



**MIKROENKAPSULASI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO
INFERIOR SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

Oleh

**NUR AISYAH
NIM. 111710101065**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**





**MIKROENKAPSULASI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO
INFERIOR SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**

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

**NUR AISYAH
NIM. 111710101065**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada :

1. Allah SWT.
2. Kedua orang tuaku yang selama ini tak henti berdoa untuk kesuksesanku
3. Keluarga besarku di Lamongan
3. Guru –guruku sejak kanak-kanak hingga perguruan tinggi.
4. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian



MOTO

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”
(QS. Al- insyirah : 5-6)

“Menuntutlah ilmu hingga ke negeri cina”
(Sabda Rasulullah)

“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi sesamanya”
(Sabda Rasulullah)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Nur Aisyah

NIM : 111710101065

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Mikroenkapsulasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao Inferior Sebagai Sumber Antioksidan dan Antimikroba“ 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, 06 Juni 2016

Yang menyatakan,

Nur Aisyah
NIM. 111710101065

SKRIPSI

**MIKROENKAPSULASI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KAKAO
INFERIOR SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIMIKROBA**

oleh

Nur Aisyah
NIM 111710101065

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Giyarto M. Sc.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Mikroenkapsulasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao Inferior Sebagai Sumber Antioksidan dan Antimikroba” karya Nur Aisyah, NIM 111710101065, telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : 06 Juni 2016

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

Ir. Giyarto M. Sc.
NIP. 196607181993031013

Tim Penguji :

Ketua,

Anggota,

Dr. Nurhayati S. TP., M.Si.
NIP. 197904102003122004

Dr. Puspita Sari, S.TP, M.Ph.
NIP. 197203011998022001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Universitas Jember,

Dr. Yuli Witono, S.TP, MP.
NIP. 196912121998021001

RINGKASAN

Mikroenkapsulasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao Inferior Sebagai Antioksidan dan Antimikroba; Nur Aisyah, 111710101056; 2016; 79 Halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

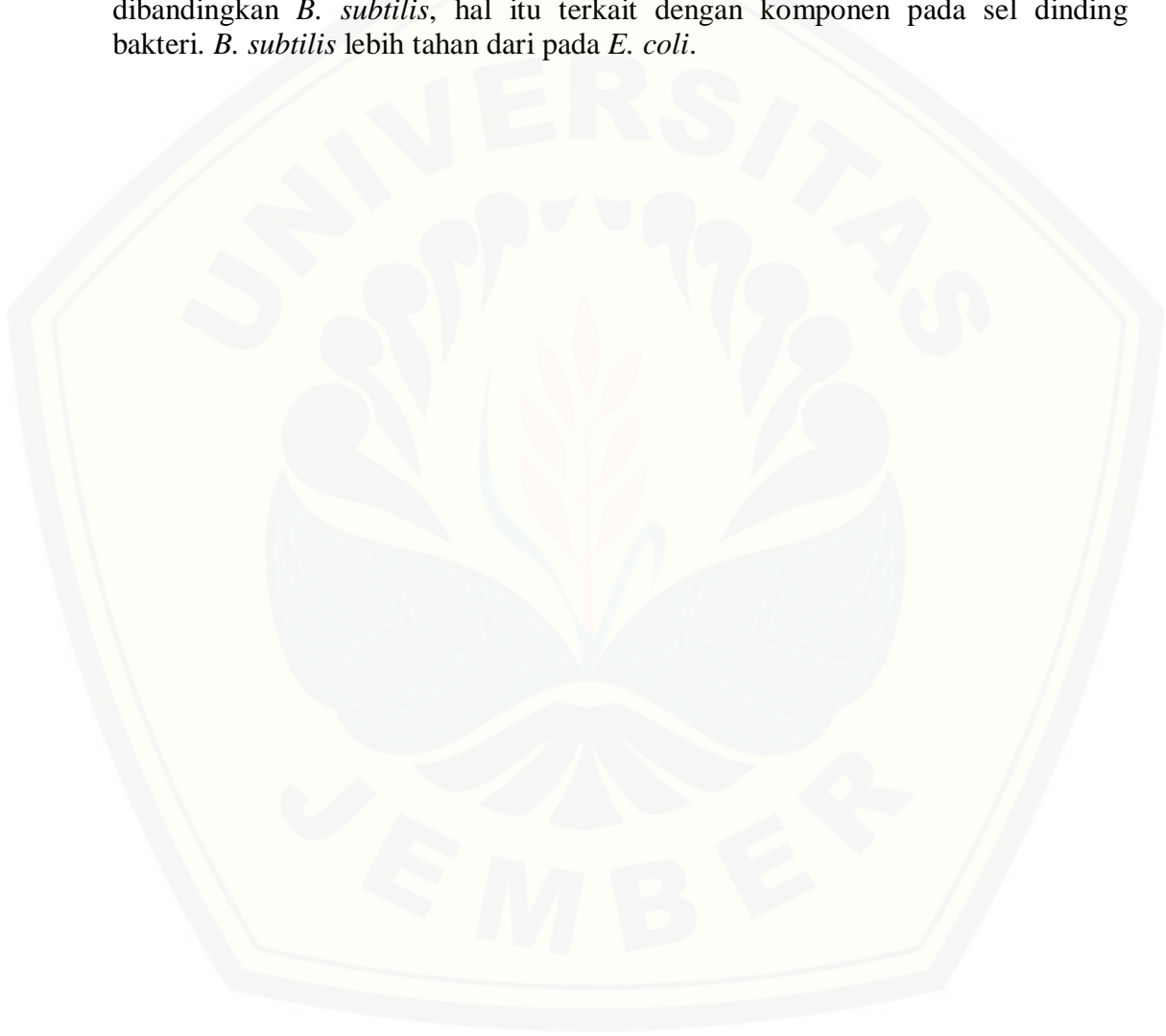
Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan komoditas perkebunan yang secara ekonomi penting di Indonesia. Jumlah produksi kakao nasional mengalami peningkatan setiap tahun. Saat ini, kualitas biji kakao menjadi rendah karena terserang hama tanaman kakao. Kakao yang berasal dari buah kakao yang terserang hama tanaman, disebut biji kakao inferior. Biji kakao inferior mengandung polifenol yang tinggi. Tiga kelompok polifenol utama dalam biji kakao adalah katekin atau flavan-3-ols (37%), antosianin (4%) dan protosianidin (58%). Biji kakao Inferior memiliki sifat fungsional yakni memiliki aktivitas antioksidan tinggi dan aktivitas antimikroba. Polifenol memiliki kelarutan rendah dalam air dan kurang stabil pada kondisi lingkungan (cahaya, oksigen, suhu dan kegiatan enzimatik). Mikroenkapsulasi dengan metode *spray drying* merupakan salah satu teknologi untuk melindungi senyawa bioaktif seperti polifenol dengan menggunakan bahan enkapsulan. Maltodekstrin umumnya digunakan sebagai bahan enkapsulan. Maltodekstrin memiliki harga rendah, viskositas rendah pada rasio tinggi, kelarutan dalam air, dan hambat. Oleh karena itu, perlu diketahui konsentrasi yang tepat dari maltodekstrin untuk mendapatkan mikroenkapsul yang baik sebagai antioksidan dan antimikroba.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi maltodekstrin yang sesuai dan pengaruh perbedaan konsentrasi maltodekstrin terhadap mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior sebagai antioksidan dan antimikroba. Hasil penelitian diharapkan mampu meningkatkan nilai ekonomi dari biji kakao inferior serta mendapatkan produk mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior yang baik.

Penelitian terdiri dari tiga tahap, tahap pertama adalah ekstraksi lemak dan polifenol biji kakao inferior, tahap kedua adalah mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior dengan menggunakan konsentrasi maltodekstrin yang berbeda yakni 5% (M05), 10% (M10), dan 15% (M15), dan tahap ketiga adalah analisis mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior, yang meliputi aktivitas antioksidan, aktivitas antimikroba, warna, total polifenol, rendemen, efisiensi enkapsulasi, dan ukuran partikel. Data yang diperoleh kemudian diolah secara deskripsi. Data ini disusun dalam bentuk tabel dan grafik, dan kemudian diinterpretasikan untuk disimpulkan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi maltodekstrin memiliki pengaruh terhadap mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior. Ukuran partikel mikroenkapsul pada perlakuan M05 sebesar 53,34 μm , M10 sebesar 73,79, dan M15 sebesar 107,68 μm , sedangkan bentuk mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior menunjukkan bentuk, penyok, dan keriput. Rendemen pada perlakuan M15 lebih tinggi dari M05 dan M10. Hal ini menunjukkan bahwa rendemen mikroenkapsul semakin tinggi ketika konsentrasi maltodekstrin

ditingkatkan. Warna mikroenkapsul adalah merah ke unguan. Hal ini disebabkan karena ekstrak polifenol biji kakao inferior mengandung antosianin. Total polifenol, aktivitas antioksidan dan aktivitas antimikroba pada perlakuan M05 lebih tinggi dari pada M10 dan M15. Hal ini menunjukkan kandungan total polifenol, aktivitas antioksidan dan aktivitas antimikroba secara signifikan mengalami penurunan ketika konsentrasi maltodekstrin ditingkatkan. Hal itu karena ketika konsentrasi maltodekstrin meningkat, ukuran partikel dan berat mikroenkapsul akan meningkat, sedangkan jumlah polifenol pada setiap perlakuan sama. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap *E. coli* lebih rendah dibandingkan *B. subtilis*, hal itu terkait dengan komponen pada sel dinding bakteri. *B. subtilis* lebih tahan dari pada *E. coli*.



SUMMARY

Microencapsulation of Polyphenols Extract from Inferior Cocoa Beans As Antioxidant And Antimicrobial. Nur Aisyah, 111710101065; 2016; 79 Pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty Of Agricultural Technology, University of Jember.

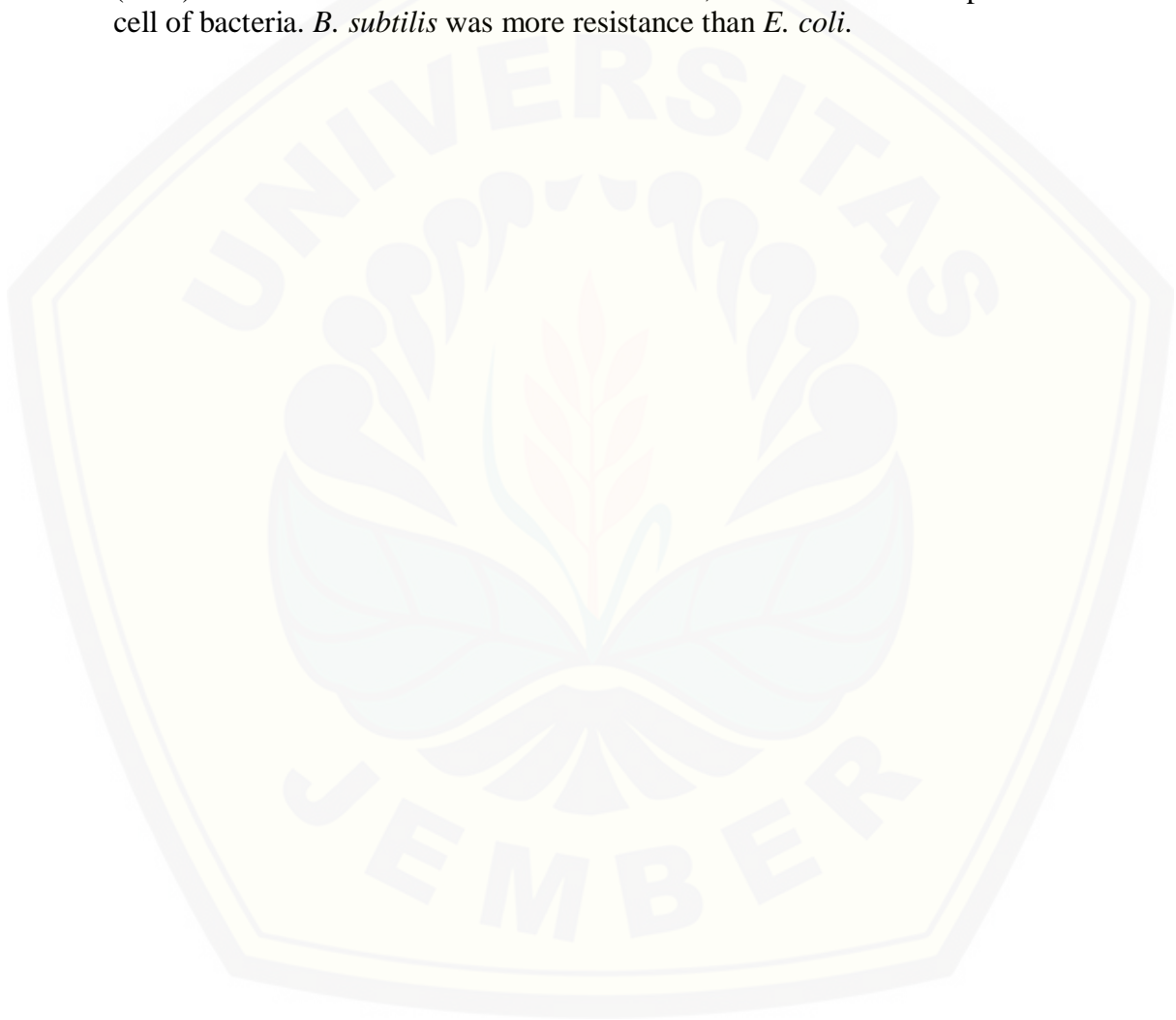
Cocoa (*Theobroma cacao L.*) is a plantation commodity which economical important in indonesia. The number of national cocoa production has been increased every years. In recent, the quality of cocoa beans to be low because of cocoa crop pests. Cocoa are derived from cocoa fruit which attacked by crop pests, are called inferior cocoa beans. Inferior cocoa beans contain of high polyphenols. Three main polyphenols groups in cocoa beans are catechin or flavan-3-ols (37%), anthocyanin (4%) and protosianidin (58%). Inferior cocoa beans have functional effect including high antioxidant activity and antimicrobial activity. Polyphenols show low water solubility and low stability to environmental conditions (light, oxygen, temperature and enzymatic activities). Microencapsulation by spray drying is one of technology to protect bioactive compounds such polyphenols by using encapsulan agent. Maltodextrin is commonly used as encapsulan agent. Maltodextrin has low cost, low viscosity in the high ratio, good solubility in water, and tasteless. Therefore, the appropriate concentration of maltodextrin need to know to obtain a good characteristic of microcapsule

The aim of this study was to determine the appropriate concentration and the effect of different maltodextrin concentration on microencapsule of polyphenols extract from inferior cocoa beans as antioxidant and antimicrobial. The research result expected to improve the economic value of inferior cocoa beans and to get a good microencapsule of polyphenols extract from inferior cocoa beans.

The Research consist of three stages, the first stage were extraction fat and extraction of polyphenols from inferior cocoa bean, the second stage was microencapsulation of polyphenols extract from inferior cocoa beans by using different concentration of maltodextrin concentration, consist of 5% (M05), 10% (M10), and 15% (M15), and the third stage was analysis microcapsule of polyphenols extract from inferior cocoa such as antioxidant activity, antimicrobial activity, color, total polyphenols, yield, and particle morphology. The data would be compiled in the form of tables and graphs, and then interpreted to be concluded.

