-diphenyl-2-picrylhidroksil). Kemudian didiamkan selama 20 menit, selanjutnya filtrat ditera dengan etanol hingga mencapai volume 2,5 ml. Setelah itu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Blanko dibuat dengan cara mengganti sampel dengan etanol. Aktifitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas Antioksidan(\%)} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

- c. Penentuan Nilai KHM dan IC50 ekstrak polifenol terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Hostettmann, 1991).

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode ini digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pada metode dilusi cair, dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran senyawa uji pada media cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji senyawa antimikroba pada konsentrasi terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM dan kemudian dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji atau senyawa antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM. Metode dilusi padat serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat. Metode ini memiliki keuntungan yaitu satu konsentrasi senyawa uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

Penentuan nilai KHM dan IC50 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* menggunakan metode dilusi padat yang terdiri dari beberapa tahapan. Tahapan tersebut terdiri dari penyiapan sampel, tahap pengujian dan tahap pengamatan. Berikut ini merupakan tahapan yang harus dilakukan dalam penentuan KHM dan IC₅₀.

- i. Penyiapan sampel

Pada tahap penyiapan sampel yang pertama dilakukan adalah sterilisasi semua peralatan dan bahan termasuk pembuatan media (kecuali ekstrak polifenol) yang akan digunakan menggunakan autoklaf selama 15

menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Dwidjoseputro, 1990). Selanjutnya pembuatan larutan uji yaitu pembuatan stok larutan polifenol 17,54% dengan cara melarutkan ekstrak polifenol sebanyak 2 gram dalam 10 ml akuades steril. Kemudian larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi 0,04%; 0,09%; 0,17%; 0,35%; 0,53%; 0,70%; 0,88%; 1,40%; 1,75%; 2,10% dan 2,81%. Larutan stok yang telah dibuat diambil secara berturut-turut 12,5µl, 25µl, 50µl, 100µl, 150µl, 200µl, 250µl, 400µl, 500µl, dan 800µl, setelah itu dilakukan penambahan DMSO masing-masing sebanyak 20µl yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak polifenol lebih maksimal dan larutan fisiologis berturut-turut adalah 967,5µl, 955µl, 930µl, 880µl, 830µl, 780µl, 730µl, 580µl, 480µl dan 180µl. Pada saat akan dilakukan uji ditambah dengan media NA yang masih hangat dengan perbandingan 1:4. Pembuatan kontrol negatif (0%) yaitu hanya menggunakan DMSO 20µl yang ditambah dengan larfis 980µl dan media yang masih hangat. Selain itu, disiapkan pula bakteri yang akan digunakan untuk pengujian yaitu pengambilan 1 ose bakteri dari agar miring yang telah disiapkan dan dimasukkan pada media NB 200µl kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

ii. Pengujian ekstrak polifenol terhadap bakteri *E.coli* dan *B.subtilis*

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC50 pada bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* dilakukan dengan metode dilusi agar dengan hitung koloni. Masing-masing media NA yang masih hangat (cair) ditambahkan pada larutan uji dengan perbandingan 4:1 sehingga didapatkan konsentrasi 0,17%; 0,35%; 0,53%; 0,70%; 0,88%; 1,40%; 1,75%; untuk penggunaan ekstrak polifenol kakao superior dan konsentrasi 0,35%; 0,70%; 1,40%; 2,10% dan 2,81% untuk ekstrak polifenol kakao inferior. Campuran media dan larutan uji yang telah divortex dimasukkan dalam cawan petri yang telah berisi 200µl suspensi mikroba (pengenceran 10⁻⁵) diratakan dan dibiarkan memadat kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh pada cawan petri menggunakan *colony*

counter. Penentuan % penghambatan pada masing-masing konsentrasi uji yang didapatkan dinyatakan dalam sebuah grafik.



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Biji Kakao Kering Superior dan Inferior

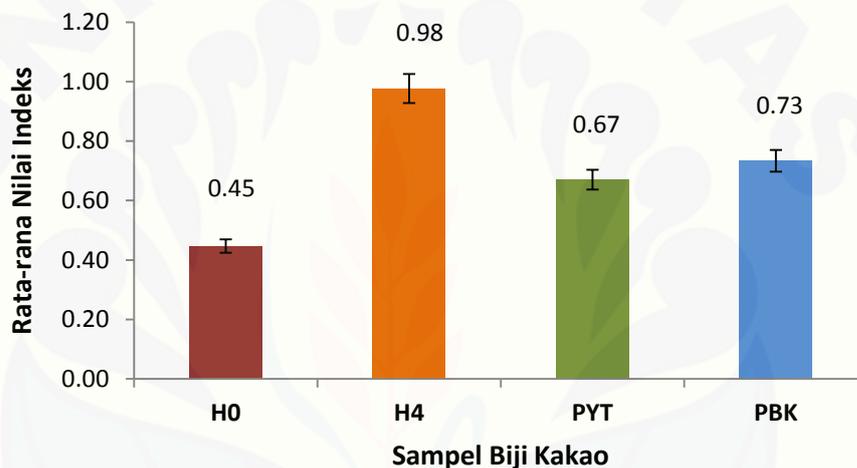
Bijikakao yang digunakan pada penelitian ini didapat dari perkebunan PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi. Biji kakao yang digunakan adalah biji kakao superior yang terdiri dari biji kakao *non* fermentasi (H0) dan fermentasi (H4) dan biji kakao inferior yang terdiri dari 2 macam yaitu biji kakao inferior terserang *P. palmivora* (PYT) dan biji kakao inferior terserang *Conopomorpha cramerella* (PBK). Penggunaan biji kakao superior pada penelitian ini adalah sebagai pembanding untuk biji kakao inferior. Biji kakao superior memiliki penampakan cukup bagus yaitu warnanya cerah dan tidak banyak biji gepeng serta pecah. Pada biji kakao terserang *P. palmivora* warna bijisangat gelap dan banyak biji gepeng, sedangkan biji kakao yang terserang PBK warnanya gelap, gepeng, keriput, dan biji pecah sangat banyak. Penampakan biji kakao superior dan inferior dapat dilihat pada **Gambar 4.1**. Analisis kimia biji kakao meliputi indeks fermentasi, kadar air, dan kadar lemak.



Gambar 4.1 Penampakan Biji Kakao Superior dan Inferior (a) Biji Kakao Superior *non* fermentasi; (b) Biji Kakao Superior Fermentasi; (c) Biji Kakao Inferior Terserang *P. palmivora*; dan (d) Biji Kakao Inferior Terserang PBK(Sumber : Dokumentasi Pribadi).

4.1.1 Indeks Fermentasi

Analisis kimia yang dilakukan untuk mengetahui biji kakao terfermentasi secara sempurna adalah mengukur nilai indeks fermentasi dengan cara spektrofotometri. Analisis indeks fermentasi dilakukan untuk mengetahui bahwa biji kakao yang digunakan merupakan biji fermentasi atau biji *non fermentasi*. Dalam penelitian ini digunakan biji kakao superior fermentasi dan *non fermentasi* dan biji kakao inferior yang terserang *P. palmivora* dan *C. cramerella*. Besarnya nilai indeks fermentasi pada biji kakao kering yang digunakan dapat dilihat pada **Gambar4.2**.



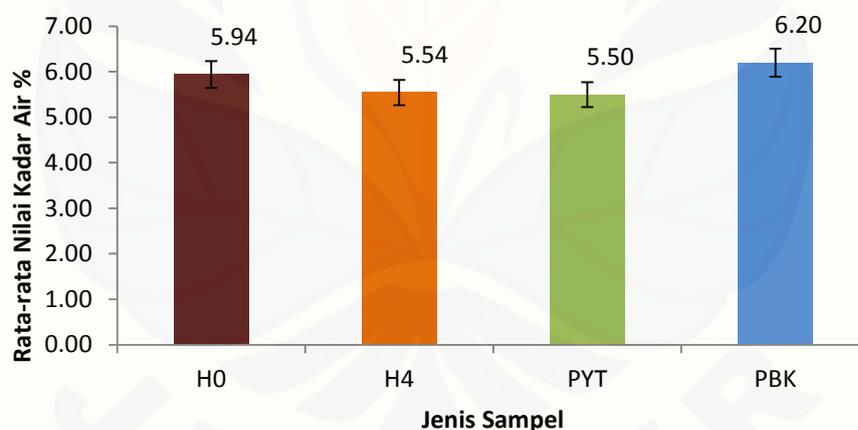
Gambar 4.2 Diagram Rata-rata Nilai Indeks Fermentasi Biji Kakao Kering.

Berdasarkan **Gambar 4.2** menunjukkan bahwa nilai IF pada biji kakao superior non fermentasi (H0) adalah 0,45 sedangkan pada sampel biji fermentasi (H4) adalah 0,98. Hal ini disebabkan sampel H4 mengalami proses fermentasi, dimana porsi bagian keping biji yang berwarna coklat lebih tinggi daripada yang berwarna ungu sehingga nilai IF mendekati 1. Pada biji kakao inferior sampel terserang *P. palmivora* memiliki nilai IF 0,67, sedangkan untuk sampel terserang PBK nilai IF adalah 0,73. Pada sampel biji kakao inferior keduanya memiliki nilai IF yang lebih tinggi daripada sampel H0 disebabkan sampel inferior telah mengalami fermentasi pada saat penumpukan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian bahwa nilai IF untuk biji kakao fermentasi 1,0 sedangkan untuk biji kakao *non fermentasi* <1,0 (Misnawi, 2005). Pada sampel H4 nilai IF mendekati 1

yang menandakan bahwa sampel tersebut sudah terfermentasi mendekati sempurna.

4.1.2 Kadar Air

Kadar air biji kakao sangat berpengaruh dalam menentukan mutu biji kakao karena sangat berpengaruh terhadap daya simpan. Biji kakao yang memiliki kadar air tinggi akan mudah diserang oleh serangga dan jamur sehingga mudah mengalami kerusakan, sedangkan apabila biji kakao rendah akan mudah rusak karena rapuh. Kadar air biji kakao ditentukan oleh cara pengeringan yang digunakan dan cara penyimpanannya. Kadar air biji kakao hasil pengeringan sebaiknya antara 6 – 7%. Jika lebih dari 8% maka hasil rendemennya akan turun, selain itu juga beresiko terhadap serangan bakteri dan jamur. Biji kakao bersifat higroskopis, karenanya kondisi lingkungan sangat berpengaruh terhadap kadar air (Wahyudi *et al*, 2008). Hasil analisis kadar air biji kakao superior dan inferior dapat dilihat pada **Gambar 4.3**



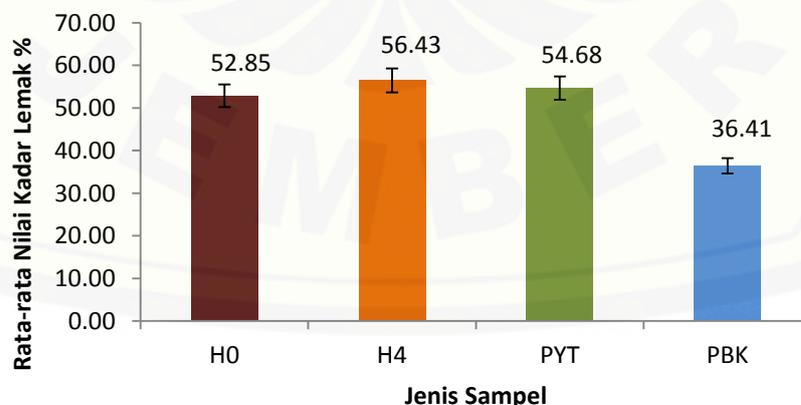
Gambar 4.3 Diagram Rata-rata Kadar Air Biji Kakao Kering.

Berdasarkan **Gambar 4.3** menunjukkan bahwa kadar air biji kakao kering sampel H0 5,94% sedangkan kadar air biji kakao kering sampel H4 5,54% dan kadar air biji kakao kering sampel terserang *P. palmivora* 5,50 % sedangkan kadar air yang terserang PBK 6,20%. Kadar air yang paling besar dan sesuai dengan SNI adalah kadar air biji kakao inferior terserang PBK yaitu 6,20%. Pada sampel H0 kadar air lebih tinggi dibandingkan pada sampel H4. Hal ini karena pada

sampel H0 masih banyak *pulp* yang menempel sehingga kadar air tinggi, sedangkan pada sampel H4 *pulp* mulai berkurang seiring dengan proses fermentasi sehingga didapatkan kadar air yang lebih rendah daripada H0. Pada biji kakao inferior tidak dilakukan fermentasi sehingga kadar air yang didapatkan cukup tinggi, selain itu pada biji kakao inferior biji kakao yang terbentuk tidak begitu sempurna karena keping biji sudah rusak atau tidak berkembang dengan baik karena adanya serangan hama atau penyakit. Pada biji kakao inferior sampel terserang PBK memiliki kadar air yang cukup tinggi karena pada sampel ini biji melekat kuat pada plasenta dan sangat sulit dipisahkan, sehingga biji kakao yang didapatkan bercampur dengan plasenta dan menyebabkan kadar air pada sampel sangat tinggi.

4.1.3 Kadar Lemak

Salah satu kandungan biji kakao yang sangat berharga adalah lemak kakao. Biji kakao mengandung lemak kakao dengan kadar antara 50 – 58% (berat nib kering). Kadar lemak pada umumnya dinyatakan dalam persen dari berat kering keping biji. Lemak kakao merupakan campuran trigliserida, yaitu senyawa gliserol dan tiga asam lemak. Lebih dari 70% dari gliserida penyusun tersebut terdiri dari tiga senyawa tidak jenuh tunggal, yaitu oleodipalmitin, oleodistearin dan oleopalmistearin. Di dalam lemak kakao juga terdapat sedikit *unsaturated* trigliserida (Wahyudi *et al.*, 2008). Besarnya kadar lemak biji kakao kering yang dihasilkan dapat dilihat pada **Gambar 4.4**



Gambar 4.4 Diagram Rata-rata Kadar Lemak Biji Kakao Kering.

