

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Cara preparasi minuman coklat berpengaruh nyata terhadap kadar total fenol minuman coklat tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap kadar total flavonoid dan kemampuan antioksidan dalam kakao yang diukur dengan metode *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP).
2. Cara preparasi minuman kakao dengan cara menambahkan air mendidih ($\pm 98^{\circ}\text{C}$) menghasilkan minuman coklat dengan kadar total fenol tertinggi, sehingga cara preparasi ini dianggap paling baik, walaupun dengan cara preparasi lain tetap tidak mempengaruhi kemampuan antioksidan dari minuman coklat.

6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian tentang kadar (+)-epikatekin dan (-)-epikatekin mengingat dalam proses pembuatan bubuk coklat terjadi epimerisasi dan memungkinkan adanya perbedaan kemampuan antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afoakwa, E. O. 2010. *Chocolate Science and Technology*. UK: Wiley-Blackwell
- Amri, E. 2007. Pengaruh Konsumsi Minuman Bubuk Kakao Lindak Bebas Lemak terhadap Sifat Antioksidatif dan Hemolisis Eritrosit Manusia, *Thesis S-2*, Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Biro Umum dan Hubungan Masyarakat Kementerian Perindustrian. 2010. Penerapan Bea Keluar Dorong Industri Hilir Kakao Domestik. *Media Industri*, 11-13
- Bagchi, K. dan S. Puri. 1998. Free Radicals and Antioxidants in Health and Disease. *Eastern Mediterranean Health Journal* 4 (2):350-360
- Bailon, M. T. E. dan C.S. Buelga. 2003. Polyphenol Extraction from Foods (dalam *Methods in Polyphenol Analysis 1st Ed.*, C.S. Buelga and G. Williamson, Eds.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1-16
- Bansode, R.R., Z.M. Xu dan J. N. Losso. 2002. Thermal Degradation of (\pm)-catechin: Implications in Tea Brewing and Functional Foods, *Annual Meeting and Food Expo*, Anaheim, 15-19 Juni 2002. http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_12611.htm (17 September 2012)
- Benzie, I. F. F. dan J. J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76
- Chang, C., M.H. Yang, H. M. Wen dan J. C. Chern. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (3): 178-182

- Christie, W.W. 2011. *Tocopherols and Tocotrienols: Structure, Composition, Biology and Analysis*. <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/tocol/file.pdf> (21 September 2012)
- Crozier, S. J. , A. G. Preston, J. W. Hurst, M. J. Payne, J. Mann, L. Hainly dan D. L. Miller. 2011. Cacao Seeds are a “Super Fruit”: A Comparative Analysis of Various Fruit Powders and Products. *Chemistry Central Journal* 5:5-11
- Devasagayam, T.P.A., J.C. Tilak, K.K. Boloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi, dan R.D. Lele. 2004. Review: Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of The Association of Physicians of India* 52: 794-804
- Ding, E.L., S.M. Hutfless, X. Ding dan S. Girotra. 2006. Review: Chocolate and Prevention of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Nutrition and Metabolism* 3: 1-12
- Drajat, B. dan A. Wibawa. 2007. Teknologi Pra Panen Kakao. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 29 (1) : 14-16
- Ghosh, D., A. Scheepens. 2009. Review: Vascular Action of Polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research* 53: 322 – 331
- Gu, L, S.E. House, X. Wu, B. Ou dan R. L. Prior. 2006. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4057 – 4061
- Harrington, W.L. .2011. The Effects of Roasting Time and Temperature on the Antioxidant Capacity of Cocoa Beans from Dominican Republic, Ecuador, Haiti, Indonesia and Ivory Coast, *Masters Theses*, University of Tennessee, Knoxville.
- Heldman, D. R. dan P.R. Singh. 2001. *Introduction to Food Engineering*. London. Academic Press, Inc.
- Hershey’s. 2010. Recipes by Product. <http://www.hersheys.com/recipes/recipe-search.aspx?cid=7&urlBeverages.aspx&ICID=KH1427&ICID=KH1427> (2 Juni 2012)

