

Uji Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Fraksi Semipolar Selama Penyimpanan Suhu Ruang ($27\pm 1^\circ\text{C}$) dan Suhu Refrigerasi ($5\pm 1^\circ\text{C}$)

*Antimicrobial and Antioxidant Activity Test of Semipolar Fraction of Cocoa Bean Husk Extract (*Theobroma cacao* L.) During Storage at Room Temperature ($27\pm 1^\circ\text{C}$) and Refrigeration Temperature ($5\pm 1^\circ\text{C}$)*

Yusuf Irfan¹, Andini Putri Riandani², Anita Suri³, Intan Puspita Sari⁴

¹⁾²⁾³⁾Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknik, Universitas Pelita Bangsa

¹yusufirfan@pelitabangsa.ac.id, ²andiniriandani@pelitabangsa.ac.id, ³anitasuri@pelitabangsa.ac.id, ⁴intannpuspita@mh.pelitabangsa.ac.id*

Abstract

The cocoa bean shell extract of the semipolar fraction (ethyl acetate) contains a number of bioactive compounds in it that have the potential as an antimicrobial and antioxidant source. Extracts containing bioactive compounds can be affected by storage duration either in room temperature or refrigeration temperature. This study aims to determine the effect of long-time to the activity of antioxidants and antimicrobials on cocoa bean extract semipolar fraction. The research method used is experimental method followed by regression and correlation analysis. The independent variable (X) in this study is the length of storage of extracts (0, 8, 16 and 24 hours) with storage conditions of room temperature ($27\pm 1^\circ\text{C}$) and refrigeration temperature ($5\pm 1^\circ\text{C}$), while the dependent variable (Y) is the result of observation of antioxidant activity and total phenol testing. Then the antimicrobial activity was analyzed descriptively against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The results showed the total phenol and antioxidant activity of cocoa bean extract of semipolar fraction had a positive correlation with storage duration at room temperature and refrigeration temperature. Similarly, the antimicrobial activity of the extract was able to inhibit the growth of *S. aureus* by 99.86% to 94.781% during storage at room temperature and 99.86% to 96.42% during storage at refrigeration temperature. Then it can inhibit *E. coli* growth of 99,923% to 70,003% during storage at room temperature and 99,923% to 76,799% during storage at refrigeration temperature.

Keywords: Total phenol compound, antioxidant activity, antimicrobial activity

Abstrak

Ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar (etil asetat) mengandung sejumlah senyawa bioaktif di dalamnya yang berpotensi sebagai sumber antimikroba dan antioksidan. Ekstrak yang mengandung senyawa bioaktif dapat dipengaruhi oleh lama penyimpanan baik dalam kondisi suhu ruang maupun suhu refrigerasi. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh lama simpan terhadap aktivitas antioksidan dan antimikroba pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yang dilanjutkan dengan analisis regresi dan korelasi. Variabel bebas (X) pada penelitian ini adalah lama penyimpanan ekstrak (0, 8, 16 dan 24 jam) dengan kondisi penyimpanan suhu ruang ($27\pm 1^\circ\text{C}$) dan suhu refrigerasi ($5\pm 1^\circ\text{C}$), sedangkan variabel terikatnya (Y) adalah hasil pengamatan aktivitas antioksidan dan pengujian total fenol. Kemudian aktivitas antimikroba dianalisis secara deskriptif terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian menunjukkan nilai total fenol dan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar memiliki korelasi positif dengan lama penyimpanan pada suhu ruang dan suhu refrigerasi. Demikian halnya pada aktivitas antimikroba ekstrak mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* sebesar 99,86% hingga 94,781% selama penyimpanan pada suhu ruang dan 99,86% hingga 96,42% selama penyimpanan pada suhu refrigerasi. Kemudian mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 99,923% hingga 70,003% selama penyimpanan pada suhu ruang dan 99,923% hingga 76,799% selama penyimpanan pada suhu refrigerasi.

Kata kunci: Total fenol, aktivitas antioksidan, aktivitas antimikroba.

Pendahuluan

Menurut Direktorat Jendral Perkebunan (2014) jumlah produksi buah kakao di Indonesia hingga tahun 2014 mencapai 709.331 ton. Tingginya angka produksi tersebut menjadikan buah kakao sebagai salah satu komoditas ekspor andalan nasional dan menjadikan Indonesia sebagai negara terbesar ketiga di dunia sebagai negara penghasil kakao setelah negara Pantai Gading dan Ghana (Kementrian Pertanian, 2015). Seiring dengan semakin tingginya angka produksi buah kakao dan berkembangnya industri pengolahan kakao, semakin tinggi pula produk sampingan atau limbah yang dihasilkan. Bagian dari buah kakao yang digunakan sebagai bahan baku cokelat adalah biji kakao kering dimana dari hasil pengolahan biji kakao kering tersebut menghasilkan produk sampingan atau limbah berupa kulit biji kakao.

Kulit biji kakao merupakan bagian yang menyelubungi keping biji kakao kulit yang bentuknya tipis dengan tekstur lunak dan agak berlendir yang menyelubungi keping biji kakao, persentasenya berkisar 10-16% dari keseluruhan bagian biji kakao kering (Fowler, 2009). Sejauh ini limbah kulit biji kakao hanya dimanfaatkan sebagai pakan ternak dan kompos padahal menurut beberapa hasil penelitian potensi kulit biji kakao untuk diolah lebih lanjut masih tinggi.

Pada dasarnya kulit biji kakao masih memiliki nilai fungsional yang tinggi, yaitu mengandung sejumlah senyawa bioaktif di dalamnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rindiantika (2013), kulit biji kakao mengandung senyawa fitokimia yaitu alkaloid, tanin, dan flavonoid pada keadaan segar dan setelah dikeringkan. Menurut Dewi (2013), hasil skrining fitokimia ekstrak kulit biji kakao fraksi etanol 70% mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antioksidan.

Senyawa bioaktif khususnya flavonoid memiliki kemampuan yang berbeda untuk larut berdasarkan kepolarannya. Kepolaran pelarut dibagi menjadi tiga macam yaitu pelarut polar, semipolar, dan nonpolar (Day dan Underwood, 2002). Cara yang tepat untuk memaksimalkan kemampuan flavonoid sebagai antimikroba adalah memisahkan kepolaran pelarut pada ekstrak kulit biji kakao dengan proses fraksinasi (Miranti, 2004 dikutip Pangaribuan, 2014).

Fraksinasi dapat dilakukan salah satunya melalui metode ekstraksi cair cair yakni proses ekstraksi dimana zat yang diekstraksi terdapat di dalam campuran yang berbentuk cair. Metode pemisahan secara ekstraksi cair-cair bergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak, yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa nonpolar (Babu dan Anggira, 2003). Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi adalah air, etil asetat, dan heksan. Menurut Carey dan Sunberg (2007), heksan tergolong sebagai pelarut nonpolar, etil asetat tergolong sebagai pelarut semipolar, dan air tergolong sebagai pelarut polar.

Menurut penelitian Pangaribuan (2014), dilaporkan bahwa ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar dengan metode ekstraksi cair-cair secara kualitatif mengandung senyawa fitokimia yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, dan triterpenoid. Sedangkan secara kuantitatif, senyawa-senyawa yang dominan dalam ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar diantaranya senyawa kafein (28,73%), asam heksadekanoat (12,20%), asam propionat (6,54%), dan teobromin (6,14%), (Pangaribuan, 2014). Ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar memiliki efektivitas paling tinggi dalam menghambat bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yakni dapat menghambat bakteri *S.aureus* dan *E.coli* (zona bening rata-rata : 18,58 mm) dibandingkan fraksi polar (zona bening rata-rata : 12,17 mm) dan nonpolar (zona bening rata-rata : 9,83 mm).

Sementara dalam hal antioksidan, menurut penelitian Prakoso (2016) dengan metode fraksinasi yang sama pada fraksi semipolar diperoleh nilai IC₅₀ 2499,46 ppm, di mana Inhibition Concentration (IC₅₀) merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan penghambatan 50%. DPPH sendiri merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam.

Dalam beberapa hasil penelitian, masa simpan suatu bahan pada suhu ruang yang mengandung komponen senyawa bioaktif dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dan efektifitas antimikroba pada bahan tersebut. Menurut Durairaj, dkk (2009), ekstrak bawang putih yang disimpan di suhu ruang akan

mengalami penurunan aktivitas antibakteri dari hari ke hari dan kehilangan aktivitasnya setelah hari ke 7. Menurut Dwiyanti dan Nurani (2014), lama penyimpanan dan lama penyeduhan berpengaruh signifikan terhadap aktivitas antioksidan teh rosela dimana aktivitas antioksidan terbaik dari teh rosela adalah teh dengan lama penyeduhan 20 menit dan lama penyimpanan 0 hari dan semakin menurun sebanding dengan lama penyeduhan dan juga penyimpanan yang semakin lama. Menurut Widarta dan Arnata (2014), ekstrak bekatul beras merah yang di dalamnya terkandung senyawa fenolik setelah penyimpanan 12 jam dalam suhu ruang dengan adanya 1% oksidator dan pada berbagai buffer pH menurun aktivitas antioksidannya sebesar 4,33-5,74%.