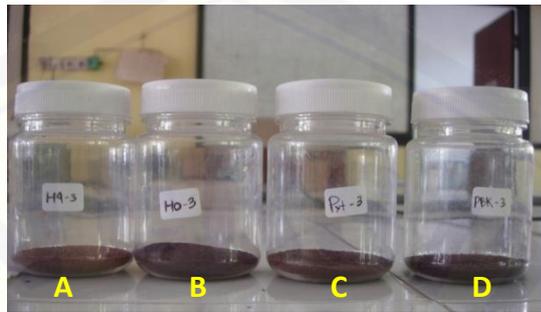
Berdasarkan **Gambar 4.4** menunjukkan bahwa kadar lemak biji kakao kering superior sampel H0 52,85% dan sampel H4 56,43%, sedangkan kadar lemak biji kakao kering inferior sampel terserang *P. palmivora* 54,68% dan kadar lemak sampel terserang PBK 36,41%. Biji kakao superior sampel H4 memiliki kadar lemak yang sangat tinggi karena pada sampel H4 memiliki kadar air yang rendah. Pada biji kakao kering inferior terserang *P. palmivora* memiliki kadar lemak cukup tinggi dan kadar air cukup rendah hal ini dikarenakan serangan pada buah kakao yang sudah dewasa sehingga kadar lemak tetap tinggi meskipun terjadi busuk buah. Pada biji kakao terserang hama PBK kadar lemak yang dihasilkan rendah karena serangan hama PBK terjadi pada saat buah kakao masih muda sehingga biji tidak berkembang baik dan lemak yang terbentuk selama metabolisme rendah.

Kadar lemak biji kakao dipengaruhi oleh faktor budidaya tanaman kakao seperti jenis bahan tanaman dan faktor musim, serta perlakuan pengolahan,. Biji kakao yang berasal dari pembuahan musim hujan umumnya mempunyai kadar lemak lebih tinggi. Karakter fisik biji kakao pasca pengolahan, seperti kadar air, tingkat fermentasi dan kadar kulit, berpengaruh pada rendemen lemak biji kakao. Proses fermentasi dapat menurunkan kadar bahan bukan lemak biji, sehingga secara relatif kadar lemak akan meningkat (Mulato *et al*, 2005). Dari hasil yang didapatkan dapat diketahui bahwa biji kakao inferior memiliki lemak yang cukup tinggi sehingga dapat dijadikan sebagai sumber lemak nabati.

4.2 Analisis Karakteristik Bubuk Kasar Polifenol

Bubuk polifenol kasar yang sering disebut *polyphenol-rich cocoa extract* didapatkan dari proses ekstraksi dengan beberapa tahapan yaitu pertama dilakukan pengupasan untuk memisahkan biji dan kulit, kemudian dilakukan pengepresan untuk memisahkan lemak yang selanjutnya dilakukan ekstraksi sisa lemak yang tersisa dengan pelarut non polar petroleum benzena. Tahap akhir adalah ekstraksi senyawa polifenol dengan pelarut etanol dan selanjutnya ekstrak cair dievaporasi secara vakuum untuk menguapkan sisa pelarut etanol dan dikeringkan dengan oven vakum sampai kering sehingga didapatkan bubuk polifenol kasar yang

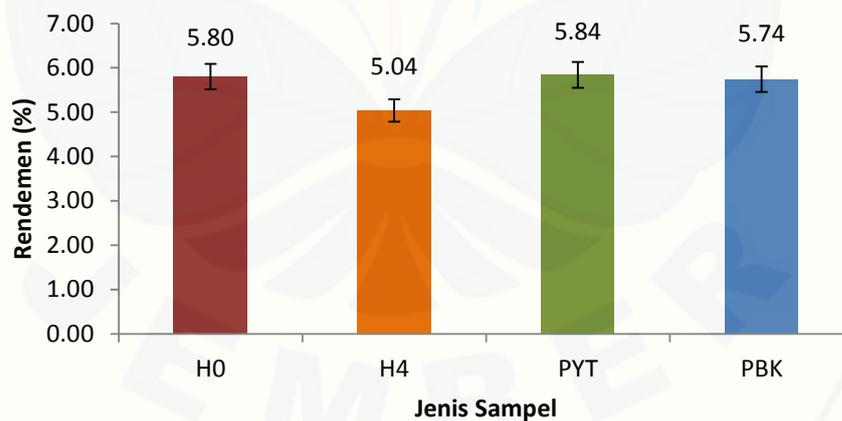
terlihat pada **Gambar 4.5**. Analisis bubuk polifenol kasar hasil ekstraksi dari biji kakao dilakukan yang meliputi rendemen, warna, total polifenol dan aktivitas antioksidan bubuk polifenol kasar. Bubuk polifenol kasar yang dihasilkan terdiri dari ekstrak bubuk polifenol dari biji kakao superior dan biji kakao inferior.



Gambar 4.5 Bubuk Polifenol Kasar Superior dan Inferior (a) Biji Kakao Superior Fermentasi; (b) Biji Kakao Superior *non* Fermentasi; (c) Biji Kakao Inferior Terserang *P. palmivora*; dan (d) Biji Kakao Inferior Terserang PBK(Sumber : Dokumentasi Pribadi).

4.2.1 Rendemen Bubuk Polifenol Kasar

Rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini adalah bubuk polifenol kasar. Rendemen yang dihasilkan tergantung dari jenis sampel yang digunakan. Rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini dapat dilihat pada **Gambar 4.6**.



Gambar 4.6. Diagram Rata-rata Rendemen Bubuk Polifenol Kasar Biji Kakao Superior dan Inferior

Berdasarkan **Gambar 4.6** menunjukkan bahwa rendemen ekstrak tertinggi dihasilkan dari sampel terserang *Pytophthora* yaitu 5.84% yang tidak berbeda jauh hasilnya dengan sampel H0 (non fermentasi) yaitu 5.80% dan yang terendah yaitu

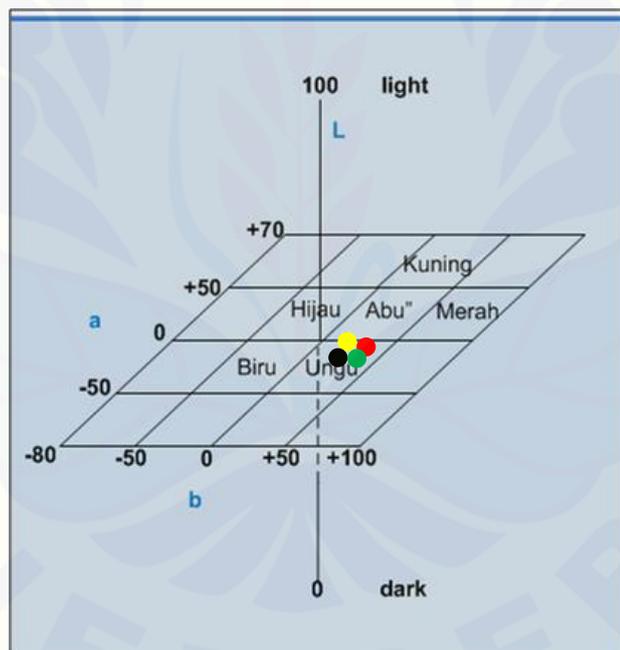
sampel H4 (fermentasi) yaitu 5.04%. Pada sampel terserang PBK yaitu 5.74%. Dapat diketahui bahwa biji superior H0 dan terserang *P. palmivora* memiliki nilai rendemen polifenol yang lebih tinggi daripada biji yang terserang PBK dan H4. Akan tetapi biji kakao superior H4 memiliki nilai rendemen yang lebih rendah daripada biji kakao inferior terserang PBK. Serangan *P. palmivora* pada saat buah sudah dewasa tidak terlalu berpengaruh terhadap biji sehingga rendemen yang dihasilkan masih cukup tinggi, sedangkan serangan PBK yang terjadi pada buah yang masih muda akan menyebabkan biji tidak berkembang sempurna sehingga rendemen yang dihasilkan rendah. Selain itu rendemen pada biji inferior lebih tinggi dibandingkan dengan H4 dikarenakan biji kakao inferior tidak dilakukan fermentasi sehingga senyawa yang ada dalam biji masih kompleks. Menurut Prayoga (2010), rendahnya rendemen bubuk polifenol kasar yang dihasilkan dari biji yang dilakukan proses pengepresan hidrolik dan perendaman petroleum benzena selain lemak yang terekstrak terikut pula fosfolipida, sterol, asam lemak bebas, karotenoid dan pigmen yang lain.

Dapat diambil suatu kesimpulan bahwa walaupun biji inferior terserang PBK dan *P. palmivora* tetapi rendemen yang dihasilkan masih tinggi dibandingkan biji kakao superior fermentasi. Hal ini sangat mendukung untuk diproduksi lebih lanjut sebagai sumber antibakteri alami dan memberikan nilai tambah sehingga dapat dimanfaatkan dengan baik.

4.2.2 Warna Bubuk Polifenol Kasar

Analisis warna bubuk polifenol kakao kasar dilakukan untuk mengetahui tingkat perubahan warna yang terjadi pada ekstrak yang didapatkan. Pengukuran warna yang dilakukan yaitu lightness (L^*), nilai a^* dan b^* yang akan digambarkan dalam sebuah diagram. Selain itu dilakukan pengukuran nilai chroma dan derajat hue. Perbedaan warna yang terbentuk terjadi karena sifat antosianin yang berbeda-beda dari setiap sampel akibat faktor perbedaan pH pada biji superior dan inferior.

Dalam penelitian ini, analisis warna bubuk polifenol kasar yaitu menggunakan alat *Colour Reader* Minolta CR-300. Dari hasil pengukuran nilai L, a dan b pada sampel diinterpolasikan dengan standart dan standar keramik sehingga diperoleh nilai L, a dan b. Hasil dari pengukuran warna yang didapatkan sudah sesuai dengan polarisasi koordinat warna. Pada semua sampel bubuk polifenol baik dari biji kakao superior maupun inferior tergambar dalam kategori warna ungu gelap. Jika diplotkan ke diagram warna (**Gambar 4.7**) terlihat 4 titik yang berbeda yaitu yang terdiri dari sampel H0 dan H4 serta sampel terserang *P. palmivora* dan PBK, dimana semua titik koordinat berada pada daerah berwarna ungu. Hal ini menandakan bahwa antosianin pada bubuk kakao polifenol masih kompleks, akan tetapi nilai yang didapatkan pada sampel H4 lebih tinggi dibandingkan pada sampel yang lain. Hal ini terjadi karena sampel H4 telah mengalami fermentasi.

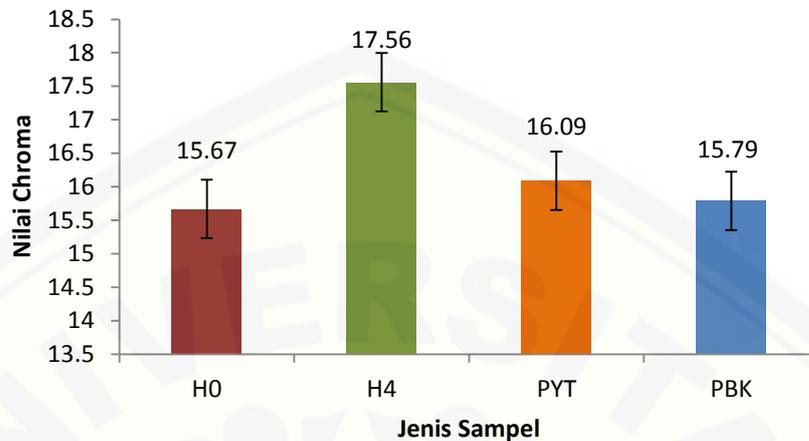


Gambar 4.7 Plot Data Warna Ekstrak Polifenol (● = sampel *unfermentasi*; ● = sampel fermentasi; ● = sampel terserang *P.palmivora*; ● = sampel terserang *C. cramerella*)

a. Chroma (C^*)

Pengukuran nilai Chroma (C^*) menunjukkan intensitas warna yang dipengaruhi oleh nilai a^* dan b^* . Semakin besar nilai a^* dan b^* maka nilai

Chroma yang didapatkan akan semakin besar. Hasil perhitungan nilai C^* ekstrak polifenol pada biji kakao superior dan inferior dapat dilihat pada **Gambar 4.8**

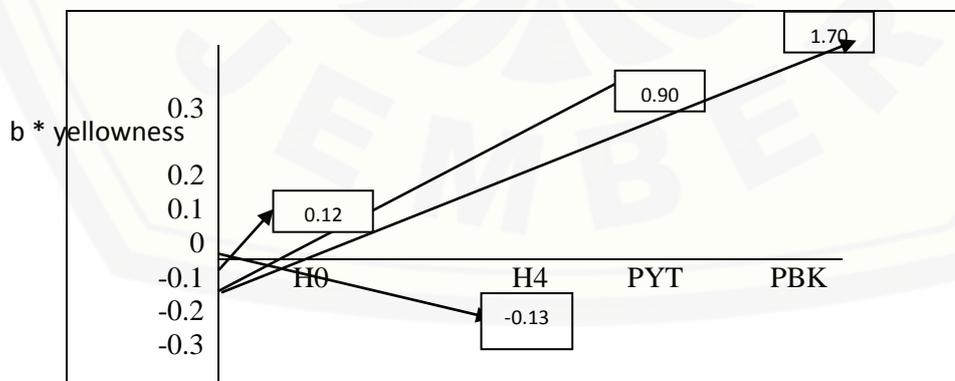


Gambar 4.8. Diagram Rata-rata Nilai Chroma Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior

Berdasarkan **Gambar 4.8** menunjukkan bahwa intensitas warna paling tinggi yaitu pada sampel H4 sebesar 17.56 dan yang terendah adalah sampel H0 yaitu 15.67. Pada sampel terserang hama dan penyakit yaitu rata-rata nilai chroma adalah sampel terserang *P. palmivora* 16.09 dan sampel terserang PBK adalah 15.79. Dapat diketahui bahwa intensitas biji yang terserang hama dan penyakit memiliki selisih yang tidak terlalu jauh dengan biji superior.

b. Hue (H^*)

Nilai Hue menunjukkan warna dominan dari sampel. Nilai Hue adalah tangensial dari nilai b^* dengan a^* yang ditunjukkan pada **Gambar 4.9**



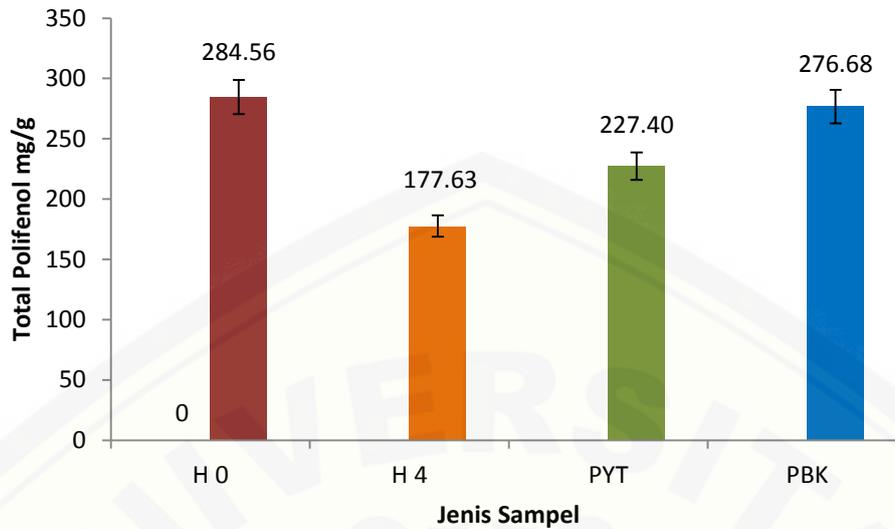
Gambar 4.9. Diagram Rata-Rata Derajat Hue Ekstrak Polifenol Superior dan Inferior

Berdasarkan **Gambar 4.9** derajat hue yang didapatkan pada sampel H0 adalah 0.12° dan sampel H4 adalah -0.13° , sedangkan pada sampel terserang *P. palmivora* adalah 0.70° dan sampel terserang PBK adalah 1.70° . Dapat diketahui nilai derajat hue tertinggi yaitu pada sampel terserang PBK yaitu 1.70° dan yang terendah adalah sampel H4 yaitu -0.13° . Dari ketiga sampel nilainya mendekati 0° sehingga dapat diketahui warna dominan adalah merah dan untuk 1 sampel yaitu yang terserang PBK nilai derajat hue yang rata-rata mendekati 2° maka menunjukkan warna dominan adalah kuning.