The result of this research showed that maltodextrin concentration had the effect on microencapsule of polyphenols extract from inferior cocoa beans. The particle size of microencapsules were 53,34 μm (M05), sebesar 73,79 μm (M10), and 107,68 μm (M15), the form of microencapsule showed imperfect form, dents, and wrinkles. The yield of sample M15 was higher than M05 and M10. It showed that the yield of microcapsule was high when maltodextrin concentration was

increased, that was caused by increasing total of solid content in suspension before drying process. The color of microcapsule was red to purple, it was caused by polyphenols extract of inferior cocoa bean is containing of antocyanin. Total phenolic content, antioxidant activity and antimicrobial activity of sample M05 were higher than M10 and M15. It showed total phenolic content, antioxidant activity and antimicrobial activity were significantly reduced when maltodextrin concentration was increased, it related to when maltodextrin concentration was increased, the particle size and weight of microcapsule will be increased, whereas the polyphenols each samples was same. Minimum Inhibition concentration (MIC) toward *E. coli* was lower than *B. subtilis*, it related to the componen of wall cell of bacteria. *B. subtilis* was more resistance than *E. coli*.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah Swt, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Mikroenkapsulasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao Inferior Sebagai Antioksidan dan Antimikroba”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan stata satu (S1) pada jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

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

1. Bapak Dr.Yuli Witono, STP, MP selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian;
2. Bapak Ir. Gyarto, M. Sc selaku ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian serta bimbingan dalam penulisan skripsi;
3. Bapak Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian serta bimbingan dalam penulisan skripsi;
4. Ibu Ir. Wiwik Siti Windrati M.P selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama kuliah di THP;
5. Ibu Dr. Nurhayati S. TP., M.Si. selaku dosen penguji utama yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan dalam peulisan skripsi;
6. Ibu Dr. Puspita Sari, S.TP, M.Ph. selaku dosen penguji anggota yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan dalam peulisan skripsi;
7. Bapak dan ibu Kasmian serta keluarga besar yang telah memberikan dorongan dan doanya demi terselesaikan skripsi ini;
8. Teman-teman seperjuangan, mulyani, humrotin, nurvia, nur azizah, dina, amatullah, ika, tika, lail, mbak izzah, agisan, eva, mbak fio, adnine, ayu, rika,

dita, fina, chevita, lulus, hadna, betty, fida, yang telah memberi semangat dan dorongan serta semua pihak yang tidak dapat saya sebut satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 06 Juni 2016

Penulis

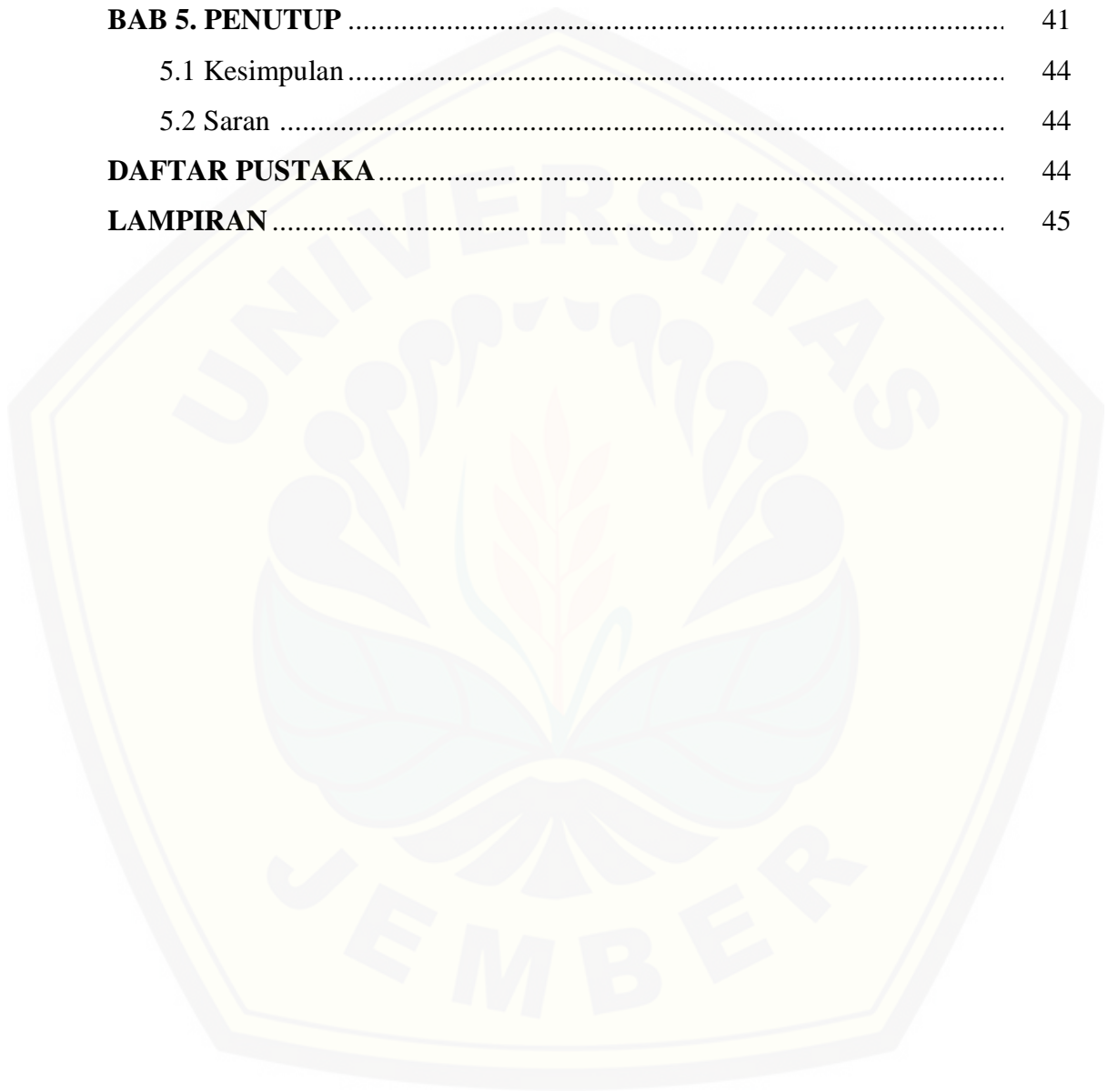


DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kakao (<i>Theobroma cocoa L.</i>)	4
2.2 Polifenol	5
2.3 Polifenol biji kakao	5
2.4 Ekstraksi polifenol biji kakao	7
2.5 Mikroenkapsulasi	8
2.6 <i>Spray Drying</i>	9
2.7 Maltodekstrin	10
2.8 Antioksidan	11
2.9 Antimikroba	12

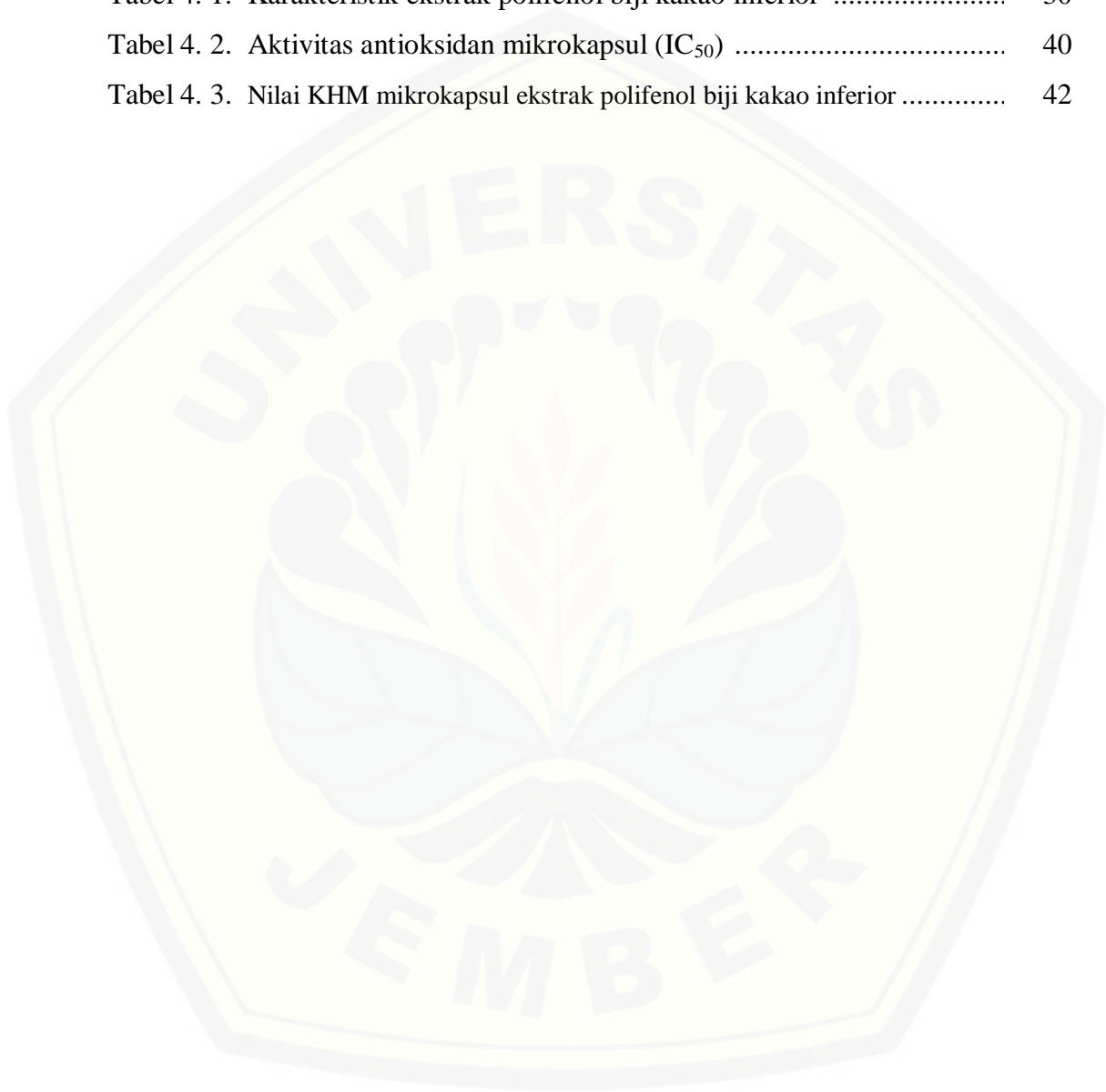
2.10 Bakteri	13
2.11 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	14
2.12 Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	15
2.13 Pengujian aktivitas antimikroba (Konsentrasi Hambat Minimum (KHM))	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Tempat dan waktu penelitian	18
3.2 Alat dan bahan penelitian	18
3.2.1 Alat	18
3.2.2 Bahan	18
3.3 Rancangan percobaan	19
3.4 Pelaksanaan penelitian.....	19
3.5.1 Tahap pertama	19
3.5.2 Tahap kedua	21
3.5.2 Tahap ketiga	22
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Karakteristik ekstrak polifenol biji kakao inferior	30
4.1.1 Warna ekstrak polifenol biji kakao inferior	30
4.1.2 Total polifenol ekstrak polifenol biji kakao inferior	31
4.1.3 Aktivitas antioksidan ekstrak polifenol biji kakao inferior.....	31
4.1.4 Aktivitas antimikroba ekstrak polifenol biji kakao inferior.....	31
4.1 Rendemen mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior.....	31
4.2 Warna mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	33
4.2.1 <i>Lightness</i>	33
4.2.2 <i>Chroma</i>	34
4.2.3 <i>Hue</i>	35
4.3 Ukuran partikel mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	36
4.4 Total polifenol mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior ...	
4.5 Efisiensi enkapsulasi mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	37

4.6 Aktivitas antioksidan (IC_{50}) mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	38
4.7 Aktivitas antimikroba (KHM) mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	39
BAB 5. PENUTUP	41
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1. Deskripsi warna berdasarkan °Hue.....	22
Tabel 4. 1. Karakteristik ekstrak polifenol biji kakao inferior	30
Tabel 4. 2. Aktivitas antioksidan mikrokapsul (IC ₅₀)	40
Tabel 4. 3. Nilai KHM mikrokapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Struktur polifenol.....	5
Gambar 2. 2. Struktur kimia katekin and enantiomers epikatekin	6
Gambar 2. 3. Alat <i>spray dryer</i>	9
Gambar 2. 4. Struktur kimia maltodekstrin	10
Gambar 2. 5. Reaksi perangkapan radikal bebas (DPPH).....	12
Gambar 2. 6. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	14
Gambar 2. 7. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	15
Gambar 3. 1. Proses pembuatan bubuk biji kakao rendah lemak	21
Gambar 3. 2. Proses pembuatan ekstrak polifenol biji kakao inferior	22
Gambar 3. 3. Mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior	23
Gambar 4. 1. Rendemen mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	32
Gambar 4. 2. Nilai <i>L</i> mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior....	33
Gambar 4. 3. Nilai <i>Chroma</i> mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior	34
Gambar 4. 4. Nilai <i>Hue</i> mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior	35
Gambar 4. 5. Ukuran Partikel mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	36
Gambar 4. 6. Efisiensi Enkapsulasi.....	37
Gambar 4. 7. Total polifenol mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	38
Gambar 4. 8. Aktivitas antioksidan mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	39
Gambar 4. 9. Penghambatan ekstrak dan mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior terhadap <i>E.coli</i>	41
Gambar 4. 10. Penghambatan ekstrak dan mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior terhadap <i>B. Subtilis</i>	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Data rendemen mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	52
Lampiran B. Data warna mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	53
Lampiran C. Data total polifenol mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	56
Lampiran D. Data aktivitas antioksidan mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	61
Lampiran E. Uji aktivitas antimikroba (KHM) mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	67
Lampiran F. Data Nilai KHM mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior terhadap bakteri <i>E.Coli</i>	68
Lampiran G. Data Nilai KHM mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior terhadap bakteri <i>B. subtilis</i>	71
Lampiran H. Efisiensi enkapsulasi.....	74
Lampiran I. Ukuran partikel mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior	75
Lampiran H. Dokumentasi	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Pendahuluan

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan salah satu komoditi perkebunan yang memiliki prospek bagus di Indonesia. Hal ini didukung dengan produktivitas buah kakao Indonesia mengalami peningkatan pesat setiap tahunnya. Menurut Susanti (2014), dalam kurun waktu 2011 hingga 2013, produksi kakao Indonesia menunjukkan peningkatan yang signifikan, yaitu dari 712.231 ton di tahun 2011 menjadi 740.513 ton di tahun 2012 dan naik kembali menjadi 918.961 ton di tahun 2013. Peningkatan tersebut sejalan dengan peningkatan volume ekspor dan produk jadi dari 16% di tahun 2009 menjadi 54% di tahun 2012.

Agrobisnis kakao di Indonesia mengalami kendala penurunan produktivitas kakao akibat serangan hama penggerek biji kakao (PBK) (Goenandi, 2007). Serangan hama dan penyakit tersebut mengakibatkan menurunnya produktivitas biji kakao menjadi 660 kg/ha/tahun atau sebesar 40% dari produktivitas yang pernah dicapai (1.100 kg/ha/tahun). Total kehilangan hasil biji kakao secara nasional sebesar 198.000 ton/tahun (Arisandy, 2014). Biji kakao yang terserang hama disebut biji kakao inferior (Manggabarani, 2011). Biji kakao inferior tergolong biji kakao yang bermutu dan bernilai ekonomi rendah.