Selain dipengaruhi penyimpanan pada suhu ruang, Javanmardi dan Kubota (2006) dikutip Evelin, dkk (2014) menyatakan bahwa perubahan aktivitas antioksidan juga dapat berlangsung pada suhu rendah atau suhu refrigerasi selama penyimpanan. Perubahan ini berlangsung oleh karena komponen-komponen yang berpotensi sebagai antioksidan mengalami penurunan selama penyimpanan dingin (4-7°C) (Rice-Evans dan Packer, 2003; Papadopoulos, 2008; Combs, 2008 dikutip Evelin, dkk 2014).

Penelitian mengenai kestabilan senyawa bioaktif dalam ekstrak kulit biji kakao belum banyak dilakukan. Untuk itu perlu dilakukan penelaahan lebih lanjut mengenai kestabilan ekstrak kulit biji kakao sebagai antioksidan dan antimikroba selama penyimpanan pada suhu ruang dan suhu refrigerasi.

Metode Penelitian

1. Bahan Percobaan

Bahan baku yang digunakan pada percobaan adalah kulit biji kakao tipe Forastero yang didapatkan dari Perkebunan Kakao Swasta di daerah Jawa Barat. Bahan – bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah akuades, etil asetat, heksan, dan etanol 70%. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis kandungan pelarut adalah H₂SO₄ dan K₂Cr₂O₇. Bahan – bahan yang digunakan untuk analisis antioksidan adalah reagen Folin-Ciocalteu 50%, Na₂CO₃ 7%, metanol, dan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). Bahan – bahan yang digunakan untuk analisis antimikroba adalah aquades, spiritus, media NA (Nutrient Agar), media NB (Nutrient Broth), kultur murni E.coli, S.aureus, larutan BaCl₂ dan H₂SO₄. 4.2.2

2. Alat Percobaan

Alat-alat yang digunakan pada percobaan yaitu fin tip, kapas, kassa, ose, spatula, ball pipet, tabung reaksi, corong, cawan petri, rak tabung, jar ekstraksi, corong pemisah, waterbath, mikropipet, pipet ukur, bunsen, gelas ukur, beaker glass, labu ukur, erlenmeyer, alumunium foil, clingwrap, corong pisah, ayakan Tyler, vacuum filter, grinder, vortex, rotary evaporator vacuum, autoclave, inkubator, vortex, spektrofotometer uv-vis dan refrigerator.

3. Metode

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yang dianalisis secara deskriptif dan dilanjutkan dengan analisis regresi dan korelasi untuk memprediksi variabel terikat (Y) bila variabel bebas diketahui. Variabel bebas (X) pada penelitian ini adalah lama penyimpanan ekstrak, sedangkan variabel terikatnya (Y) adalah hasil pengujian aktivitas antioksidan dan nilai total fenol. Kemudian untuk pengamatan profil ekstrak kulit biji kakao, pengujian kualitatif alkohol, dan uji aktivitas antimikroba dianalisis secara deskriptif.

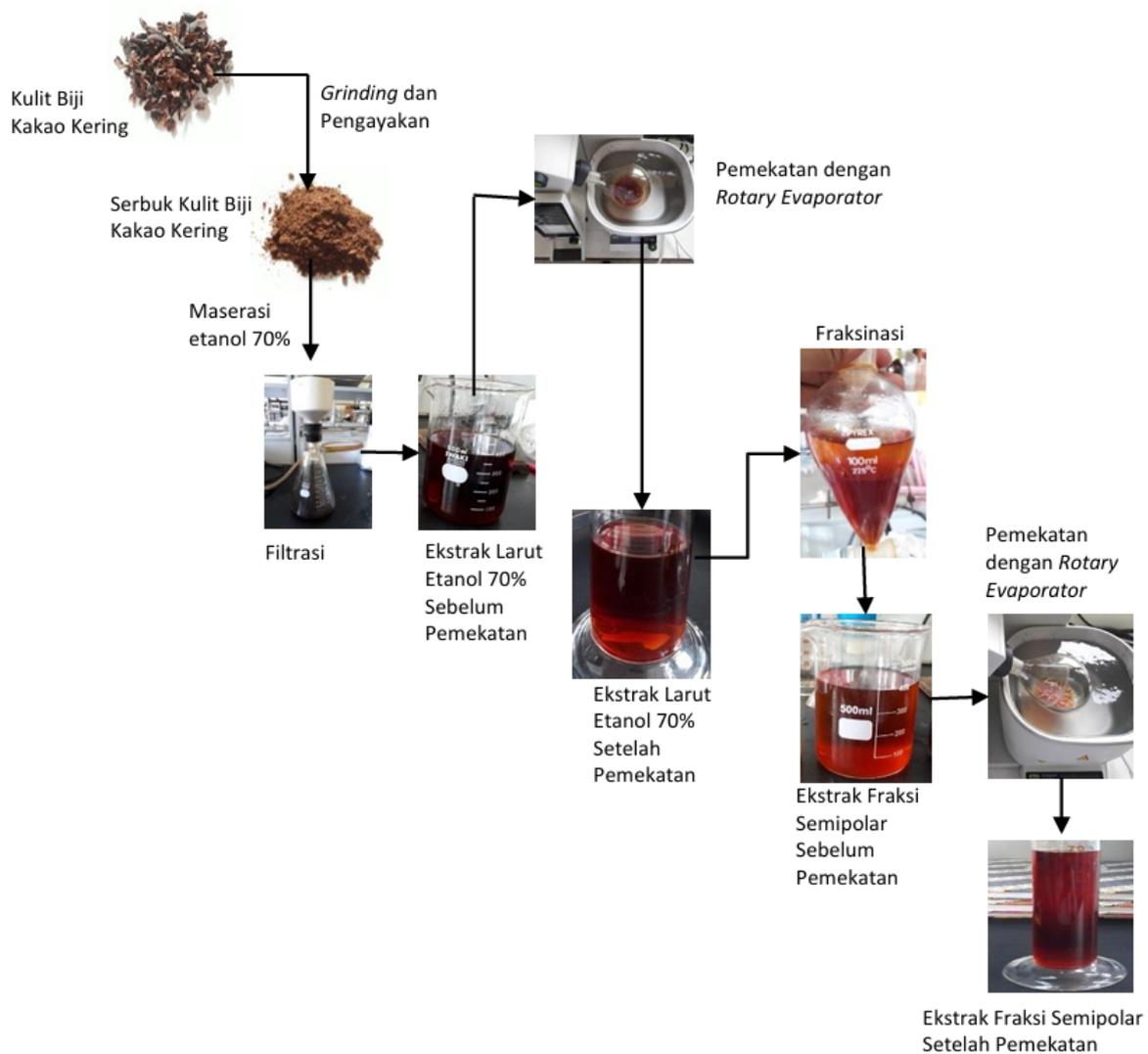
Penelitian dilakukan terhadap kulit biji kakao kering yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% menghasilkan ekstrak kulit biji kakao fraksi larut etanol 70%. Kemudian dilakukan fraksinasi metode ekstraksi cair-cair untuk menghasilkan fraksi semipolar ekstrak kulit biji kakao. Proses fraksinasi menggunakan corong pisah dengan pelarut heksan, etil asetat, dan akuades, menghasilkan fraksi polar (akuades), fraksi semipolar (etil asetat), fraksi nonpolar (heksan).

Kemudian ekstrak dari ketiga fraksi tersebut hanya digunakan fraksi semipolar saja untuk dianalisis dan diketahui bagaimana karakteristik aktivitas antimikroba dan antioksidannya selama penyimpanan. Kondisi penyimpanan dilakukan dalam suhu refrigerasi (5±1°C) dan suhu ruang (27±1°C). Analisis nilai total fenol menggunakan metode Folin-Ciocalteu, aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan aktivitas

antimikroba menggunakan metode dilusi. Pengamatan pada penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali ulangan dengan lama penyimpanan selama 24 jam dan dianalisis setiap 8 jam yakni pada jam ke-0, 8, 16, dan 24.