4.2.3 Total Polifenol Bubuk Kasar

Analisis total polifenol dilakukan untuk mengetahui kandungan total polifenol pada sampel. Analisis total polifenol pada bubuk polifenol kasar dihitung berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh dari hasil pengukuran absorbansi (+)-katekin yang bereaksi dengan *Folin Ciocalteu*. Penentuan total polifenol menggunakan standart (+)-katekin dengan konsentrasi 0 – 750 ppm (0.000 – 0,750 mg/ml) dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Persamaan linier yang diperoleh dari kurva standart katekin yang telah dibuat adalah $y = 0,8373x + 0,062$. Hasil pengukuran total polifenol pada sampel dapat dilihat pada **Gambar 4.10**.

Berdasarkan **Gambar 4.10** yang didapatkan diketahui bahwa total polifenol pada sampel H0 adalah 284.56 mg/g dan sampel H4 adalah 177.63 mg/g, sedangkan pada sampel terserang *P. palmivora* adalah 227.40 mg/g dan sampel terserang PBK adalah 276.68 mg/g. Dari hasil tersebut tampak bahwa pada sampel H4 menunjukkan total polifenol yang rendah karena biji kakao sudah mengalami proses fermentasi. Perubahan enzimatik yang terjadi pada saat fermentasi akan menyebabkan kandungan polifenol pada biji kakao akan menurun.

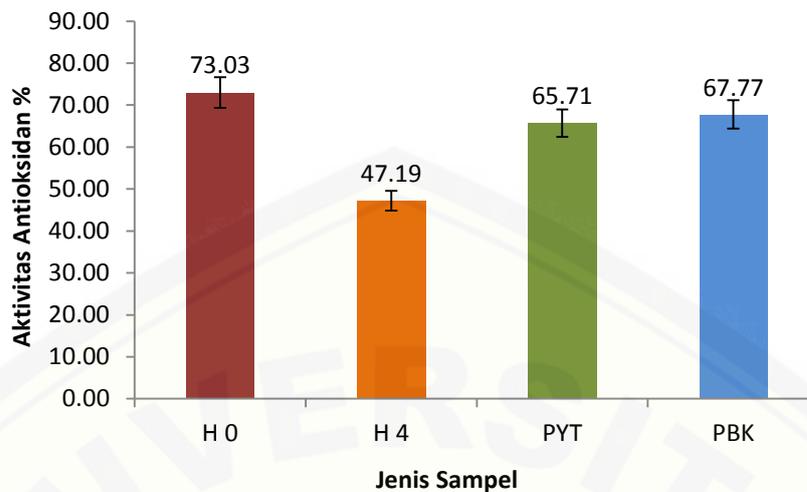


Gambar 4.10 Diagram Rata-rata Total Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior

Terbukanya permukaan biji akan menyebabkan enzim polifenol oksidase menjadi aktif dan merubah polifenol untuk membentuk quinon dan diquinon (Soenaryo,1988). Selain itu juga perubahan pH dan suhu akibat terbentuknya asam asetat dari hasil oksidasi alkohol oleh *acetobacter* akan menyebabkan terjadi degradasi polifenol (Jalil, 2006). Polifenol pada sampel H0 masih tinggi karena biji tidak difermentasi. Sementara pada biji inferior terserang *P. palmivora* dan *C.cramerella* yang sudah mengalami sedikit fermentasi, kandungan total polifenol sudah menurun.

4.2.4 Aktivitas Antioksidan Bubuk Polifenol Kasar

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi ekstrak polifenol kasar yang direaksikan dengan reagen DPPH. Pada reaksi tersebut reagen DPPH akan diikat oleh senyawa polifenol sehingga DPPH akan tereduksi dan warna reagen DPPH akan berubah dari ungu gelap menjadi warna kuning atau warnanya memudar. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak polifenol dapat dilihat pada **Gambar 4.11**



Gambar 4.11. Diagram Rata-rata Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan **Gambar 4.11** menunjukkan bahwa rata-rata aktifitas antioksidan sampel H0 73.03% adalah dan H4 adalah 47.19%, sedangkan sampel terserang *P. palmivora* adalah 65.71% dan sampel terserang PBK adalah 67.77%. Dapat diketahui aktivitas antioksidan tertinggi adalah ekstrak polifenol sampel H0 sedangkan aktivitas antioksidan terendah adalah pada sampel H4. Hal ini membuktikan total polifenol sesuai dengan aktivitas antioksidannya. Menurut Reyhan (2014) peningkatan aktifitas antioksidan dipengaruhi oleh kandungan lemak pada bubuk kakao. Kandungan lemak yang tinggi akan berpotensi mengalami oksidasi sehingga mengurangi aktifitas antioksidannya.

4.3 Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi

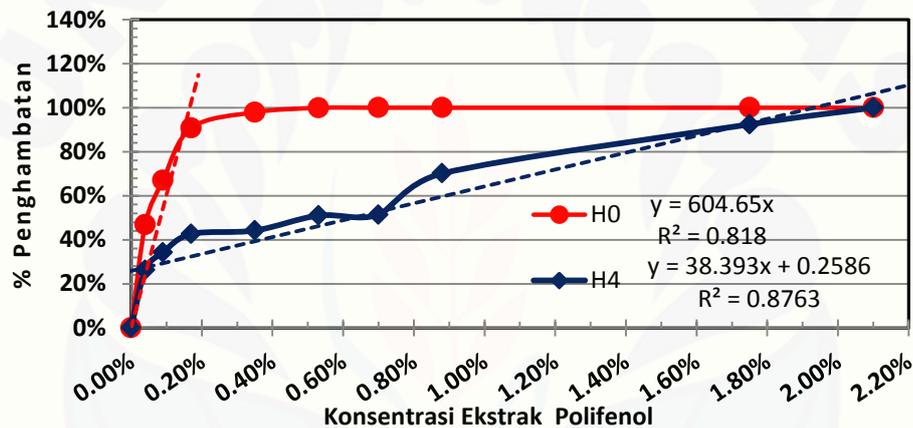
Hambatan 50 (IC₅₀) pada Bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*

Konsentrasi hambat minimum adalah konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini penentuan nilai KHM ekstrak polifenol biji kakao superior dan inferior pada bakteri *E.coli* dan *B.subtilis* menggunakan metode dilusi agar. Pengamatan yang dilakukan yaitu dengan menghitung koloni yang tumbuh pada berbagai konsentrasi yang digunakan dan kemudian dibandingkan dengan kontrol negative (larutan uji tanpa ekstrak polifenol). Pada penentuan KHM, penurunan jumlah koloni dengan seiring

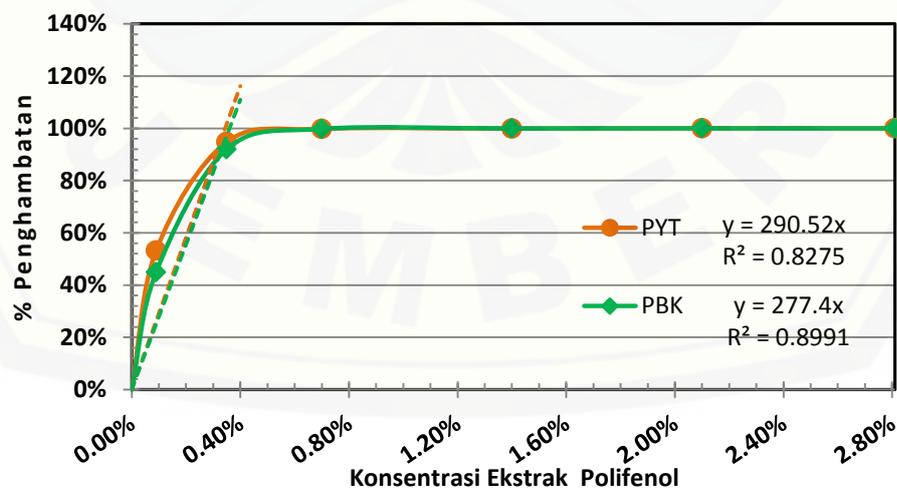
tingginya konsentrasi polifenol yang digunakan dapat dinyatakan dalam nilai persen penghambatan.

4.3.1 Penentuan KHM dan IC₅₀ Bakteri *E.coli*

Penentuan nilai KHM bertujuan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak polifenol yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal atau lebih dari 90% penghambatan, sedangkan penentuan nilai IC₅₀ dilakukan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak polifenol yang digunakan dapat menghambat 50% pertumbuhan bakteri. Data hasil perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran C**. Hasil nilai KHM dapat dilihat pada **Gambar 4.12**



Gambar 4.12 Grafik Penghambatan Ekstrak Polifenol Superior terhadap Bakteri *E. coli*



Gambar 4.13 Grafik Penghambatan Ekstrak Polifenol Inferior Terhadap Bakteri *E. coli*

Berdasarkan **Gambar 4.12** dapat diketahui bahwa sampel ekstrak polifenol memiliki penghambatan yang berbeda-beda pada bakteri *E.coli*. Sampel H0 pada konsentrasi 0,157% menunjukkan penghambatan lebih dari 90% terhadap pertumbuhan *E.coli*, sedangkan untuk sampel H4 menunjukkan penghambatan lebih dari 90% pada konsentrasi 1,801%. Pada **Gambar 4.13** menunjukkan hasil yang cukup memuaskan dibandingkan dengan sampel H4 yaitu sampel terserang *P. palmivora* dan terserang PBK menunjukkan penghambatan optimal terhadap pertumbuhan bakteri yaitu pada konsentrasi 0,327% dan 0,342%. Dari hasil yang ditunjukkan diatas dapat disimpulkan bahwa sampel ekstrak polifenol terserang hama dan penyakit mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif seperti *E.coli*. Hal ini disebabkan karena kandungan polifenol pada biji kakao terserang hama dan penyakit masih cukup tinggi. Perhitungan KHM dan IC₅₀ dapat dilihat hasilnya pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan KHM Dan IC₅₀ untuk Bakteri *E.Coli*

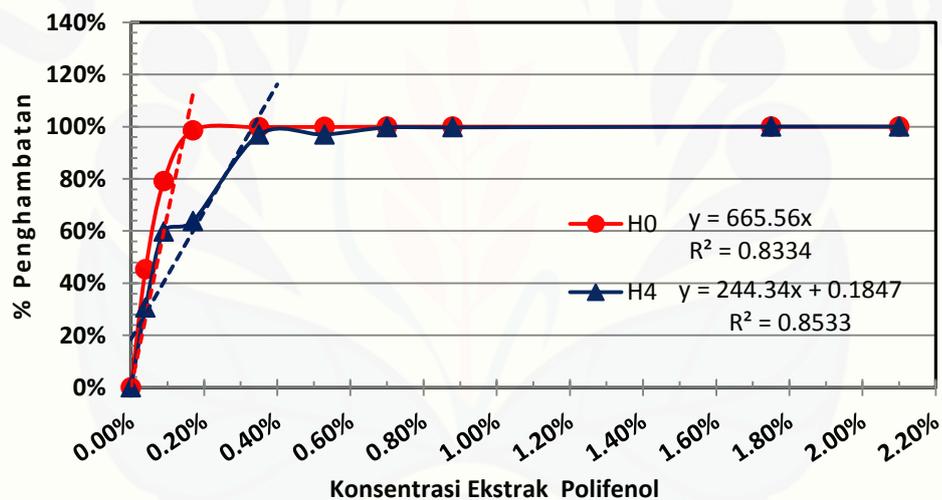
Ekstrak Sampel	Persamaan Garis	R ²	IC ₅₀ (x)	KHM
H0	$y = 604.65x$	0.818	0.083%	0.157%
H4	$y = 38.393x + 0.2586$	0.8763	0.629%	1.801%
PYT	$y = 290.52x$	0.8275	0,172%	0.327%
PBK	$y = 277.4x$	0.8991	0,180%	0.342%

Tabel 4.1 menunjukkan hasil perhitungan nilai KHM dan IC50 masing-masing sampel terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli*. Sampel H0 menunjukkan nilai KHM pada konsentrasi 0,157% dan IC50 pada konsentrasi 0,083% yaitu artinya pada konsentrasi 0.157% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* sebesar 95% dan pada konsentrasi 0,083% ekstrak polifenol dapat menghambat 50% koloni bakteri dan pada sampel H4 menunjukkan nilai KHM 1,801% dan IC50 0,629%. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel H0 kandungan polifenolnya lebih tinggi dibandingkan sampel H4 yang telah mengalami fermentasi dan polifenol mengalami degradasi. Sampel terserang *Pytophthora* memiliki nilai KHM 0,327% dan IC50 0,172% dan sampel terserang PBK memiliki nilai KHM 0,342% dan IC50 0,180%. Hal ini menunjukkan bahwa

ekstrak polifenol terserang hama dan penyakit masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan sampel ekstrak polifenol biji superior karena biji terserang hama dan penyakit bijinya tidak berkembang baik akan tetapi kandungan polifenol masih cukup tinggi.