Biji kakao inferior mengandung senyawa polifenol yang cukup tinggi. Biji kakao inferior mengandung polifenol yang hampir setara dengan biji kakao superior (Ernawati, 2015). Kelompok polifenol yang terkandung dalam biji kakao diantaranya katekin atau flavan-3-ols (37%), antosianin (4%) dan protosianidin (58%) (Belscak *et al.*, 2009). Senyawa polifenol biji kakao inferior memiliki kemampuan sebagai antioksidan (Ernawati, 2015; dan Kusuma, 2013). Biji kakao inferior juga memiliki kemampuan antibakteri. Polifenol biji kakao inferior dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli*, juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif yaitu *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* yang berperan penting sebagai

bakteri penyebab karies (Misnawi *et al.*, 2008; Kusuma, 2013; dan Pratiwi, 2013).

Senyawa polifenol dapat diaplikasikan sebagai minuman suplemen bagi kesehatan karena memiliki kemampuan antioksidan dan antimikroba. Namun, senyawa polifenol sensitif dan tidak stabil terhadap keadaan lingkungan, yakni mudah rusak oleh keberadaan oksidator, cahaya, dan panas. Senyawa polifenol tidak stabil karena struktur polifenol memiliki ikatan rangkap tidak jenuh (Sukatiningih *et al.*, 2011).

Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk melindungi komponen polifenol dari kerusakan akibat lingkungan adalah mikroenkapsulasi dengan metode *spray drying* (Munin *et al.*, 2011). Prinsip mikroenkapsulasi dengan metode *spray drying* adalah menyalut komponen bioaktif dengan bahan enkapsulan kemudian dikeringkan dengan alat *spray dryer* (Ahmed *et al.*, 2010; Bakowska-Barczk *et al.*, 2011; dan Barros *et al.*, 2006). Bahan enkapsulan yang ideal adalah polimer yang dapat membentuk formasi lapisan yang baik, *biodegradable*, memiliki viskositas yang rendah pada konsentrasi tinggi, dan memiliki harga yang ekonomis (Barros *et al.*, 2006).

Maltodekstrin adalah salah satu bahan enkapsulan yang populer dan sering digunakan. Selain harganya ekonomis, maltodekstrin memiliki viskositas yang rendah dalam rasio yang banyak, kelarutan yang baik dalam air, tidak memiliki rasa, dan memiliki sifat higrokopis yang buruk (Apintanapong *et al.*, 2003). Penggunaan konsentrasi maltodekstrin sebagai bahan enkapsulan berbeda tergantung pada sifat bahan inti (*core*) yang akan dienkapsulasi. Oleh sebab itu dilakukan penelitian ini untuk mengetahui jumlah konsentrasi maltodekstrin yang tepat pada proses mikroenkapsulasi dengan menggunakan metode *spray drying* terhadap ekstrak polifenol biji kakao inferior sehingga menghasilkan mikroenkapsul yang memiliki kemampuan antioksidan dan antimikroba.

1.2 Perumusan Masalah

Biji kakao inferior mengandung senyawa polifenol yang berpotensi sebagai antioksidan dan antimikroba. Senyawa polifenol tidak stabil dan mengalami kerusakan akibat faktor lingkungan, seperti suhu, oksigen dan cahaya. Mikroenkapsulasi metode *spray drying* dapat melindungi polifenol dari pengaruh lingkungan. Maltodekstrin memiliki karakteristik yang baik sebagai bahan enkapsulan. Namun belum diketahui jumlah konsentrasi maltodekstrin yang tepat untuk mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior sehingga menghasilkan mikroenkapsul yang memiliki kemampuan antioksidan dan antimikroba.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. mengetahui pengaruh konsentrasi maltodekstrin terhadap karakteristik mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior.
2. mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi maltodekstrin terhadap aktivitas antioksidan dan antimikroba mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. sebagai informasi mengenai potensi biji kakao inferior
2. terciptanya produk mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior yang memiliki kemampuan antioksidan dan antimikroba.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao (*Theobroma cacao L.*)

Kakao merupakan satu-satunya spesies diantara 22 jenis dalam genus *Theobroma* yang diusahakan secara komersial. Tanaman ini diperkirakan berasal dari lembah Amazon di Benua Amerika yang mempunyai iklim tropis. Colombus dalam pengembaraan dan petualangannya di benua Amerika menemukan dan membawanya ke Spanyol (Poedjiwidodo, 1996).

Tiga komponen utama penyusun buah kakao yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen paling dominan yaitu kulit buah dengan presentase lebih dari 70% berat buah masak. Biji kakao memiliki presentase berkisar 27-29% berat buah masak, sedangkan sisanya merupakan plasenta dari 30-40 biji. Biji diselubungi lapisan lendir atau pulpa berwarna putih (Widyotomo *et al.*, 2004).

Kulit pada buah kakao masak berwarna kuning atau oranye yang saat masih muda berwarna hijau atau merah. Buah masak memiliki kondisi optimal dalam hal pembentukan senyawa penyusun lemak dalam biji. Buah muda memiliki rendemen lemak rendah, presentase biji pipih (*flat beans*) tinggi, kadar kulit biji tinggi, dan biji kakao yang dihasilkan tidak memiliki cita rasa khas yang maksimal (Widyotomo *et al.*, 2004).

Tanaman kakao terdiri dari 2 (dua) tipe yang dibedakan berdasarkan atas warna bijinya, warna putih termasuk ke dalam grup Criollo, sedangkan biji tanaman ungu termasuk grup Forastero. Walaupun spesies tanaman yang ada cukup banyak, pada umumnya kakao dibagi 2 jenis, jenis pertama adalah Criollo terdiri dari Criollo Amerika Tengah, dan Criollo Amerika Selatan, jenis kedua adalah Forastero terdiri dari Forastero Amazone dan, Trinitario (merupakan hibrid Criollo dan Forastero) (Nasution, 1976).

2.2 Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang memiliki lebih dari satu gugus -OH (fenol) pada stuktur molekulnya. Gugus -OH yang terkandung merupakan

aktivator yang kuat dalam reaksi substitusi aromatik elektrofilik (Fessenden, 1982). Senyawa polifenol terbagi menjadi tiga subkelas yaitu flavonoid, asam fenolik, dan stilbenoid. Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar (Markham, 1988). Struktur senyawa polifenol dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Struktur Polifenol (Anonim, 2014)

Senyawa polifenol memiliki banyak anggota yakni lebih dari 8000 jenis senyawa. Anggota senyawa polifenol mulai dari yang sederhana dengan berat molekul paling kecil hingga senyawa yang kompleks dengan berat molekul lebih dari 30.000 Da (Marinova *et al.*, 2005).

Senyawa polifenol sensitif terhadap oksidasi, suhu, dan cahaya akibat adanya ikatan rangkap dalam struktur molekulnya (Sukati *et al.*, 2011). Polifenol dapat berperan sebagai antioksidan karena dapat menstabilkan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Hattenschwiler, 2000).

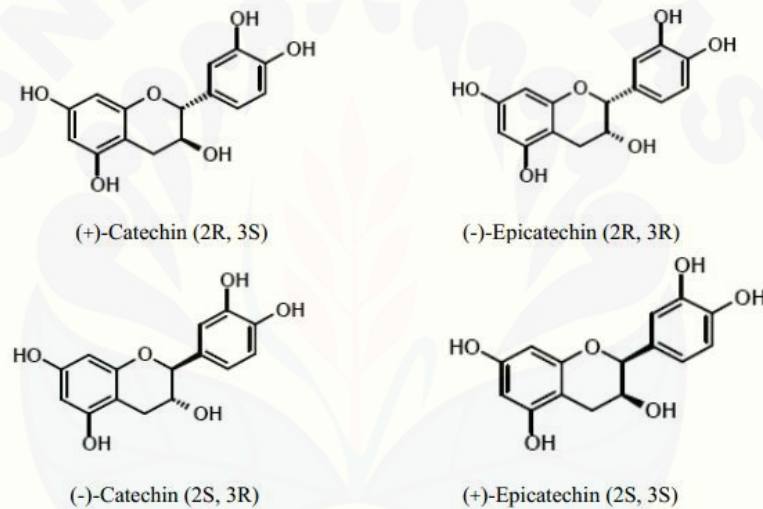
2.3 Polifenol Biji Kakao

Biji kakao mengandung senyawa polifenol. Senyawa polifenol yang terdapat pada biji kakao terdiri atas tiga kelompok utama yaitu proantosianidin (58%), katekin atau flavan-3-ol (37%), dan antosianin (4%) (Belscak *et al.*, 2009). Kelompok katekin yang paling dominan pada kakao yaitu (-)-epikatekin sebesar 35% dari kandungan polifenol dalam daging biji kakao kering varietas *forastero*

tidak terfermentasi (Wollgast, 2000). Berikut ini adalah polifenol yang telah teridentifikasi dalam biji kakao atau produk kakao (Rusconi, 2010):

- Prosianidin B3 = katekin-(4 α 8)-katekin
- Prosianidin B4 = katekin-(4 8 α)-epikatekin
- Prosianidin B5 = epikatekin-(4 α 6)-epikatekin
- Prosianidin C1 = epikatekin-(4 8 α)-epikatekin-(4 8 α)-epikatekin
- Prosianidin D = epikatekin-(4 α 8)-epikatekin-(4 8 α)-epikatekin-(4 8 α)-epikatekin. Adapun struktur polifenol dalam biji kakao dapat dilihat pada

Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur kimia katekin and enantiomers epikatekin (Sumber: Kanwar *et al.*, 2012)

Senyawa polifenol mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus -OH dan -OR (Okawa *et al.*, 2001). Potensi senyawa polifenol untuk merangkap radikal bebas (R) adalah dengan kemampuan untuk menyumbangkan sebuah atom hidrogen dari ikatan hidroksil dan dengan demikian mampu merangkap radikal bebas (Okawa *et al.*, 2001). Sifat antioksidan dari polifenol sederhana telah banyak dipelajari dengan cara uji *in vitro* DPPH (Othman *et al.*, 2007).

Polifenol biji kakao juga memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa polifenol biji kakao mampu

menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* (Nawaekasari, 2012), *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Setiadevi, 2010) dan Polifenol 100% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* (Ardianto, 2012). Bahkan polifenol biji kakao terserang penyakit (inferior) juga memiliki kemampuan antimikroba. Penelitian terakhir menjelaskan bahwa ekstrak polifenol biji kakao inferior mampu menghambat bakteri Polifenol 25000 ppm mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*, *B. subtilis* (Kusuma *et al.*, 2013), Polifenol 0,8% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan polifenol 1,6 % mampu menghambat pertumbuhan *Candida albican* (Pratiwi *et al.*, 2013).

2.4 Ekstraksi Polifenol Biji Kakao

Proses ekstraksi polifenol biji kakao diawali dengan menghilangkan lemak kakao dari biji kakao (*defatting*). *Defatting* dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dibandingkan tanpa perlakuan *non- defatting* (Pratiwi, 2013). *Defatting* yang dilakukan tidak maksimal sehingga ada sisa-sisa lemak yang tidak terekstrak, akan berpengaruh terhadap aktivitas antimikroba karena adanya lemak dapat menghalangi polifenol masuk ke dalam sel bakteri sehingga dapat menurunkan aktivitas antimikroba (Nurcahyani *et al.* 2011).

Ekstraksi polifenol menggunakan metode maserasi dengan beberapa pelarut seperti etanol 70 %, metanol, etil asetat, dan asam asetat. Pada umumnya, ekstrak polifenol biji kakao yang diaplikasikan dalam produk pangan menggunakan pelarut etanol 70% karena selain aman, juga relatif stabil terhadap kehadiran oksidator dan reduktor, memiliki aktivitas antioksidan dan stabilitas pigmen terbaik serta menjaga stabilitas pigmen dibandingkan pelarut metanol, etil asetat, dan asam asetat (Probowaseso, 2005). Etanol memiliki indeks polaritas sebesar 5,2 dan pelarut etanol dalam ekstraksi dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel simplisia sehingga proses ekstraksi menjadi lebih efisien dalam menarik komponen polar hingga semi polar (Siedel, 2008).

2.5 Mikroenkapsulasi

Enkapsulasi merupakan proses penyalutan partikel inti baik berbentuk cair, padat atau gas dengan bahan pengisi khusus sehingga partikel-partikel inti tersebut mempunyai sifat fisik dan kimia sesuai yang dikehendaki (Kim *et al.*, 1996). Berdasarkan ukuran bahan aktif enkapsulasi terbagi atas makroenkapsulasi (500 μm), mikroenkapsulasi (ukuran 0.2-5000 μm) dan nanoenkapsulasi (ukuran bahan lebih kecil dari 0.2 μm) (Risch, 1995).

Bahan yang dilapisi disebut dengan bahan inti (*core*) sedang bahan yang melapisi disebut bahan enkapsulan (Dziezak, 1998). Bahan aktif biasanya berupa flavor, minyak, mikroorganisme, vitamin, enzim, zat warna dan lain-lain (Bhandary, 1996). Enkapsulasi bertujuan untuk melindungi bahan aktif yang sensitif terhadap kerusakan, karena oksidasi, kehilangan nutrisi, melindungi flavor, aroma pigmen serta meningkatkan kelarutan (Versich, 2000).

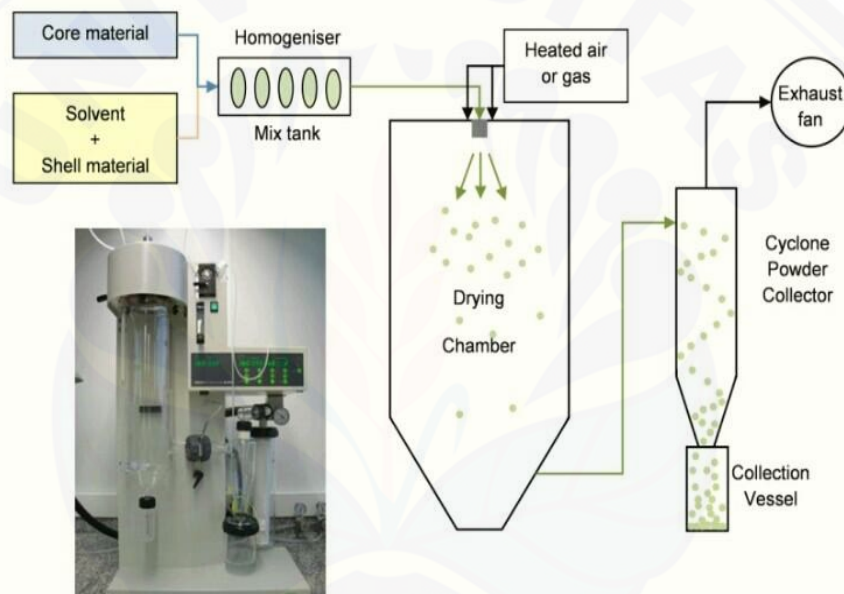
Bentuk enkapsulasi dapat dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu berbentuk bubuk dengan teknik pengeringan dan yang berbentuk cair. Teknik pengeringan yang biasa digunakan untuk enkapsulasi dalam bentuk bubuk adalah pengeringan semprot, sedangkan teknik untuk enkapsulasi dalam bentuk cairan biasanya menggunakan teknik koaservasi (pemisahan fase), dan emulsi dalam bentuk basah. Selain yang telah disebutkan di atas teknik enkapsulasi lain dapat berupa proses suspensi udara (*fluidized bed atau spray coating*), *spray cooling*, *spray chilling*, ekstruksi sentrifugal, pemisahan suspensi rotasional, dan kompleksasi inklusi (Versich, 2000). Banyak bahan enkapsulan yang pada umumnya digunakan berasal dari polisakarida seperti gum arab, CMC, maltodekstrin, kitosan, alginat, dan karagenan.

