

TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

AKTIVITAS EKSTRAK KAYA POLIFENOL BIJI KAKAO SUPERIOR DAN INFERIOR DARI PTP N XII KEBUN KALIKEMPIT- BANYUWANGI SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI

Activity of Polyphenol-Rich Extract from Superior and Inferior Cocoa Beans in PTP N XII Kalikempit-Banyuwangi as Antioxidant and Antibacterial Sources

Ernawati*, Sony Suwasono, Sih Yuwanti

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Kampus Bumi Tegal Boto Jember 68121

*E-mail : ernawati1042@gmail.com

ABSTRACT

*Cocoa is one of main agricultural and plantation commodities in Indonesia. However, the production of cocoa beans in estate disturbed with rotten fruit disease caused by *Phytophthora palmivora* and cocoa pod borer caused by *Conopomorpha cramerella*, thus produced cocoa beans inferior low quality. Therefore need an effort to increase the selling values of the inferior cocoa bean by way of polyphenol extracting. Characterisation of polyphenol-rich extract is colour, yield, total polyphenol, and antioxidant activity and 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 yield of polyphenol-rich extract was from cocoa beans infested by *P.palmivora* (5,84%), colour for all samples were, the highest total polyphenol was from non fermentasi cocoa beans (284,56 mg/g), and the highest antioxidant activity of polyphenols extract was from non fermentasi beans (73,03%). Polyphenol-rich extract from non fermentasi 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.*

Key words: Polyphenol extract, Antioxidant, Antibacterial, *E.coli*, *B.subtilis*.

ABSTRAK

Kakao merupakan salah satu komoditas andalan perkebunan di Indonesia. Akan tetapi produksi kakao dikebun terganggu dengan adanya serangan hama PBK oleh *Conopomorpha cramerella* dan penyakit busuk buah oleh *Phytophthora palmivora* sehingga dihasilkan biji kakao inferior yang bermutu rendah. Oleh karena itu perlu upaya untuk meningkatkan nilai jual biji inferior dengan cara mengekstrak polifenolnya. Karakteristik ekstrak kasar polifenol meliputi rendemen, warna, total polifenol, dan aktivitas antioksidan dan dilakukan uji antibakteri dengan penentuan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan Inhibition Concentration 50% (IC50) terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *B.subtilis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak polifenol dengan rendemen tertinggi yaitu sampel terserang *Phytophthora palmivora* sebesar 5,84%, warna semua sampel menunjukkan warna ungu gelap, total polifenol tertinggi didapatkan dari perlakuan non fermentasi yakni sebesar 284,56 mg/g, dan aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh dari ekstrak polifenol pada sampel non fermentasi yaitu 73,03 %. Ekstrak polifenol non fermentasi memiliki nilai KHM dan IC50 adalah 0,157% dan 0,083% untuk bakteri *E.coli* dan pada bakteri *B.subtilis* 0,14% dan 0,08%. Pada sampel terserang *P. Palmivora* nilai KHM dan IC50 0,327% dan 0,172% untuk bakteri *E.coli* dan pada bakteri *B.subtilis* 0,34% dan 0,18% . Pada sampel terserang *C.cramerella* nilai KHM dan IC50 0,342% dan 0,18% untuk bakteri *E.coli* dan pada bakteri *B.subtilis* 0,40% dan 0,21.

Kata kunci: Ekstrak polifenol, Antioksidan, Antibakteri, *E.coli*, *B.subtilis*

How To Cite: Ernawati., Suwasono, S., Yuwanti, S. 20xx. Aktivitas Ekstrak Kaya Polifenol Biji Kakao Superior dan Inferior dari PTP N XII Kebun Kalikempit-Banyuwangi Sebagai Sumber Antioksidan dan Antibakteri. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

PENDAHULUAN

Menurut Goenadi *et al.* (2005), agribisnis kakao 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% per tahunnya (Sulistiyowati *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 cokelat. 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 *Escherichia coli* dan *Basillus 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 *Escherichia coli* dan *Basillus 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) di desa 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%. Oleh karena itu pada penelitian ini peneliti ingin mempelajari profil ekstrak polifenol biji kakao yang diambil dari PTPN XII kebun Kalikempit-Banyuwangi dengan ketinggian 340 m dpl.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian. Penelitian ini dilaksanakan di PTPN XII Kebun Kalikempit, Banyuwangi dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Rekayasa Proses dan Hasil Pertanian serta Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada bulan Januari sampai Desember 2014.