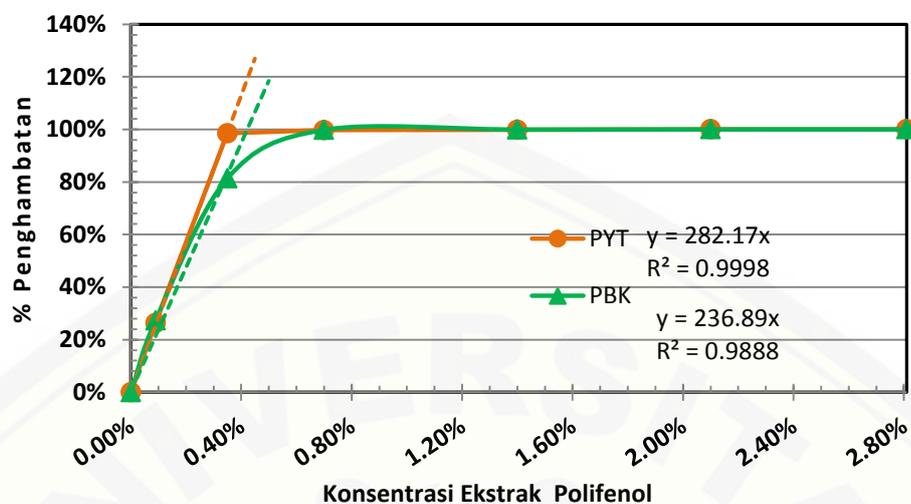
4.3.2 Penentuan KHM dan IC₅₀ Bakteri *B.Subtilis*

PenentuannilaiKHMbertujuan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak polifenol yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal, sedangkan penentuan nilai IC₅₀ dilakukan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak polifenol yang digunakan dapat menghambat 50% koloni bakteri. Data hasil perhitungan dapat dilihat pada lampiran F. Hasil nilai KHM dapat dilihat pada **Gambar 4.14**



Gambar 4.14 Grafik Penghambatan Ekstrak Polifenol Superior Terhadap Bakteri *B.subtilis*

Berdasarkan **Gambar 4.14** dapat diketahui bahwa sampel ekstrak polifenol memiliki penghambatan yang berbeda-beda pada bakteri *E.coli*. Sampel H0 pada konsentrasi 0,14% menunjukkan penghambatan lebih dari 90% terhadap pertumbuhan *E.coli*, sedangkan untuk sampel H4 menunjukkan penghambatan lebih dari 90% pada konsentrasi 0,31%.



Gambar 4.15 Grafik Penghambatan Ekstrak Polifenol Inferior Terhadap Bakteri *B.subtilis*

Pada **Gambar 4.15** menunjukkan hasil sampel terserang *P. palmivora* dan terserang PBK menunjukkan penghambatan optimal terhadap pertumbuhan bakteri yaitu pada konsentrasi 0,34% dan 0,40%. Dari hasil yang ditunjukkan diatas dapat disimpulkan bahwa sampel ekstrak polifenol terserang hama dan penyakit mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif seperti *E.coli*. Hal ini disebabkan karena kandungan polifenol pada biji kakao terserang hama dan penyakit masih cukup tinggi. Perhitungan KHM dan IC_{50} dapat dilihat hasilnya pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Hasil Perhitungan KHM Dan IC_{50} untuk Bakteri *B.Subtilis*

Ekstrak Sampel	Persamaan Garis	R2	IC_{50} (x)	KHM
H0	$y = 665.56x$	0.8334	0,08%	0,14%
H4	$y = 244.34x + 0.1847$	0.8533	0,13%	0,31%
PYT	$y = 282.17x$	0.9998	0,18%	0,34%
PBK	$y = 236.89x$	0.9888	0,21%	0,40%

Tabel 4.2 menunjukkan hasil perhitungan nilai KHM dan IC_{50} masing-masing sampel terhadap pertumbuhan bakteri *B.subtilis*. Sampel H0 menunjukkan nilai KHM pada konsentrasi 0,14% dan IC_{50} pada konsentrasi 0,08% yaitu artinya pada konsentrasi 0,14% tidak ditemukan lagi pertumbuhan bakteri

B.subtilis dan pada konsentrasi 0,09% ekstrak polifenol dapat menghambat 50% koloni bakteri dan pada sampel H4 menunjukkan nilai KHM 0,31% dan IC50 0,13%. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel H0 kandungan polifenolnya lebih tinggi dibandingkan sampel H4 yang telah mengalami fermentasi dan polifenol mengalami degradasi. Sampel terserang *Pytophthora* memiliki nilai KHM 0,34% dan IC50 0,18% dan sampel terserang PBK memiliki nilai KHM 0,40% dan IC50 0,21%. Dari hasil yang didapatkan bahwa nilai penghambatan untuk ekstrak superior non fermentasi tidak berbeda jauh dengan penghambatan ekstrak polifenol terserang *Pytophthora* terhadap bakteri *B.subtilis*. Ekstrak polifenol terserang hama dan penyakit masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi yang lebih tinggi seperti halnya ekstrak polifenol biji superior karena biji terserang hama dan penyakit bijinya tidak berkembang dengan baik akan tetapi kandungan polifenol masih cukup tinggi.

4.4 Mekanisme Penghambatan Polifenol terhadap Bakteri *E. Coli* dan *B. Subtilis*

Uji penghambatan ekstrak polifenol biji kakao superior dan inferior dilakukan menggunakan dua jenis bakteri yang berbeda yaitu bakteri *E.coli* yang merupakan bakteri gram negatif dan bakteri *B.subtilis* yang merupakan bakteri gram positif. Tujuan penggunaan bakteri dengan jenis gram yang berbeda untuk mengetahui apakah ada perbedaan hasil penghambatan yang didapatkan.

Mekanisme polifenol sebagai antimikroba beragam tergantung jenis senyawanya. Polifenol biji kakao terdiri dari 3 kelompok yaitu katekin 37%, antosianin 4% dan proantosianidin 58% (Wollgast dan Anklam, 2000). Kandungan terbesar adalah proantosianidin yang merupakan tanin terkondensasi. Mekanisme tanin sebagai antimikroba yaitu menyebabkan proteolisis dan inhibisi sintesis dinding sel mikroba (Kylli *et al*, 2011). Sedangkan senyawa flavonoid yang ada pada kakao yaitu katekin mengganggu fungsi membran sel dan mekanisme (-)-epigallocatekin sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis asam nukleat (Cushine & Lamb, 2005).

Senyawa polifenol akan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler menginaktivasi enzim dan merusak membran sel, sehingga apabila fenol dan protein berikatan (ikatan hidrogen) akan menyebabkan struktur protein pada bakteri mengalami kerusakan. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas sel selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein pada sel bakteri akan terganggu yang mengakibatkan pelepasan makromolekul dan ion dari sel bakteri. Sehingga bakteri kehilangan bentuk dan terjadi lisis (Susanti, 2008 dalam Rinawati 2010).

Bakteri gram positif dan gram negatif memiliki dinding sel yang berbeda kepekaannya terhadap perlakuan fisik, enzim dan antibiotik (Fardiaz, 1983). Menurut Pelezar dan Chan (1986) bakteri gram positif cenderung lebih tahan terhadap senyawa antibakteri. Hal ini karena struktur dinding sel bakteri gram positif yang lebih tebal dengan lapisan peptidoglikan 90%. Sedangkan struktur dinding sel bakteri gram negatif memiliki lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa peptidoglikan 5-20%, dan lapisan dalam yang berupa lipopolisakarida. Dari hasil yang didapatkan terlihat bahwa bakteri gram positif *B.subtilis* lebih tahan dihambat pertumbuhannya oleh ekstrak polifenol dibandingkan dengan bakteri gram negatif yaitu *E.coli*.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Karakteristik kimia sampel H0,H4,PYT dan PBK berturut-turut adalah berkisar nilai indeks fermentasi 0,45; 0,98; 0,67; 0,73, kadar air 5,94%; 5,54%; 5,50%; 6,20% dan untuk kadar lemak berturut-turut berkisar 52.85%; 56,43%; 54,68% dan 36,41%. Karakteristik kimia biji kakao inferior tidak berbeda jauh dengan biji kakao superior non fermentasi walaupun biji tidak berkembang dengan baik.
2. Karakteristik bubuk ekstrak polifenol sampel H0,H4,PYT dan PBK berturut-turut adalah berdasarkan rendemen 5,80%; 5,04%; 5,84%; 5,74%, total polifenol 284,56mg/g; 177,63mg/g; 227,40mg/g; 276,68mg/g, aktivitas antioksidan 73,03%; 47,19%; 65,71%; 67,77% dan untuk warna semua sampel mendekati warna ungu gelap. Karakteristik bubuk ekstrak polifenol inferior tidak berbeda jauh dengan bubuk ekstrak polifenol *non* fermentasi walaupun biji tidak berkembang dengan baik.
3. Nilai KHM dan IC₅₀ ekstrak polifenol sampel H0,H4, PYT dan PBK berturut-turut untuk bakteri *E.coli* adalah 0,157 %; 1,801%; 0,327%; 0,342% dan 0,083%; 0,629%; 0,172% dan 0,180%, sedangkan nilai KHM dan IC₅₀ untuk bakteri *B.subtilis* berturut-turut adalah 0,14%; 0,31%; 0,34%; 0,40% dan 0,08%; 0,13%; 0,18% dan 0,21%. Ekstrak polifenol biji kakao inferior berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif dan dapat dijadikan sebagai antibakteri alami.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kakao superior dan inferior sebagai antikapang dan untuk mengetahui masa simpan serta proses penyimpanan atau pengawetan yang tepat untuk ekstrak polifenol biji kakao. Selain itu perlu dilakukan penelitian tentang pengaplikasian polifenol biji kakao.



DAFTAR PUSTAKA

- Aulia, I. P..2009. *Efek Minyak Atsiri Cabe Jawa terhadap Jumlah Limfosit Tikus Wistar yang Diberi Diet Kuning Telur*, Universitas Diponegoro Semarang.
- Badan Standarisasi Nasional Indonesia. *SNI-2323-2008 tentang Biji Kakao*. Jakarta : Badan Standarisasi Nasional.
- Bonvehi, J.S. dan Coll, F.V. 1997. Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Journal of Food Chemistry* 60: 365-370.
- Cosentio, S, C.I.G Tuberoso, B. Pisano, M. Satta, V. Mascia, E. Arzedi dn F. Palmas. 1999. In-vitro Antimicrobial Activity And Chemical Composition Of Sardinian Thymus Essential Oils. *The Society For Applied Microbiology*. Vol. 29 :130-135
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 26: 343-356.
- Departemen Perindustrian. 2013. *Gambaran Sekilas Industri Kakao*. Jakarta : Departemen Perindustrian.
- Ditjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian.2013. *Profil Olahan Kakao Indonesia*. Jakarta :Departemen Pertanian
- Dwidjoseputro, D. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan. Departemen
- Fardiaz, S. 1989. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Pangan*. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Frazier, W.C. dan Wetshoff.D.C.1988.*Food Microbiology 4thed*. New York : Mc Graw Hill Publ. Co.Ltd.
- Gadow, A. 1996. Comparison of The antioxidan activity of aspalahitin with that of other plant phenols of roiboos ten (*aspalathus linearis*.*J. Agric. Food chem*, 45 : 832-638.
- Goenadi, Bako, Herman, dan Purwoto. 2005. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis kakao di Indonesia*. Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian.
- Gupte. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta : Percetakan Binarupa Aksara.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia, terjemahan K. Radmawinata dan I. Soediro*. Bandung : Penerbit ITB , 69-94, 142-158,234-238.11

- Harmawan, S. 2010. *Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao (Theobroma cacao L) Kering Non Fermented Terserang Conopomorpha cramerella dan Pitophthora palmivota Butler Sebagai Antibakteri*. Skripsi.FTP :UJ.
- Heywood, V.H., 1972. *Plant phenolics. Olivers and Boyd tweeddale Court*, 14 High Street, Edinburgh EH 1 YL
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., &Marston, A. 1986.*Cara Kromatografi Preparatif Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam*. Alih bahasa : Kosasih Padmawinata.Bandung : Penerbit ITB.
- Hostettmann,K. 1991. *Methods In Plant Biochemistry*. San Diego: Academic Press.
- Jalil, A.M.M dan Ismail, A. 2006. Polyphenol In Cocoa And Cocoa Product Between Antioxidant Properties And Health. *Journal Review Molecules*. Vol. 13:2019-2219.
- Jawetz, E. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Diterjemahkan oleh Edi Nugroho, RF. Jakarta : EGC
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimia, R., Westerlund-Wikstrom, B., Leppanen, T., Welling, J. Moilanen, E., & Heinonen, M. 2011. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European Cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol (59): 3373-3384
- Kim, H dan P.G.Keeney. 1983. Method of Analysis for (-)-Epicatechin in Cocoa Beans by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science*, 48, 548-551.
- Kim, H and Keeney, P.1983. *Polyphenols-Tanins in Cocoa Beans*, 37 th P.M.C.A. Production Conference, Penn State University
- Kusuma, Y. 2013.*Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antibakteri*. Skripsi.FTP : UJ.
- Linggawati, A. 2002.*Pemanfaatan Tanin Limbah Kayu Industri Kayu Lapis untuk Modifikasi Resin Fenol Formaldehid*. Riau : FMIPA Universitas Riau
- Manohara, D., D. Wahyuno, R.Noveriza, 2005. *Penyakit busuk pangkal batang tanaman Lada dan strategi pengendaliannya perkembangan teknologi TRO17* : 1-11.
- Markham, K.R. 1988. *Senyawa Flavonoid*. Bandung : ITB

- Meskin, M.S., W.R. Billack, A.J. Davies. 2002. *Phytochemicals in nutrition and health*. CRC Press.
- Misnawi; S. Jinap; B. Jamilah dan S. Nazamid. 2003b. Effects of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenos Content, Hydropobicity Astringency. *ASEAN Food Journal*, 103-113.
- Misnawi, Jinap, Jamilah dan Nazamid. 2003. *Sensory Properties of Cacao Liquor as Affected by Polyphenol Concentration and Duration of Roasting Food Quality of Preperence*. 15 (2004) 403-409.
- Misnawi, S. 2005. Effect of cocoa Liquor Roasting on Polyphenol Content, Hydropobicity Astringency. *ASEAN food journal*, 12 (2), 103-113.
- Mulato, Widyotomo, Misnawi, Suharyanto. 2005. *Petunjuk Teknis Produk Primer Dan Sekunder Kakao*. Jember : Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Mulato, S dan Suharyanto, E,. 2011. *Kakao, Cokelat dan Kesehatan*. Jember : Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Nasution, Z., W. Ciptadi dan B. S. Laksmi. 1976. *Pengolahan Coklat*. Bogor : Departemen Fatemeta, IPB.
- Nuciferani, N.M. 2004. *Potensi Pigmen Antosianin Bunga Mawar (Rosa Sp Sortiran sebagai Zat Warna dan Antioksidan Alami pada Produk Yogurt dan Sari Buah Jeruk (KAjian Warna Bunga dan Umur Simpan)* Malang : Universita Muhammadiyah Malang.
- Osakabe, N; M. Yamagishi; C. Sanboghi dan T. Takizawa (1998a). *Effects of Polyphenol Substances Derived from Theobroma Cacao on Gastric Mucosal Lesion Induced by Methanol*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 1535-1538.
- Osakabe, N; M. Yamagishi; C. Sanboghi; M. Natsume; T. Osawa dan T. Takizawa. 1998b. The Antioxidative Substances in Cacao Liquor. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, 44, 313-321.
- Pelczar, M dan Chan. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid1*. Jakarta: UI Press.
- Prayoga, R. 2010. *Pemanfaatan Biji Kakao untuk Produksi Polifenol sebagai Senyawa Antibakteri*. Skripsi. FTP: UJ.
- Ray, B. 2001. *Fundamental Food Microbiology 2nded*. New York. CRC Press.
- Reyhan, P.S.R. 2014. *Produksi Polifenol Dari Olahan Primer Biji Kakao Bulk Sebagai Senyawa Antioksidan Dan Antimikroba*. Skripsi. FTP : UJ.
- Rinawati, N. D. 2010. *Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (Crescentia cujete L.) terhadap Bakteri Vibrio alginolyticus*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.