Hasil dan Pembahasan

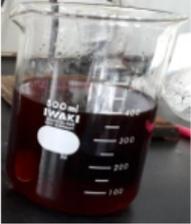
Proses ekstraksi kulit biji kakao hingga diperoleh ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar dilakukan dalam beberapa tahapan proses. Tahapan proses pembuatan ekstrak kulit biji kakao dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Tahapan Proses Pembuatan Ekstrak Kulit Biji Kakao Fraksi Semipolar

Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit biji kakao dapat dipengaruhi oleh faktor luar. Menurut Pokorny et al, (2001) beberapa faktor yang mempengaruhi diantaranya oksidasi akibat dari paparan cahaya selama penyimpanan. Oleh karena itu selama penyimpanan digunakan botol kaca berwarna gelap yang bertujuan untuk menghindari oksidasi senyawa aktif selama penyimpanan akibat pengaruh cahaya matahari. Pengamatan profil ekstrak kulit biji kakao dilakukan pada ekstrak kulit biji kakao larut etanol 70% dan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar yang meliputi warna, aroma, dan rendemen. Profil dari ekstrak kulit biji kakao larut etanol 70% dan fraksi semipolar disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Profil Ekstrak Kulit Biji Kakao Larut Etanol 70% dan Fraksi Semipolar

No.	Ekstrak Kulit Biji Kakao	Karakteristik			Gambar
		Warna	Aroma	Rendemen	
1.	Ekstrak kulit biji kakao larut etanol 70%	Cokelat pekat, keruh (++)	Kakao (+)	26%	 Sebelum pemekatan  Setelah pemekatan
2.	Ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar	Cokelat kekuningan, keruh (+)	Kakao dan senyawa eteris	15,31%	 Sebelum pemekatan  Setelah pemekatan

Keterangan : tanda “+” menunjukkan kenaikan intensitas.

1. Warna

Warna dari ekstrak kulit biji kakao awal (sebelum fraksinasi) yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% adalah coklat pekat. Woo (2004) dikutip Ginting (2014), menyatakan bahwa warna ekstrak murni tanpa fraksinasi akan semakin gelap karena mengidentifikasi bahwa ekstrak tersebut memiliki kandungan flavonoid yang lebih besar. Menurut Harbone (1987), warna coklat pada ekstrak disebabkan oleh adanya kandungan senyawa flavonoid dan quinon. Quinon dapat membentuk kompleks dengan asam amino dan protein serta mengalami polimerisasi dengan flavonoid untuk membentuk tanin dengan berat molekul tinggi.

Tanin akan membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen dan menghasilkan pigmen tak larut air berwarna coklat yang memberikan warna khas kakao (Afoakwa et al., 2012). Selain itu, warna coklat pada ekstrak kulit biji kakao juga disebabkan karena kandungan golongan polifenolik pada kakao menyebabkan warna coklat yang dihasilkan pada ekstrak dan bermanfaat sebagai antioksidan (Fowler, 2009).

Ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar yang menggunakan pelarut etil asetat memiliki warna cokelat kekuningan. Adanya warna kuning pada ekstrak kulit biji kakao fraksi ini dikarenakan senyawa tanin yang sifatnya semipolar seperti proantosianidin (Septiana dan Ari, 2012). Tanin yang dapat larut dalam senyawa etil asetat diduga adalah tanin jenis oligomerik, tanin jenis ini termasuk ke dalam tanin terkondensasi yang memiliki kelarutan yang baik dalam etil asetat, hal ini didukung oleh pernyataan Contis et al. (1998) yaitu hanya tanin monomerik dan proantosianidin dimerik yang dapat larut dalam etil asetat.

2. Aroma

Aroma ekstrak kulit biji kakao yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 70% adalah aroma kakao. Aroma kakao yang timbul ini terbentuk dari reaksi antara prekursor aroma kakao (asam amino bebas dan peptida) dengan gula melalui reaksi Maillard yang menghasilkan komponen aroma seperti alkohol, eter, furan, tiazol, piron, asam, ester, aldehida, imina, amina, oksazol, pirazin, dan pirol (Misnawi dan Ariza, 2011). Saat ini sudah ditemukan sekitar 200 macam senyawa komponen aroma kakao (Minifie, 1988), diantaranya terdapat 30 macam senyawa pyrazine, 10 pyrole dan 15 furan (Reineccus et al., 1972).

Ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar yang difraksinasi dari ekstrak kulit biji kakao larut etanol 70% menggunakan etil asetat memiliki aroma kakao yang lebih lemah dan memiliki bau senyawa eteris. Aroma kakao yang dihasilkan lebih lemah karena senyawa prekursor yang terlarut di dalam etil asetat lebih sedikit jenisnya, contohnya senyawa pyrazine yang merupakan senyawa prekursor aroma kakao agak sulit larut dalam eter, dan kloroform (Dirjen POM, 1995). Aroma senyawa eteris diakibatkan karena aroma pelarut dalam ekstrak yaitu etil asetat yang memiliki bau yang menyengat seperti bau lem atau pembersih kuku (aseton), bau yang menyengat tersebut disebabkan karena etil asetat termasuk ke dalam golongan senyawa ester yang memiliki sifat volatil.

3. Rendemen

Rendemen pada ekstrak kulit biji kakao dengan pelarut etanol 70% yaitu 26% sedangkan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar yaitu 15,13%. Nilai rendemen didapatkan dari volume ekstrak setelah dipekatkan dibandingkan dengan berat awal sampel yang diekstrak sebelum dipekatkan. Jumlah rendemen yang dihasilkan berbeda tergantung pada volatilitas pelarut, semakin rendah titik didih dari pelarut maka volatilitasnya semakin tinggi karena titik uapnya semakin rendah, sedangkan semakin tinggi titik didihnya maka volatilitasnya semakin rendah (Henrickson, 2005). Etanol dan etil asetat masing-masing memiliki titik didih 78,37°C dan 77,1°C (Sutresna, 2006). Semakin volatil maka saat dipekatkan volumenya akan semakin sedikit dan menghasilkan rendemen yang kecil.

Pengujian Kualitatif Alkohol

Pengujian alkohol secara kualitatif dilakukan pada ekstrak kulit biji kakao setelah maserasi etanol 70% dan setelah diperoleh ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar menggunakan pelarut etil asetat yang masing-masing telah melalui proses pemekatan menggunakan rotary evaporator. Pengujian alkohol secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya residu alkohol yang digunakan sebagai pelarut dalam pembuatan ekstrak kulit biji kakao yakni pelarut etanol 70% yang tergolong dalam kelompok alkohol dan etil asetat yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat (Daniel, 2010). Pengujian kualitatif alkohol disajikan dalam **Tabel 2**

Tabel 2. Hasil Pengujian Alkohol Secara Kualitatif

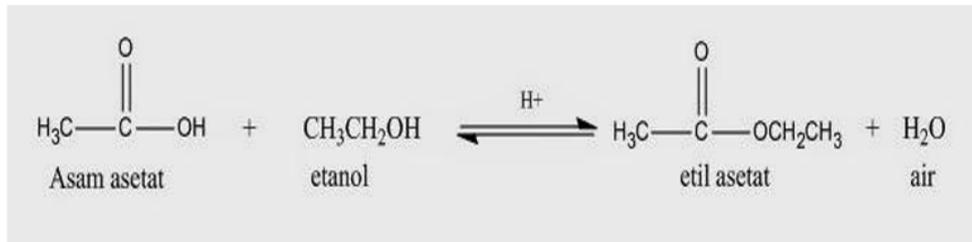
Kondisi Ekstrak	Hasil Pengujian	Gambar
Larut etanol 70% (Sebelum fraksinasi)	Negatif	 Kontrol - Sampel
Fraksi Semipolar (Setelah fraksinasi)	Negatif	 Kontrol - Sampel

Pengujian alkohol dalam ekstrak diuji secara oksidasi menggunakan larutan $K_2Cr_2O_7$. Prinsip dari pengujian ini adalah berdasarkan reaksi redoks antara etanol dengan kalium dikromat dalam suasana asam dengan penambahan H_2SO_4 . Alkohol primer dan sekunder dengan penambahan $K_2Cr_2O_7$ dalam suasana asam akan mengalami perubahan warna dari larutan berwarna jingga menjadi hijau kebiruan. $K_2Cr_2O_7$ merupakan oksidator kuat sehingga dalam kondisi yang mengandung alkohol akan mengalami reduksi. Jumlah $Cr_2O_7^{2-}$ yang direduksi oleh etanol menunjukkan kadar etanol dalam suatu larutan (Bertram, 2002)

Berdasarkan hasil pengujian, kandungan alkohol pada ekstrak adalah negatif yang menunjukkan residu alkohol sudah tidak terdapat dalam ekstrak. Etanol memiliki titik didih $78,4^\circ C$ dan bersifat mudah menguap (Sutresna, 2006). Oleh karena itu, hasil negatif tersebut dimungkinkan karena sifat etanol yang mudah menguap sehingga setelah proses pemekatan menggunakan rotary evaporator pada suhu $45^\circ C$ etanol sudah dapat teruapkan seluruhnya.

Berdasarkan hasil pengujian alkohol secara kualitatif terhadap ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar (Tabel 8) menunjukkan bahwa hasil pengujian adalah negatif. Sama halnya seperti etanol, etil asetat bersifat mudah menguap dengan titik didih $77,1^\circ C$ (Sutresna, 2006). Akan tetapi dalam pengamatan profil ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar (Tabel 7) menunjukkan bahwa aroma dari ekstrak tersebut adalah aroma senyawa eteris yang diduga dihasilkan oleh pelarut etil asetat yang bersifat volatil dan memiliki aroma yang menyengat.