- Huang, D, B. Ou dan R.L Prior. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*53: 1841-1856
- Jalil, A. M. M. dan A. Ismail. 2008. Review: Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health. *Molecule* 13: 2190-2219
- Kumar, S. 2011. Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research* 2(1): 129-135
- Kofink 2007. (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer, *Molecules* 12: 1274-1288
- Kohen, R. dan A. Nyska. 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 30 (6): 620-650
- Lee, K.W., Y. J. Kim, H. J. Lee, dan C. Y. Lee. 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity Than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7292-7295
- Naczk, M. dan F. Shahidi, 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food, *J. Chromatogr.* 1054:95-111
- Nijveldt, R.J., E.V. Nood, D.E.V. Hoorn, P.G. Boelens, K.V. Norren, dan P.A.V. Leeuwen. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications, *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418-425
- Pak-Dek, M.S., A. Osman, N.G. Sahib, N. Saari, M. Markom, A.A. Hamid and F. Anwar. 2011. Effects of Extraction Techniques on Phenolic Components and Antioxidant Activity of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Leaf Extracts. *J. Med. Plant. Res.*5 (20), 5050-5057
- Pereira, D.M., P. Valentao, J.A. Pereira dan P.B. Andrade. 2009. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211
- Pomeranz, Y. dan C.E. Meloan. 1971. *Food Analysis: Theory and Practice*. 3rd edition. USA: Chapman and Hall

- Prior R. L., X. Wu dan K. Schaich. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302
- Pujimulyani, D., S. Raharjo, Y. Marsono dan U. Santoso. 2010. Aktivitas Antioksidan dan Kadar Senyawa Fenolik pada Kunir Putih (*Curcuma mangga* Val.) Segar dan Setelah *Blanching*. *Agritech* 30(2): 68-74
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. 2008. Pengolahan Kakao Sekunder. Leaflet. Jember. *Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. 2011. Produk yang Diperoleh. http://www.iccri.net/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=97 (13 April 2012)
- Shumow, L. dan A. Bodor. 2011. An Industry Consensus Study on An HPLC Fluorescence Method for The Determination of (\pm)-Catechin and (\pm)-Epicatechin in Cocoa and Chocolate Products. *Chemistry Central Journal* 5:39-45
- The Nutrition Source, Harvard School of Public Health. 2012. Antioxidants: Beyond the Hype. http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/what-should-you-eat/antioxidants/#the_bottom_line_on_antioxidants (8 Maret 2012)
- Vijitha, P.K. dan K. Nizar. 2009. Role of Antioxidants in Biological System. <http://farmacists.blogspot.com/2009/05/role-of-antioxidants-in-biological.html?m=1> (25 Februari 2012)
- Wanasundara, P.K.J.P.D. dan F. Shahidi. 2005. Antioxidants: Science, Technology, and Applications (dalam *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* 6th Edition, Vol. 1. Y.H. Hui,Ed.) New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Waterhouse, A.L. 2002. Determination of Total Phenolics (dalam *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Vol 1, R.E. Wrolstad, Ed.). New York: Wiley & Sons

- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius. <http://books.google.co.id/books?id=AIC1KQ2Oaj0C&pg=PA3&dq=winarsi+hery&hl=id&sa=X&ei=90KIT42iJoiTiAK6jL2bCw&ved=0CDIQ6AEwAQ#v=onepage&q=winarsi%20hery&f=false> (10 Februari 2012)
- Wollgast, J. dan E. Anklam. 2000. Review on Polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in Composition during the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification. *Abstract, Food Research International* 33 (6):423-447
- World Chocolate Foundation. 2010. *How Chocolate is Made* <http://www.worldcocoaafoundation.org/learn-about-cocoa/tree-to-table/how-chocolate-is-made.asp> (2 Maret 2011)

Lampiran 1. Analisa Kadar Lemak Bubuk Coklat dengan Metode Soxhlet

Prinsip:

Prinsip ekstraksi lemak dan minyak dengan ekstraksi Soxhlet adalah dengan melarutkan lemak/minyak dari bahan pangan yang diekstrak dengan menggunakan pelarut organik sehingga diperoleh campuran lemak/minyak bersama dengan pelarutnya. Setelah ekstraksi selesai, labu dipisahkan dari tabung Soxhlet, dan kemudian pelarut yang digunakan dipisahkan dari lemak/minyak dengan cara diuapkan, sehingga diperoleh sejumlah lemak/minyak yang dapat ditentukan beratnya (Pomeranz dan Meloan, 1971).