- Singleton, V.L. dan Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolibdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *Journal Enologi and Vitiiculture*. Vol. 16:147.
- Soenaryo, S. 1988. Pengaruh Lama Fermentasi dan Perendaman Terhadap Mutu Lemak Kakao. *Jurnal Pelita Perkebunan*. Vol. 4 (2) : 73-80
- Sukanto, S. 2002. *Pengenalan dan Pengendalian Hama Penyakit Tanaman Kakao*. Jember : Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- Sunanto, H. 1992. *Coklat : Budidaya, Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta : Kanisius.
- Susanto, 1994. *Tanaman Kakao : Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sulistyowati, E., Yohanes D. Junianto, Sri – Sukanto, Sukadar Wiryadiputra, Loso Winarto, dan Nova Primawati. 2003. *Analisis status penelitian dan pengembangan PHT pada pertanaman kakao*. Risalah Simposium Nasional Penelitian PHT Perkebunan Rakyat Bogor, (17-18 September 2003).
- Timotius, K. H. 1982. *Mikrobiologi Dasar*. Salatiga : Uksw.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1993. *Mikrobiologi Dasar Jilid 1*. Jakarta : Erlangga.
- Wahyudi, T., T.R Pangabean, dan Pujiyanto. 2008. *Panduan Lengkap Kakao : Manajemen Agribisnis Dari Hulu Hingga Hilir*. Jakarta : Penebar swadaya.
- Wahyudin, A. 2013. *Ekstraksi Zat Antimikroba (Polifenol) Biji Kakao (Theobroma Cacao L) Terserang Phytophthora Palmivora Dengan Variasi Pelarut*. Skripsi. FTP : UJ.
- Weisburger, J.H. 2005. *Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Disease*. [<http://www.ebmonline.org/cgi/content/short/226/10/891>.] diakses tanggal 29 Mei 2013).
- Wilkinson, S.L. 1999. *Take two cups of coffe and call me tomorrow, coffe and chocolate contain antioxidants that may promote healt*. Chemical and engineering new April 12, 47-50.
- Winarsi, H. 2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta : Kanisius.
- Wollgast, J. dan E. Anklam. 2000. *Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identificaation and Quantification*. Food Research International, 33, 423-447.

LAMPIRAN

A. Analisis Karakteristik Kimia Biji Kakao Superior dan Inferior

A.1 Data Hasil Analisis Indeks Fermentasi Biji Kakao Superior Dan Inferior

Sampel	Ulangan	Panjang gelombang				IF		Rata-rata	IF
		460 nm		530 nm		1	2		
		1	2	1	2				
H0	1	0.566	0.553	1.125	1.09	0.503	0.507	0.51	0.45
	2	1.102	0.984	2.546	2.321	0.433	0.424	0.43	
	3	1.064	0.954	2.55	2.444	0.417	0.390	0.40	
H4	1	0.57	0.583	0.545	0.603	1.046	0.967	1.01	0.98
	2	0.637	0.523	0.573	0.645	1.112	0.811	0.96	
	3	0.572	0.492	0.567	0.539	1.009	0.913	0.96	
PYT	1	0.487	0.499	0.69	0.677	0.706	0.737	0.72	0.67
	2	0.583	0.581	0.964	0.823	0.605	0.706	0.66	
	3	0.595	0.577	0.916	0.942	0.650	0.613	0.63	
PBK	1	0.692	0.714	1.103	1.058	0.627	0.675	0.65	0.74
	2	0.406	0.423	0.596	0.47	0.681	0.900	0.79	
	3	0.505	0.411	0.63	0.565	0.802	0.727	0.76	

A.2 Data Hasil Analisis Kadar Air Biji Kakao Superior dan Inferior

Sampel	Ulangan	M0		M1		M2		Kadar air		Rata-rata	% Kadar air
		1	2	1	2	1	2	1	2		
H0	1	102.338	97.211	112.346	107.213	111.757	106.631	0.0589	0.0582	0.0585	5.94%
	2	102.594	93.076	112.598	103.081	111.997	102.47	0.0601	0.0611	0.0606	
	3	97.431	97.211	107.435	107.213	106.837	106.628	0.0598	0.0585	0.0591	
H4	1	103.607	101.244	113.611	111.244	113.059	110.698	0.0552	0.0546	0.0549	5.54%
	2	99.975	97.331	109.979	107.335	109.411	106.791	0.0568	0.0544	0.0556	
	3	97.391	87.713	107.395	97.718	106.839	97.157	0.0556	0.0561	0.0558	
PYT	1	101.644	98.712	111.65	108.716	111.065	108.135	0.0585	0.0581	0.0583	5.50%
	2	96.762	97.644	106.766	107.645	106.237	107.072	0.0529	0.0573	0.0551	
	3	80.523	89.66	90.529	99.666	90.014	99.15	0.0515	0.0516	0.0515	
PBK	1	99.361	101.152	109.371	111.158	108.505	110.658	0.0865	0.0500	0.0682	6.20%
	2	70.532	70.787	80.534	80.787	79.977	80.225	0.0557	0.0562	0.0559	
	3	87.469	70.773	97.469	80.776	96.855	80.153	0.0614	0.0623	0.0618	

A.3 Data Hasil Analisis Kadar Lemak Biji Kakao Superior dan Inferior

Sampel	Ulangan	M0	M1	M2	Kadar Air	Kadar lemak	Rata-rata
H0	1	2	29.417	30.455	5.85%	51.930	52.85
	2	2	29.417	30.488	6.06%	53.582	
	3	2	37.602	38.662	5.91%	53.031	
H4	1	2	37.582	38.698	5.49%	55.831	56.43
	2	2	29.416	30.548	5.56%	56.631	
	3	2	29.415	30.551	5.58%	56.832	
PYT	1	2	32.084	33.192	5.83%	55.432	54.68
	2	2	32.076	33.192	5.51%	55.831	
	3	2	37.628	38.683	5.16%	52.777	
PBK	1	2	32.07	32.885	6.82%	40.778	36.41
	2	2	32.062	32.839	5.59%	38.872	
	3	2	32.064	32.655	6.18%	29.568	

B. Analisis Karakteristik Bubuk Kasar Polifenol Superior dan Inferior

B.1 Data Hasil Analisis Randemen Bubuk Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior

Sampel	Ulangan	Berat Biji Kakao Kering Awal (gr)	Berat biji Kakao Setelah Press (Bk)	Berat Lemak (Lk)	Berat Bubuk Kakao Rendah Lemak I yang digunakan	Berat bubuk kakao setelah Ekstraksi Benzen (Ih) / bubuk rendah lemak II	Berat Bubuk Polifeno l	% Rendemen Bubuk PF/Bubuk Kakao Rendah Lemak	% Rata2 rendemen
H0	1	600.45	424.67	175.78	150	113.16	10.89	5.13	5.80
	2	600.59	395.64	204.95	150	120.01	13.01	5.71	
	3	600.52	456.45	144.07	150	113.16	12.94	6.56	
H4	1	600.09	414.53	185.56	150	117.32	10.58	4.87	5.04
	2	600.58	348.95	251.63	150	117.33	13.01	5.04	
	3	600.58	443.97	156.61	150	119.09	10.58	5.21	
PYT	1	600.32	466.96	133.36	150	110.48	11.44	5.93	5.84
	2	600.23	399.24	200.99	150	117.76	12.66	5.61	
	3	600.88	471.61	129.27	150	119.64	11.44	5.99	
PBK	1	600.11	436.43	163.68	150	119.46	12.13	5.88	5.74
	2	600.15	466.69	133.46	150	115.48	10.57	5.48	
	3	600.45	436.00	164.45	150	110.48	12.13	5.87	

B.2 Data Hasil Analisis Warna Bubuk Polifenol Kakao Biji Kakao Superior dan Inferior

Sampel	n	Titik Objek	L sampel	a sampel	b sampel	L*	Rata-rata	a*	Rata-rata	b*	Rata-rata	C	Rata-rata	H	Rata-rata
H0	1	1	31.3	4.1	15.1	47.02		-4.91		4.99		15.65		0.60	
		2	31.5	4.8	15.2	47.33		-5.75		5.02		15.94		0.03	
		3	31.2	4.7	15.1	46.87		-5.63		4.99		15.81		0.07	
	2	1	31.3	4.2	15.1	47.02		-5.03		4.99		15.67		0.49	
		2	31.6	4.4	15.3	47.48	47.43	-5.27	-5.54	5.06	4.95	15.92	15.67	0.35	0.12
		3	31.4	4.7	15.2	47.18		-5.63		5.02		15.91		0.09	
	3	1	32.1	4.9	14.6	48.23		-5.87		4.82		15.40		-0.16	
		2	32.5	5.1	14.7	48.83		-6.11		4.86		15.56		-0.27	
		3	31.2	4.7	14.4	46.87		-5.63		4.76		15.15		-0.08	
H4	1	1	32.0	5.2	16.6	48.08		-6.23		5.49		17.40		0.05	
		2	31.3	4.7	16.1	47.02		-5.63		5.32		16.77		0.29	
		3	31.3	5.3	16.1	47.02		-6.35		5.32		16.95		-0.10	
	2	1	32.1	5.0	16.2	48.23		-5.99		5.35		16.95		0.10	
		2	31.4	4.8	15.9	47.18	48.04	-5.75	-6.68	5.25	5.50	16.61	17.56	0.17	-0.13
		3	31.0	5.2	16.0	46.57		-6.23		5.29		16.82		-0.06	
	3	1	32.9	6.8	17.3	49.43		-8.15		5.72		18.59		-0.68	
		2	32.4	6.3	17.8	48.68		-7.55		5.88		18.88		-0.33	
		3	33.4	6.9	17.8	50.18		-8.27		5.88		19.09		-0.63	

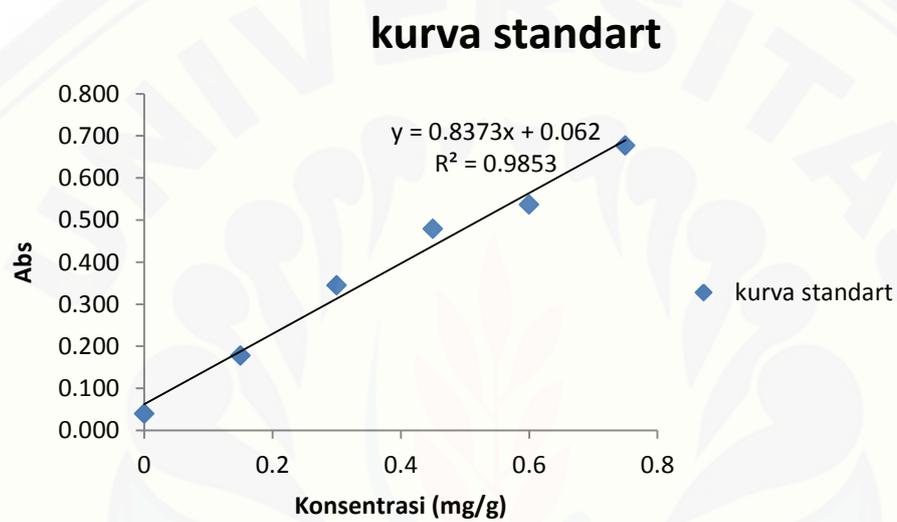
Digital Repository Universitas Jember

		1	31.3	3.8	15.3	47.02									
	1	2	31.1	3.8	15.1	46.72									
		3	31.7	3.7	15.5	47.63									
		1	31.2	3.7	15.0	46.87									
PYT	2	2	31.0	3.5	15.2	46.57	47.48	-4.19	-5.22	5.02	5.11	15.60	16.09	2.58	0.90
		3	31.5	3.8	15.1	47.33									
		1	33.1	6.4	16.9	49.73									
	3	2	31.8	5.1	16.3	47.78									
		3	31.7	5.4	14.8	47.63									
<hr/>															
		1	31.0	3.6	15.4	46.57									
	1	2	30.6	3.5	15.3	45.97									
		3	30.8	3.8	15.3	46.27									
		1	31.0	3.4	15.2	46.57									
PBK	2	2	30.8	3.7	15.5	46.27	46.46	-4.43	-4.53	5.12	5.07	15.94	15.79	1.73	1.70
		3	31.2	3.9	15.5	46.87									
		1	31.0	4.0	15.2	46.57									
	3	2	31.2	4.1	15.3	46.87									
		3	30.7	4.0	15.3	46.12									
<hr/>															

B.3 Data Hasil Analisis Total Polifenol Bubuk Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior

Sampel	ulangan	nilai Abs	a	b	x	FP	W (g)	total polifenol (mg/g)	rata-rata
H0	1	1.114	0.8373	0.062	1.256	25	0.125	251.284	284.565
	2	1.410	0.8373	0.062	1.610	25	0.125	321.987	
	3	1.236	0.8373	0.062	1.402	25	0.125	280.425	
H4	1	1.112	0.8373	0.062	1.254	25	0.125	250.806	177.634
	2	0.719	0.8373	0.062	0.785	25	0.125	156.933	
	3	0.586	0.8373	0.062	0.626	25	0.125	125.164	
PYT	1	1.078	0.8373	0.062	1.213	25	0.125	242.685	227.398
	2	0.982	0.8373	0.062	1.099	25	0.125	219.754	
	3	0.982	0.8373	0.062	1.099	25	0.125	219.754	
PBK	1	1.575	0.8373	0.062	1.807	25	0.125	361.400	276.683
	2	1.141	0.8373	0.062	1.289	25	0.125	257.733	
	3	0.945	0.8373	0.062	1.055	25	0.125	210.916	

Konsentrasi	Nilai Absorbansi
0	0.040
0.15	0.178
0.3	0.345
0.45	0.479
0.6	0.537
0.75	0.677



B.4 Data Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Bubuk Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior

Sampel	Ulangan	Berat Sampel (g)	Abs 1	Abs 2	Abs rerata	Abs (B - S)/B	% Aktivitas Antioksidan	Rata-rata
H0	1	0.1000	0.199	0.255	0.227	0.667	66.667	73.030
	2	0.1000	0.175	0.151	0.163	0.761	76.065	
	3	0.1000	0.160	0.162	0.161	0.764	76.358	
H4	1	0.1000	0.358	0.369	0.364	0.466	46.623	47.186
	2	0.1000	0.356	0.26	0.308	0.548	54.772	
	3	0.1000	0.388	0.427	0.408	0.402	40.162	
PYT	1	0.1000	0.148	0.228	0.188	0.724	72.394	65.712
	2	0.1000	0.178	0.256	0.217	0.681	68.135	
	3	0.1000	0.295	0.296	0.296	0.566	56.608	
PBK	1	0.1000	0.198	0.147	0.173	0.747	74.670	67.768
	2	0.1000	0.223	0.147	0.185	0.728	72.834	
	3	0.1000	0.298	0.304	0.301	0.558	55.800	
BLANKO								0.681

C. Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol Terhadap Bakteri *E.coli* dan *B.subtilis*

C.1 Pembuatan Larutan Uji untuk Uji KHM dn IC₅₀

Pembuatan larutan stok ekstrak polifenol dengan cara sebagai berikut :

Larutan stok konsentrasi 17,54% =2 gram /11,4 ml jadi larutkan 2 gram ekstrak polifenol dalam 10 ml akuades steril

Konsentrasi	Polifenol	DMSO	Larfis
0%	0 µl	20 µl	980 µl
0,04%	12,5 µl	20 µl	967,5 µl
0,09%	25 µl	20 µl	955 µl
0,17%	50 µl	20 µl	930 µl
0,35%	100 µl	20 µl	880 µl
0,53%	150 µl	20 µl	830 µl
0,70%	200 µl	20 µl	780 µl
0,88%	250 µl	20 µl	730 µl
1,40%	400 µl	20 µl	580 µl
1,75%	500 µl	20 µl	480 µl
2,10%	600 µl	20 µl	380 µl
2,81%	800 µl	20 µl	180 µl

Contoh perhitungan penentuan konsentrasi dan pengambilan polifenol dari stok

Ex : konsentrasi 0,1% dalam menentukan pengambilan polifenol dari stok

$$M1V1=M2V2$$

$$17,54\% \times V1 = 5000 \mu\text{l} \times 0,09\%$$

$$17,54\% \times V1 = 5000 \mu\text{l} \times 0,09\%$$

$$V1 = 450 \mu\text{l} / 17,54 = 25 \mu\text{l}$$

Ex : konsentrasi 0,1% dalam menentukan konsentrasi yang digunakan

$$M1V1=M2V2$$

$$17,54\% \times 25 = M2 \times 5000 \mu\text{l}$$

$$17,54\% \times 25 \mu\text{l} = 5000 \mu\text{l} \times M2$$

$$M2 = 438,5 / 5000 = 0,09\%$$

C.2 Data Hasil Penentuan Nilai KHM dan IC50 Terhadap Bakteri *E. Coli*

Sampel	Konsentrasi	Jumlah Koloni (cfu/ml)		Rata-rata (cfu/ml)	Log jumlah koloni	% penghambatan
H0	0.00%	5.65E+07	5.25E+07	5.45E+07	7.736	0.00%
	0.04%	2.80E+07	3.00E+07	2.90E+07	7.462	46.79%
	0.09%	1.75E+07	1.85E+07	1.80E+07	7.255	66.97%
	0.17%	5.00E+06	5.00E+06	5.00E+06	6.699	90.83%
	0.35%	1.00E+06	1.25E+06	1.13E+06	6.051	97.94%
	0.53%	5.00E+04	5.00E+04	5.00E+04	4.699	99.91%
	0.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	0.88%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	1.40%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	TD	TD	TD	TD	TD
	2.81%	TD	TD	TD	TD	TD
H4	0.00%	6.05E+07	6.50E+07	6.28E+07	7.798	0.00%
	0.04%	4.50E+07	4.75E+07	4.63E+07	7.665	26.29%
	0.09%	4.20E+07	4.05E+07	4.13E+07	7.615	34.26%
	0.17%	3.70E+07	3.50E+07	3.60E+07	7.556	42.63%
	0.35%	3.45E+06	3.55E+06	3.50E+06	6.544	94.42%
	0.53%	3.25E+06	2.90E+06	3.08E+06	6.488	95.10%
	0.75%	2.75E+06	3.35E+06	3.05E+06	6.484	95.14%
	0.88%	2.15E+06	1.60E+06	1.88E+06	6.273	97.01%
	1.40%	4.50E+05	5.00E+05	4.75E+05	5.677	99.24%
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	TD	TD	TD	TD	TD
	2.81%	TD	TD	TD	TD	TD

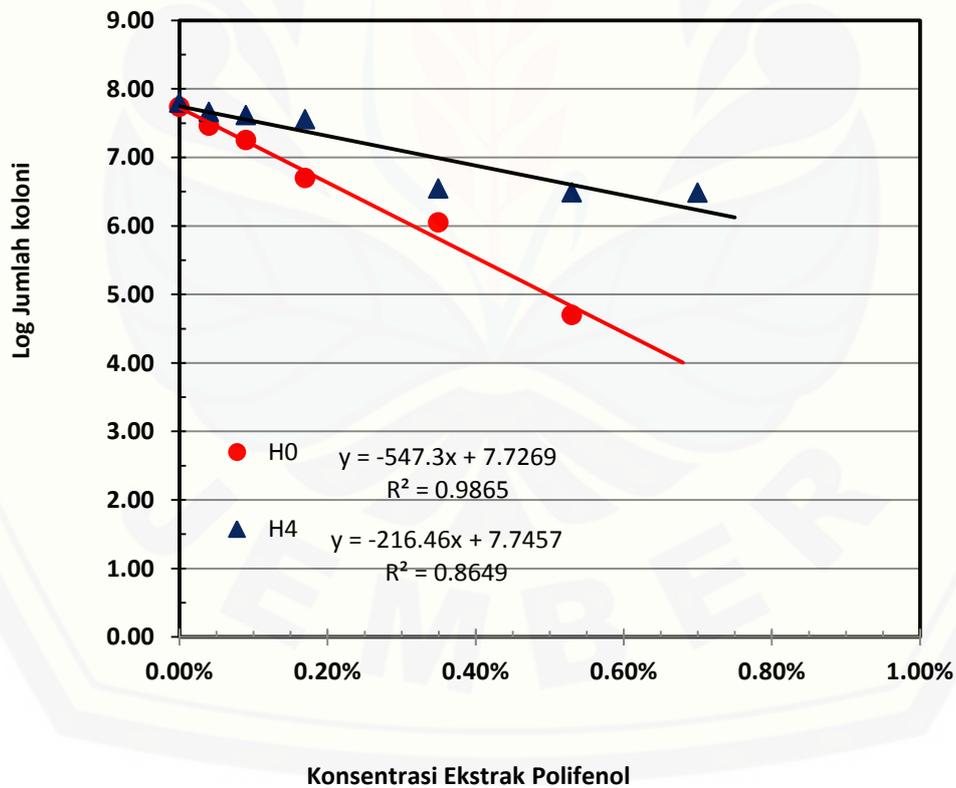
*TD =Tidak Dilakukan

	0.00%	9.10E+07	9.90E+07	9.50E+07	7.978	0.00%
	0.04%	4.50E+07	4.40E+07	4.45E+07	7.648	53.16%
	0.09%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.17%	5.50E+06	4.50E+06	5.00E+06	6.699	94.74%
	0.35%	TD	TD	TD	TD	TD
PYT	0.53%	1.50E+05	3.00E+05	2.25E+05	5.352	99.76%
	0.75%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.88%	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05	5.000	99.89%
	1.40%	TD	TD	TD	TD	TD
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	0.00%	7.80E+07	7.10E+07	7.45E+07	7.872	0.00%
	0.04%	4.20E+07	4.00E+07	4.10E+07	7.613	44.97%
	0.09%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.17%	4.00E+06	8.00E+06	6.00E+06	6.778	91.95%
	0.35%	TD	TD	TD	TD	TD
PBK	0.53%	5.00E+04	2.50E+05	1.50E+05	5.176	99.80%
	0.75%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.88%	5.00E+04	0.00E+00	2.50E+04	4.398	99.97%
	1.40%	TD	TD	TD	TD	TD
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%

*TD =Tidak Dilakukan

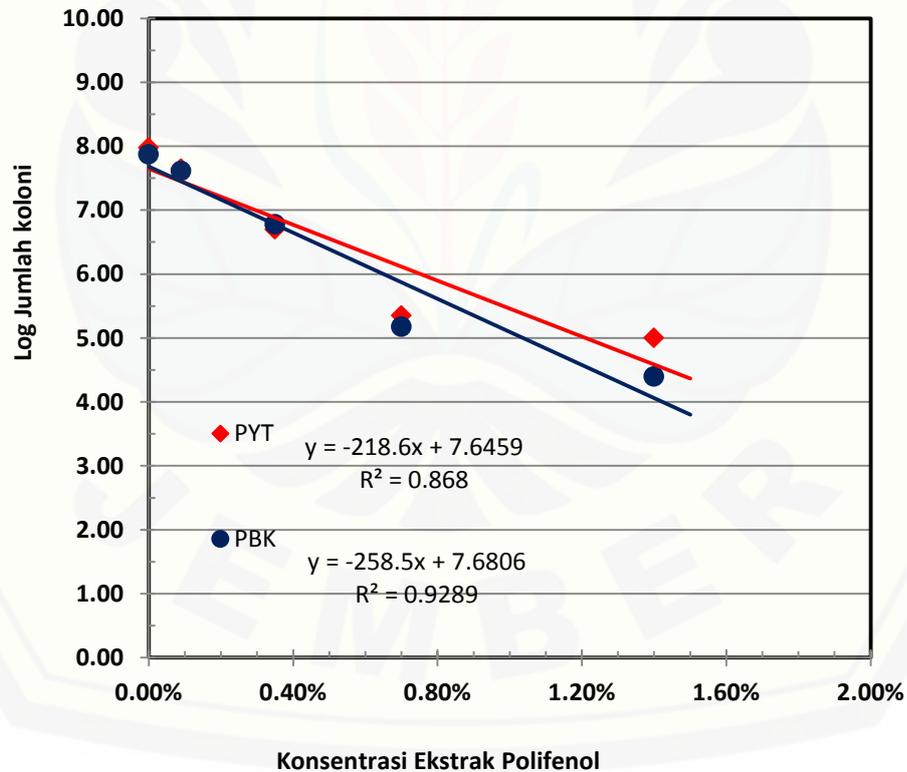
C.3 Penentuan Log Jumlah log Koloni pada bakteri *E.coli* pada sampel Superior

sampel	Konsentrasi	Log jumlah koloni
H0	0.00%	7.7364
	0.04%	7.4624
	0.09%	7.2553
	0.17%	6.6990
	0.35%	6.0512
	0.53%	4.6990
	0.70%	0.0000
	0.88%	0.0000
H4	0.00%	7.7976
	0.04%	7.6651
	0.09%	7.6154
	0.17%	7.5563
	0.35%	6.5441
	0.53%	6.4878
	0.70%	6.4843
	0.88%	6.4878



C.4 Penentuan Jumlah Log Koloni Bakteri *E.coli* pada Sampel Inferior

sampel	Konsentrasi	Log jumlah koloni
PYT	0.00%	7.9777
	0.09%	7.6484
	0.35%	6.6990
	0.70%	5.3522
	1.40%	5.0000
	2.10%	0.0000
	2.81%	0.0000
PBK	1.60%	7.8722
	0.09%	7.6128
	0.35%	6.7782
	0.70%	5.1761
	1.40%	4.3979
	2.10%	0.0000
	2.81%	0.0000



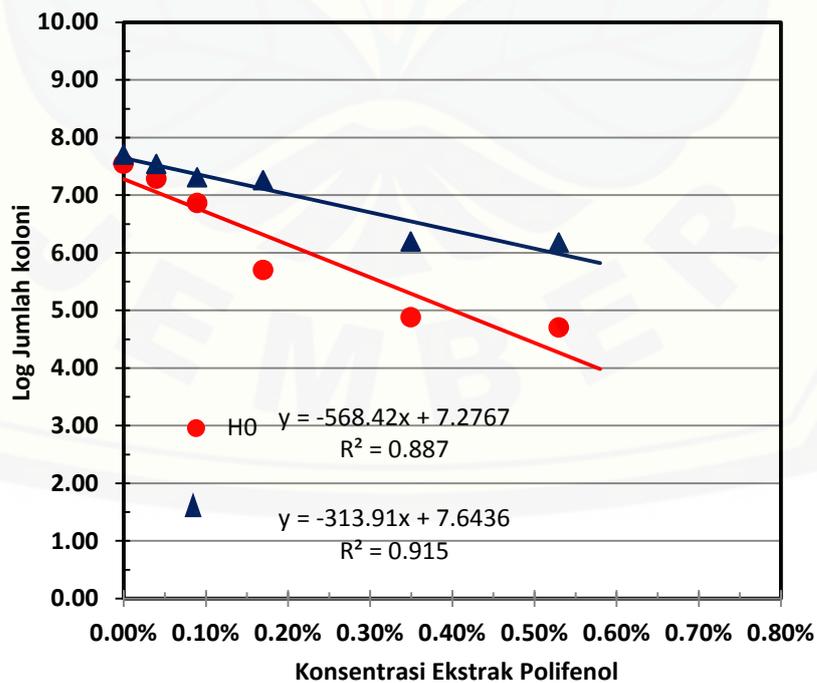
C.5 Data Hasil Perhitungan KHM terhadap Bakteri *B.subtilis*