Berdasarkan kedua hasil tersebut, diduga dalam ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar masih terdapat residu pelarut yang digunakan pada saat fraksinasi yakni etil asetat. Etil asetat sendiri merupakan senyawa hasil dari proses esterifikasi antara etil asetat dan etanol (Fessenden, 1982). Reaksi esterifikasi pembentukan etil asetat dapat dilihat pada **Gambar 2**.

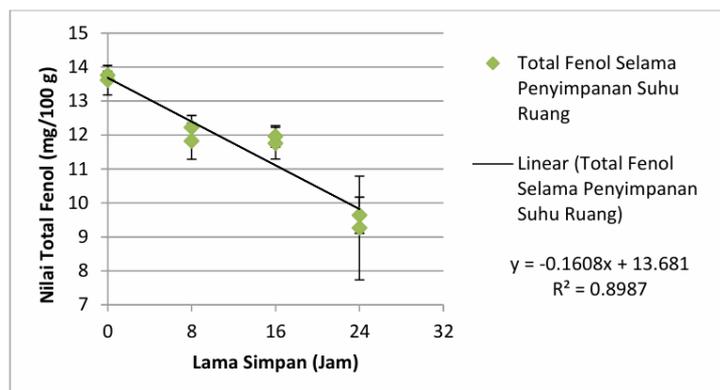


Gambar 2. Reaksi Esterifikasi Pembentukan Etil Asetat
(Fessenden, 1982)

Menurut Fessenden (1982), produk yang dihasilkan dari proses esterifikasi tersebut yakni etil asetat dan air. Oleh karena itu, etanol yang merupakan senyawa pembentuk etil asetat diduga tidak terdapat dalam etil asetat maupun dalam ekstrak sehingga hasil pengujian alkohol secara kualitatif yang dihasilkan adalah negatif.

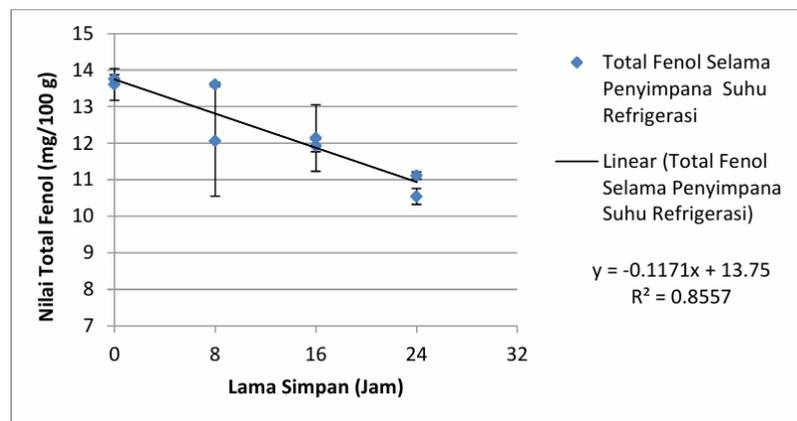
Total Fenol Ekstrak Kulit Biji Kakao Fraksi Semipolar Selama Penyimpanan

Hasil pengujian total fenol menunjukkan adanya pengaruh lama penyimpanan terhadap nilai total fenol pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar. Pengaruh lama penyimpanan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar pada suhu ruang terhadap nilai total fenol disajikan dalam **Gambar 3**.



Gambar 3. Total Fenol Selama Penyimpanan Suhu Ruang

Berdasarkan hasil pengujian total fenol ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan pada suhu ruang menunjukkan adanya pengaruh yang sangat kuat dan berkorelasi positif antara lama penyimpanan dengan nilai total fenol dalam ekstrak dengan ditunjukkannya nilai koefisien determinasi sebesar 0,8987 (Sudjana, 2002). Sama halnya dengan kondisi penyimpanan suhu ruang, lama penyimpanan dalam kondisi suhu refrigerasi mempengaruhi nilai total fenol. Pengaruh lama penyimpanan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar pada suhu refrigerasi terhadap nilai total fenol disajikan dalam **Gambar 4**.



Gambar 4. Total Fenol Selama Penyimpanan Suhu Refrigerasi

Berdasarkan hasil pengujian total fenol ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan pada suhu refrigerasi, menunjukkan nilai koefisien determinasi adalah sebesar 0,8557. Nilai koefisien determinasi tersebut menunjukkan adanya pengaruh yang sangat kuat dan korelasi positif antara lama penyimpanan dengan nilai total dalam ekstrak (Sudjana, 2002). Laju penurunan nilai total fenol selama penyimpanan dapat diamati berdasarkan hasil analisis nilai koefisien regresi. Hasil analisis koefisien regresi terhadap nilai total fenol selama penyimpanan dapat diamati pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Koefisien Regresi Nilai Total Fenol Selama Penyimpanan

Kondisi Penyimpanan	Koefisien Regresi (mg/100gram/jam)
Suhu Ruang	0,1608
Suhu Refrigerasi	0,1171

Berdasarkan hasil analisis pada **Tabel 3**, apabila dibandingkan antara kondisi penyimpanan suhu ruang dan suhu refrigerasi, nilai total fenol pada kondisi penyimpanan suhu ruang lebih tinggi laju penurunannya dibandingkan penyimpanan suhu refrigerasi dengan ditunjukkannya nilai koefisien regresi sebesar 0,1608 mg/100gram/jam sedangkan pada kondisi penyimpanan suhu refrigerasi menunjukkan laju penurunan nilai total fenol yang lebih rendah dengan ditunjukkannya nilai koefisien regresi sebesar 0,1171 mg/100gram/jam.

Jumlah senyawa fenolik yang terdapat pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar berkaitan dengan kepolaran pelarut dan tingkat kelarutan senyawa aktif dalam polaritas yang berbeda-beda. Total fenolik yang terkandung dalam fraksi semipolar lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak kulit biji kakao tanpa fraksinasi dan fraksi polar, namun lebih tinggi dari fraksi nonpolar (Prakoso, 2016). Senyawa fenolik yang terlarut dalam fraksi semipolar antara lain alkaloid, tanin, triterpenoid, saponin, dan flavonoid (Pangaribuan, 2014).

Penurunan nilai total fenol selama penyimpanan diakibatkan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar mengandung senyawa metabolit sekunder salah satunya flavonoid yang mudah teroksidasi. Menurut Pokorny et al, (2001) beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat oksidasi diantaranya, kondisi pengolahan, tekanan oksigen, suhu, radiasi cahaya dan penyimpanan.

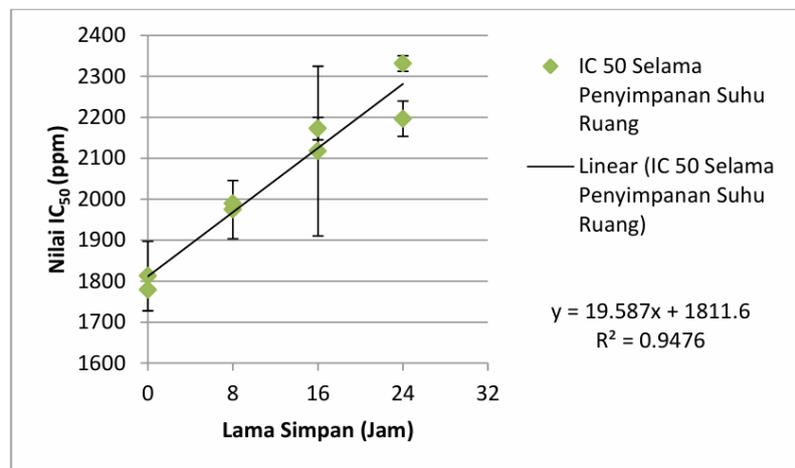
Kondisi pengolahan umumnya melibatkan proses pemanasan. Pada persiapan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar dilakukan proses pemanasan menggunakan rotary evaporator. Proses tersebut dilakukan sebanyak dua kali diantaranya pada ekstrak hasil maserasi menggunakan etanol 70% dan setelah fraksinasi. Lamanya proses pemanasan tersebut dapat mempengaruhi kandungan senyawa fenol pada ekstrak. Menurut Di Mattia et al., (2013) kandungan polifenol pada biji kakao dan produk olahannya sangat dipengaruhi oleh proses pengolahan diantaranya proses pengeringan dan penyangraian, proses tersebut melibatkan suhu tinggi yang mengakibatkan terjadinya proses perombakan dan penguraian senyawa polifenol.