2.6 *Spray Drying*

Prinsip metode *spray drying* yakni menyemprotkan masa cair (dapat berupa larutan, emulsi atau suspensi) dengan atau tanpa bahan tambahan pada medium kering yang panas (udara) (Filkova *et al.*, 1995), melalui kontak panas dari aliran udara kering-panas, cairan yang telah diatomisasi dengan menggunakan roda

berputar atau *nozzle* akan menguap dengan cepat dan dihasilkan masa berupa padatan/serbuk.

Kualitas hasil yang diperoleh dari metode *spray drying* dipengaruhi oleh dua hal, yaitu proses selama pengeringan (suhu inlet, kecepatan semprot, kondisi tabung, kecepatan aliran udara, dan lain-lain) dan kondisi sampel yang akan dikeringkan (sifat bahan, jenis dan konsentrasi bahan pengisi, dan lain-lain) (Filikova *et al.*, 1995). Bentuk visual *spray dryer* selengkapnya dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.



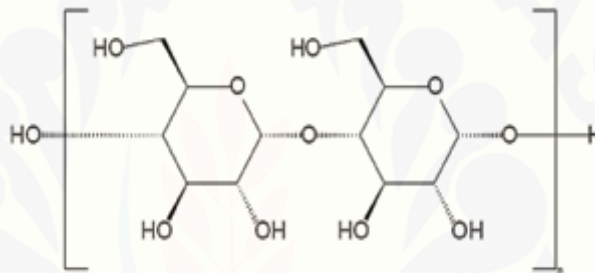
Gambar 2.3 Alat *spray dryer* (sumber: Anonim, 2014)

2.7 Maltodekstrin

Maltodekstrin merupakan salah satu turunan pati yang dihasilkan dari proses hidrolisis parsial oleh enzim α -amilase yang memiliki nilai *Dextrose Equivalen* (DE) kurang dari 20. Maltodekstrin memiliki *mouthfeel* yang lembut dan mudah dicerna. Nilai DE memberi gambaran tentang kandungan gula pereduksi. Pada hidrolisis sempurna (pati seluruhnya dikonversikan menjadi dextrosa), nilai DE-nya 100 sedangkan pati yang sama sekali tidak terhidrolisis DE-nya 0. Nilai DE

maltodekstrin berkisar antara 3-20. Maltodekstrin dengan nilai DE rendah rendah menunjukkan kecenderungan rendahnya penyerapan air. Maltodekstrin dengan DE tinggi cenderung menyerap air (higrokopis) (Luthana, 2008).

Perubahan nilai DE akan memberikan karakteristik yang berbeda-beda. Peningkatan nilai DE akan meningkatkan warna, sifat higrokopis, plastilitas, rasa manis, dan kelarutan (Kunz, 1997). Maltodekstrin dengan DE antara 10 dan 20, secara luas digunakan sebagai bahan enkapsulan antosianin dan asam fenolik (Ahmed *et al.*, 2010; Ersus *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010; Tonon *et al.*, 2008). Rumus kimia maltodekstrin adalah $[(C_6H_{10}O_5)_nH_2O]$. Struktur kimia maltodekstrin dapat dilihat pada **Gambar 2. 4**.



Gambar 2.4 Struktur kimia maltodekstrin (Rowe *et al.*, 2009)

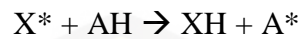
Maltodekstrin memiliki daya larut yang tinggi, memiliki sifat membentuk film, memiliki higroskopis yang rendah, memiliki sifat *browning* yang rendah, dapat menghambat kristalisasi dan memiliki daya ikat yang kuat (Luthana, 2008).

2.8 Antioksidan

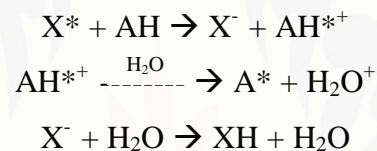
Antioksidan merupakan senyawa yang pada konsentrasi kecil secara signifikan mampu menghambat atau mencegah reaksi oksidasi (Isnindar, 2011). Antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan larut air seperti polifenol, natrium metabisulfit, asam sitrat, dan vitamin C, dan antioksidan larut lemak seperti BHT dan BHA (Angela, 2012).

Mekanisme dalam antioksidan merangkap radikal bebas digolongkan menjadi dua yaitu mekanisme *Hidrogen Atom Transfer* (HAT) dan *Electron*

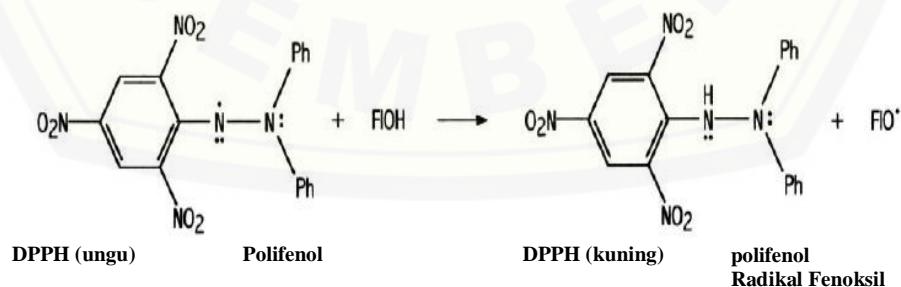
Transfer (ET) (Okawa *et al.*, 2001). Reaksi HAT pada umumnya terjadi akibat peroksidasi lemak yaitu antara radikal (X^*) dengan antioksidan (AH) seperti pada reaksi di bawah ini :



Reaksi ET terjadi akibat reaksi reduksi oksidasi (redoks) antara radikal (X^*) dengan antioksidan (AH) yang menghasilkan produk stabil (XH) dan air (H_2O). Produk inilah yang dapat mempengaruhi warna menjadi memudar. Tahapan reaksinya disajikan pada reaksi di bawah ini :



Pengujian aktivitas antioksidan pada umumnya menggunakan metode DPPH, yaitu dengan mereaksikan senyawa *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl* (DPPH) dengan antioksidan. Adanya aktivitas perangkapan radikal bebas dapat ditandai dengan perubahan warna DPPH (ungu) menjadi warna kuning (Amic *et al.*, 2003). Reaksi perangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5 Reaksi perangkapan radikal bebas (DPPH) (Sumber: Amic, *et al.*, 2003)

2.9 Antimikroba

Senyawa antimikroba merupakan senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Senyawa yang dapat membunuh organisme (bakteri) disebut bakterisidal. Bahan yang tidak membunuh namun dapat menghambat pertumbuhan organisme (bakteri) disebut bakteristatik (Madigan *et al.*, 2009).

Aktivitas antimikroba diukur secara *in vitro* untuk menentukan potensi agen antibakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan, dan kerentanan mikroorganisme tertentu terhadap obat dengan konsentrasi tertentu. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba *in vitro* yaitu pH lingkungan, komponen medium, stabilitas obat, ukuran inokulum, lama inkubasi, dan aktivitas metabolik mikroorganisme (Warsa, 1994).

Mekanisme zat antimikroba dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroba antara lain:

a. Mengganggu pembentukan dinding sel.

Mekanisme ini disebabkan karena adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antimikroba dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi (Koswara, 2009).

b. Bereaksi dengan membran sel

Komponen bioaktif dapat mengganggu dan mempengaruhi integritas membran sitoplasma, yang dapat mengakibatkan kebocoran materi intraseluler, seperti senyawa fenol dapat mengakibatkan lisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, menghambat pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat, dan menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel (Koswara, 2009).

c. Menginaktivasi enzim

Mekanisme yang terjadi menunjukkan bahwa kerja enzim akan terganggu dalam mempertahankan kelangsungan aktivitas mikroba sehingga mengakibatkan enzim memerlukan energi yang besar untuk mempertahankan kelangsungan aktivitasnya. Akibatnya energi yang 13 dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang sehingga aktivitas mikroba menjadi terhambat atau jika kondisi ini berlangsung lama akan mengakibatkan pertumbuhan

mikroba terhenti (inaktif). Efek senyawa antimikroba dapat menghambat kerja enzim jika mempunyai spesifitas yang sama antara ikatan kompleks yang menyusun struktur enzim dengan komponen senyawa antimikroba (Koswara, 2009).

d. Menginaktivasi fungsi material genetik

Komponen bioaktif dapat mengganggu pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA), menyebabkan terganggunya transfer informasi genetik yang selanjutnya akan menginaktivasi atau merusak materi genetik sehingga terganggunya proses pembelahan sel untuk pembiakan (Koswara, 2009).

2.10 Bakteri

Bakteri merupakan makhluk hidup prokariotik yang memiliki ukuran mikron. Umumnya bakteri memiliki diameter 0,5-2,5 μm (Pelczar, 2008). Bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif, hal ini dapat dibedakan berdasarkan perbedaan komposisi dan dinding selnya.

Bakteri gram positif mempunyai struktur dinding sel tebal (15-80 nm) dan berlapis tunggal, dengan komposisi dinding sel terdiri dari lipid, beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk suatu struktur yang tebal dan kaku, dan asam teikoat. Bakteri gram positif rentan terhadap penicillin, namun lebih resisten terhadap gangguan fisik (Pelczar, 2008). Ketebalan peptidoglikan bakteri gram positif resisten terhadap lisis osmotik (Jewetz *et al.*, 2001).

Bakteri Gram negatif, struktur dinding selnya berlapis tiga dengan ketebalan yang tipis (10-15 nm). Komposisi dinding sel terdiri dari lipid dan peptidoglikan yang berada di dalam lapisan kaku sebelah dalam dengan jumlah sekitar 10% dari berat kering. Kandungan lipid dari bakteri Gram negatif cukup tinggi yaitu 11-22 %. Bakteri Gram negatif ini umumnya rentan terhadap penisilin dan kurang rentan terhadap gangguan fisik (Pelczar, 2008). Bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* dan *Pseudomonas sp* terdiri atas satu atau sangat sedikit lapisan peptidoglikan pada dinding selnya. Selain itu dinding sel bakteri gram negatif ini tidak

mengandung asam teikoik tetapi mengandung sejumlah polisakarida dan lebih rentan terhadap kerusakan mekanik dan kimia (Gupta,2000).

2.11 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz *et al.*, 2001). Pada umumnya bakteri memerlukan kelembaban yang cukup tinggi sekitar 85% (Madigan, 2009). Bentuk bakteri *E. coli* dapat dilihat pada **Gambar 2.6**.



Gambar 2.6 Bakteri *Escherichia coli* (Sumber: Anonim, 2015)

E. coli merupakan golongan bakteri mesofilik yaitu bakteri yang suhu pertumbuhan optimumnya 15-45°C dan dapat hidup pada pH 5,5-8. *E. coli* akan tumbuh secara optimal pada suhu 27° C. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hawa *et al.* (2011), menyatakan bahwa *E. coli* memiliki suhu maksimum pertumbuhan 40-45°C, di atas suhu tersebut bakteri akan mengalami inaktivasi. Penentuan serotipe bakteri *E. coli* berdasarkan antigen dinding sel (O), kapsular (K), dan flagela (H). Diperkirakan terdapat 173 antigen O, 80 antigen kapsular (K), 56 antigen H yang telah diisolasi (Gyles, 2010). Bakteri *E. coli* dapat bertahan hidup hingga pada suhu 60°C selama 15 menit atau pada suhu 55°C

selama 60 menit. *E. coli* sangat mudah dijumpai pada kotoran manusia dan tempat yang kotor.

E. coli biasanya berkolonisasi di saluran pencernaan dalam beberapa jam setelah masuk ke dalam tubuh dan membangun hubungan mutualistik. Namun, strain non-patogenik dari *E. coli* bisa menjadi patogen, ketika adanya gangguan di dalam pencernaan (Sanz-Garcia *et al.*, 2009; Saurabh *et al.*, 2011; Janny *et al.*, 2012).

2.12 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis merupakan bakteri gram positif. Bakteri *B. subtilis* dapat memproduksi enzim proteolitik subtilisin. Bakteri ini berbentuk batang lurus yang tersusun dalam bentuk rantai dan bergerak. Bakteri ini berukuran $1,5\mu \times 4,5\mu$ (Gupta, 2000). Bentuk bakteri *B. subtilis* dapat dilihat pada **Gambar 2.7**.



Gambar 2.7 Bakteri *Bacillus subtilis* (Sumber: Anonim, 2013)

B. subtilis akan tumbuh secara optimal pada suhu 27°C . Bakteri ini mempunyai kemampuan membentuk pertahanan diri yang kuat, dengan membentuk endospora yang bersifat melindungi sehingga dapat tahan pada kondisi lingkungan yang ekstrim (Quadri *et al.*, 1998). *B. subtilis* tidak secara langsung termasuk sebagai patogen pada manusia, bagaimanapun *B. subtilis* dapat mengkontaminasi makanan tetapi tidak sampai menyebabkan makanan menjadi beracun (Ryan *et al.*, 2004). Spora *B. subtilis* dapat bertahan hidup pada pemanasan ekstrim yang seringkali digunakan untuk memasak makanan dan juga

mampu membuat produk pangan roti menjadi busuk atau rusak (Gielen *et al.*, 2004).

2.12 Pengujian Aktivitas Antimikroba (Konsentrasi Hambat Minimum (KHM))

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) suatu antimikroba merupakan konsentrasi antimikroba terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba sebagai konsentrasi paling rendah yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba hingga 90% pertumbuhan bakteri (Aboellil *et al.*, 2010). KHM dapat ditentukan dengan metode dilusi (Anonim, 2016).

Metode dilusi disebut metode pengenceran. Pada metode ini obat (misalnya antibiotik atau antimikroba) dibuat dalam berbagai konsentrasi, kemudian ditambahkan pada media yang mengandung mikroba uji. Hasil yang dibaca adalah kekeruhan. Kekeruhan menandakan adanya potensi hambat obat pada konsentrasi tersebut. Keuntungan metode ini dibandingkan dengan metode difusi adalah dapat menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dari antiikroba tersebut (Aboellil *et al.*, 2010).

Terdapat 3 macam cara dalam metode dilusi yaitu metode *Macro Broth Dilution*, metode *Micro Broth Dilution* dan metode agar dilusi (dilusi padat). Pada metode agar dilusi digunakan satu seri plate agar, masing-masing mengandung konsentrasi obat yang berbeda yang berkisar pada dosis terapeutik. Setelah inkubasi dapat dilihat hasilnya dengan membaca kekeruhan pada masing-masing konsentrasi sehingga bisa ditentukan KHM (Koneman *et al.*, 1997).