Sampel	Konsentrasi	Jumlah Koloni (cfu/ml)		Rata-rata (cfu/ml)	Log jumlah koloni	% penghambatan
H0	0.00%	3.90E+07	3.05E+07	3.48E+07	7.541	0.00%
	0.04%	1.85E+07	1.95E+07	1.90E+07	7.279	45.32%
	0.09%	6.50E+06	8.00E+06	7.25E+06	6.860	79.14%
	0.17%	5.00E+05	5.00E+05	5.00E+05	5.699	98.56%
	0.35%	1.00E+05	5.00E+04	7.50E+04	4.875	99.78%
	0.53%	5.00E+04	5.00E+04	5.00E+04	4.699	99.86%
	0.70%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	0.88%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	1.40%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	TD	TD	TD	TD	TD
	2.81%	TD	TD	TD	TD	TD
H4	0.00%	4.60E+07	5.35E+07	4.98E+07	7.697	0.00%
	0.04%	3.40E+07	3.50E+07	3.45E+07	7.538	30.65%
	0.09%	1.90E+07	2.10E+07	2.00E+07	7.301	59.80%
	0.17%	1.45E+07	2.15E+07	1.80E+07	7.255	63.82%
	0.35%	1.30E+06	1.80E+06	1.55E+06	6.190	96.88%
	0.53%	1.55E+06	1.45E+06	1.50E+06	6.176	96.98%
	0.70%	1.30E+05	1.65E+05	1.48E+05	5.169	99.70%
	0.88%	9.50E+04	1.80E+05	1.38E+05	5.138	99.72%
	1.40%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	TD	TD	TD	TD	TD
	2.81%	TD	TD	TD	TD	TD

	0.00%	4.25E+07	3.15E+07	3.70E+07	7.568	0.00%
	0.04%	2.85E+07	2.60E+07	2.73E+07	7.435	26.35%
	0.09%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.17%	7.50E+05	3.50E+05	5.50E+05	5.740	98.51%
	0.35%	TD	TD	TD	TD	TD
PYT	0.53%	5.00E+04	1.50E+05	1.00E+05	5.000	99.73%
	0.70%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.88%	5.00E+04	5.00E+04	5.00E+04	4.699	99.86%
	1.40%	TD	TD	TD	TD	TD
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	0.00%	4.35E+07	3.70E+07	4.03E+07	7.605	0.00%
	0.04%	3.00E+07	2.85E+07	2.93E+07	7.466	27.33%
	0.09%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.17%	1.10E+07	4.00E+06	7.50E+06	6.875	81.37%
	0.35%	TD	TD	TD	TD	TD
PBK	0.53%	1.00E+05	5.00E+04	7.50E+04	4.875	99.81%
	0.70%	TD	TD	TD	TD	TD
	0.88%	0.00E+00	5.00E+04	2.50E+04	4.398	99.94%
	1.40%	TD	TD	TD	TD	TD
	1.75%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%
	2.10%	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.000	100.00%

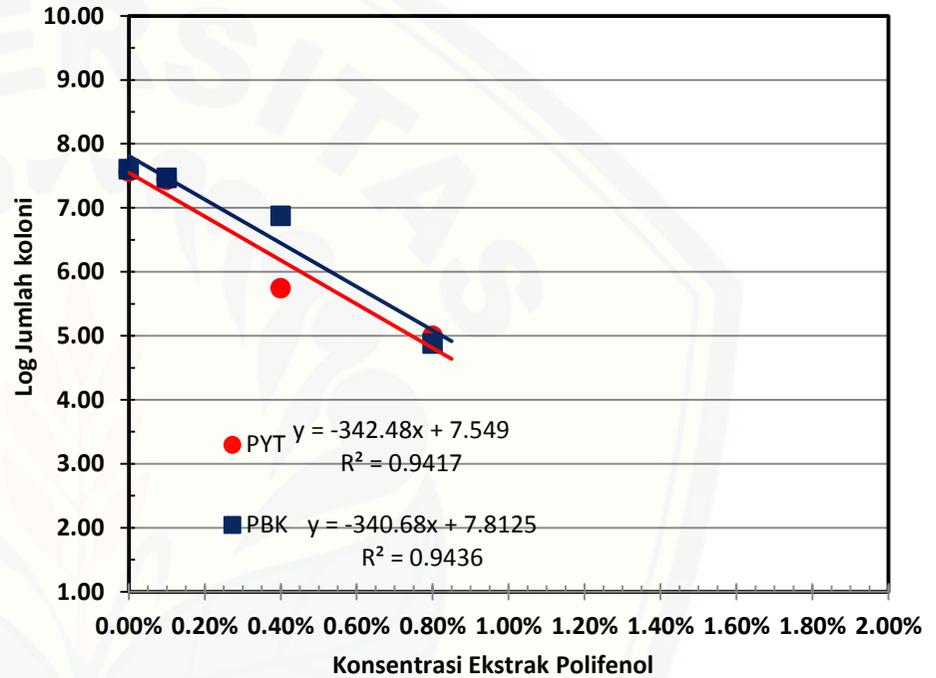
C.6 Data perhitungan Log jumlah koloni Bakteri *B.subtilis* sampel Superior

sampel	Konsentrasi	Log jumlah koloni
H0	0.00%	7.5410
	0.04%	7.2788
	0.09%	6.8603
	0.17%	5.6990
	0.35%	4.8751
	0.53%	4.6990
	0.70%	0.0000
	0.88%	0.0000
	1.40%	0.0000
	1.75%	0.0000
H4	0.00%	7.6968
	0.04%	7.5378
	0.09%	7.3010
	0.17%	7.2553
	0.35%	6.1903
	0.53%	6.1761
	0.70%	5.1688
	0.88%	5.1383
	1.40%	0.0000
	1.75%	0.0000



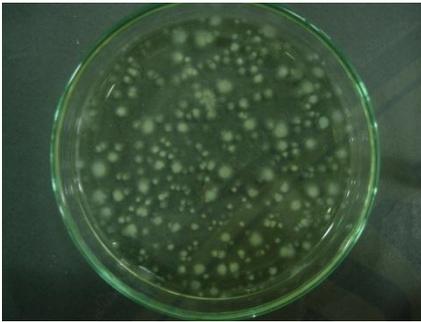
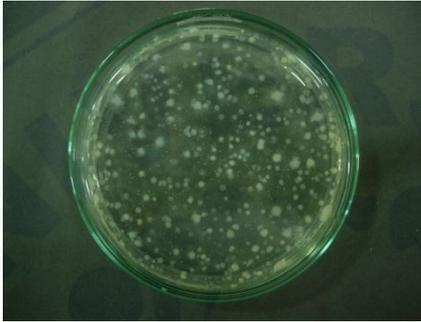
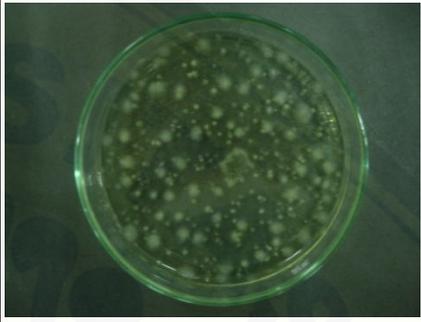
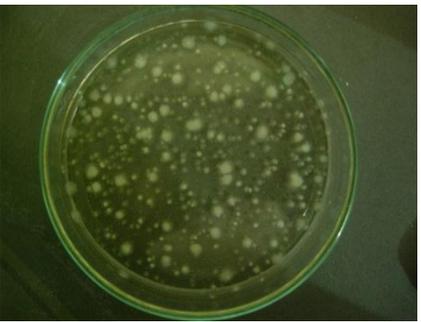
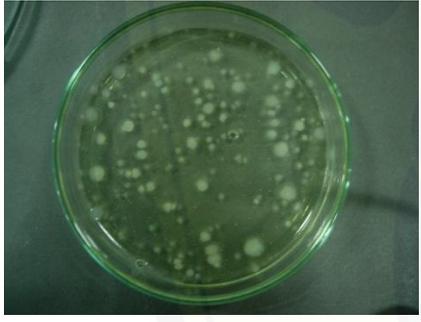
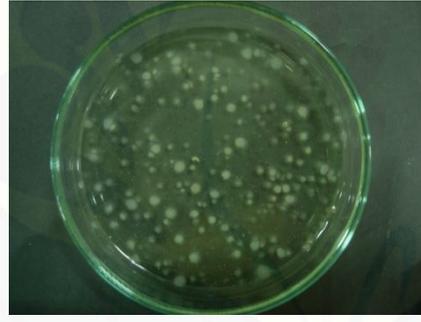
C.7 Data perhitungan Log jumlah koloni Bakteri *B.subtilis* sampel Inferior

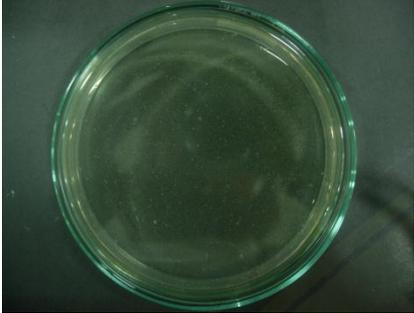
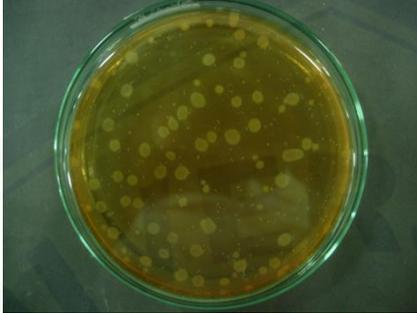
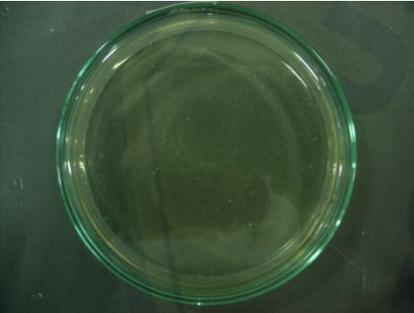
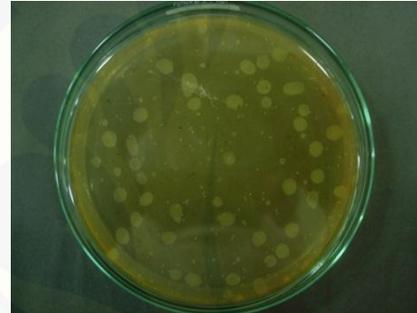
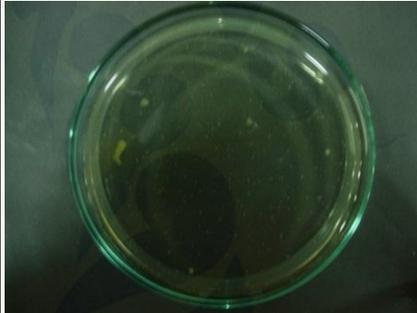
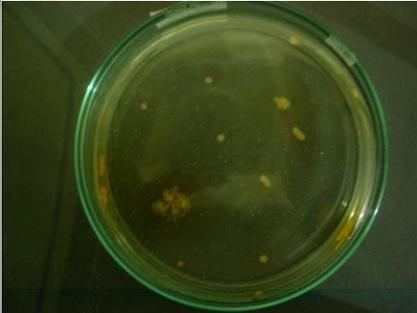
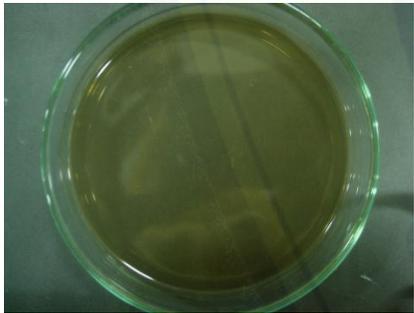
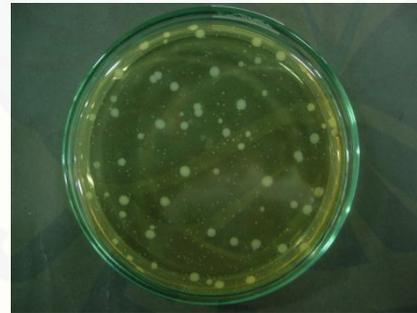
sampel	Konsentrasi	Log jumlah koloni
PYT	0.00%	7.5682
	0.10%	7.4354
	0.40%	5.7404
	0.80%	5.0000
	1.60%	4.6990
	2.40%	0.0000
PBK	0.00%	7.6048
	0.10%	7.4661
	0.40%	6.8751
	0.80%	4.8751
	1.60%	4.3979
	2.40%	0.0000