Kondisi penyimpanan melibatkan faktor suhu, radiasi cahaya dan oksigen pada lingkungan selama dilakukan penyimpanan. Jika dibandingkan antara penyimpanan suhu ruang dan suhu refrigerasi, penyimpanan suhu refrigerasi menunjukkan laju penurunan yang lebih rendah dibandingkan pada penyimpanan suhu ruang (Tabel 9). Hal tersebut dikarenakan suhu penyimpanan pada kondisi penyimpanan suhu ruang yang lebih tinggi dibandingkan suhu refrigerasi. Semakin tinggi suhu yang digunakan, semakin cepat terjadinya reaksi-reaksi kimia (Frazier dan Westhoff, 1978). Penyimpanan pada suhu refrigerasi merupakan salah satu cara untuk mengawetkan bahan, karena suhu refrigerasi dapat menghambat reaksi-reaksi kimia dalam bahan. Pada umumnya setiap penurunan suhu 10°C kecepatan reaksi akan berkurang kira-kira menjadi setengahnya dan sekaligus (Parker, 2003).

Keberadaan oksigen juga dapat mempengaruhi degradasi komponen fenolik dalam ekstrak. Hal tersebut dikarenakan sifat dari senyawa fenolik yang mudah teroksidasi sehingga rentan terhadap degradasi oksidatif dalam berbagai tahapan selama proses persiapan dan juga selama penyimpanan. Keberadaan oksigen dapat mempercepat degradasi senyawa fenol melalui mekanisme oksidatif langsung atau melalui peran enzim pengoksidasi (Patras dkk., 2010). Sementara paparan cahaya matahari diduga tidak mempengaruhi penurunan senyawa fenol yang terjadi pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar. Hal tersebut dikarenakan penggunaan botol kaca berwarna gelap yang dapat menghindari ekstrak dari pengaruh tersebut.

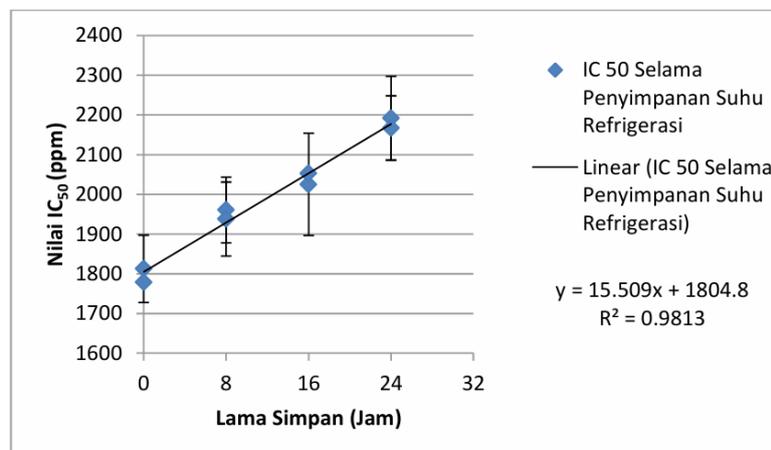
Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao Fraksi Semipolar Selama Penyimpanan

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao Fraksi Semipolar Selama Penyimpanan Hasil pengujian aktivitas antioksidan (Lampiran 3) selama penyimpanan pada suhu ruang maupun suhu refrigerasi menunjukkan adanya pengaruh antara lamanya penyimpanan dengan aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan pada suhu ruang ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀ (Inhibitory Concentration) yang disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Nilai IC₅₀ Selama Penyimpanan Suhu Ruang

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan pada suhu ruang (Gambar 5) menunjukkan adanya pengaruh yang sangat kuat antara lama penyimpanan dengan nilai IC₅₀ yang menunjukkan aktivitas antioksidan dalam ekstrak dengan ditunjukkannya nilai koefisien determinasi sebesar 0,9476 (Sudjana, 2002). Sama halnya dengan kondisi penyimpanan suhu ruang, lama penyimpanan dalam kondisi suhu refrigerasi mempengaruhi aktivitas antioksidan dalam ekstrak. Pengaruh lama penyimpanan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar pada suhu refrigerasi terhadap nilai total fenol disajikan dalam **Gambar 6**.



Gambar 6. Nilai IC₅₀ Selama Penyimpanan Suhu Refrigerasi

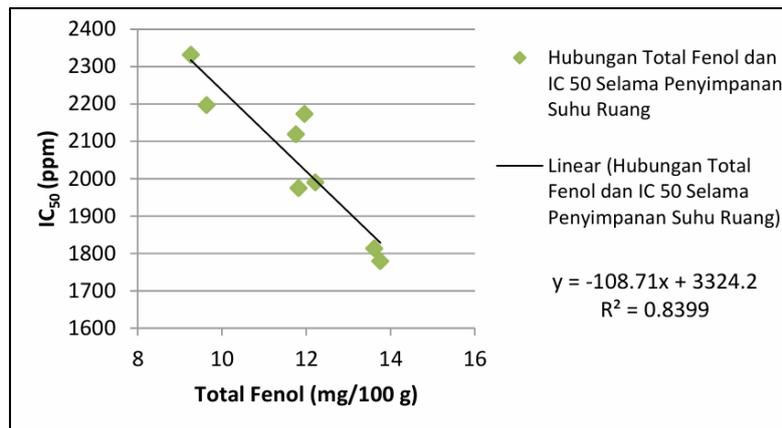
Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan pada suhu refrigerasi (Gambar 23) menunjukkan nilai koefisien determinasi sebesar 0,9813. Nilai koefisien determinasi tersebut menunjukkan adanya pengaruh yang sangat kuat dan berkorelasi positif antara lama penyimpanan dengan aktivitas antioksidan dalam ekstrak (Sudjana, 2002). Nilai IC50 (Inhibitory Concentration) menunjukkan kemampuan antoksidan mereduksi 50% konsentrasi radikal bebas DPPH. Semakin tinggi nilai IC50 maka aktivitas antioksidan semakin rendah, sebaliknya nilai IC50 yang semakin rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi (Molyneux, 2004). Laju peningkatan nilai IC50 selama penyimpanan dapat diamati berdasarkan hasil analisis nilai koefisien regresi. Hasil analisis koefisien regresi terhadap nilai IC50 selama penyimpanan dapat diamati pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Nilai Koefisien Regresi Nilai IC50 Selama Penyimpanan

Kondisi Penyimpanan	Koefisien Regresi (ppm/jam)
Suhu Ruang	19,587
Suhu Refrigerasi	15,509

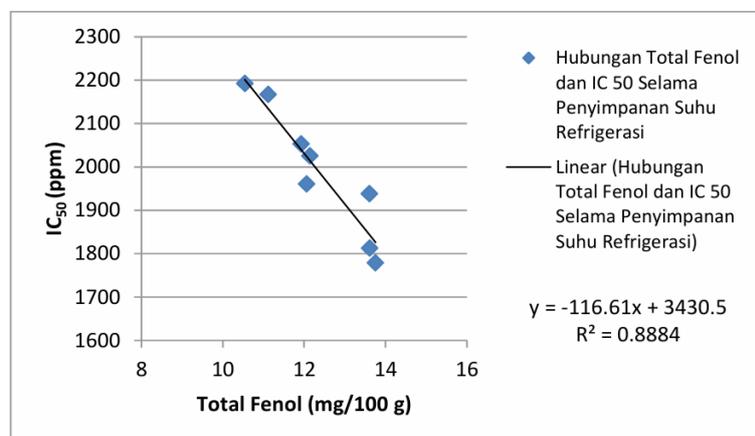
Berdasarkan hasil analisis yang disajikan pada **Tabel 4**, apabila dibandingkan antara kondisi penyimpanan suhu ruang dan suhu refrigerasi, laju peningkatan nilai IC50 pada kondisi penyimpanan suhu refrigerasi selama penyimpanan lebih rendah dengan ditunjukkannya nilai koefisien regresi sebesar 15,509 ppm/jam sedangkan pada kondisi penyimpanan suhu ruang menunjukkan nilai koefisien regresi yang lebih besar yakni 19,587 ppm/jam yang menunjukkan laju peningkatan nilai IC50 pada kondisi suhu ruang lebih tinggi dibandingkan pada kondisi suhu refrigerasi. Nilai IC50 semakin meningkat seiring lamanya penyimpanan dan nilai tersebut lebih tinggi tingkat peningkatannya dalam kondisi penyimpanan suhu ruang dibandingkan pada kondisi penyimpanan suhu refrigerasi.

Hasil tersebut sama seperti yang terjadi pada nilai total fenol yang juga mengalami penurunan selama penyimpanan dikarenakan senyawa-senyawa fenolik merupakan senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Menurut Kalt et, al (1999) aktivitas antioksidan dan nilai total fenol memiliki korelasi yang sangat kuat diantara keduanya. Hasil analisis hubungan antara nilai total fenol dan nilai IC50 selama penyimpanan suhu ruang menunjukkan hubungan yang berkorelasi positif diantara keduanya. Hubungan antara nilai total fenol dan nilai IC50 disajikan dalam **Gambar 7**.