1. Menimbang ± 2 gram bubuk coklat.
2. Membungkus sampel dengan kertas saring lalu memasukkan dalam tabung Soxhlet.
3. Mengalirkan air pendingin melalui kondensor.
4. Memasang tabung dan labu Soxhlet pada alat destilasi dan menambahkan 60 mL pelarut n-heksana.
5. Melakukan ekstraksi selama 4 jam pada suhu 80°C .
6. Memisahkan tabung Soxhlet dan labu Soxhlet yang berisi campuran pelarut dan minyak hasil ekstraksi.
7. Menguapkan pelarut dengan oven sampai agak pekat.
8. Mengeringkan dalam oven suhu 100°C selama 1 jam.
9. Mendinginkan dalam eksikator selama 10 menit.
10. Menimbang labu Soxhlet.
11. Mengulangi pengeringan dalam oven sampai berat labu konstan (selisih 2 kali penimbangan berturut-turut $\leq 0,2$ mg).
12. Menentukan kadar lemak dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{kadar lemak (\%)} = \frac{(\text{berat labu+residu}) - \text{berat labu kosong}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

Lampiran 2. Analisa Kadar Total Fenol dengan Metode Kolorimetri Folin-Ciocalteu (Lee *et al.*, 2003)

Prinsip:

Prinsip analisa kadar total fenol dengan metode kolorimetri Folin-Ciocalteu (FC) berdasarkan reaksi reduksi reagen yang merupakan campuran dari tungsten dan molibdenum oksida oleh senyawa fenolik. Hasilnya berupa metal oksida yang memiliki warna biru dan memiliki absorbansi maksimum pada 765 nm. Intensitas absorpsi gelombang adalah berbanding lurus dengan konsentrasi fenol (Waterhouse, 2002).

2.1. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat

1. 0,0250 gram asam galat ditimbang secara analitis dalam kertas timbang dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL.
2. Ditambahkan etanol p.a sebanyak 0,2 mL dan ditempatkan dengan akuabides pada labu takar 100 mL (larutan asam galat 250 ppm). Kemudian dilakukan homogenisasi dengan pengocokan. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai **Larutan Induk Asam Galat**.
3. **Larutan Induk Asam Galat** dipipet sebanyak 0,4 mL secara analitis, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL yang sudah dibungkus dengan karbon, lalu ditambahkan 0,4 mL Folin-ciocalteu dikocok dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 4 mL 7% Na_2CO_3 , dikocok dan ditambahkan akuabides hingga 10 mL lalu diinkubasi selama 90 menit pada suhu 23°C.
4. Pengukuran panjang gelombang maksimum dari larutan yang diperoleh dari poin c dilakukan dengan spektrofotometer UV-VIS *double beam* pada kisaran panjang gelombang 750-800 nm. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi paling tinggi merupakan panjang gelombang maksimum (λ_{max}).

5. Dibuat **Larutan Asam Galat Standar** dengan berbagai konsentrasi 0; 50; 100; 150; 200; 250 ppm dengan mengambil masing-masing **Larutan Induk Asam Galat** sebanyak 0; 2; 4; 6; 48; 10 mL secara analitis kemudian dimasukkan ke dalam labu takar ukuran 10 mL kemudian ditempatkan hingga 10 mL dengan akuabides
6. **Larutan Asam Galat Standar** dengan berbagai konsentrasi kemudian dipipet 0,4 mL secara analitis kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mL yang sudah dibungkus karbon, lalu ditambahkan 0,4 mL Folin-ciocalteu dikocok dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 4 mL 7% Na_2CO_3 , dikocok dan ditambahkan akuabides hingga 10 mL lalu diinkubasi selama 90 menit pada suhu 23°C dalam *waterbath* (masing-masing konsentrasi larutan asam galat standar dibuat saat akan dilakukan pengukuran absorbansinya).
7. Pengukuran absorbansi larutan asam galat standar dilakukan pada λ_{max} dengan spektrofotometer UV-VIS *double beam*.
8. Pembuatan kurva standar antara absorbansi (sebagai sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x) dengan satuan ppm. Dihitung persamaan kurva regresi linier dan dihasilkan persamaan:

$$Y = ax + b$$

2.2. Pengukuran Kadar Total Fenol dengan Metode Kolorimetri Folin-Ciocalteu (Lee *et al.*, 2003)

Pengukuran kadar total fenol dilakukan berdasarkan metode yang diterapkan oleh Lee *et al.* (2003) dengan tahapan sebagai berikut:

