

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi, Karakteristik dan Taksonomi Buah Kelapa (*Cocos nucifera*)

Kelapa (*Cocos nucifera*) merupakan tanaman monokotil yang memiliki tinggi sekitar 25 m dengan kanopi yang padat. Akar kelapa merupakan akar serabut dan memiliki sistem fasikulata, tipe batang tak bercabang. Daun terletak ujung atau puncak melindungi tunas apikal tunggal dengan bentuk tulang daun menyirip. Buah kelapa merupakan buah berbiji yang memiliki diameter 10 - 20 dan warna hijau hingga kecoklatan tergantung usia dan jenis pohon (Lima dkk., 2015). Taksonomi buah kelapa adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Plantae
Subkerajaan	: Tracheobionta
Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Sub kelas	: Arecidae
Bangsa	: Arceles
Suku	: Arecaceae
Marga	: <i>Cocos</i>
Jenis	: <i>Cocos nucifera</i> L

(Nampoothiri dkk, 2018)

Buah kelapa memiliki lapisan eksokarp, mesokarp dan endokarp. Eksokarp merupakan bagian luar buah dan mesokarp merupakan bagian tengah yang tebal dan mengandung serat (kulit ari). Endokarp merupakan bagian inti buah (endosperma) yang memiliki lapisan luar yang disebut testa. Testa berwarna kecoklatan yang dipengaruhi oleh usia buah. Pada kelapa yang sudah matang, endosperma yang tebal akan menempel di bagian dalam testa. Endosperma atau daging buah ini adalah bagian kelapa yang memiliki kandungan minyak/lemak (Victor, 2013; Lima dkk., 2015). Komposisi kimia daging buah kelapa dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia daging buah kelapa dalam 100 g bahan

Komposisi Kimia	Jumlah
Kalori	68 – 359 kal
Protein	1 – 3,4 g
Lemak	0,9 – 34,7 g
Karbohidrat	10-14 g
Air	83,3 g
Kalsium	17-21 mg
Fosfor	30-98 mg
Thiamin	0,05-0,1 mg
Besi	1-2 mg

Vitamin A	0-10 SI
Vitamin C	2-4 mg
Air	46,9-83,3

(Sumber : Depkes, 1981)

B. Deskripsi, Komposisi dan Standar Mutu *Virgin Coconut Oil*

Minyak kelapa murni atau *virgin coconut oil* (VCO) merupakan minyak nabati yang terbuat dari daging kelapa segar yang matang yang dibuat dengan cara mekanis atau alami tanpa menggunakan panas tinggi, tanpa mengalami pemutihan atau penghilang bau, yang tidak mengarah pada perubahan sifat minyak. VCO memiliki karakteristik yaitu tidak berwarna dan memiliki aroma khas kelapa (Ahmad dkk., 2015). VCO mengandung α - tokoferol yang terdapat pada bagian testa atau kulit daging buah kelapa yang berfungsi sebagai antioksidan (Marina dkk., 2009). Tokoferol dapat menstabilkan minyak dari proses oksidasi karena merupakan senyawa antioksidan (O'brien, 2002). Selain memiliki kandungan antioksidan, VCO memiliki banyak kegunaan bagi masyarakat luas yaitu memiliki manfaat kesehatan (Mariana dkk., 2009).

Berbagai manfaat VCO dalam bidang kesehatan menjadikan produk VCO semakin digemari dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat sehingga memiliki prospek yang bagus. Minyak kelapa murni atau VCO dapat menurunkan resiko kanker, mendukung sistem kekebalan tubuh, melembutkan

kulit, mengandung kolesterol rendah dan tidak menyebabkan kegemukan (Lim dkk. 2014 dalam Pulung dkk., 2016).