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.

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 Na₂CO₃, aseton, larutan katekin, reagen DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidroksil), akuades, benang wol, kertas saring, aluminium foil, larutan IF (metanol dan HCl), spiritus, NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), alkohol 70%, DMSO 2%, kultur bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*.

Rendemen bubuk polifenol (Misnawi et al., 2003) . Bubuk polifenol kasar yang dihasilkan dihitung rendemennya menggunakan rumus :

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

Warna Bubuk Polifenol. Penentuan warna pada ekstrak polifenol biji kakao dilakukan menggunakan Colour Reader Minolta CR-300. Colour reader distandardkan 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 L, a dan b secara tegak lurus .

Total Polifenol (Singleton dan Rossi, 1965). Sebanyak 0,125 gram sampel ekstrak polifenol dilarutkan dengan 20 ml aseton 80%, kemudian dimasukkan dalam beaker glass dan ditutup aluminium 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 625 µl 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), keudian 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, diamkan selama 2 jam, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm . Total polifenol dihitung dengan rumus berikut

$$\text{Total Polifenol (mg/g)} = \frac{X \times \text{Volume Total}}{\text{Berat Sampel}}$$

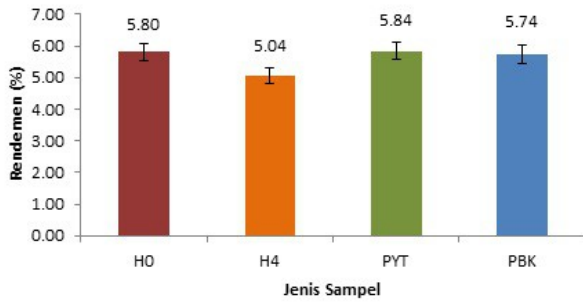
Aktifitas antioksidan (Gadow, 1996). Sebanyak 0.1 gram sampel dilarutkan dalam 10 ml etanol pada beaker glass 50 ml, kemudian ditutup dengan aluminium foil dan distirer selama 30 menit. Selanjutnya disentrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Filtrat yang dihasilkan diambil 0,5 ml dan ditambah 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.

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

Kemampuan Penghambatan Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri E.coli dan B.subtilis (Metode Dilusi Agar). Uji penghambatan dilakukan dengan menentukan nilai KHM dan IC50. pada pengujian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap pertama persiapan sampel, tahap kedua pengujian dan tahap ketiga adalah tahap pengamatan. Tahap pertama yaitu penyiapan sampel yang meliputi proses sterilisasi alat dan bahan dengan autklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm (Dwidjoseputro, 1990). Selanjutnya adalah pembuatan larutan uji dengan konsentrasi 0,04%; 0,09%; 0,17%; 0,35%; 0,53%; 0,70%; 0,88%; 1,40%; 1,75%; 2,10% dan 2,81%. Selain itu pembuatan isolat bakteri (*Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*) dan Pembuatan kontrol negatif (0%) yaitu hanya menggunakan DMSO 20µl yang ditambah dengan larfis 980µl dan media yang masih hangat. Tahap kedua adalah pengujian yaitu masing-masing media NA yang masih hangat (cair) ditambahkan pada larutan uji dengan perbandingan 4:1 sehingga didapatkan konsentrasi 0,04%; 0,09%; 0,17%; 0,35%; 0,53%; 0,70%; 0,88%; untuk penggunaan ekstrak polifenol kakao superior dan konsentrasi 0,09%; 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. Tahap terakhir adalah pengamatan yaitu perhitungan jumlah koloni pada cawan petri pada masing-masing konsentrasi dengan colony counter dan kemudian dibandingkan dengan hasil pada kontrol negatif.