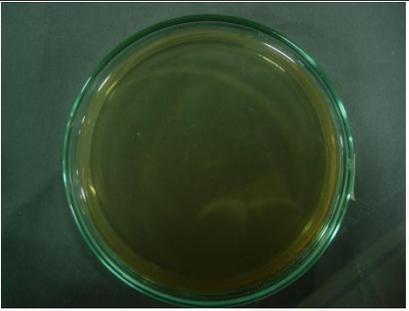
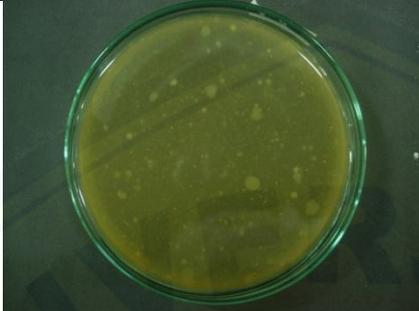
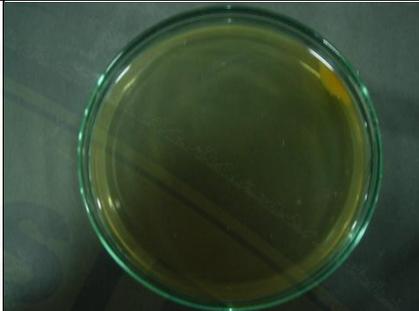
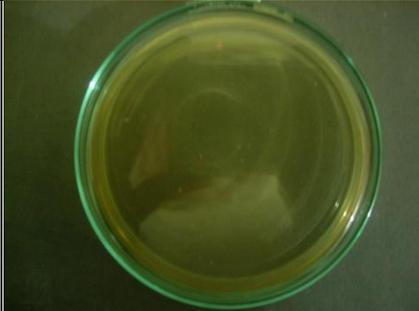
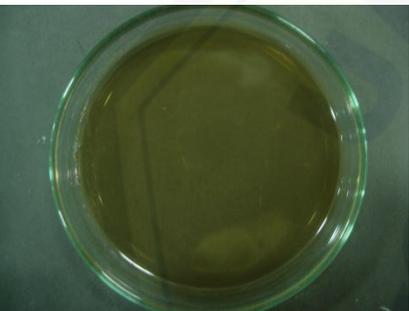
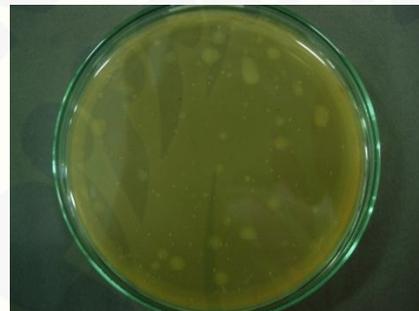
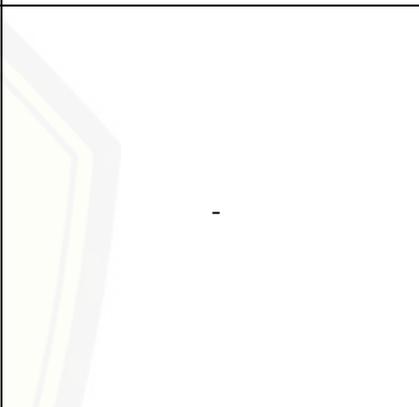
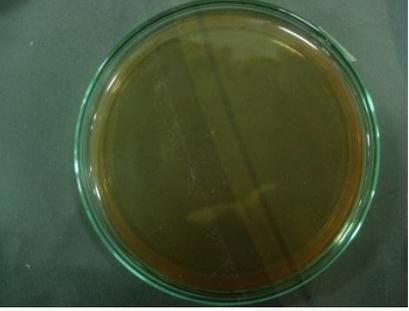
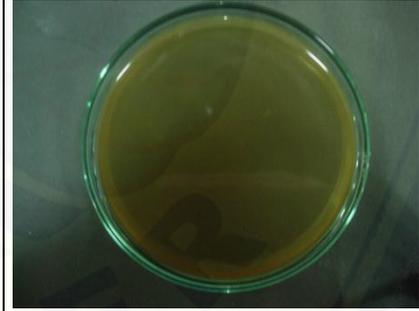
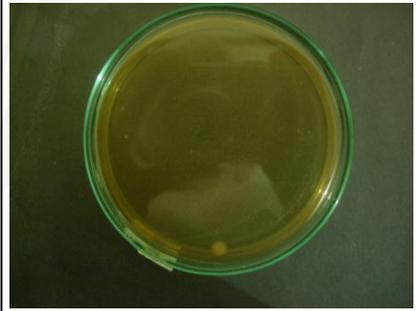


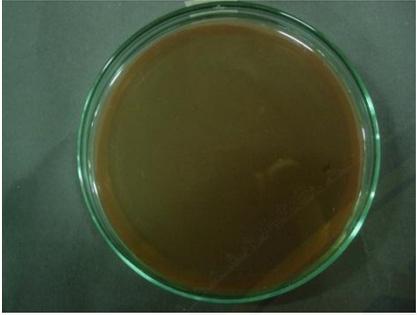
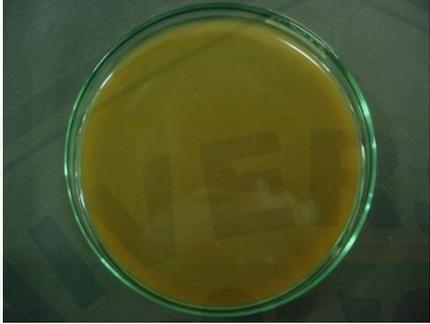
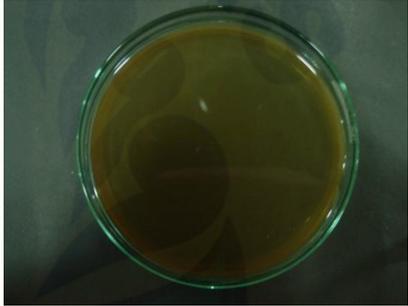
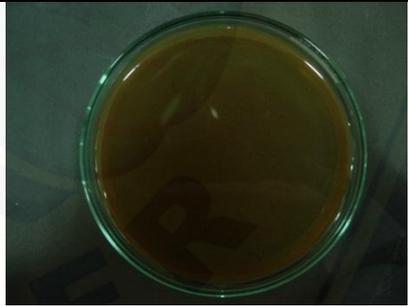
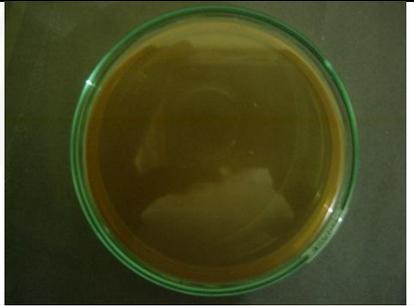
D. Foto Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri *E.coli* dan *B.subtilis*

D.1 Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri *E.coli*

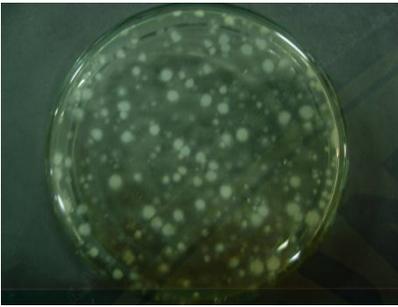
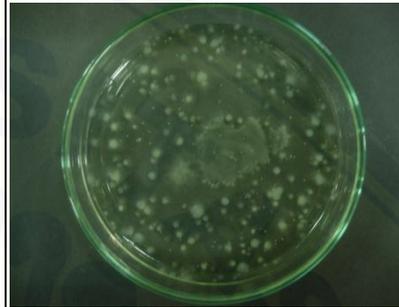
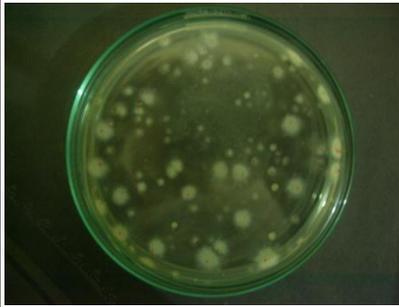
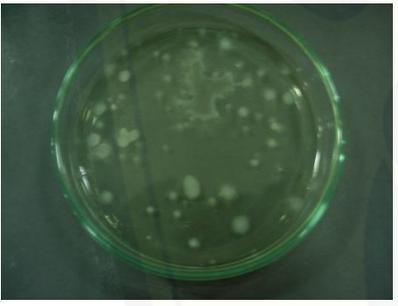
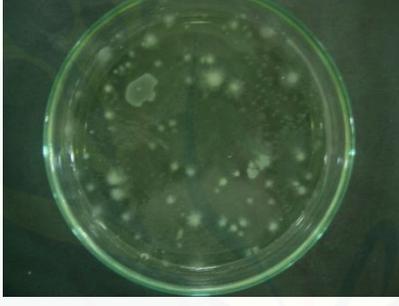
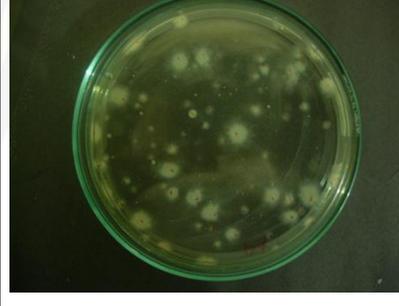
Konsentrasi	Sampel			
	H0	H4	PYT	PBK
0%				
0,04%			-	-
0,09%				

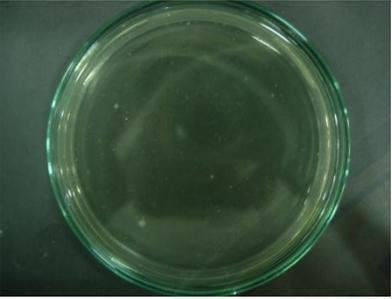
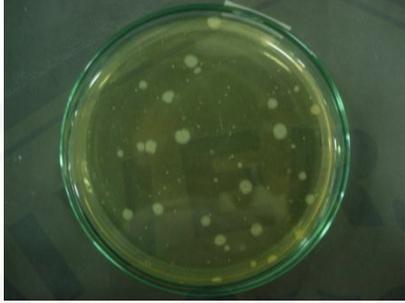
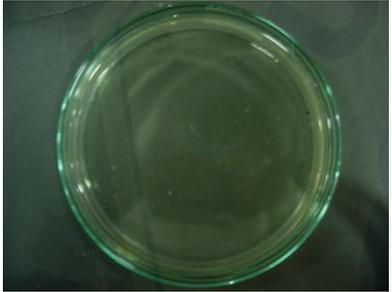
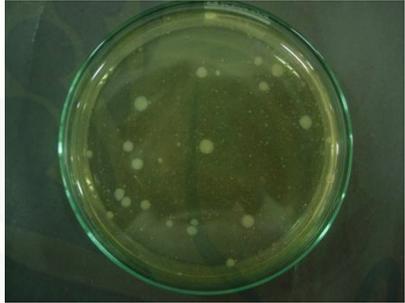
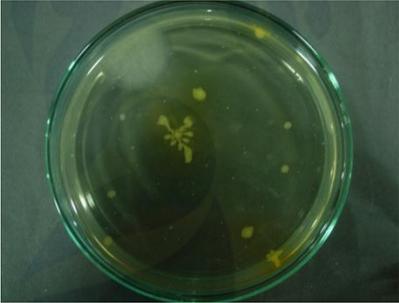
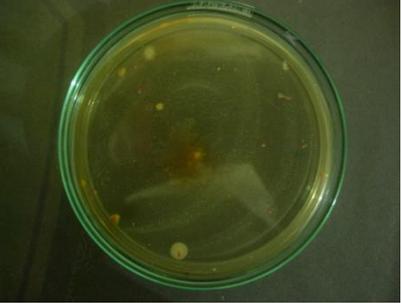
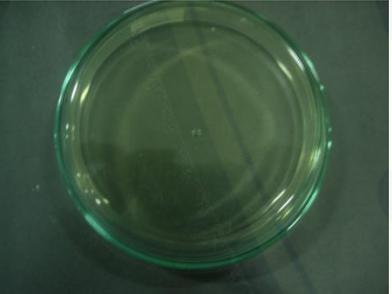
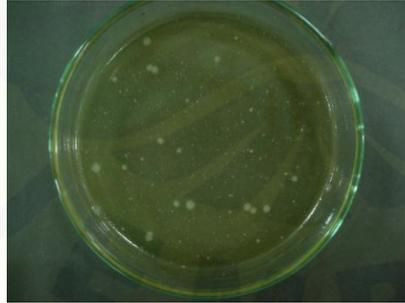
0,17%			-	-
0,35%				
0,53%			-	-

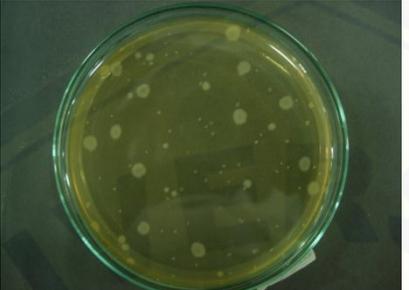
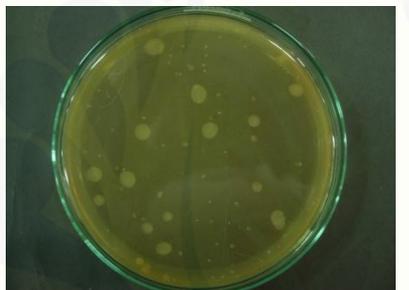
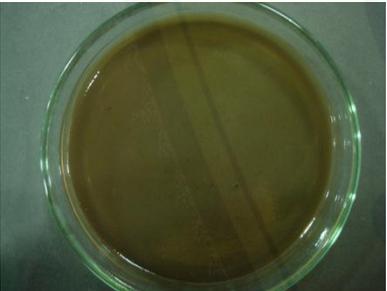
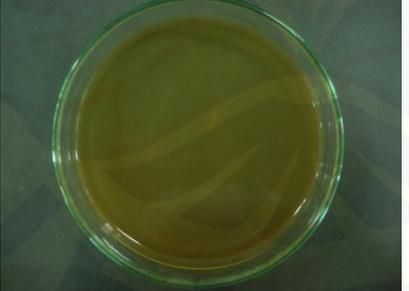
0,70%				
0,88%				
1,40%				

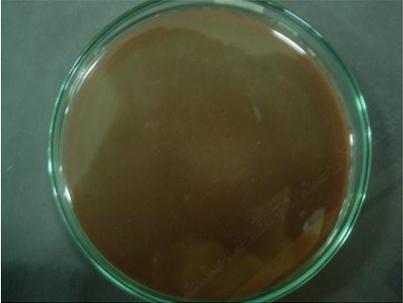
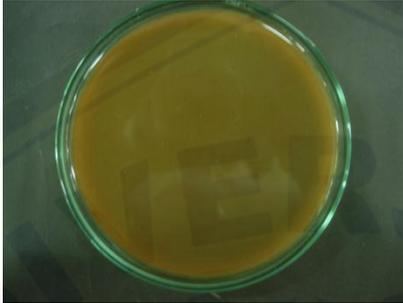
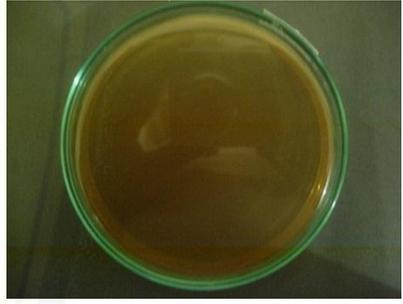
1,75%			-	-
2,10%	-	-		
2,81%	-	-		

D.2 Uji Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri *B.subtilis*

Konsentrasi	Sampel			
	H0	H4	PYT	PBK
0%				
0,04%			-	-
0,09%				

0,17%			-	-
0,35%				
0,53%			-	-

0,70%				
0,88%				
1,40%				

1,75%			-	-
2,10%	-	-		
2,81%	-	-	