VCO dapat meningkatkan kekebalan tubuh dengan adanya asam laurat sebagai asam lemak paling dominan pada VCO. Asam laurat dapat diubah oleh tubuh menjadi komponen yang lebih sederhana yaitu monolaurin yang bersifat antibakteri, antijamur dan antivirus. Membran lipida (lapisan pembungkus sel) berbagai virus yang dapat dirusak oleh monolaurin diantaranya virus HIV, influenza, cytomegalovirus dan herpes. Selain itu monolaurin juga diketahui dapat menginaktifkan bakteri patogen seperti *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus galactiae*, *Helicobacter pylori* serta protozoa seperti *Giardia lamblia* (Enig, 1999).

Minyak kelapa memiliki kandungan asam lemak jenuh yang tinggi dengan asam lemak rantai menengah (MUFA) paling mendominasi minyak kelapa terutama asam laurat dan diikuti oleh asam lemak rantai menengah lain seperti asam miristat, palmitat, kaprat dan kaplirat. Selain itu, juga terkandung asam lemak rantai ganda sekitar 8-10 % (Ahmad dkk., 2015).

Presentase asam lemak pada VCO disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Asam Lemak dalam *Virgin Coconut Oil* (VCO)

Jenis asam lemak	Presentase (%)
Asam kaproat (C 6:0)	0 – 0,7
Asam kaprilat (C 8:0)	4,6 – 10,0
Asam kaprat (C 10:0)	5,0 – 8,0

Asam laurat (C 12:0)	45, 1
Asam miristat (C 14:0)	16,8 – 21
Asam palmitat (C 16:0)	7,5 – 10,2
Asam palmitoleat (C 16:1)	0
Asam stearat (C 18:0)	2,0 – 4,0
Asam oleat (C 18:1)	5,0 – 10,0
Asam linoleat (C 18:2)	1,0 – 2,5
Asam linolenat (C 18:3)	0 – 0,2

(Sumber : Bawalan dan Chapman, 2006)

Pembuatan VCO harus memperhatikan tingkat kematangan buah kelapa yang digunakan. Buah kelapa yang baik digunakan dalam pembuatan VCO yaitu buah kelapa yang masih segar dan tua. Minyak kelapa dari buah yang sudah tua (10-12 bulan) memiliki kadar minyak pada daging buah kelapa lebih tinggi serta memiliki rasa dan bau yang khas.

Proses pembuatan VCO dapat dilakukan secara kering yaitu dilakukan dengan mengekstraksi minyak secara langsung dari parutan kelapa kering atau secara basah dengan mengekstraksi minyak setelah dibuat santan baik secara fisik, mekanik maupun enzimatis. Kedua proses ini akan menghasilkan ampas maupun blondo dengan ampas kelapa (Subagio, 2010). Berdasarkan proses pembuatannya terdapat beberapa metode pembuatan VCO diantaranya metode ekstraksi dingin/ tanpa pemanasan, metode pendinginan, pembekuan dan

pencairan, metode sentrifugasi, metode ekstraksi enzimatis dan metode ekstraksi panas (Argawal dan Bosco, 2017).

1. Metode dingin merupakan metode ekstraksi minyak kelapa dengan memecah emulsi dari santan kelapa tanpa proses pemanasan. Santan kelapa memiliki emulsi yang stabil sehingga untuk memecah kestabilan santan kelapa maka dilakukan 3 langkah. Langkah pertama yaitu pemisahan krim dengan bantuan gaya gravitasi yang menghasilkan 2 fase yaitu lapisan krim dibagian atas dan lapisan air dibagian bawah. Langkah kedua yaitu flokuasi dan pengelompokan, saat minyak bergerak dan berkumpul sebagai kelompok sehingga terdapat 3 lapisan yaitu blondo/ gumpalan minyak, minyak dan air. Langkah terakhir yaitu tahap yang kritis karena merupakan tahap saat proses pemisahan antara minyak dari air dan blondo (Argawal,dan Bosco, 2007).
2. Metode ekstraksi panas, merupakan metode ekstraksi minyak kelapa dengan bantuan pemanasan menggunakan suhu 100-120 °C selama 60 menit sampai airnya benar-benar menguap. Pemanasan menyebabkan protein dari santan didenaturasi dan mengganggu kestabilan emulsi. Pemanasan akan melepaskan minyak dari residu yang mengganggu dan dibantu dengan melalui penyaringan. Residu yang tersisa dapat dipanaskan lebih lanjut untuk menghasilkan lebih banyak minyak.