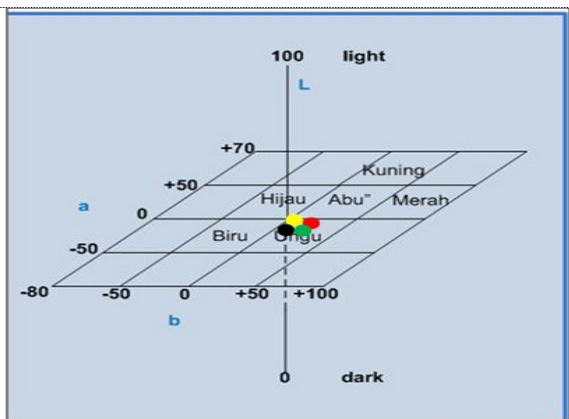
HASIL

Rendemen ekstrak polifenol. Rendemen yang dihasilkan tidak jauh berbeda pada keempat sampel. Rendemen tertinggi yaitu pada sampel terserang busuk buah sebesar 5,84% dan terendah pada sampel superior fermentasi yaitu sebesar 5,04%. Hasil analisis rendemen dapat dilihat pada **Gambar 1**.



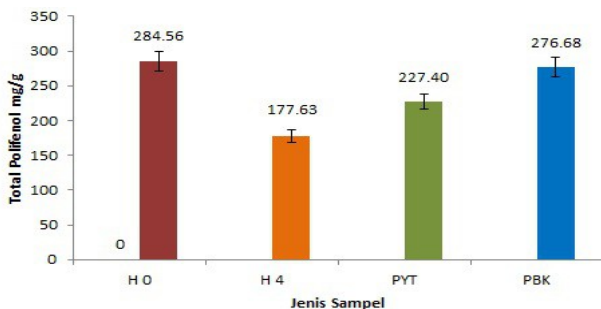
Gambar 1. Rendemen Bubuk Polifenol Kasar (H0 = Sampel non fermentasi; H4 = Sampel fermentasi ; PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

Warna Ekstrak Polifenol. Hasil pengukuran warna yang didapatkan yaitu menunjukkan bahwa semua sampel yang digunakan adalah berwarna ungu gelap. Hasil pengukuran warna dapat dilihat pada **Gambar 2**.



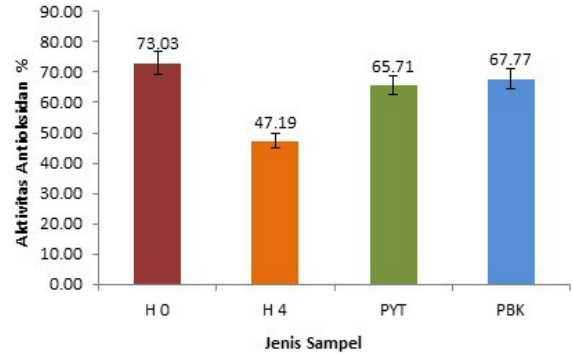
Gambar 2. Plot Warna Bubuk Polifenol Kasar (Titik Kuning = Sampel non fermentasi; Titik Merah = Sampel fermentasi ; Titik Hitam = Sampel terserang *P. palmivora*; Titik Hijau = Sampel Terserang *C. cramerella*)

Total Polifenol. Hasil analisis total polifenol tertinggi yaitu pada sampel superior non fermentasi sebesar 284,56 mg/g dan terendah sampel superior non fermentasi sebesar 177,63 mg/g. Sedangkan pada sampel terserang busuk buah dan PBK lebih tinggi dari dari sampel fermentasi karena sampel terserang penyakit dan hama tidak dilakukan fermentasi. Hasil dapat dilihat pada **Gambar 3**.