Gambar 7. Hubungan Total Fenol dan IC50 Selama Penyimpanan Suhu Ruang

Berdasarkan hasil analisis hubungan nilai total fenol dan nilai IC50 ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan suhu ruang (Gambar 7), menunjukkan nilai koefisien determinasi pada hasil analisis tersebut sebesar 0,8399. Nilai koefisien determinasi tersebut menunjukkan adanya pengaruh yang sangat kuat dan berkorelasi positif antara nilai total fenol dengan aktivitas antioksidan dalam ekstrak selama penyimpanan pada suhu ruang (Sudjana, 2002). Sama halnya dengan kondisi penyimpanan suhu ruang, lama penyimpanan dalam kondisi suhu refrigerasi juga menunjukkan adanya hubungan yang berkorelasi positif antara nilai total fenol dan nilai IC50 yang menunjukkan aktivitas antioksidan dalam ekstrak. Hubungan tersebut disajikan dalam **Gambar 7**.



Gambar 8. Hubungan Total Fenol dan IC50 Selama Penyimpanan Suhu Refrigerasi

Berdasarkan hasil analisis hubungan nilai total fenol dan nilai IC50 ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar selama penyimpanan suhu refrigerasi (Gambar 8), menunjukkan nilai koefisien determinasi pada hasil analisis tersebut sebesar 0,8884. Nilai koefisien determinasi tersebut menunjukkan adanya pengaruh yang sangat kuat dan berkorelasi positif antara nilai total fenol dengan aktivitas antioksidan dalam ekstrak selama penyimpanan pada suhu refrigerasi (Sudjana, 2002).

Menurut Wiboonsirikul et al (2007), kadar total fenolik memiliki korelasi yang linier dengan aktivitas antioksidan. Zheng et al (2011) juga melaporkan bahwa terdapat korelasi yang positif antara kadar total fenol dengan penghambatan DPPH. Berdasarkan hasil analisis pada Gambar 7 dan Gambar 8, ditunjukkan bahwa semakin menurun nilai total fenol semakin menurun pula aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar. Oleh karena itu, nilai IC50 yang menunjukkan aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar mengalami penurunan seperti yang terjadi pada nilai total fenol.

Jumlah senyawa fenolik yang terdapat pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar berkaitan dengan kepolaran pelarut dan tingkat kelarutan senyawa aktif dalam polaritas yang berbeda-beda. Oleh karena itu sama halnya dengan senyawa fenol, aktivitas antioksidan dalam fraksi semipolar lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak kulit biji kakao tanpa fraksinasi dan fraksi polar, namun lebih tinggi dari fraksi nonpolar (Prakoso, 2016). Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan (Lampiran 3) nilai IC50 pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar tergolong ke dalam aktivitas antioksidan sangat lemah karena berada pada >600 ppm (Molyneux, 2004). Aktivitas antioksidan tersebut semakin melemah seiring dengan semakin lamanya waktu penyimpanan.

Menurut Es-Safi, et al (2007) aktivitas antioksidan yang lebih tinggi akan dihasilkan pada senyawa fenolik yang mempunyai jumlah gugus hidroksil yang lebih banyak pada inti flavonoidnya. Oleh karena itu, selain dipengaruhi oleh kepolaran pelarut, lemahnya aktivitas peredaman radikal bebas senyawa fenol diyakini dipengaruhi oleh jumlah gugus hidroksil dalam molekulnya. Menurut Fukumoto dan Mazza (2000), aktivitas antioksidan akan meningkat dengan bertambahnya gugus hidroksil dan akan menurun dengan adanya gugus glikosida. Menurut Harborne (1987), flavonoid dalam tumbuhan sering terdapat sebagai glikosida (flavonoid glikosida) dan jarang ditemukan dalam bentuk flavonoid tunggal sehingga dapat menurunkan aktivitas antioksidannya.

Faktor lain yang juga berpengaruh pada aktivitas antioksidan adalah proses. Lemahnya aktivitas antioksidan diduga karena adanya proses pemisahan melalui proses fraksinasi dan juga proses pemanasan melalui rotary evaporator yang lebih lama dibandingkan dengan ekstrak kulit biji kakao tanpa fraksinasi. Salah satu faktor fisik yang dapat mempengaruhi stabilitas antioksidan adalah pemanasan, senyawa antioksidan memiliki sifat tidak stabil dan mudah rusak akibat pemanasan, oleh karena itu pada kondisi tersebut kurang mampu mereduksi radikal bebas dengan baik (Laleh, et al, 2006). Selain itu menurut Dwiyantri dan Nurani (2014) melaporkan bahwa aktivitas antioksidan dari teh rosela semakin menurun seiring dengan semakin lamanya proses penyeduhan.

Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Biji Kakao Fraksi Semipolar Selama Penyimpanan

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan terhadap dua jenis bakteri patogen yakni *S.aureus* dan *E.coli*. Hasil pengujian aktivitas antimikroba selama penyimpanan disajikan pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba Selama Penyimpanan

Bakteri Uji	Total Koloni Awal (CFU/mL)	Lama Simpan (Jam)	Total Koloni Setelah Diberi Ekstrak (CFU/mL)		Persentase Penghambatan Bakteri (%)	
			Suhu Ruang	Suhu Refrigerasi	Suhu Ruang	Suhu Refrigerasi
<i>S.aureus</i>	1,5x10 ⁸	0	2,1x10 ⁵	2,1x10 ⁵	99,86	99,86
		8	1,7x10 ⁶	4,5x10 ⁵	98,848	99,701
		16	5,5x10 ⁶	3,8x10 ⁶	96,315	97,446
		24	7,8x10 ⁶	5,4x10 ⁶	94,781	96,42
<i>E.coli</i>		0	1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵	99,923	99,923
		8	5,3x10 ⁶	3,4x10 ⁵	96,446	99,772
		16	2,8x10 ⁷	1,5x10 ⁷	81,523	89,713
		24	4,5x10 ⁷	3,5x10 ⁷	70,003	76,799

Berdasarkan hasil pengujian (Tabel 5), ditunjukkan bahwa aktivitas antimikroba fraksi semipolar menunjukkan adanya penurunan sejak penyimpanan ekstrak selama 8 jam dan selanjutnya mengalami penurunan di jam ke-16 dan jam ke-24. Penurunan aktivitas tersebut terjadi pada penyimpanan suhu ruang dan suhu refrigerasi, akan tetapi penyimpanan pada suhu refrigerasi menunjukkan penurunan yang lebih rendah. Hasil tersebut dikarenakan senyawa-senyawa fenolik yang berperan sebagai antimikroba pada ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar lebih stabil pada penyimpanan suhu refrigerasi. Sama halnya seperti pengaruh penyimpanan terhadap total fenol dan aktivitas antioksidan kondisi tersebut diakibatkan suhu penyimpanan pada suhu ruang yang lebih tinggi.

Senyawa fenolik yang terlarut dalam fraksi semipolar antara lain alkaloid, tanin, triterpenoid, saponin, dan flavonoid (Pangaribuan, 2014). Senyawa fenol mampu berperan sebagai antimikroba dengan cara memutuskan ikatan silang peptidoglikan dalam upayanya menerobos dinding sel. Setelah menerobos dinding sel, senyawa fenol dapat menyebabkan kebocoran nutrisi sel dengan merusak ikatan hidrofobik komponen penyusun membran sel seperti protein dan fosfolipid serta larutnya komponen-komponen yang berikatan secara hidrofobik yang berakibat meningkatnya permeabilitas membran. Terjadinya kerusakan pada membran sel berakibat terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme (Davidson dan Branen, 2005).

Berdasarkan hasil pengujian (Tabel 5), menunjukkan bahwa penghambatan ekstrak lebih efektif terhadap bakteri *S.aureus* dibandingkan terhadap *E.coli*. Persentase penghambatan terhadap *S.aureus* mulai penyimpanan selama 0 jam pada kondisi penyimpanan suhu ruang maupun refrigerasi adalah sebesar 99,86% dan berakhir di penyimpanan 24 jam dengan persentase penghambatan sebesar 94,781% pada penyimpanan suhu ruang dan 96,42% pada suhu refrigerasi. Untuk pengujian terhadap *E.coli* persentase penghambatan saat penyimpanan 0 jam adalah 99,923% dan berakhir di penyimpanan 24 jam sebesar 70,003% pada suhu ruang dan 76,799% pada suhu refrigerasi.

Lebih mudah dihambatnya bakteri *S.aureus* dibandingkan bakteri *E.coli*. dikarenakan susunan dinding sel pada bakteri gram positif relatif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antimikroba untuk masuk ke dalam sel bakteri tersebut. Oleh karena itu *S.aureus* yang termasuk bakteri gram positif memiliki sensitivitas lebih tinggi dibandingkan bakteri gram negatif yaitu *E.coli*.

Menurut Fardiaz (1992), struktur dinding sel bakteri gram positif memiliki satu lapisan tebal peptidoglikan. Sedangkan bakteri gram negatif relatif lebih kompleks dengan tiga lapisan yaitu, lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah yaitu lipopolisakarida, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan yang lebih tipis. Perbedaan lapisan peptidoglikan tersebut yang mempengaruhi pengambatan terhadap bakteri uji.