Metode dilusi (*dilution method*) menggunakan senyawa antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Pada media yang diinokulasi mikroba uji, dilarutkan senyawa antimikroba dengan menggunakan beberapa tingkatan konsentrasi senyawa antimikroba, dan kemudian diamati pada konsentrasi berapakah senyawa antimikroba tersebut bersifat menghambat atau mematikan (Jawetz *et al.*, 2001).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat yakni di laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian, laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, laboratorium Mikrobiologi Pangan, dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian dan laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember, Fakultas Teknologi pertanian Universitas Gajah Mada, dan di laboratorium bioteknologi Universitas Kasetsart. Waktu penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret 2015 hingga bulan Maret 2016.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah pengempres hidrolik, sentrifuse (Medifriger 1200 rpm), *vacum rotary evaporator* (Buchi Rotavapor R-124), spektrofotometer UV-Vis, *spray dryer* (SD Basic, Lab. PlantTM), *magnetic stirrer*, *homogenizer* (K-Ultra Turax T150), *digital colreader* (Minolta Co. LTP. Japan), *shaker*, mikro pipet, *blue tip*, *yellow tip*, vortex, cawan petri, alat-alat gelas, autoklaf, inkubator 37 °C, ose, neraca analitik, *laminar air flow*, bunsen, oven.

Bahan yang digunakan adalah biji kakao inferior *nonfermented* dari PTPN XII Kebun Kalikempit Kabupaten Banyuwangi, ethanol 70%, petroleum benzene, pereaksi Follin-Ciocalteu, Na₂CO₃, asam galat, metanol, akuades, ethanol 97%, DPPH, Maltodekstrin DE 12, kertas saring, kain saring, *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), spiritus, *Nutrient Broth*, *Nutrient Agar*, alkohol 70%, bakteri *Ercherichia coli* dan bakteri *Bacillus subtilis*.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan biji kakao inferior tidak terfermentasi. Penelitian ini terdiri dari tiga tahapan. Tahapan pertama yaitu ekstraksi lemak dan ekstraksi polifenol dari biji kakao inferior, tahapan kedua yaitu mikroenkapsulasi

ekstrak polifenol kakao dengan menggunakan satu perlakuan yaitu perbedaan konsentrasi maltodekstrin M05 (5% maltodekstrin), M10 (10% maltodekstrin), dan M15 (15%), dan tahapan ketiga yaitu pengujian mikroenkapsul polifenol biji kakao yang meliputi sifat mikroenkapsul, aktivitas antioksidan, dan aktivitas antimikroba.

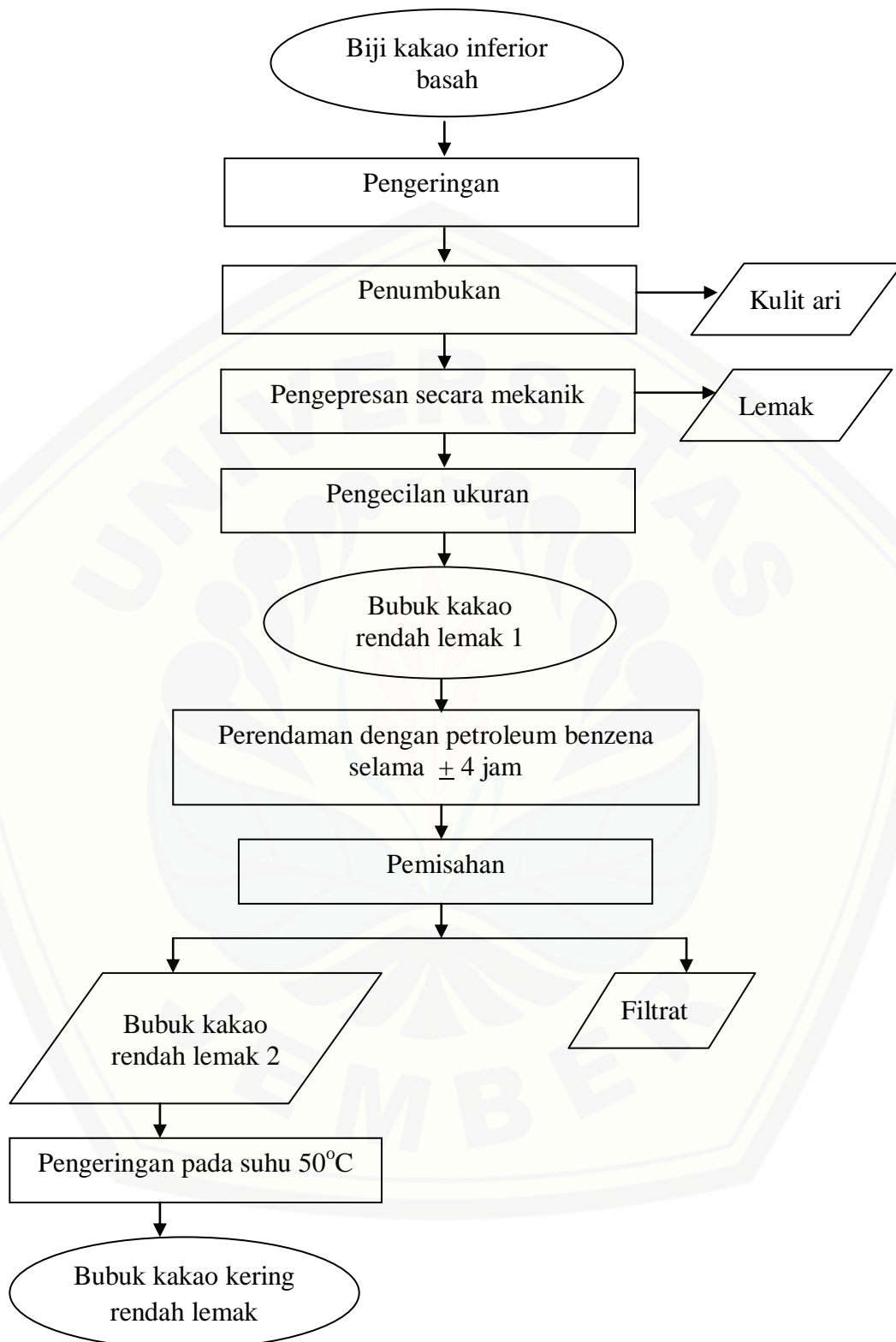
Data penelitian ini diolah secara deskriptif. Data hasil penelitian disusun dalam bentuk tabel, kemudian dirata-rata dan dibuat grafik untuk selanjutnya diinterpretasikan sehingga didapat kesimpulan.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Tahapan Pertama

a. Prosedur Pembuatan Bubuk kakao rendah lemak (Kusuma, 2013)

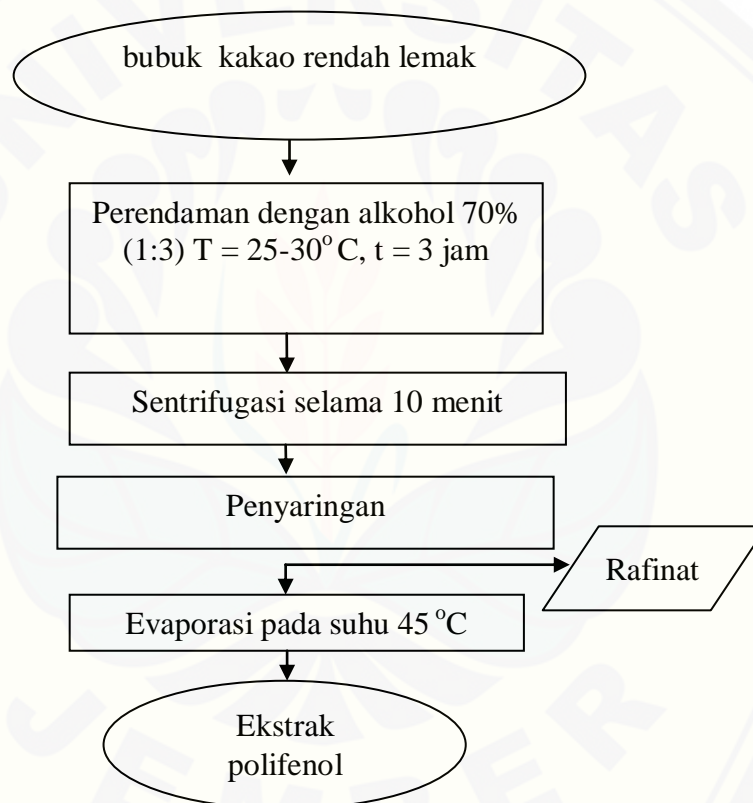
Pembuatan bubuk biji kakao rendah lemak dilakukan dengan cara biji kakao yang telah terpisah dari kulit buah dan pulp dilakukan pengeringan biji kakao sehingga diperoleh biji kakao kering. Biji kakao kering yang diperoleh dilakukan penumbukan kasar dan pemisahan kulit arinya. Biji kakao kering hasil penumbukan dilakukan pemisahan lemak dengan menggunakan press hidrolis dan diperoleh biji kakao rendah lemak 1. Biji kakao tersebut dilakukan pengecilan ukuran menggunakan belender sehingga diperoleh bubuk kakao rendah lemak 1. Perendaman bubuk kakao rendah lemak 1 dalam petroleum benzene selama 4 jam dengan perbandingan 1:3 (b/v) untuk menghilangkan lemak yang masih tersisa sehingga diperoleh bubuk kakao rendah lemak 2. Penyaringan antara bubuk kakao rendah lemak 1 dari petroleum benzene untuk memisahkan padatan sebagai bubuk kakao rendah lemak 2 dan cairan. Pengeringan bubuk kakao rendah lemak 2 pada suhu 50°C untuk menghilangkan pelarut yang tersisa. Skema proses pembuatan bubuk kakao rendah lemak selengkapnya dapat dilihat pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Proses pembuatan bubuk biji kakao inferior rendah lemak.

b. Ekstraksi polifenol biji kakao inferior (Kusuma, 2013)

Bubuk biji kakao rendah lemak diekstrak polifenolnya dengan cara ekstraksi menggunakan etanol 70% selama 3 jam dengan perbandingan 1:3 (b/v). Campuran serbuk biji kakao dan etanol 70% disentrifugasi untuk memisahkan antara larutan polifenol dengan rafinatnya. Larutan polifenol dievaporasi menggunakan rotary evaporator suhu 40-50⁰C dan dihasilkan konsentrat polifenol (Harmawan, 2010, Setiadevi, 2010, dan Kusuma *et al.*, 2013). Adapun skema ekstraksi polifenol selengkapnya dapat dilihat pada **Gambar 3.2**.



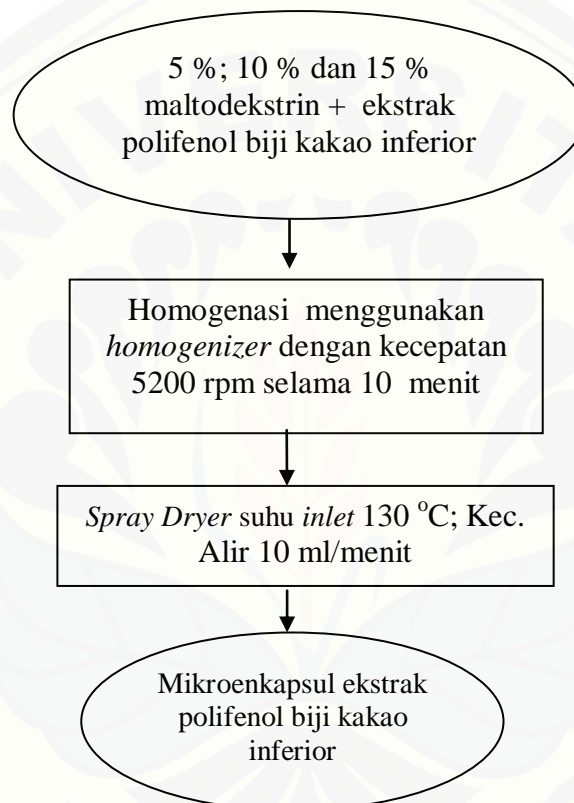
Gambar 3.2 Proses pembuatan ekstrak polifenol biji kakao inferior.

3.4.2 Tahapan kedua

a. Mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior

Mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior menggunakan metode *spray drying* diawali dengan membuat larutan suspensi antara ekstrak dengan

maltodekstrin dengan variasi konsentrasi maltodekstrin 5%, 10% dan 15 %. Homogenasi suspensi menggunakan *homogenizer* selama 10 menit dengan kecepatan 5200 rpm. Suspensi yang dihasilkan kemudian dilakukan mikroenkapsulasi menggunakan *spray dryer* dengan suhu *inlet* 130°C dan suhu *outlet* 78°C, dengan aliran feed 10 ml/menit. Enkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior dapat dilihat pada **Gambar 2.5**.



Gambar 2.5 Mikroenkapsulasi ekstrak polifenol biji kakao inferior

3.4.2 Tahapan ketiga

Pada tahapan ini dilakukan pengujian mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior, diantaranya:

a. Rendemen (Khamanga, *et al.*, 2009)

Rendemen diperoleh dari berat awal sesudah dan sebelum pengeringan menggunakan *spray dryer*, kemudian dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen Bubuk Polifenol (\%)} = \frac{\text{Berat Mikroenkapsul}}{\text{Berat awal sebelum spray drying}} \times 100$$

b. Warna (Hutching, 1999)

Pengukuran warna mikrokapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior menggunakan *color reader*. Pengukuran warna dibaca pada parameter L*, a*, b* di 3 titik yang berbeda. L* menunjukkan derajat kecerahan dari hitam (0) hingga putih (100). a* mendeskripsikan warna merah hijau dengan nilai a* positif mengindikasikan kemerahan dan a* negatif mengindikasikan kehijauan. Sedangkan b* mendeskripsikan warna kuning-biru dengan nilai b* negatif mengindikasikan kebiruan dan b* positif mengindikasikan kekuningan. Sebelum warna mikrokapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior diukur, color reader dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan porselen khusus. Ujung lensa color reader ditempelkan pada permukaan sampel yang akan dianalisis pada 3 titik yang berbeda. Nilai L, a, dan b yang didapatkan kemudian dimasukkan pada rumus konversi. Penggunaan rumus konversi dikarenakan alat yang digunakan sudah tidak dapat memenuhi standard saat dikalibrasi menggunakan porselen khusus. Perhitungan nilai L, a, dan b ditujukan untuk mendapatkan nilai °H sehingga sampel dapat di deskripsikan warnanya berdasarkan **Tabel 3.1**.

$$L^* = \frac{\text{Nilai rata-rata L di 3 titik} \times 94,35}{\text{Nilai L porselen standar}}$$

$$a^* = \frac{\text{Nilai rata-rata a di 3 titik} \times 5,75}{\text{Nilai a porselen standar}}$$

$$b^* = \frac{\text{Nilai rata-rata b di 3 titik} \times 5,75}{\text{Nilai b porselen standar}}$$

$$H = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*}$$

Keterangan:

L : kecerahan warna, nilai berkisar antara 0-100 yang menunjukkan warna hitam hingga putih

a*: nilai berkisar antara -80 – (+100), menunjukkan warna hijau hingga merah

b*: nilai berkisar antara -50 – (+70), menunjukkan warna biru hingga kuning

H : Hue, sudut warna (0° = warna netral, 90° = kuning, 180° = hijau, 270° = biru)