1. 0,4 mL sampel atau larutan standar asam galat ditambahkan pada 10 mL tabung volumetrik yang mengandung 3,6 mL akuabides.
2. Disiapkan blanko, yaitu akuabides.
3. 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu ditambahkan pada campuran dan kemudian dikocok.

4. Setelah 5 menit, 4 mL 7% Na_2CO_3 dicampurkan.
5. Larutan kemudian dilarutkan hingga 10 mL akuabides.
6. Dilakukan inkubasi selama 90 menit pada suhu 23°C .
7. Dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer pada λ_{max} .
8. Pembuatan kurva standar antara absorbansi sebagai (sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x). Persamaan regresi secara linier adalah sebagai berikut:

$$y = ax + b$$
9. Kadar total fenol didefinisikan sebagai *milligrams per serving of gallic acid equivalents* (GAE).

Lampiran 3. Analisa Kadar Total Flavonoid berdasarkan Aluminium Klorida Kolorimetri (Zhishen *et al.*, 1999 dalam Lee *et al.*,2003)

Prinsip:

Prinsip analisa kadar total flavonoid berdasarkan aluminium klorida kolorimetri adalah aluminium klorida akan membentuk asam kompleks yang stabil dengan kelompok keto C-4 , C-3 atau dengan kelompok hidroksil C-5 dari flavon dan flavonol. Aluminium klorida akan membentuk asam kompleks yang labil dengan kelompok orto-dihidroksil dalam cincin A- atau B- pada flavonoid (Mabry *et al.*, 1970 dalam Chang *et al.*, 2002).

3.1. Pembuatan Kurva Standar (+)-katekin

1. 0,0250 gram (+)-katekin ditimbang secara analitis dalam kertas timbang dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL.
2. Ditempatkan dengan akuabides pada labu takar 100 mL (larutan (+)-katekin 250 ppm). Kemudian dilakukan homogenisasi dengan pengocokan. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai **Larutan Induk (+)-katekin**.
3. **Larutan Induk (+)-katekin** dipipet sebanyak 1 mL secara analitis, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL yang telah berisi 4 mL akuabides lalu ditambahkan 0,3 mL 5% NaNO_2 (b/v), dikocok dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10%(b/v), dikocok dan 1 menit kemudian ditambahkan 2 mL NaOH 1 M. Kemudian ditempatkan dengan akuabides hingga 10 mL lalu dikocok.
4. Pengukuran panjang gelombang maksimum dari larutan yang diperoleh dari poin c dilakukan dengan spektrofotometer UV-VIS *double beam* pada kisaran panjang gelombang 490-600 nm. Panjang gelombang

yang menghasilkan absorbansi paling tinggi merupakan panjang gelombang maksimum (λ_{\max}).

5. Dibuat **Larutan (+)-katekin Standar** dengan berbagai konsentrasi 0; 50; 100; 150; 200; 250 ppm dengan mengambil masing-masing **Larutan Induk (+)-katekin** sebanyak 0; 2; 4; 6; 8; 10 mL secara analitis kemudian dimasukkan ke dalam labu takar ukuran 10 mL kemudian ditempatkan dengan akuabides hingga 10 mL
6. 1 mL larutan (+)-katekin standar dipipet secara analitis, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL yang telah berisi 4 mL akuabides lalu ditambahkan 0,3 mL 5% NaNO_2 (b/v), dikocok dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10% (b/v), dikocok dan 1 menit kemudian ditambahkan 2 mL NaOH 1 M. Kemudian ditempatkan dengan akuabides hingga 10 mL lalu dikocok.
7. Pengukuran absorbansi larutan (+)-katekin standar dilakukan pada λ_{\max} dengan spektrofotometer UV-VIS *double beam*.
8. Pembuatan kurva standar antara absorbansi (sebagai sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x) dengan satuan ppm. Dihitung persamaan kurva regresi linier dan dihasilkan persamaan:

$$Y = ax + b$$

3.2. Pembuatan Kurva Standar (-)-epikatekin

1. Melarutkan 0,0010 g (-)-epikatekin dalam 2 mL akuabides.
2. Mengambil 1 mL larutan standar (-)-epikatekin dan ditempatkan dengan akuabides pada labu takar 10 mL (larutan (-)-epikatekin 50 ppm). Kemudian dilakukan homogenisasi dengan pengocokan. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai **Larutan Induk (-)-epikatekin**.
3. **Larutan Induk (-)-epikatekin** dipipet sebanyak 1 mL secara analitis, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL yang telah berisi 4

mL akuabides lalu ditambahkan 0,3 mL 5% NaNO_2 (b/v), dikocok dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10%(b/v), dikocok dan 1 menit kemudian ditambahkan 2 mL NaOH 1 M. Kemudian ditempatkan dengan akuabides hingga 10 mL lalu dikocok.

4. Pengukuran panjang gelombang maksimum dari larutan yang diperoleh dari poin c dilakukan dengan spektrofotometer UV-VIS *double beam* pada kisaran panjang gelombang 490-520 nm. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi paling tinggi merupakan panjang gelombang maksimum (λ_{max}).
5. Dibuat **Larutan (-)epikatekin Standar** dengan berbagai konsentrasi 0; 10; 20; 30; 40; 50 ppm dengan mengambil dari **Larutan Induk (-)epikatekin**.
6. 1 mL larutan (-)epikatekin standar dipipet secara analitis, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL yang telah berisi 4 mL akuabides lalu ditambahkan 0,3 mL 5% NaNO_2 (b/v), dikocok dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10%(b/v), dikocok dan 1 menit kemudian ditambahkan 2 mL NaOH 1 M. Kemudian ditempatkan dengan akuabides hingga 10 mL lalu dikocok.
7. Pengukuran absorbansi larutan (-)epikatekin standar dilakukan pada λ_{max} dengan spektrofotometer UV-VIS *double beam*.
8. Pembuatan kurva standar antara absorbansi (sebagai sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x) dengan satuan ppm. Dihitung persamaan kurva regresi linier dan dihasilkan persamaan:

$$Y = ax + b$$

3.3. Pengukuran Kadar Total Flavonoid berdasarkan Aluminium Klorida Kolorimetri (Zhishen *et al.*, 1999 dalam Lee *et al.*,2003)

Menurut Zhishen *et al.*(1999) dalam Lee *et al.* (2003), pengukuran konsentrasi total flavonoid dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. 1 mL sampel atau larutan standar dimasukkan ke dalam tabung volumetrik 10 mL yang di dalamnya terdapat 4 mL akuabides.
2. Pada menit 0, ditambahkan 0,3 mL 5% NaNO_2 .
3. Pada menit kelima, ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 .
4. Pada menit keenam, ditambahkan 2 mL NaOH 1M.
5. Tiap tabung ditambah akuabides hingga 10 mL dan dikocok.
6. Absorbansi pembentukan warna merah muda diukur pada λ 510 nm relatif dengan blanko yang telah dipersiapkan.
7. Pembuatan kurva standar antara absorbansi sebagai (sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x). Persamaan regresi secara linier adalah sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

8. Kadar total flavonoid sampel didefinisikan sebagai *milligrams per serving of catechin equivalents* (CE) atau *milligrams per serving of epicatechin equivalents* (ECE) .

Lampiran 4. Analisa Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometri Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) menurut Benzie dan Strain (1996)

Prinsip:

Uji FRAP menentukan total kapasitas antioksidan dengan memanfaatkan antioksidan dalam kolorimetri berbasis reaksi redoks. Prinsip uji ini adalah reduksi dari senyawa kompleks *Ferric Tripyridyl Triazine* (Fe III TPTZ) menjadi bentuk ferro yang berwarna biru. Warna ini dapat diukur pada spektrum absorpsi 593 nm.