Kesimpulan

1. Lama penyimpanan ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar pada suhu ruang ($27\pm 1^\circ\text{C}$) dan suhu refrigerasi ($5\pm 1^\circ\text{C}$) memiliki hubungan yang berkorelasi positif terhadap nilai total fenol dan aktivitas antioksidannya.
2. Aktivitas antimikroba ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* sebesar 99,86% hingga 94,781% selama penyimpanan pada suhu ruang dan 99,86% hingga 96,42% selama penyimpanan pada suhu refrigerasi.
3. Aktivitas antimikroba ekstrak kulit biji kakao fraksi semipolar mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 99,923% hingga 70,003% selama penyimpanan pada suhu ruang dan 99,923% hingga 76,799% selama penyimpanan pada suhu refrigerasi.

Daftar Rujukan

- Afoakwa, E.O. 2010. *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell. Chichester.
- Aguinaldo, Jeremy. 2015. *Biofilm Research*. Available at <http://mph.sgu.edu/mphblog/2015/04/27/687/> (Diakses 13 Januari 2017)
- Agwartyney. 2013. *Staphylococcus aureus*. Available at : : <http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=11181> (Diakses 18 Januari 2017)
- Akbar, C. 2015. *Macam – Macam Jenis Ekstraksi*. Available at : <http://www.anakfarmasi.com>. (Diakses 5 Januari 2017).
- Ardy. 2013. *Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Belalang Terhadap Bakteri E.coli Dan S. aureus Serta Aplikasinya Pada Bakso Daging*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Babu dan Anggira. 2003. *New Strategies of Different Evolution for Optimization of Extraction Process*. Proceedings of International Symposium. Department of Chemical Engineering, Birla Institute of Technology and Science, Pilani – India
- Badan Litbang Pertanian. 2012. *Proses Pengolahan Limbah Jambu Mete, Kakao, dan Kopi untuk Pakan Penguat Ransum Ternak*. Available online at <http://balittri.litbang.deptan.go.id> (Diakses 4 Januari 2017).
- Baker, C., R.C. Kill, dan M.D. Ranken. 1997. *Food Industries Manual*. Blackie Academic & Professional, London.
- Beckett, S.T. 2009. *The Science of Chocolate*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Belitz, H-D., W.Grosch, P. Schieberle. 2009. *Food Chemistry*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg Germany.
- Bertram, Katzung G. 2002. *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Jakarta : Salemba Medika
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. *Use of a Free Radical Method to Evaluated Antioxidant Activity*. *Lebensmittel-wissenschaft und Technologie*. Pages 28, 25-30.
- Brenner, J.G. 1999. *The Emperors of Chocolate*. Broadway Books, New York.
- Brooks G.F, J.S. Butel, S.A. Morse. 2005. *Medical Microbiology*. McGraw-Hills Companies Inc.
- Carey, F.A., dan R.J. Sundberg. 2007. *Advance Organic Chemistry Fifth Edition*. Springer, Virginia.

- Choi, J.S., N.H.Park, S.Y.Hwang, J.H.Sohn, I.Kwak, K.K.Cho, dan I.S.Choi. 2013. The Antibacterial Activity of Various Saturated and Unsaturated Fatty Acids Against Several Oral Pathogens. *Journal of Environmental Biology* vol 34 : 673-676.
- Contis, E.T., C.-T. Ho., C.J. Mussinan., T.H. Parliament., F. Shahidi., dan A.M. Spanier. 1998. *Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences*. Elsevier, Amsterdam.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* vol 12(4): 564-582.
- Dalimartha, S. dan Soedibyo, M., 1999. Awet Muda Dengan Tumbuhan Obat dan Diet Suplemen. *Trubus Agriwidya*, Jakarta. hal. 36-40.
- Daniel. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). *Mulawarman Scientific*, Samarinda.
- Darusman L. K, Sajuthi D, Sutriah K, Pamungkas D. 1995. Ekstraksi Komponen Bioaktif sebagai Bahan Obat dari Karang-karangan, Bunga Karang, dan Ganggang di Perairan P. Pari Kepulauan Seribu. [laporan penelitian]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Davidson, P. M., J. N. Sofos., A. L. Branen. 2005. *Antimicrobials in Foods*. CRC Press. New York.
- Day, R.A., dan A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Erlangga, Jakarta.
- Depkes RI. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta : Depkes RI. Hal. 7, 854.
- Dewi, D.L. 2013. *Kajian Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Biji Kakao (Theobroma cacao L.)*. Skripsi. Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Di Mattia, C., Martuscelli, M., Sacchetti, G., Scheirlinck, I., Beheydt, B., Mastrocola, D. & Pittia, P. (2013). Effect of fermentation and drying on procyanidins, antiradical activity and reducing properties of cocoa beans. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 3420-3432. doi: 10.1007/s11947-012 1028-x.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia: Kakao*. Direktorat Jendral Perkebunan, Jakarta.
- Dirjen POM Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 1083, 1084.
- Ditjen POM. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman 3-5, 10-11.
- Durairaj, S., Srinivasan, S. & Lakshmanaperumalsamy, P., 2010, In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature , *Electronic Journal Of Biologi*, 6(4): 92-91
- Dwiyanti, G dan Hati Nurani K. 2014. Aktivitas Antioksidan Teh Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) Selama Penyimpanan pada Suhu Ruang. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains IX*, Fakultas Sains dan Matematika, UKSW: 5 (1): 536-541.
- Es-Safi N.E., S. Ghidouche, P.H. Ducrot, *Molecule* 12 (2007) 2228.
- Evelin et al. 2014. Studi Aktivitas Antioksidan pada Tomat (*Lycopersicon esculentum*) Konvensional dan Organik Selama Penyimpanan. *Jurnal Teknologi Pangan*, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Pelita Harapan 5:22-28.
- Fajri, Rofiah. 2015. Stabilitas dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Antosianin Beras Hitam (*Oryza sativa*) dan Ekstrak Antosianin Ketan Hitam (*Oryza sativa glutinosa*) Selama Penyimpanan pada Berbagai Suhu dan pH. Tesis. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Fajriani, G.N. 2016. Isomer Ester. Available at: <http://nurul.kimia.upi.edu/arsipkuliah/web2012/0902172/> (Diakses pada 3 Januari 2017).
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Fessenden, R., 1982, *Kimia Organik*, Edisi 3, Jilid II, Erlangga, Jakarta.
- Fowler, M.S. 2009. *Cocoa Beans: From Tree to Factory*. Wiley-Blackwell. Chichester.
- Frazier W.C, Westhoff P.C. 1978. *Food Microbiology*. New Uork: Mc Graw Hill Book Co. Inc.
- Fukumoto, LR dan Mazza G. (2000). Assesing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal Agricultural Food* 48(8) : 3597-3604.
- Ganiswara S. G. 1995. *Farmakologi dan Terapi* ed. 4. UI-Fakultas Kedokteran. Jakarta.
- Ginting, G. 2014. Uji Efektivitas Antimikroba Propolis Apis melifera Fraksi Polar, Semipolar, dan Nonpolar Terhadap Bakteri *Bacillus cereus* dan *Salmonella* sp. [Skripsi]. *Teknologi Industri Pangan Universitas Padjadjaran, Jatinangor*.

- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edn. Oxford: Clarendon Press
- Ham, M., 2006. *Membuat Reagen Kimia di Laboratorium*. Bumi Aksara, Jakarta.
- Hamdani, S. 2010. *Metode Pemisahan dengan Maserasi*. Available online at <http://catatankimia.com/catatan/maserasi.html> (Diakses 29 Desember 2016).
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. ITB Press, Bandung.
- Hasanah, Putri A. 2015. *Asam Lemak Jenuh dan Asam Lemak Tidak Jenuh Beserta Sifat Kimia Fisika*. Available <http://putriasantihsn.blogspot.co.id/2015/03/asam-lemak-jenuh-dan-asam-lemak-tidak.html> (Diakses 19 Februari, 2017).
- Haque, M.N., R.Chowdhury, K.M.S.Islam, dan M.A.Akbar. 2009. Propionic Acid is an Alternative to Antibiotics in Poultry Diet. *Bang.Journal Animal Science* vol.38 : 115-122.
- Helmenstine, Anne. M. 2017. *Theobromine Is Chocolate's Caffeine Relative*. Available at : <https://www.thoughtco.com/theobromine-chemistry-structure-606832> (Diakses 19 Februari, 2017).
- Henrickson, C. 2005. *Chemistry. Cliffs Notes*. ISBN 0-764- 57419-1.
- Hidayat, U.Z. 2014. *Pengujian Daya Hambat Antimikroba Ekstrak Kulit Biji Kakao Fraksi Larut Etanol Terhadap Mikroorganisme Salmonella sp. dan Escherichia coli pada Berbagai Lama Maserasi [Skripsi]*. Teknologi Industri Pangan Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Houghton, P.J., dan A.Raman. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Thomson Science Publ., London.
- IMC. 2016. *Interaksi antarmolekul H₂O*. Available <http://imc.kimia.undip.ac.id/mata-kuliah/kimia-supramolekul/bab-1/> (Diakses pada 3 Januari 2017). at:
- Iorio, E.L. 2007. *The Measurement of Oxidative Stress*. International Observatory of Oxidative Stress, Free Radicals and Antioxidant Systems. Special supplement to Bulletin, New York.
- Istiantoro, Y.H, dan Gan. V.G.H., 2007. *Penisilin, Sefalosporin dan Antibiotik Betalaktam lainnya dalam Farmakologi dan Terapi*. Edisi kelima. Editor Sulistia G. Ganiswara. Jakarta. hal. 643
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*, 23th ed. Jakarta: ISBN 978-979-448-859-1.
- Kalt,W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R., 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4638–4644.
- Kartika, B., Guritno, A. D., dan Ismoyowati. 1997. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Kartikawati D. 1999. *Studi efek protektif vitamin C dan vitamin E terhadap respon imun dan enzim antioksidan pada mencit yang dipapar paraquat*. [tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
- Keloko, Lea Lehelio O. 2016. *Efektivitas Ekstrak Kulit Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Fraksi Semipolar (1:1) untuk Meningkatkan Daya Tahan Simpan Daging Ayam pada Suhu Ruang*. Skripsi, Fakultas Teknologi Industri Pertanian.
- Kementrian Pertanian. 2015. *Kakao Indonesia*. Available online at <http://ditjenbun.deptan.go.id> (Diakses 4 Januari 2017). Khamidinal. 2009. *Teknik Laboratorium Kimia*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Kurniasih, Surti. 2012. *Pemanfaatan Marka Molekuler untuk Mendukung Perakitan Kultivar Unggul Kakao (Theobroma cacao L.)* Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Kusnandar, F. 2010. *Kimia Pangan : Komponen Makro*. Penerbit Dian Rakyat, Jakarta.
- Laleh, G. H., H Frydoonfar, R, Heidary, R. Jameei, and S. Zare. 2006. The Effect of Light, Temperature, pH, and Species on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberies Species. *Pakistan Journal of Nutrition*. Vol. 5, no.1, pp.90-92,2006.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., dan Parker, J., 2000, *Brock Biology of Microorganisms*, 9th Edition, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Mariani, L. 2011. *Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Polifenol Dalam Kulit Biji Kakao dan Potensinya Sebagai Antioksidan*. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Miller, J. M. 1975. *Separation Methods in Chemical Analysis*. John Willey & Sons. New York.
- Minifie, B.W., 1988. *Chocolate, Cocoa and Confectionary: Science and Technology*. The AVI Publishing, Connecticut, USA.

- Miranti, M. 2004. Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Antiagregasi Platelet dari Daun Kedondong (*Spondias acida Blume*). Tesis. Pascasarjana IPB. Bogor.
- Misnawi dan B.S.T. Ariza. 2011. Use of Gas Chromatography-Olfactometry in Combination With Solid Phase Micro Extraction for Cocoa Liquor Aroma Analysis. *International Food Research Journal* vol 18 : 829-835.
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26 (2), 211-219.
- Pangaribuan, H. 2014. Uji Efektivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Biji Kakao Kering (*Theobroma cacao L.*) Fraksi Polar, Semipolar, dan Nonpolar terhadap Penghambatan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Teknologi Industri Pangan Universitas Padjadjaran, Jatinangor
- Parker R. 2003. *Introduction to Food Science*. United States of America: Delmar a division of Thomson Learning, Inc.
- Patras, A., N.P. Brunton, C. O'Donell, and B.K. Tiwari. 2010. Effect of Thermal Processing on Anthocyanin Stability in Foods; Mechanisms and Kinetics of Degradation. *Trends in Food Science & Technology* 21 : 3 – 11.
- Pinata, Dian dan Refdinal Nawfa. 2011. Uji Kualitatif Etanol yang Diproduksi Secara Enzimatis Menggunakan *Z. Mobilis Permeabel*. Prosiding Skripsi. Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.
- Poedjiwidodo, M. S., 1996. *Sambung Samping Kakao*. Trubus Agriwidya, Jawa Tengah.
- Pokorny, Jan, Nedyalka Yanishlieva, Michael Gordon. 2001. *Antioxidants in Food*. Boca Raton Boston New York Washington DC. Woodhead Publishing Limited
- Prakash, A., dkk. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, Vol. 19. No. 2
- Prakoso, M. R. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Tipe Forastero Fraksi Polar, Semipolar, dan Non Polar. Skripsi. Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Prawoto A.A, dan Endri M. 2014. Pedoman Budidaya Kakao pada Kebun Campur [Seminar]. World Agroforestry Centre (ICRAF) Southeast Asia Regional Program Indonesia, Bogor.
- PREVOR. 2016. The Secrets of Solvation. Available at: <http://www.prevor.com/en/the-secrets-of-solvation> (Diakses pada 3 Januari 2017).
- Rachmayati, R. 2013. Uji Efektivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Fraksi Larut Etanol 70% Terhadap Aktivitas Bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Rahayu, SS. 2009. Ekstraksi. Available at <http://www.chem-is-try.org/> (Diakses 29 Desember 2016).
- Rahmi, Maulida. 2016. Budidaya Tanaman Kakao. Available at : <http://www.kebunpedia.com/threads/budidaya-tanaman-kakao.3315/> (Diakses 13 Januari 2017)
- Reineccus, G.A.; P.G. Keeney & W. Weisberger .1972. Factors Affecting the Concentration of Pyrazines in Cocoa Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20, 203-206.
- Rindiantika, T.S. 2013. Kajian Kandungan Kimia dan Toksisitas Kulit Biji Kakao dengan Metode Brine Shrimp Letality Test (BSLT). [Skripsi]. Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Samudra, U. 2005. *Bertanam Coklat*. PT Musa Perkasa Utama. 42 hal.
- Sax, I. dan Lewis, R.J. 1998. *Condensed Chemical Dictionary*, edisi ke-11. Van Nostrad Reinhold Company, New York.
- Schiller, M. 2010. Ethanol as Solvent. Available <http://www.easychem.com.au/production-of-materials/renewable-ethanol/ethanol-as-a-solvent>. (Diakses 22 Maret 2017) at:
- Septiana, A.T., dan Ari. A. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumpun Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Jurnal AGROINTEK* Vol. 6 No.1 (22-28). Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto.
- Snyder, C. R., J. J. Kirkland, and J. L. Glajach. 1997. *Practical HPLC Method Development*, Second Edition. New York: John Wiley and Sons, Lnc. Pp. 722-723.
- Sudjana, Nana. 2002. *Metode Statistika*. Bandung : Tarsito
- Sugiat, D., Endang H., dan Abdul. M. 2010. Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenol Total Ekstrak Metanol Dedak Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa L.*). *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. VII, No. 1, April 2010, 24-33 ISSN : 1693-9883.

- Suhartatik Nanik, Merkuria Karyantina, Akhmad Mustofa, Muhammad Nur C. Sri Raharjo, Endang Sutriswati R. 2013. Stabilitas Ekstrak Antosianin Beras Ketan (*Oryza sativa* var. *glutinosa*) Hitam Selama Proses Pemanasan dan Penyimpanan. *Jurnal Agritech* Vol 33 No.4:384-390.
- Sutresna, N. 2006. *Kimia*. Penerbit Grafindo Media Pratama, Bandung.
- Sutton, S. 2011. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal Of Validation Technology*. 17: 46-49
- Thambe, V. D., dan R. S. Bhambar. 2014. Estimation of Total Phenol, Tannin, Alkaloid and Flavonoids in *Hibiscus tillaceus* Linn. Woos Extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* Volume 2, Issue 4. ISSN : 2321-6182.
- Venn, R. F. 2008. *Principles and Practice of Bioanalysis* Second Edition. CRC Press, New York.
- Wendakoon C., Calderon P., Gagnon D. 2012. Evaluation of Selected Medicine Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants* Vol 1(2).p.60-68
- Wiboonsirikul J, Kimura Y, Kadota M, Morita H, Tsuno T, Adachi S. 2007. Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. *J Agr Food Chem* 55: 8759-8765. DOI:10.1021/jf072041I.
- Widarta, I Wayan Rai dan I Wayan Arnata. 2014. Stabilitas Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bekatul Beras Merah terhadap Oksidator dan Pemanasan pada Berbagai pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. 25 No. 2: 193 199.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.
- Wira, D. W. 2014. Potensi Antimikroba dan Fitokimia Ekstrak Buah Ketapang Badak (*Ficus lyrata* Warb) terhadap Karkas Ayam. [Thesis] Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Yuono, T. 2013. Klasifikasi Tanaman Kakao. Available at <http://detiktani.com/> (diakses 29 Desember 2017)
- Zheng J, Ding C, Wang L, Li G, Shi J, Li H, Wanga H, Suo Y. 2011. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. From Qinghai-Tibet Plateau. *Food Chem* 126: 859-865 DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.052