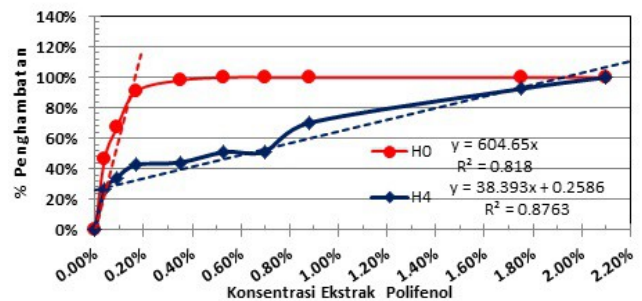
Gambar 3. Total Polifenol (H0 = Sampel non fermentasi; H4 = Sampel fermentasi ; PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

Aktivitas Antioksidan. Hasil analisis aktivitas antioksidan yaitu tertinggi pada sampel superior non fermentasi sebesar 73,03% dan terendah pada sampel superior non fermentasi sebesar 47,19%. sedangkan pada sampel terserang penyakit busuk buah dan hama PBK nilai aktivitas antioksidannya lebih tinggi daripada sampel superior fermentasi dikarenakan sampel terserang hama dan penyakit tidak dilakukan fermentasi sehingga kandungan polifenol masih cukup tinggi dan memiliki antioksidan yang baik. Hasil dapat dilihat pada **Gambar 4**.

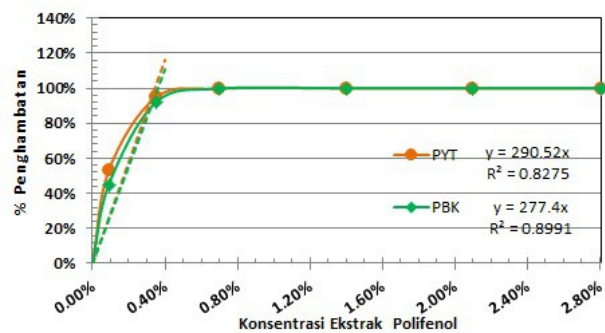


Gambar 4. Aktivitas Antioksidan (H0 = Sampel non fermentasi; H4 = Sampel fermentasi ; PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

Nilai KHM dan IC50 untuk Bakteri E.coli. Grafik penghambatan pada bakteri *E. coli* dapat dilihat pada **Gambar 5** dan **Gambar 6**. Pada tabel dapat menjelaskan bahwa nilai KHM dan IC50 pada sampel non fermentasi yaitu 0,157% dan 0,083%, pada sampel fermentasi nilai KHM dan IC50 yaitu 1,801% dan 0,629%. sedangkan pada sampel terserang busuk buah nilai KHM dan IC50 yaitu 0,327% dan 0,172%.



Gambar 5. Grafik Penghambatan untuk Bakteri *E.coli* (H0 = Sampel non fermentasi dan H4 = Sampel fermentasi)



Gambar 6. Grafik Penghambatan untuk Bakteri *E.coli* (PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

pada sampel terserang PBK nilai KHM dan IC50 yaitu 0,342% dan 0,180%.

PEMBAHASAN

1. Karakteristik Ekstrak Polifenol

a. Rendemen Ekstrak polifenol

Berdasarkan **Gambar 1** 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 hidrolis dan perendaman petroleum benzena selain lemak yang terekstrak terikut pula fosfolipida, sterol, asam lemak bebas, karotenoid dan pigmen yang lain.

b. Warna Ekstrak Polifenol

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 2** 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.

c. Total Polifenol

Berdasarkan **Gambar 3** 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. Pada analisa total polifenol, hasil penelitian menunjukkan semakin lama fermentasi terjadi penurunan kandungan polifenol. Penurunan kadar polifenol disebabkan oleh adanya perubahan enzimatik dengan terbukanya permukaan biji sehingga akan mengaktifkan enzim polifenol oksidase yang membentuk quinon dan diquinon seperti yang dinyatakan oleh (Soenaryo; 1988). Selain itu perubahan pH dan suhu tersebut akibat terbentuknya asam asetat dari hasil oksidasi alkohol oleh *Acetobacter* sehingga akan terjadi degradasi senyawa polifenol selama fermentasi (Jalil; 2006), sedangkan pada sampel terserang hama dan penyakit nilai total polifenol cukup tinggi dibandingkan dengan sampel fermentasi dikarenakan sampel terserang hama dan penyakit tidak difermentasi.