Tabel 3.1 Deskripsi warna berdasarkan $^\circ$ Hue

$^\circ$ Hue [arc tan (b/a)]	Deskripsi warna
18 – 54	<i>Red (R)</i>
54 – 90	<i>Yellow Red (YR)</i>
90 – 126	<i>Yellow (Y)</i>
126 – 162	<i>Yellow Green (YG)</i>
162 – 198	<i>Green (G)</i>
198 – 234	<i>Blue Green (BG)</i>
234 – 270	<i>Blue (B)</i>
270 – 306	<i>Blue Purple (BP)</i>
306 – 342	<i>Purple (P)</i>
342 – 18	<i>Red Purple (RP)</i>

c. Efisiensi Enkapsulasi (Yang *et. al.*, 2014)

Efisiensi enkapsulasi (EE) dihitung berdasarkan total berat antioksidan kapsul (A_K) per total berat antioksidan filtrat (A_F). Efisiensi enkapsulasi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Efisiensi Enkapsulasi (\%)} = \frac{A_K}{A_F} \times 100$$

d. Morfologi partikel menggunakan *Scanning Electron Miscroscopy* (SEM) (Khamanga, Parfitt, Tsitsi Nyamuzhiwa, Haidula, & Walker¹, 2009; Rajesh, *et al.*, 2011)

Sampel diletakkan pada sampel holder aluminium yang sebelumnya dilapisi dengan karbon tip dengan ketebalan 10 nm. Sampel kemudian diamati berbagai perbesaran alat SEM. Voltase diatur pada 5 kV dan arus 12 mA.

e. Total Polifenol (Singelton, 1999)

Total polifenol ditentukan secara spektrofotometri. Sebanyak 2 mg/ml sampel dalam aquades, kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 5 menit. Sebanyak 0,2 ml sampel diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 0,8 ml reagen Follin-Ciocalteu 10% dan diamkan selama 20 menit. Selanjutnya tambahkan 1 ml larutan Na₂CO₃ 8,5% dan diamkan selama 90 menit untuk pengembangan warna biru yang terbentuk, kemudian larutan dipisahkan dengan sentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Menggunakan langkah yang sama, sampel diganti dengan asam galat untuk membuat kurva standar polifenol. Ukur absorbansi pada panjang gelombang 765 nm. Asam galat standar yang telah diketahui konsentrasinya digunakan untuk perhitungan. Kurva standar polifenol dibuat dengan cara yang sama, menggunakan larutan standard asam galat dengan konsentrasi (0.175, 0.150, 0.125, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, dan 0 mg/ml).

Kandungan total polifenol sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standard asam galat. Diperoleh nilai (x), lalu hasil perhitungan dibagi berat sampel yang digunakan untuk analisa.

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

f. Aktivitas Antioksidan, Metode DPPH (Takasi, 1996)

Aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan reagen DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 0,2 mM dalam metanol. Sampel dengan beberapa konsentrasi (0,1 mg/ml - 0,8 mg/ml) dilarutkan dalam aquades, dihomogenkan dengan vortex selama 5 menit. Sampel yang dihasilkan diambil 0,25 ml dan ditambah 1,25 ml reagen DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidroksil), dihomogenkan dengan vortex selama 5 menit. Sampel didiamkan 20 menit. Sampel dihomogenkan dengan vortex kembali dan diabsorbansi menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang 517 nm. Blanko dibuat dengan cara yang sama yaitu mengganti sampel dengan etanol. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100$$

Nilai persen aktivitas antioksidan dari beberapa konsentrasi sampel dibentuk grafik, sehingga diperoleh sebuah persamaan. Persamaan yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (50% *inhibition concentration*).

g. Uji Antimikroba Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Russell and Furr, 1977; Gulluce *et al.*,2003)**1) Sterilisasi Alat dan Bahan**

Peralatan yang digunakan dan bahan-bahan yang akan digunakan (kecuali ekstrak) disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm.

2) Media Nutrient Agar

Nutrient Agar sebanyak 4,2 g ditambah 210 ml aquades pada suhu panas. Media *Nutrient Agar* disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

3) Media *Nutrient Broth*

Sebanyak 3,2 g serbuk *Nutrient Broth* dilarutkan dengan 400 ml aquades, diaduk sampai benar-benar larut. Larutan media *Nutrient Broth* disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

4) Pembuatan Larutan Fisiologis NaCl 0,85 %

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

5) Pembuatan suspensi bakteri

Beberapa *single colony* diambil dengan ose steril dan dimasukkan tabung reaksi yang berisi 5 ml media *Nutrient Broth*, kemudian diinkubasi selama 18-20 jam pada suhu 37 °C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan diambil 1 ml dari media *Nutrient Broth* yang telah diinkubasi dan dibuat beberapa seri pengenceran dengan NaCl 0,85% hingga diperoleh suspensi mikroba 10^5 cfu/ml.

6) Pembuatan larutan uji

Larutan stok dari ekstrak polifenol biji kakao dibuat dengan melarutkan 2 g mikrokapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior kedalam 10 ml aquades steril, kemudian divortex hingga homogen. Kemudian larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi 0,75 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 3,2 mg/ml, 5,2 mg/ml, 6,4 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml, 12,8 mg/ml, 25,6 mg/ml, dan 32 mg/ml. Larutan stok yang telah dibuat diambil secara berturut-turut 18µl, 20µl, 38µl, 40µl, 80µl, 130µl, 160µl, 250µl, 300µl, 320µl, 400µl, 640µl, dan 800µl, setelah itu dilakukan penambahan *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) masing-masing sebanyak 0,02 ml yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak polifenol lebih maksimal dan larutan fisiologis berturut-turut adalah 962µl, 960µl, 942µl, 940µl, 900µl, 850µl, 820µl, 730µl, 680µl, 660µl, 580µl, 340µl dan 180µl. Pada saat akan dilakukan uji ditambah dengan media *Nutrient Agar* yang masih hangat dengan perbandingan

1:4. Pembuatan kontrol (0 mg/ml) yaitu hanya menggunakan DMSO 0,02 ml yang ditambah dengan larfis 980 μ l dan media yang masih hangat.

7) Prosedur uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Sebanyak 1 ml dari beberapa konsentrasi larutan uji (termasuk dengan DMSO 2%), dilarutkan dalam 4 ml media agar steril dihomogenkan menggunakan vortex. Sebanyak 0,2 ml mikroba uji diambil dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian 5 ml media yang sudah dicampur dengan ekstrak polifenol dituangkan kedalam cawan berisi mikroba uji, selanjutnya digoyang dan diputar kearah jarum jam hingga homogen. Biarkan hingga media padat dan di inkubasi pada 37°C selama 24 jam, selanjutnya dievaluasi persen hambatan pada setiap cawan petri. Sebelumnya juga dibuat Larutan fisiologis dalam media sebagai kontrol. Nilai KHM ditentukan sebagai konsentrasi paling rendah yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba hingga 90% pertumbuhan bakteri (Aboellil *et al.*, 2010).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Konsentrasi maltodekstrin berpengaruh terhadap warna, ukuran partikel, efisiensi enkapsulasi, aktivitas antioksidan, aktivitas antimikroba, dan total polifenol mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior.
2. Peningkatan konsentrasi maltodekstrin pada pembuatan mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao menurunkan aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan aktivitas antimikroba (KHM) mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior yang dihasilkan.

5.2 Saran

Saran pada penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait stabilitas mikrokapsul ekstrak polifenol biji kakao, dengan demikian dapat diketahui pengaruh konsentrasi maltodekstrin terhadap stabilitas polifenol biji kakao selama penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboellil, A. H. and Majdah M. Y. 2010. Effect of some alternative medicine and biological factors on *Candida albicans* in Saudi Arabia. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 1(6): 100 – 107.
- Adrianto, K. 2012. “Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao Pada *Streptococcus mutans*”. Skripsi. Jember: FKG Universitas Jember.
- Agusandi, Supriadi, dan Shanti. 2013. Pengaruh Penambahan Tinta Cumi Cumi (*Loligo sp.*) Terhadap Kualitas Nutrisi dan Penerimaan Sensoris Mie Basah. *Fishtech*. 2: 1.
- Ahmed, M. M.S. Akter, and J.-C. Lee, J.-B. 2010. Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *Food Science and Technology*, 43 (9): 1307–1312.
- Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Trinasjstic N. 2003. Structure Radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatia Chem*. 76: 55-61.
- Andrade, I., Flores, H.2004. *Optimization of spray drying of roselle extract (Hibiscus sabdariffa L.)*. Paper presented at the 14th International Drying Symposium. São Paulo.
- Angela, L. 2012. “Aktivitas Antioksidan dan Stabilitas Fisik Gel Anti-Aging yang mengandung Ekstrak Air Kentang Kuning (*Solanum tuberosum L.*)”. Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Anonim. 2013. *Bacillus subtilis* penghasil antibiotik Basitrasin. <http://zahrotulmaulia88.blogspot.co.id/2013/07/bacillus-subtilis-penghasil-antibiotik.html>. Diakses pada 29 April 2016
- Anonim. 2014. Antioksidan Senyawa Kimia Sejuta Manfaat. <http://madingelektronikpolimer.blogspot.co.id/2014/03/perkaya-hidup-dengan-antioksidan.html>. Diakses pada 29 April 2016
- Anonim. 2014. *Sonarome presents micro-encapsulated Flavours that lock the flavour and provide it to you in the powder form to enrich your product*. <http://sonarome.com/2014/12/02/spray-drying-technology/>. Diakses pada 29 April 2016
- Anonim. 2015. Peranan Bakteri *Escherichia coli* Bagi Manusia. <http://feri-3797.blogspot.co.id/2014/06/peranan-bakteri-escherichia-coli-bagi.html>. Diakses pada 29 April 2016

- Apintanapong, M. & Noomhorm, A. 2003. The use of spray-drying to microencapsulated 2-acetyl-1-pyrroline, a major flavour component of aromatic rice. *Food science and Technology*. Vol. 38: 95-102.
- Arisandy, P. 2014. "Pemuliaan Ketahanan Kakao (*Theobroma Cocoa L.*) Terhadap Serangan Penyakit *Vascular Streak Dieback*". Makalah pada seminar nasional kakao. Yogyakarta: UGM
- Arlorio, M., Corisson, J. D., Travaglia, F., Locatelli, M., Bottini, C., Tessitore, L., *et al.* 2006. Melanoidin extracts from not-roasted and roasted cocoa beans (*Theobroma cacao L.*): antioxidant and protective properties on stress-induced cell death. *Pigments in Food, a challenge to life sciences*. 167–169.
- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Miglio, G., Lombardi, G. 2005. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*. 38: 1009-1014.
- Arnelia. 2002. Fitokimia, Komponen Ajaib Cegah PJK, Diabetes Mellitus & Kanker. <http://www.kimianet.lipi.go.id/utama.cgi?artikel&1100397943&2>. (akses 19 April 2015).
- Bakowska-Barczak, A.M, and Kolodziejczyk, P. P. 2011. Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation. *Industrial Crops and Products*. 34 (2): 1301–1309.
- Barros, F.A.R.d. and Stringheta, P.C. 2006. Microencapsulamento de antocianinas – uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*. 36: 18–24.
- Belscak A, Komes D, Horzic, D, Ganic K, Damir KD. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Res Int*. 42: 707-16.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols : Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. 56 : 317-333.
- Çam, M., İçyer, N.C., Erdogan, F. 2014. Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Sci. Technol*. 55: 117–123.
- Che Man Y.B, Irwandi J., Abdullah W.J.W. 1999. Effect of different types of maltodextrin and drying methods physico-chemical and sensory

properties of encapsulated durian flavor. *J.Sci.Food.Agric.*79: 1075-1080.

Departemen Perindustrian. 2007. Gambaran Sekilas Industri Kakao. Jakarta: Pusat data dan informasi Depperindo

Dwidjoseputro, D. 1994. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jakarta: Djambatan.

Ernawati. 2015. “Aktivitas Ekstrak Polifenol Biji Kakao Superior Dan Inferior Dari Ptpn Xii Kebun Kalikempit-Banyuwangi Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antibakteri”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Tenologi Pertanian Universitas Jember.

Fang, Z.X., Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols. a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21: 510–523.

Fessenden, R.J., dan Fessenden, J. S. Dasar-Dasar Kimia Organik. Terjemahan oleh Maun, S., Anas, K., Sally, T.S. 1982. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Bipura Aksara.

Filková I, Mujumdar AS. 1995. *Industrial spray drying systems. Handbook of Industrial Drying*. France: CRC Press, Taylor & Francis Company.

Giesen, N. C., Falkenbach B., Beicht P., Claasen S., Lüers G., Stuermer C.A., Herzog V., Tikkanen R. 2004. Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem Journal.* 78 (2):509-18.

Good, H. 2002. Measurement Of Colour In Cereal Product. *J. Food Sci. Technol.* 4: 5-6.

Goenandi, D. H. 2007. Prospek Dan Arah Pengembangan Agribisnis Kakao. Edisi kedua. Jakarta: Badan Litbang Pertanian. Halaman 5.

Gupta, R. S. 2000. The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Pubmed.* 26(2):111-31.

Gyles, C. L., John F. P., J. Glenn S., dan Charles O. T. 2010. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Fourth Edition. USA: Blackwell Publishing. 267-298.

- Hartiati, A. dan Mulyani, S. 2015. The Effect of Maltodextrin Concentration and Drying Temperature to Antioxidant Content of Sinom Beverage Powder. Published. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 3: 231-234.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terbitan Kedua. Bandung : Penerbit ITB. Halaman 239.
- Hattenschwiler, S., dan Peter M. V. 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Science Direct*. 15 (6): 238–243.
- Hii, C. L., Lawi, C. L., Suzannah, S., Misnawi, dan Clokei, M. 2009. Polyphenol in cocoa (*Theobroma cacao* L). *Asian Journal of Food and Agro Industry*. 2 (4): 703.
- Hutching, J. B. 1999. *Food Color and Appearance Chapman and Hall Food Science Book*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. Maryland.
- Isnindar, Setyowati, E. P., dan Wahyuono, S. 2011. Aktivitas Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros Kaki* L.F) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1 Pikrilhidrazil). *Media Farmasi Indonesia*. Jogjakarta: UGM. Hal 114.
- Janny, S., Bert F., Dondero F., Chanoine M. H., Belghiti J., Mantz J., Paugam-Burtz C. 2012. Fatal *Escherichia coli* skin and soft tissue infections in liver transplant recipients: report of three cases. *Pubmed*. USA: 15(2): 49-53.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brook, J.S. Butel and S.A. Morse, 2001. *Medical Microbiology*. 22nd Edn. New York: Appleton and Lange.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Jonfia-Essien, W.A., West, G., Alderson, P.G. and Tucker, G. 2008. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. *Food Chemistry*. 108: 1155-1159
- Kanwar, J., Mujtaba T., Imthiyaz M., Congde., Tak H. C., and Qing P. D. 2012. Recent advances on tea polyphenols. *Front Biosci. Elite Ed.* 4: 111–131
- Katzung, B. G. 1989. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. diterjemahkan oleh Staf Pengajar Laboratorium Farmakologi. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya
- Keen, C.L., Holt, R.R., Oteiza, P.I., Fraga, C.G. and Schmitz, H.H. 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 298-303.