3. Metode enzimatik dengan ekstraksi air merupakan metode ekstraksi VCO yang dapat dilakukan dengan menggunakan campuran beberapa enzim dalam proses ekstraksi air. Minyak kelapa dapat diekstraksi dengan menambahkan campuran enzim pada kernel kelapa segar. Campuran enzim yang dapat digunakan yaitu campuran enzim Cellulase, Term amyl (endoamylase), Viscozyme L, neutrase dan alcalase (protease), campuran protease, α -amilase, selulase, hemiselulase dan enzim pektinase dalam sistem air, campuran enzim hemiselulase, pektinase, selulase dan gamanase, campuran enzim selulosa, α -amilase, poligalakturonase dan protease pada 60 ° C pH 7 atau campuran α -amilase, polygalacturonase dan protease.
4. Metode sentrifugasi merupakan metode ekstraksi VCO yang dilakukan dengan menggunakan kecepatan sentrifugasi, suhu dan interval waktu. Kecepatan sentrifugasi dapat dilakukan pada kecepatan yang berbeda dari 6000 hingga 12000 rpm untuk waktu yang bervariasi dari 30 hingga 105 menit. Proses sentrifugasi akan menghasilkan peningkatan demulsifikasi santan dalam waktu yang sangat singkat dan memberikan hasil yang tinggi.
5. Metode pendinginan, pembekuan dan pencairan merupakan metode ekstraksi dengan merusak stabilitas VCO melalui adanya pendinginan, pembekuan dan pencairan. Emulsi awalnya disentrifugasi sebelum didinginkan pada suhu 10 °C, lalu dibekukan pada suhu - 4 ° C dan dicairkan untuk dalam wadah air pada suhu 40 ° C sampai krim kelapa

mencapai suhu kamar (25 °C). Langkah sentrifugasi diikuti untuk mengemas globula minyak krim yang mengkristal pada penurunan suhu. Proses sentrifugasi dilakukan dari 2000 hingga 5.000 rpm hingga 6 menit. Selama pencairan, minyak akan menyatu karena kehilangan bentuk bola dan membentuk tetesan besar dengan berbagai ukuran.

VCO memiliki standar mutu yang telah ditetapkan. Produk VCO yang baik harus memenuhi standar mutu yang telah ditetapkan. Berikut merupakan syarat mutu produk VCO menurut SNI pada Tabel 3.

Tabel 3. Standar Nasional Indonesia untuk Minyak Kelapa *Virgin* (VCO) SNI 7381 : 2008

No	Jenis uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan :		
	1.1 Bau		Khas kelapa segar, tidak tengik
	1.2 Rasa		
	1.3 Warna		Normal, khas minyak kelapa
			Tidak berwarna hingga kuning pucat
2	Air dan senyawa yang menguap		Maks. 0,2
3	Bilangan iod	% g iod/	4,1 – 11,0

100 g		
4	Asam lemak bebas (dihitung sebagai asam laurat)	% Maks 0,2
5	Bilangan peroksida	mg ek/g Maks 2,0
6	Asam lemak :	
	6.1 Asam kaproat (C6 : 0)	% ND - 7
	6.2 Asam kaprilat (C8 : 0)	% 4,6 – 10,0
	6.3 Asam kaprat (C10 : 0)	% 5,0 – 8,0
	6.4 Asam laurat (C12 : 0)	% 45,1 – 53,2
	6.5 Asam miristat (C14: 0)	% 16,8 – 21
	6.6 Asam palmitat(C16: 0)	% 7,5 – 10,2
	6.7 Asam stearat (C18)	% 2,0 – 4,0
	6.8 Asam oleat (C18 : 1)	% 5,0 – 10,0
	6.9 Asam linoleat (C18:2)	% 1,0 – 2,5
	6.10Asam linolenat (C18:3)	% ND – 0,2
7	Cemaran mikrobial	
	7.1 Angka lempeng total	mg/kg Maks 0,1
8	Cemara logam	
	8.1 Timbal (Pb)	mg/kg Maks 0,4
	8.2 Tembaga (Cu)	mg/kg Maks 5,0
	8.3 Besi (Fe)	mg/kg Maks 0,1