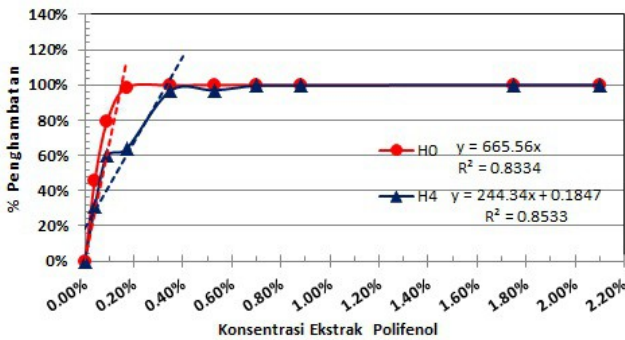
d. Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan **Gambar 4** 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

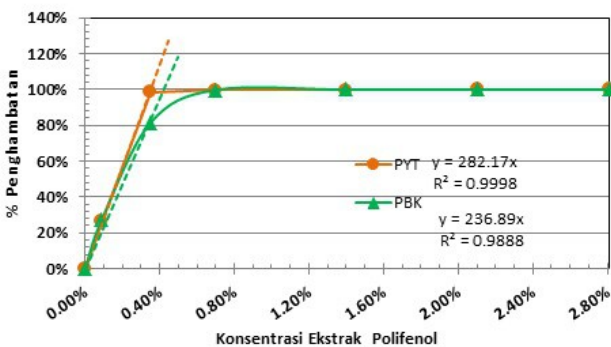
Ekstrak Sampel	Persamaan Garis	R ²	IC ₅₀ (x)	KHM
H0	y = 604.65x	0.818	0.083%	0.157%
H4	y = 38.393x + 0.2586	0.8763	0.629%	1.801%
PYT	y = 290.52x	0.8275	0,172%	0.327%
PBK	y = 277.4x	0.8991	0,180%	0.342%

Gambar 7. Tabel nilai KHM dan IC50 pada Bakteri *E.coli* (H0 = Sampel non fermented; H4 = Sampel fermented ; PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

Nilai KHM dan IC50 untuk Bakteri B.subtilis. Grafik penghambatan pada bakteri *B.subtilis* dapat dilihat pada **Gambar 8** dan **Gambar 9**. Pada tabel dapat menjelaskan bahwa nilai KHM dan IC50 pada sampel non fermentasi yaitu 0,14% dan 0,08%, pada sampel fermentasi nilai KHM dan IC50 yaitu 0,31% dan 0,13%. sedangkan pada sampel terserang busuk buah nilai KHM dan IC50 yaitu 0,34% dan 0,18%, pada sampel terserang PBK nilai KHM dan IC50 yaitu 0,40% dan 0,21%.



Gambar 8. Tabel nilai KHM dan IC50 pada Bakteri *B.subtilis* (H0 = Sampel non fermented; H4 = Sampel fermented)



Gambar 9. Tabel nilai KHM dan IC50 pada Bakteri *B.subtilis* (PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

Ekstrak Sampel	Persamaan Garis	R ²	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%

Gambar 10. Tabel nilai KHM dan IC50 pada Bakteri *B.subtilis* (H0 = Sampel non fermented; H4 = Sampel fermented ; PYT = Sampel terserang *P. palmivora*; PBK = Sampel Terserang *C. cramerella*)

tertinggialah 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

2. Pengujian Antibakteri Ekstrak Polifenol terhadap Bakteri *E.coli* dan *B. subtilis*.

a. Antibakteri terhadap *E.coli*

Berdasarkan **Gambar 5** 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 6** 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 karena tidak dilakukan fermentasi, walaupun biji tidak berkembang baik.

b. Antibakteri terhadap *B.subtilis*

Berdasarkan **Gambar 8** dapat diketahui bahwa sampel ekstrak polifenol memiliki penghambatan yang berbeda-beda pada bakteri *B.subtilis*. Sampel H0 pada konsentrasi 0,14% menunjukkan penghambatan lebih dari 90% terhadap pertumbuhan *B.subtilis*, sedangkan untuk sampel H4 menunjukkan penghambatan lebih dari 90% pada konsentrasi 0,31%. Pada **Gambar 9** 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 positif seperti *B.subtilis*. Hal ini disebabkan karena kandungan polifenol pada biji kakao terserang hama dan penyakit masih cukup tinggi karena tidak dilakukan fermentasi, walaupun biji tidak berkembang baik.