- Koneman EW, Allen SD, Schreckenberger PC, Janda WM, dan Winn WC. 1997. *Color Atlas and Textbook Microbiology*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Company
- Koswara. 2009. Teknologi Pembuatan Yogurt. eBook Pangan.com
- Khamanga, S. M., Parfitt, N., Tsitsi Nyamuzhiwa, Haidula, H., & Walker1, R. B. 2009. The Evaluation of Eudragit Microcapsules Manufactured by Solvent Evaporation Using USP Apparatus 1. *Dissolution Technologies*.
- Kusuma, Y. T. C., Suwasono, S., dan Yuwanti, S., 2013. Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antibakteri. *Jurnal Ilmiah Pertanian*. Vol. 1(2): 33-37.
- Lian, W.C., Hsiao, H.C., Chou, C.C., 2002. Survival of bifidobacteria after spray drying. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 79–86.
- Madigan, dan Michael T. 2009. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education. 12th Edition. San Francisco: CA.
- Manggabarani, A. 2011. Konsepsi Gerakan Peningkatan Produksi Dan Mutu Kakao (Gernas Kakao). Makalah seminar kakao. Jakarta: Gernas Kakao BAPPENAS.
- Marinova, D., Ribarova F., dan Atanassova M. 2005. Total Phenolics and total Flavonoids in Bulgarian Fruit and Vegetables. *Journal of University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40 (3): 255-260.
- Markham, K.R. Cara *Mengidentifikasi Flavonoid*. terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. 1988. Bandung: Penerbit ITB.
- Masibo, M. and He, Q. 2009. *In vitro* antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. *Malaysian Journal of Microbiology*. 5(2): 73-80.
- Mishra, P., Mishra, S., Mahanta, C.L., 2014. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food Bioprod. Process.* 92: 252–258.
- Munin, A. and Levy, F. E. 2011. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds. *a Review Journal pharmaci.* 793-829.
- Nasution, Z., 1976. *Pengolahan Cokelat*. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Pertanian IPB Press.

- Nawaekasari, M. 2012. “Efek Senyawa Polifenol Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Lactobacillus acidophilus*”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Nollet, Leo M. L. 1996. Handbook of Food Analysis: Physical characterization and nutrient analysis. v.2. Residues and other food component analysis. *Food science and technology*. 77
- Nurcahyanti, A. D. R., Dewi, L., dan Timotius, K.H. 2011. Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Polar nan Non Polar Biji Selasih (*Ocimum sanctum* Linn). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 22 (1).
- Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. 2001. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Boil. Pharm. Bull.* 24: 1202-1205
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, A.N. and Adenan, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*. 100: 1523–1530.
- Parrarud, S. & Pranee, A. 2010. Microencapsulation of Zn-Chlorophyll pigment from pandan leaf by spray drying and its characteristic. *International Food Research*. 17: 1031-1042.
- Pelczar, M.J. Jr. dan Chan E.C. S. 2008. *Dasar - Dasar Mikrobiologi 1*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia
- Poedjiwidodo, M. S., 1996. “Sambung Samping Kakao”. Jawa Tengah: Trubus Agriwidya.
- Pratiwi, M. I. 2013. “Uji Aktivitas Antimikrobaekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Kaya Polifenol Terserang *Phytophthora palmivora* terhadap *Streptococcusmutans* dan *Candida albicans*”. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi UNEJ.
- Purwaningsih, D., Whyllies A. A., dan Ireno M. 2013. “Formulasi Sediaan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Kandidat *Natural Antioxidant* Melalui Teknologi Mikroenkapsulasi Dengan Metode *Spray-Drying*”. Skripsi. Makasar: Fakultas Farmasi UNHAS.
- Quadri L. E., Weinreb P. H., Lei M., Nakano M. M., Zuber P., dan Walsh C. T. 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*. 37(6): 1585-95.

- Ré, M.I., 1998. Microencapsulation by spray drying. *Dry Technology*. 16: 1195–1236.
- Risch, J.H. 1995. Encapsulation: Overview of Uses and Techniques in Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients, *Acs Symposium Series*. Washington D C.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C., 2010. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45: 1386–1494.
- Rosenberg, M., Kopelman, I.J., Talmon, Y., 1985. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *J. Food Sci.* 50: 139–144.
- Rowe *et al.*, 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. London: The Pharmaceutical
- Rusconi, M and Conti, A. 2010. *Theobroma cacao L.*, the Food of the Gods: A scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological Research*. 61: 5–13
- Russell, A. D. and Furr, J. R. 1977. Antibacterial activity of a new chloroxylenol preparation containing ethylenediamine tetraacetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*. 4: 253-260.
- Ryan, K. J., dan Ray, C. G. 2004. *Sherris Medical Microbiology*. Fourth Edition. Washington: The McGraw-Hill Companies.
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. 2009. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chem.* 114: 616–622.
- Sanz G. M., Fernández C. A., Rodríguez C. M., Cercenado E., Marin M., Muñoz P., Bouza E. 2009. Recurrent *Escherichia coli* bloodstream infections: epidemiology and risk factors. *Pubmed*. USA. 882 : 77-82.
- Saurabh, S., and Nanda A. 2011. Use of Porous Carriers in The Development of Intra-gastric Floating Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharmacy*. 2 (10): 16-18.
- Setiadevi, Shinta. 2010. “Karakterisasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao *Nonfermented* Dari Berbagai Macam Metode Ekstraksi”. Skripsi. Tidak Dipublikasikan. Jember: Universitas Jember.

- Seidel, V. 2008. Initial and Bulk Extraction. In: Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I., editors. *Natural Products Isolation*. 2nd Ed. New Jersey: Humana Press. 33-34.
- Silva, P. I., Stringheta, P. C., Teófilo, R. F., and Nolasco de Oliveira, I.R. 2012. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*. 117: 538–544
- Sukatiningsih, Windarti, W., 2011. “Ekstraksi Senyawa Antioksidan Kulit Buah Kopi”. Makalah. Tidak dipublikasikan. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Susanti, A. A. 2014. Outlook Komoditi Kakao. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. Halaman 11.
- Spillane, J.J. 1995. *Komoditi Kakao Peranannya Dalam Perekonomian Indonesia*. Yogyakarta: Kanisius.
- Warsa, U.C. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Jakarta : Penerbit Binarupa Aksara. Halaman 103-110.
- Wattimena, JR.. 1981. *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*. Yogyakarta: UGM.
- Weisburger, J. H. 2001, Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 226: 891-897
- Widyotomo, S, Sri Mulato, dan Handaka. 2004. Mengenal Lebih Dalam Teknologi Pengolahan Biji Kakao. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 26 (2).
- Wiyono, R. 2012. “Preparation of Effervescent Powder Study Curcuma (*Curcuma Roxb xanthorrhiza*) Dryer Temperature Study, Concentration Dextrin, Citric Acid Concentration and Na-bicarbonate”. Thesis. Bandung: Universitas Pajajaran.
- Wollgast J, Anklam E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int*. 33:423–47.

LAMPIRAN

Lampiran A. Data Rendemen Mikroenkapsulasi EPBKI

Sampel	ulangan	Berat wadah (g)	berat bahan awal (g)	berat bahan akhir (g)	Rendemen (%)	Rata-Rata Rendemen (%)	STDEV
M05	1	34,8	192,9	8	4,15		
	2	34,8	206,1	10,2	4,95	4,59	0,41
	3	34,7	204,9	9,6	4,69		
M10	1	34,8	213,9	12,7	5,94		
	2	34,7	204,7	13,9	6,79	6,65	0,66
	3	34,8	217,1	15,7	7,23		
M15	1	34,8	223,8	21	9,25		
	2	34,8	225,2	21,5	9,55	9,17	0,42
	3	34,7	223,9	19,5	8,71		

Contoh Perhitungan:

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat bahan akhir}}{\text{Berat bahan awal}} \times 100\% \\ &= \frac{10,2}{206,1} \times 100\% = 5\%\end{aligned}$$

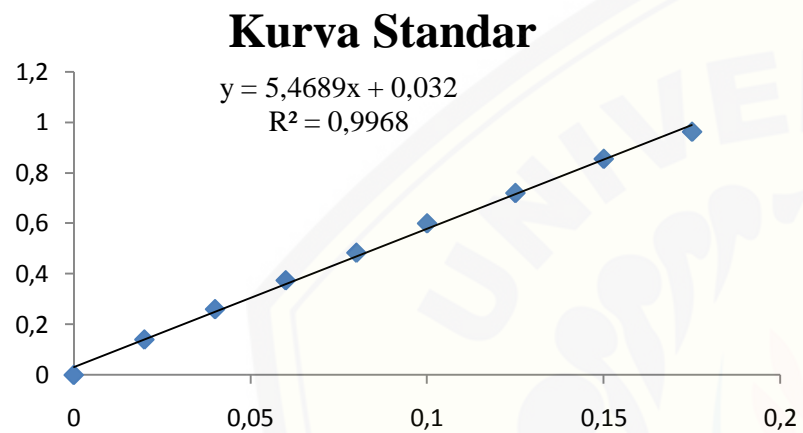
		47,9	9,9	16,4								
	2	47,8	9,8	16,5	70,99	71	11,90	12,24	5,42	5,43	22,418	13,07
		47,2	10	16,5								
		47,5	9,5	16,2								
		47,4	9,6	16,4								
	3	47,9	10,2	16,3	71,29		12,54		5,45		22,403	13,67
		47,9	10,3	16,5								
		47,9	10,3	16,7								
		47	10,2	16,5								
M15	1	49,5	10,1	17,1	74,20		12,63		5,73		22,415	13,86
		49,3	10,3	17,3								
		49,9	10,5	17,6								
		49,8	10,4	17,3								
	2	49	10,1	17,2	73,75	74	12,63	12,56	5,68	5,69	22,413	13,85
		49,6	10,3	17,2								
		49,7	10,4	17,4								
		49	10,5	17								
	3	49,3	10,1	17,3	73,75		12,42		5,68		22,42	13,65

Lampiran C. Data Total Polifenol Mikroenkapsulasi EPBKI

Perlakuan	ulangan	abs	a	b	X	Vol	Berat	TP	Rata	STDEV
M05	I	0,9065	5,4689	0,032	0,16	2	0,004	79,95		
		0,9285	5,4689	0,032	0,16	2	0,004	81,96		
	II	0,915	5,4689	0,032	0,16	2	0,004	80,73	81,78	1,40
		0,921	5,4689	0,032	0,16	2	0,004	81,28		
	III	0,9385	5,4689	0,032	0,17	2	0,004	82,88		
		0,9495	5,4689	0,032	0,17	2	0,004	83,88		
M10	I	0,689	5,4689	0,032	0,12	2	0,004	60,07		

		0,6815	5,4689	0,032	0,12	2	0,004	59,38		
	II	0,6335	5,4689	0,032	0,11	2	0,004	54,99	57,83	2,60
		0,632	5,4689	0,032	0,11	2	0,004	54,86		
	III	0,668	5,4689	0,032	0,12	2	0,004	58,15		
		0,6835	5,4689	0,032	0,12	2	0,004	59,56		
M15	I	0,4905	5,4689	0,032	0,08	2	0,004	41,92		
		0,438	5,4689	0,032	0,07	2	0,004	37,12		
	II	0,4635	5,4689	0,032	0,08	2	0,004	39,45	42,28	4,40
		0,4735	5,4689	0,032	0,08	2	0,004	40,36		

	III	0,559	5,4689	0,032	0,10	2	0,004	48,18		
		0,542	5,4689	0,032	0,09	2	0,004	46,63		
Ekstrak	I	0,8795	5,4689	0,032	0,15	1	0,1	309,93	297,20	12,00
	II	0,8145	5,4689	0,032	0,14	1	0,1	286,16		
	III	0,84	5,4689	0,032	0,15	1	0,1	295,49		



Konsentrasi	Abs I	Abs II	Rata Rata
0,175	0,967	0,955	0,961
0,15	0,829	0,879	0,854
0,125	0,719	0,719	0,719
0,1	0,609	0,589	0,599
0,08	0,488	0,478	0,483
0,06	0,384	0,364	0,374

0,04	0,266	0,254	0,26
0,02	0,147	0,133	0,14
0	0	0	0

Contoh Perhitungan:

$$\text{Persamaan: } y = 5,4689x + 0,032$$

$$0,9065 = 5,4689x + 0,032$$

$$0,9065 - 0,032 = 5,4689x$$

$$0,8745 = 5,4689x$$

$$x = 0,16$$

$$\begin{aligned} \text{Total fenol} &= \frac{X \times \text{Faktor pengenceran} \times \text{Volume}}{\text{Berat Bahan}} \\ &= \frac{0,16 \times 1 \times 2}{0,004} \\ &= 80 \text{ mg GAE/ g} \end{aligned}$$

Lampiran D. Data aktivitas antioksidan Mikroenkapsulasi EPBKI

Sampel	Ulangan	Kons	abs 1	abs 2	Hambatan 1	Hambatan 2	Rata- rata	Rata-rata final	IC ₅₀	Rata-rata IC ₅₀	STDEV
M05	1	0,5	0,1195	0,141	86	84	85	88	0,26	0,25	0,01
		0,45	0,201	0,1715	77	80	79	82			
		0,4	0,2495	0,241	71	72	72	75			
		0,3	0,3535	0,3585	59	59	59	60			
		0,2	0,497	0,5075	43	42	42	43			
		0,1	0,6815	0,6795	22	22	22	23			
	2	0,5	0,113	0,0775	87	91	89		0,24		
		0,45	0,1285	0,1485	85	83	84				
		0,4	0,1895	0,1935	78	78	78				
		0,3	0,33	0,334	62	62	62				
		0,2	0,48	0,4895	45	44	44				

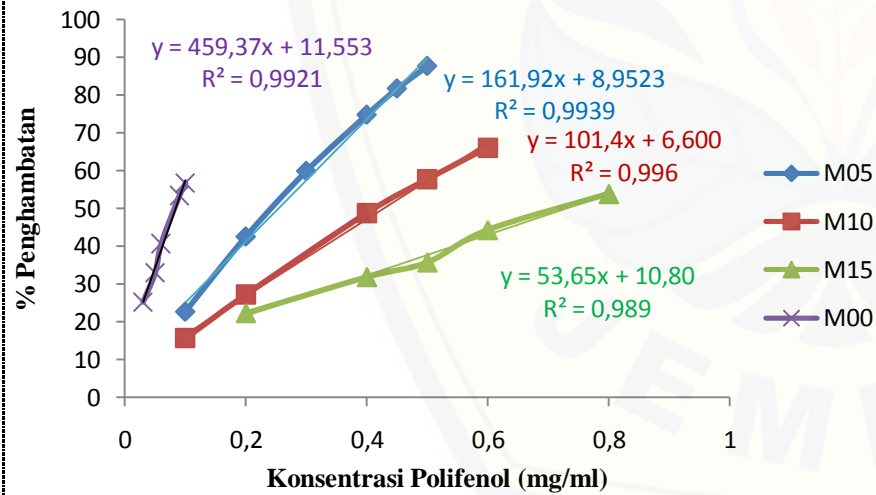
		0,1	0,6575	0,662	24	24	24				
	3	0,5	0,095	0,0975	89	89	89		0,26		
		0,45	0,1365	0,1685	84	81	82				
		0,4	0,2045	0,238	77	73	75				
		0,3	0,3425	0,374	61	57	59				
		0,2	0,496	0,528	43	39	41				
		0,1	0,667	0,686	23	21	22				
Blanko			0,87025								
M10	1	0,8	0,2085	0,1705	77	81	79	77	0,42	0,43	0,02
		0,6	0,323	0,3	65	67	66	66			
		0,5	0,3685	0,3775	60	59	60	58			
		0,4	0,4775	0,444	48	52	50	49			
		0,2	0,66	0,661	28	28	28	27			
		0,1	0,779	0,781	15	15	15	16			
	2	0,8	0,1895	0,2135	79	77	78		0,42		