8.4 Cadmium (Cd)	mg/kg	Maks 0,1
9 Cemarkan arsen (As)		
CATATAN ND : <i>No detection</i> (tidak terdeteksi)		
Sumber : Badan Standarisasi Nasional (2008)		

C. Deskripsi Daun Salam, Taksonomi, Cara Produksi dan Kandungan Minyak atsiri Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.)

Tanaman salam dapat tumbuh di daerah dataran rendah pada ketinggian 100 mdpl hingga ketinggian 1.800 mdpl. Tanaman salam memiliki pohon bertajuk rimbun dengan tinggi mencapai 25 cm. Akar tanaman salam berakar tunggang, berbatang bulat dengan bagian yang permukaan licin. Daun tanaman salam berjenis tunggal, letaknya berhadapan dan bertangkai yang panjangnya 0,5-1 cm. Bentuk helaian daun lonjong hingga elips atau bundar telur sungsang dengan bentuk ujung dan pangkal daun meruncing. Tepi daun rata dengan panjang 5-15 cm dan lebar daun 3-8 cm, bertulang daun menyirip, permukaan atas licin berwarna hijau tua dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda (Ulung, 2014). Morfologi daun salam yang dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) (Utami dan Sumekar, 2017).

Kerajaan : Plantae
 Super divisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliphyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Bangsa : Myrtales
 Suku : Myrtaceae
 Marga : *Syzygium*
 Jenis : *Syzygium polyanthum*/ *Eugenia polyantha* Wight

(Steenis, 2003 dalam Naliza, 2016)

Daun salam merupakan salah satu tanaman yang mudah diperoleh dan ditemukan karena tidak terlepas dari penggunaan masyarakat. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa daun salam memiliki efek farmakologis dalam mengobati diabetes melitus, kolesterol, diare dan hipertensi (Silalahi,

2014). Daun salam juga diketahui memiliki aktivitas antioksidan, akan tetapi pemanfaatan daun salam masih sangat terbatas yaitu hanya sebagai bumbu atau bahan tambahan makanan saat memasak (Karlina, 2016). Berikut adalah komponen yang terdapat dalam minyak daun salam dapat dilihat pada Tabel 4.

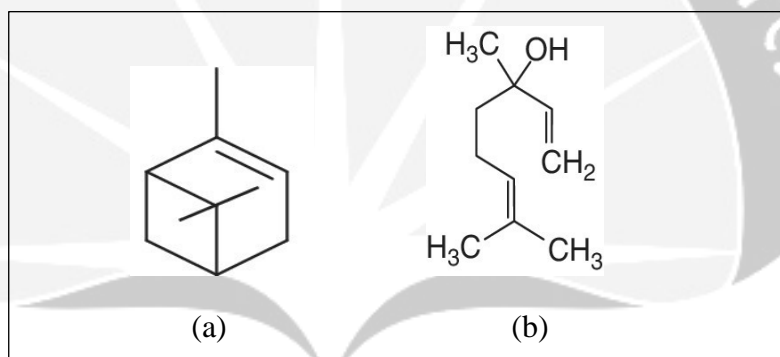
Tabel 4. Komponen kimia daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Komponen	Jumlah
Protein kasar	14 %
Lemak kasar	16,3 %
Serat kasar	24 %
Tanin	7,63 %
Saponin	95,27 ppm
Niasin	2,004 mg
Minyak atsiri	0,2 %