Mekanisme polifenol sebagai antimikroba beragam tergantung dari jenis senyawanya. Pada biji kakao kandungan polifenol terbesar adalah proisianidin yaitu tanin terkondensasi. Mekanisme tanin sebagai antibakteri yaitu menyebabkan proteolisis dan inhibisi sintesis dinding sel mikroba (Kylli *et al*; 2011). *E.coli* dan *B.subtilis* merupakan bakteri dengan gram yang berbeda, sehingga kepekaannya terhadap perlakuan fisik, enzim dan antibiotik berbeda (Fardiaz; 1983). Menurut Peleazar 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 lipoposakarida.

PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan yaitu karakteristik bubuk ekstrak polifenol inferior tidak berbeda jauh dengan bubuk ekstrak polifenol *non* fermentasi walaupun biji tidak berkembang dengan baik. Selain itu ekstrak polifenol biji kakao inferior berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif dan dapat dijadikan sebagai sumber antioksidan dan antibakteri alami.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak terimakasih kepada PTP N XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi dan semua pihak yang telah mendukung terselesainya penelitian yang dilakukan oleh penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Departemen Perindustrian. 2013. *Gambaran Sekilas Industri Kakao*. Jakarta : Departemen Perindustrian.
- Ditjen Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian. 2013. *Profil Olahan Kakao Indonesia*. Jakarta : Departemen Pertanian
- Fardiaz, S. 1989. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi Pangan*. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian IPB
- Gadow, A. 1996. Comparison of the Antioxidan Activity of Aspalathin with that of other Plant Phenol of Roiboos ten (*Aspalathus linearis*). *J. Agric. Food chem*, Vol. 45 : 832-836
- Goenadi, Bako, Herman, dan Purwoto. 2005. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Kakao di Indonesia*. Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian.
- Harmawan, S. 2010. "Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Kering non fermentasi Terserang *Conopomorpha cramerella* snellen dan *Pytophthora palmivora* Butler sebagai Antibakteri". Skripsi. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Jalil, A. M. M dan Ismail, A. 2006. Polyphenol in Cocoa and Cocoa Product Beetwen Antioxidan Properties and Health. *Journal Review Molecules*. Vol. 13 : 2190-2219.
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimia, R., Westerland-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
- Kusuma, Y. 2013. "Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber Antioksidan dan Antibakteri". Skripsi. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. 2003. Effect of Cocoa Bean Polyphenol on Sensory Properties and Their Changes during Fermentation. *Pelita Perkebunan*. Vol. 19 : 90-103.
- Pelczar, M & Chan. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid I*. Jakarta : UI Press.
- Prayoga, R. 2010. "Pemanfaatan Biji Kakao untuk Produksi Polifenol sebagai Senyawa Antibakteri". Skripsi. Jember : FTP Universitas Jember.
- Reyhan, P.S.R. 2014. "Produksi Polifenol dari Olahan Primer Biji Kakao Bulk Sebagai Senyawa Antioksidan dan Antimikroba". Skripsi. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Singelton, V.L & Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagen. *Journal Enology and Viticulture*. Vol. 16 : 147
- Soenaryo, S. 1998. Pengaruh Lama Fermentasi dan Perendaman Terhadap Mutu Lemak Kakao. *Pelita Perkebunan*. Vol. 4 : 73-80
- Sulistiyowati, E., Yohanes, D., Juniarto, Sukamto, S., Sukadar, W., Winarto, L., & Primawati, N. 2003. *Analisis Status Penelitian dan Pengembangan PHT pada Pertanaman Kakao*. Risalah Simposium Nasional Penelitian PHT Perkebunan Rakyat Bogor, (17-18 September 2003).
- Wahyudin, A. 2013. "Ekstraksi Zat Antimikroba (Polifenol) Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terserang *Pytophthora palmivora* dengan Variasi Pelarut". Skripsi. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.