		0,6	0,2875	0,3065	69	67	68				
		0,5	0,366	0,3915	60	57	59				
		0,4	0,4605	0,465	50	50	50				
		0,2	0,658	0,673	29	27	28				
		0,1	0,7705	0,7895	16	14	15				
	3	0,8	0,221	0,243	76	74	75		0,45		
		0,6	0,3405	0,3145	63	66	64				
		0,5	0,4105	0,421	55	54	55				
		0,4	0,487	0,4935	47	46	47				
		0,2	0,6925	0,675	25	27	26				
		0,1	0,7285	0,8085	21	12	17				
Blanko			0,921								
M15	1	0,8	0,407	0,4365	55	52	54	54	0,72	0,73	0,02
		0,6	0,507	0,524	44	42	43	44			
		0,5	0,5565	0,5915	39	35	37	36			

		0,4	0,6025	0,6265	34	31	33	32			
		0,2	0,7415	0,766	19	16	17	22			
	2	0,8	0,4305	0,432	53	53	53		0,75		
		0,6	0,5305	0,5095	42	44	43				
		0,5	0,6	0,6	34	34	34				
		0,4	0,623	0,63015	32	31	31				
		0,2	0,6955	0,697	24	23	24				
	3	0,8	0,401	0,411	56	55	55		0,71		
		0,6	0,489	0,481	46	47	47				
		0,5	0,5875	0,5745	35	37	36				
		0,4	0,6265	0,6135	31	33	32				
		0,2	0,6485	0,6965	29	24	26				
Blanko			0,9105								
Ekstrak		0,1	0,3685	0,411	59	54	57	57	0,08	0,08	0,01
		0,09	0,4075	0,431	55	52	53	53	0,09		

		0,07	0,4795	0,461	47	49	48	48			
		0,06	0,5145	0,5525	43	39	41	41			
		0,05	0,614	0,5905	32	34	33	33			
		0,03	0,7435	0,6015	17	33	25	25			
Blanko			0,9005								

Grafik Aktivitas Antioksidan



Contoh perhitungan:

1. Aktivitas Antioksidan

$$= \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$
$$= \frac{0,9005 - 0,3685}{0,9005} \times 100\%$$
$$= 59 \%$$

2. Nilai IC₅₀

Persamaan: $y = 459,37x + 11,553$

$$50 = 459,37x + 11,553$$

$$50 - 11,553 = 459,37x$$

$$0,084 = x \text{ (IC50)}$$

Lampiran E. Uji Aktivitas Antimikroba (KHM)**Contoh pembuatan larutan**

a. Larutan stok polifenol (200 mg/ml)

Sebanyak 20 gr sampel dilarutkan dalam 10 ml aquades steril.

b. media uji 1,6 mg/ml

Total media uji adalah 5 ml, yakni terdiri dari 4 ml *Nutrient Agar*, 20 μ L DMSO, dan 980 μ l (sejumlah larutan stok polifenol dan aquades steril/ larutan fisiologis). Untuk mengetahui jumlah polifenol dari larutan stok yang diperlukan sehingga didapatkan konsentrasi akhir 16 mg/ml adalah sebagai berikut:

$$M1V1=M2V2$$

$$200 \text{ mg/ml} \times V1 = 5 \text{ ml} \times 1,6 \text{ mg/ml}$$

$$200 \text{ mg/ml} \times V1 = 8 \text{ mg}$$

$$V1 = 8 \text{ mg} / 200 \text{ mg/ml} = 0,04 \text{ ml} = 40 \mu\text{l}$$

Jadi, untuk membuat media uji dengan konsentrasi polifenol 1,6 mg/ml dibutuhkan 4 ml, *Nutrient Agar*, 20 μ L DMSO, 40 μ l polifenol dari larutan stok dan 940 μ l aquades steril/ larutan fisiologis.

F. Data Hasil Penentuan Nilai KHM Terhadap Bakteri *E.Coli*

Sampel	Konsentrasi (mg/ml)	Ulangan 1 (cfu/ml)	Ulangan 2 (cfu/ml)	% hambatan	% hambatan	KHM	STDEV
M05	16	1900000	800000	97,73	99,04	12,67	0,76
	12,8	2500000	1300000	97,01	98,44		
	6,4	52000000	34400000	37,80	58,85		
	3,2	76000000	79200000	9,09	5,26		
M10	16	1500000	1600000	98,21	98,09	14,60	2,97
	12,8	4700000	28800000	94,38	65,55		
	6,4	32800000	58400000	60,77	30,14		
	3,2	83200000	83200000	0,48	0,48		
M15	22,4	1200000	1000000	98,56	98,80	22,45	3,04
	16	34400000	25600000	58,85	69,38		

	3,2	71200000	92000000	14,83	14,83		
Ekstrak	11,7	5300000	4200000	93,66	94,98	8,93	0,18
	8,3	7000000	5600000	91,63	93,30		
	3,3	30400000	34400000	63,64	58,85		
	0,17	61600000	58400000	26,32	30,14		
Kontrol		83600000	83600000				

Contoh Perhitungan:

$$\begin{aligned}
 1. \text{ Aktivitas Antimikroba} &= \frac{\text{Total mikroba kontrol} - \text{Total mikroba perlakuan}}{\text{Total mikroba kontrol}} \times 100\% \\
 &= \frac{8,36 \times 10^7 - 1,35 \times 10^6}{8,36 \times 10^7} \times 100\% \\
 &= 98 \%
 \end{aligned}$$

2. Nilai KHM

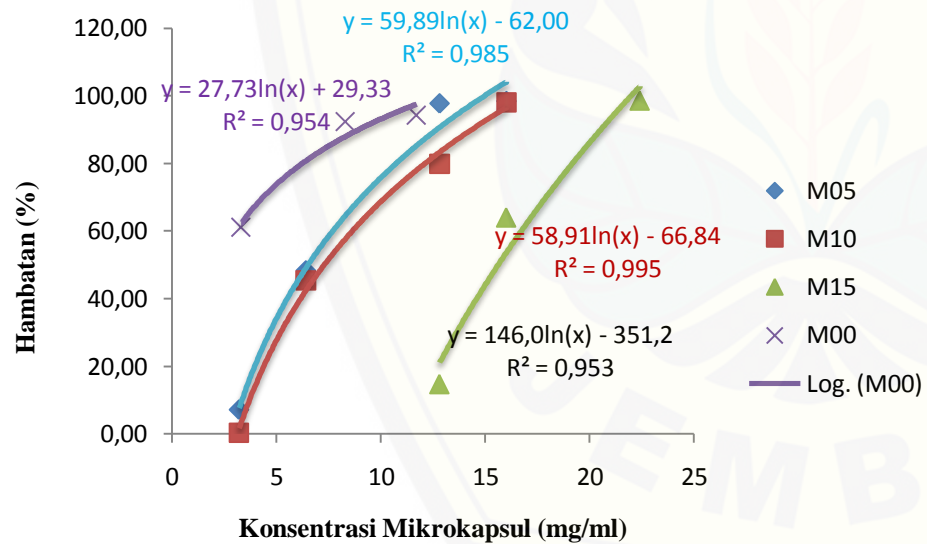
$$\text{Persamaan: } y = 58,911 \ln(x) - 66,84$$

$$90 = 58,911 \ln(x) - 66,84$$

$$90 + 66,84 = 58,911 \ln(x)$$

$$14 = \ln(x) \text{ (KHM)}$$

Grafik Aktivitas Antimikroba terhadap *E. coli*

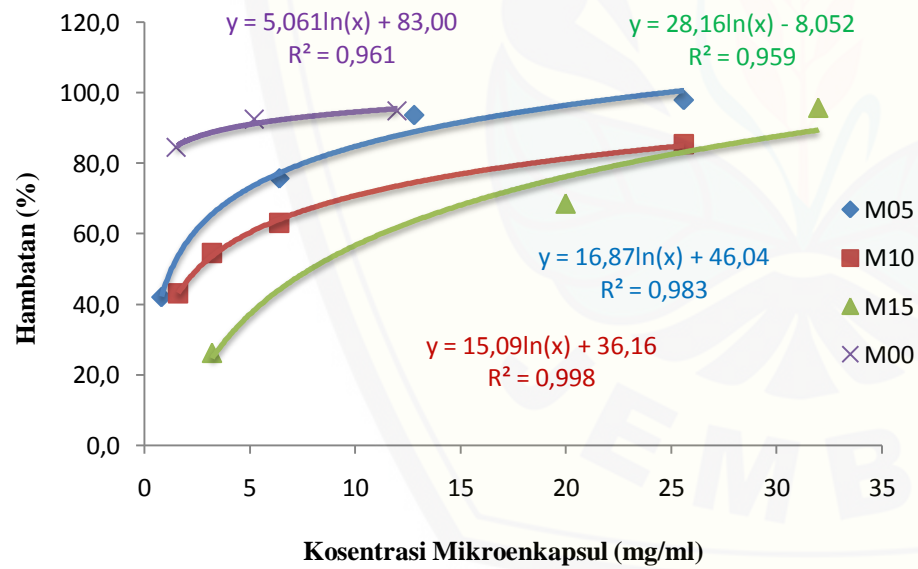


G. Data Hasil Penentuan Nilai KHM Terhadap Bakteri *B. subtilis*

Sampel	Konsentrasi (mg/ml)	Ulangan 1 (cfu/ml)	Ulangan 2 (cfu/ml)	% hambatan 1	% hambatan 2	KHM	STDEV
M05	25,6	600000	100000	96,6	99,4	13,68	2,16
	12,8	800000	1400000	95,4	92,0		
	6,4	2900000	5600000	83,4	68,0		
	0,8	10600000	9700000	39,4	44,6		
M10	25,6	2200000	2900000	87,4	83,4	30,3	7,35
	6,4	7800000	5100000	55,4	70,9		
	1,6	10300000	9600000	41,1	45,1		
M15	32	200000	1300000	98,9	92,6	33,15	9,69
	20	4200000	6800000	76,0	61,1		
	10	5200000	6800000	70,3	61,1		
	3,2	12900000	12900000	26,3	26,3		

Ekstrak	12	100000	900000	99,4	94,9	4,10	0,14
	5,2	1700000	1300000	90,3	92,6		
	1,5	2700000	2700000	84,6	84,6		
Kontrol		15600000	19400000				

Grafik Aktivitas Antimikroba terhadap *B. subtilis*



Contoh Perhitungan:

$$\begin{aligned} 1. \text{ Aktivitas Antimikroba} &= \frac{\text{Total mikroba kontrol} - \text{Total mikroba sampel}}{\text{Total mikroba kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{1,75 \times 10^7 - 5,2 \times 10^6}{8,36 \times 10^7} \times 100\% \\ &= 65,7 \% \end{aligned}$$

2. Nilai KHM

$$\text{Persamaan: } y = 5,061 \ln(x) + 83,009$$

$$90 = 5,061 \ln(x) + 83,009$$

$$90 - 83,009 = 5,061 \ln(x)$$

$$1,381 = \ln(x)$$

$$4 = x \text{ (KHM)}$$

Lampiran H. Efisiensi Enkapsulasi

Perlakuan	ulangan	TPC	EF	Rata-rata	STDEV
5	1	80,96	27,26	27,54	0,467
	2	81,00	27,27		
	3	83,38	28,07		
10	1	59,72	20,11	19,47	0,86
	2	54,92	18,49		
	3	58,86	19,82		
15	1	39,52	13,31	14,23	1,50
	2	39,91	13,44		
	3	47,40	15,96		
Ekstrak		297			

Contoh Perhitungan:

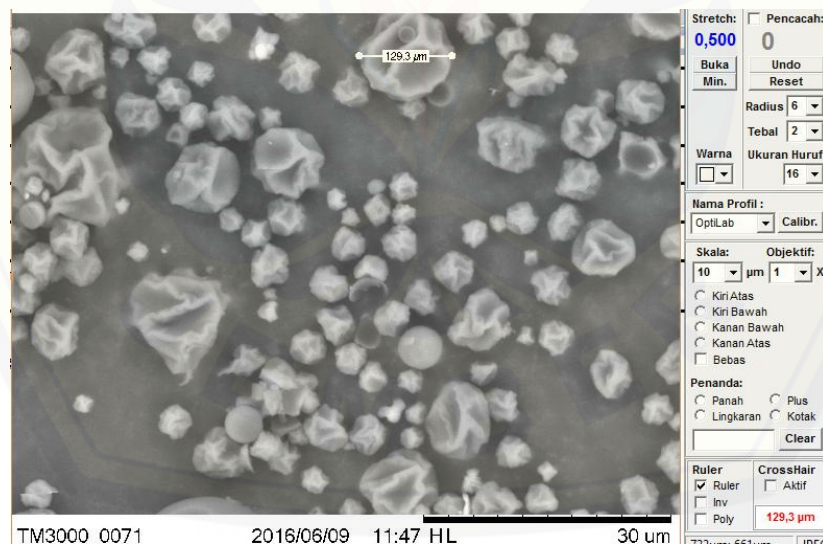
$$\begin{aligned}
 1. \text{ Efisiensi Enkapsulasi} &= \frac{\text{total fenol awal} - \text{total fenol akhir}}{\text{total fenol awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{297 - 82}{297} \times 100\% = 27,5\%
 \end{aligned}$$

Lampiran I. Ukuran Partikel

No.	Ukuran Partikel (μm)		
	M05	M10	M15
1	71,2	95,9	29,9
2	48,0	42,3	154,1
3	72,9	100,2	72,7
4	27,6	20,4	78,5
5	40,8	49,6	98,8
6	32,0	74,1	90,2
7	33,4	34,9	85,7
8	49,5	81,4	209,3
9	47,9	40,7	111,9
10	129	24,7	53,8
11	27,6	85,7	143,1

12	50,8	119,2	116,3
13	45,0	179	162,8
14	46,5	61,1	132,2
15	81,4	68,3	102,2
16	26,2	103,2	81,3
Rata-rata Ukuran Partikel (µm)	53,34	73,79	107,68

Contoh pengukuran:



Lampiran J. Dokumentasi Penelitian



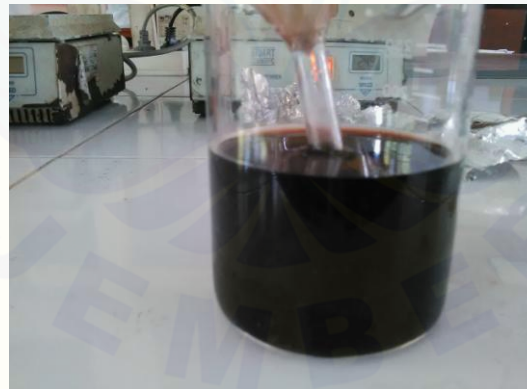
Bubuk kakao rendah lemak 1



Bubuk kakao rendah lemak 2



Tabung Sentrifugasi



Ekstrak polifenol



Ekstraksi



Vacum rotary evaporator



Spray Dryer



Biji kakao inferior



Mikroenkapsul ekstrak polifenol biji kakao inferior



Maltodekstrin