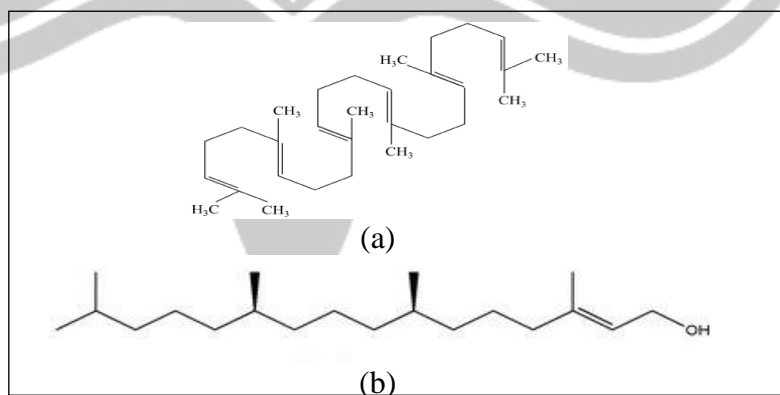
(Sumber : Ravindran, 2016)

Minyak atsiri merupakan campuran senyawa volatil yang memiliki senyawa kimia yang kompleks dan dihasilkan dari berbagai bagian tanaman. Bagian tanaman yang umumnya digunakan dalam mengekstrak minyak atsiri yaitu bagian akar, batang, ranting, daun, bunga atau buah (Julianto, 2016). Minyak atsiri daun salam terdiri dari eugenol, metil kavikol dan sitral (Raghavan, 2006). Beberapa hasil penelitian menunjukkan hasil yang berbeda pada komponen dan komposisi minyak daun salam.

Komponen terbesar penyusun minyak daun salam yaitu monoterpen hidrokarbon dan sesquiterpen hidrokarbon dengan komponen utama minyak yaitu α -pinene (30,88 %), diikuti oktanal (18,30 %), dan α -karyopilen (6,22 %) (Ahmad., 2013). Selain itu juga ditemukan farnesol (8,84%), β -ocimene (7,62%) dan nonanal (7,60%) skualena (10,9 %), β -sitosterol (5,56 %), pirogalol (5,24 %) α -tokoferol (4,93 %) nerolidol (2,26 %) (Wartini, 2009; Rahim dkk. (2018). Struktur α -pinene dan linalool dapat dilihat pada Gambar 2, sedangkan struktur kimia skualena dan fitol dapat dilihat pada Gambar 3.

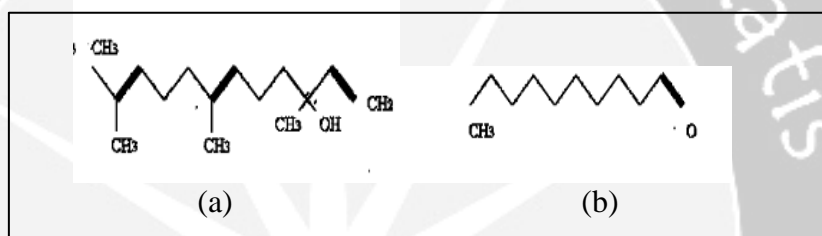


Gambar 2. Struktur kimia α -pinen (a) dan linalool (b)
(Sumber : Hashemi dkk., 2017).