4.1. Pembuatan Kurva Standar $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

1. 0,0278 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ditimbang secara analitis dalam kertas timbang dan dimasukkan dalam *beaker glass* 100 mL.
2. Ditempatkan dengan akuabides pada labu takar 100 mL (larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM). Kemudian dilakukan homogenisasi dengan pengocokan. Larutan ini selanjutnya disebut sebagai **Larutan Induk $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$** .
3. Dibuat **Larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ Standar** dengan berbagai konsentrasi 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mM dengan mengambil masing-masing **Larutan Induk $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$** sebanyak 1; 2; 4; 6; 8; 10 mL secara analitis kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditempatkan dengan akuabides hingga 10 mL
4. Pengambilan sampel/blanko sebanyak 100 μL kemudian dicampurkan dengan 3 ml reagen FRAP
5. Inkubasi sampel pada 37°C dalam *waterbath*
6. Pengukuran absorbansi setelah 4 menit.
7. Pembuatan kurva standar antara absorbansi (sebagai sumbu y) dan konsentrasi (sebagai sumbu x) dengan satuan mM. Dihitung persamaan kurva regresi linier dan dihasilkan persamaan:

$$Y = ax + b$$

4.2. Pembuatan Larutan α -tokoferol dan Pengukuran Aktivitas Antioksidannya

1. Menimbang 0,0125 g α -tokoferol secara analitis lalu menambahkan 2,5 mL methanol p.a dan ditempatkan hingga 25 mL dengan akuabides pada labu takar ukuran 25 mL (diperoleh kadar larutan standar α -tokoferol 500 ppm)
2. Membuat larutan standar vitamin E dengan konsentrasi 200 ppm dengan cara mengambil 4 mL larutan standar α -tokoferol 500 ppm dan menempatkannya dalam labu takar 10 mL dengan akuabides.
3. Pengambilan larutan standar α -tokoferol 200 ppm sebanyak 100 μ L kemudian dicampurkan dengan 3 ml reagen FRAP
4. Inkubasi sampel pada 37°C dalam *waterbath*
5. Pengukuran absorbansi setelah 4 menit.
6. Aktivitas antioksidan didefinisikan sebagai nilai FRAP (mM Fe(II)/L)

4.3. Analisa Aktivitas Antioksidan dengan Spektrofotometri Metode FRAP

Menurut Benzie dan Strain (1996), analisa aktivitas antioksidan dengan spektrofotometri metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan reagen FRAP dengan cara mencampurkan buffer asetat 300 mM (pH 3,6), TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-*s*- triazine) 10 mM dalam 40mM HCl dan FeCl₃. 6H₂O 20 mM dengan perbandingan 10:1:1
2. Pengambilan sampel/blanko sebanyak 100 μ L kemudian dicampurkan dengan 3 ml reagen FRAP
3. Inkubasi sampel pada 37°C dalam *waterbath*
4. Pengukuran absorbansi setelah 4 menit.
5. Aktivitas antioksidan sampel didefinisikan sebagai nilai FRAP (mM Fe(II)/L)

Lampiran 5. Data Kadar Lemak Bubuk Coklat

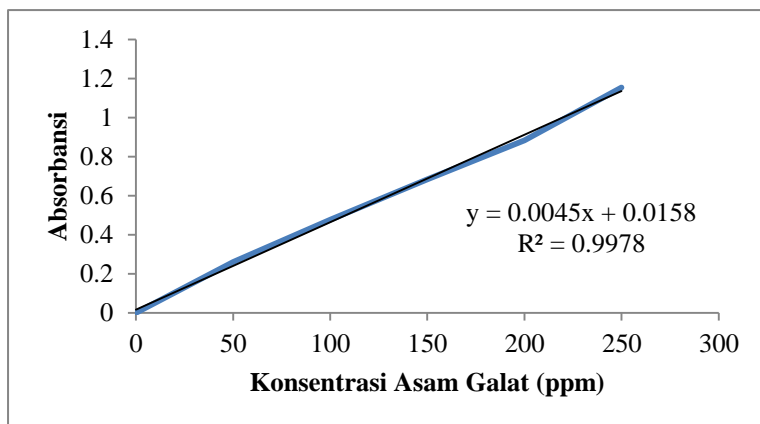
Sampel	Berat Labu Konstan (g)	Berat Sampel (g)	Berat Labu + Sampel (g)	Berat Sampel Akhir (g)	Kadar Lemak Sampel (%)	Rata-rata Kadar Lemak Sampel (%)
BC 1	35,8542	2,0022	36,4085	0,5543	27,68	26,67
BC 2	30,9297	2,0026	31,4944	0,5647	28,20	
BC 3	38,1181	2,0001	38,6006	0,4825	24,12	