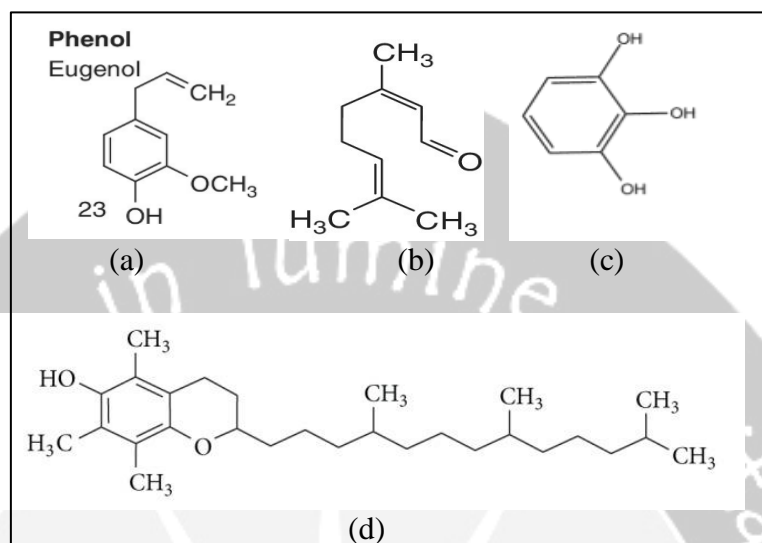
Gambar 3. Struktur kimia skualena (a) dan fitol (b)
(Mallakin dkk., 2018; Mohanty dkk., 2017).

Komponen utama yang berperan pada aroma daun salam yaitu nerolidol dan diikuti oleh komponen volatil lain seperti cis-4-dekenal, α -osimen, oktanal, α -humulen dan dekanal (Sembiring dkk., 2013; Wartini, 2009). Asam lemak yang dominan pada minyak daun salam yaitu asam stearat (0,6 %), asam heksadekanoat, 2 hidroksil-1-(hidroksimetil) (0,52 %), asam palmitat (0,5 %), metil oleat (0,34 %). Struktur kimia nerolidol dan cis-4-dekenal dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur kimia nerolidol (a) dan cis-4-dekenal (b)
(Sumber : Hamad dkk., 2017; Sembiring dkk., 2013).

Komponen monoterpen seperti pinen, farsenol, fitol, skualena, linalool, nerolidol memiliki kemampuan bertindak sebagai antioksidan (Ismail dan Ahmad., 2019; Rahim dkk., 2018). Selain itu komponen fenolik seperti eugenol, flavonoid, asam kafet, asam galat merupakan senyawa fenolik yang berkontribusi terhadap antioksidan daun salam (Rahim dkk., 2018; Hard an Ismail; 2012). Struktur komponen yang berperan sebagai antioksidan dapat dilihat pada Gambar 5.

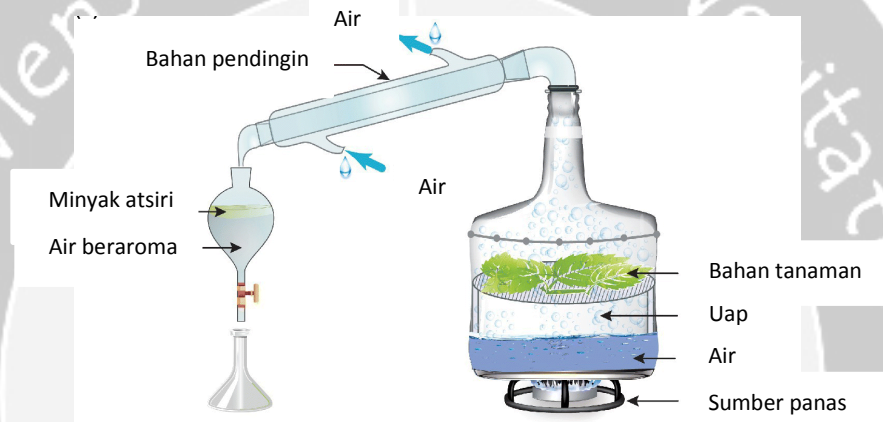


Gambar 5. Eugenol (a), sitral (b), pirogallol (c), dan (d) α -tokoferol (Sumber: Hashemi dkk., 2017; Cynthia dkk., 2018; Radhakrishnan dkk., 2013).