Contoh perhitungan kadar lemak sampel BC 1:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(36,4085 - 35,8542)}{2,0022} \times 100\% = 27,68\%$$

$$\text{Rata-rata kadar lemak} = \frac{27,68 + 28,20 + 24,12}{3} = 26,67\%$$

Lampiran 6. Data Kadar Total Fenol dan Total Flavonoid Minuman Coklat



Gambar 6.1 Kurva Standar Asam Galat

6.1. Kadar Total Fenol Minuman Coklat

Ulangan	Kadar Total Fenol (mg GAE/g bubuk coklat)				
	Bubuk Coklat	P1	P2	P3	P4
1	430.0	430.0	702.2	557.8	513.3
2	413.3	374.4	730.0	652.2	552.2
Rata-rata	421.7	402.2	716.1	605.0	532.8
SD	11.8	39.3	19.6	66.8	27.5

ANAVA Kadar Total Fenol Minuman Coklat

SV	db	JK	KT	Fhitung	F tabel
Cara preparasi	3	103931.327	34643.775	19.395	6.591
Galat kelompok	4	7145.062	1786.265		
Total	7	111076.389			

Kesimpulan:

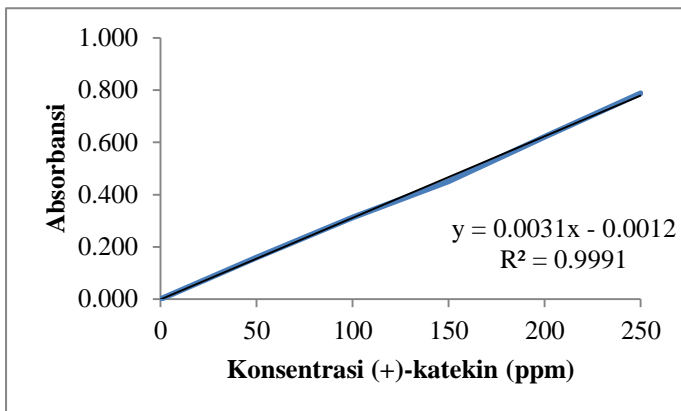
Pengaruh Cara Preparasi Minuman Coklat

F hitung > F tabel ($\alpha = 5\%$) \rightarrow ada pengaruh perbedaan cara preparasi minuman coklat terhadap kadar total fenol minuman coklat.

Uji DMRT

Perlakuan	N	Perbedaan pada $\alpha = 0.05$			Notasi
		1	2	3	
P1	2	67037.037			a
P4	2		88796.297		b
P3	2		100833.334	100833.334	bc
P2	2			119351.852	c
Sig.		1.000	0.163	0.058	

6.2. Kadar Total Flavonoid (dihitung sebagai (+)-katekin)



Gambar 6.2 Kurva Standar (+)-katekin

Ulangan	Kadar Total Flavonoid (mg CE/g bubuk coklat)				
	Bubuk Coklat	P1	P2	P3	P4
1	294.8	156.1	259.4	259.4	200.0
2	211.0	220.6	272.3	291.1	194.8
Rata-rata	252.9	188.4	265.8	288.4	256.1
SD	59.3	45.6	9.1	22.5	3.6

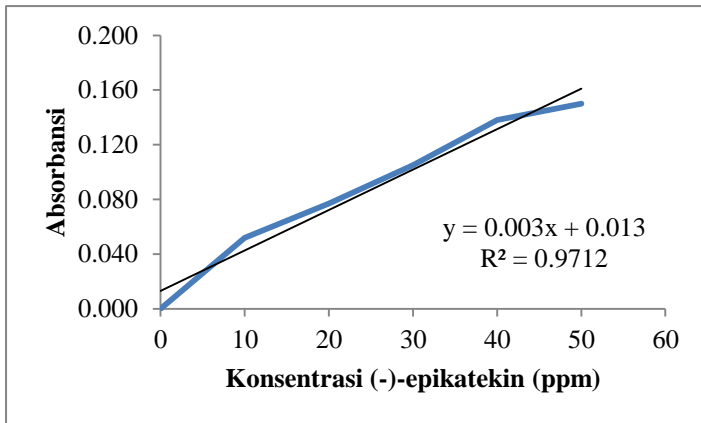
ANAVA Kadar Total Flavonoid ((+)-*Catechin Equivalent*) Minuman Coklat

<i>SV</i>	<i>JK</i>	<i>db</i>	<i>KT</i>	<i>F hitung</i>	<i>F tabel</i>
Cara preparasi	12219.069	3	4073.023	6.0747	6.591
Galat kelompok	2681.958	4	670.490		
Total	14901.028	7			

Kesimpulan:

$F_{hitung} < F_{tabel}$ ($\alpha = 5\%$) \rightarrow tidak ada pengaruh perbedaan cara preparasi minuman coklat terhadap kadar total flavonoid ((+)-*Catechin Equivalent*) minuman coklat.

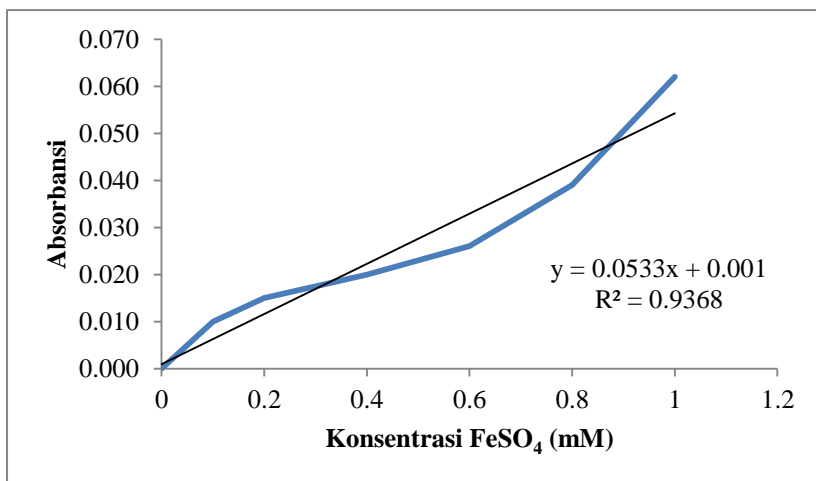
6.3. Kadar Total Flavonoid (dihitung sebagai (-)-epikatekin)



Gambar 6.3 Kurva Standar (-)-epikatekin

Ulangan	Kadar Total Flavonoid (mg ECE/g bubuk coklat)				
	Bubuk Coklat	P1	P2	P3	P4
1	240,0	360,0	433.3	473.3	383.3

Lampiran 7. Data Aktivitas Antioksidan (Metode FRAP)



Gambar 7.1 Kurva Standar FeSO₄

Ulangan	Nilai FRAP (mM Fe(II)/L)				
	Bubuk Coklat	P1	P2	P3	P4
1	194.2	176.0	210.1	175.8	194.9
2	90.2	96.4	126.8	123.5	83.7
Rata2	142.2	136.2	168.5	149.7	139.3
SD	73.5	56.3	58.9	37.0	78.6

ANAVA Aktivitas Antioksidan Minuman Coklat diukur dengan metode FRAP

<i>SV</i>	<i>JK</i>	<i>db</i>	<i>KT</i>	<i>F hitung</i>	<i>F tabel</i>
Cara preparasi	1270.43	3	423.477	0.119	6.591
Galat kelompok	14187.89	4	3546.972		
Total	15458.32	7			

Kesimpulan:

$F_{hitung} < F_{tabel} (\alpha = 5\%) \rightarrow$ tidak ada pengaruh perbedaan cara preparasi minuman coklat terhadap aktivitas antioksidan dalam mereduksi senyawa Fe III TPTZ menjadi bentuk Ferro