Minyak atsiri diperoleh dengan cara destilasi atau penyulingan untuk ekstraksi minyak. Destilasi adalah suatu metode yang didasarkan pada perbedaan titik didih untuk memisahkan zat cair dari campurannya atau berdasarkan kemampuan suatu zat untuk menguap. Destilasi dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti destilasi air dan uap air, fraksional atau destilasi vakum dengan bertekanan (Kusuma dan Mahfud, 2017).

Rendemen minyak atsiri yang didestilasi dapat dipengaruhi oleh karakteristik daun yang digunakan. Proses pengeringan daun salam sebelum diekstrak lebih efektif dibanding penggunaan daun salam segar (Hassan dkk., 2015). Perlakuan pengeringan menyebabkan komponen air dalam sel semakin berkurang dan lebih mudah ditembus uap sehingga minyak dalam lebih mudah untuk diuapkan (Sunardi dkk., 2018). Perlakuan perajangan atau

pemotongan daun untuk memaksimalkan kelenjar minyak pada daun agar dapat terbuka sebanyak mungkin sehingga memudahkan minyak untuk keluar saat proses destilasi. Selain itu, perajangan juga menyebabkan dinding-dinding sel daun lebih terbuka sehingga mudah ditembus oleh uap (Nugraheni dkk., 2016) .



Gambar 6. Proses destilasi minyak atsiri dengan metode uap-air
(Sumber: Hashemi dkk., 2017).

D. Parameter dan Faktor yang Memengaruhi Kualitas VCO

1. Kadar Air

Pengujian kadar air merupakan pengujian yang bertujuan untuk mengetahui kadar air yang terdapat dalam minyak. Keberadaan air dalam minyak dapat memengaruhi kualitas dari minyak tersebut. Semakin rendah kadar airnya maka ketahanan minyak serta kualitas minyak semakin bagus (Silalahi dkk., 2017).

Pengukuran kadar air pada minyak dapat dilakukan dengan menggunakan metode oven. Penggunaan metode oven menghasilkan hasil yang akurat dan dapat dipercaya namun membutuhkan banyak waktu dibandingkan metode lain seperti metode *hotplate* dan *moisture balancing*. Kadar air diukur dengan menimbang sebanyak 5 gram minyak dalam wadah kering yang dikeringkan dan dimasukkan dalam oven selama kurang lebih 1 jam pada suhu 101 ± 1 °C. Prosedur ini diulang hingga diperoleh berat konstan (O'Brien, 2002).

Berat konstan merupakan tanda bahwa kandungan air yang ada pada minyak telah menguap seluruhnya sehingga tinggal menyisahkan berat kering minyak itu sendiri. Keberadaan air pada minyak sangat tidak diinginkan karena dapat minyak dapat mengalami hidrolisis. Kadar air yang tinggi akan menurunkan kualitas minyak yang selama penyimpanan karena menghasilkan komponen asam lemak bebas yang menghasilkan bau tengik (Poedjiadi, 1999; Lelang dkk., 2016).

2. Asam Lemak Bebas

Asam lemak bebas atau *Free Fatty Acid* (FFA) merupakan bilangan yang menunjukkan tingkat hidrolisis dari minyak atau lemak. Perhitungan FFA sangat penting sebagai indikator kualitas selama tiap tingkatan lemak dan pemrosesan minyak. Ketengikan hidrolisis terjadi karena adanya proses pemecahan molekul trigliserida pada ikatan ester

dengan formasi dari asam lemak bebas yang mana dapat berkontribusi terhadap aroma, *flavor* dan karakteristik lainnya. *Flavor* dihasilkan dari pengaruh komposisi pembentukan asam lemak bebas. Pembentukan asam lemak rantai pendek seperti butirat menyebabkan aroma dan *flavor* yang kurang enak mengingat panjangnya rantai asam lemak (C-12 ke atas) menghasilkan lilin atau pada pH basa terasa sabun (O'Brien, 2002).

Penetapan kadar asam lemak bebas minyak kelapa dilakukan dengan metode titrasi menggunakan pereaksi basa yaitu KOH atau NaOH. Penambahan etanol (95-96 %) dalam prosedur analisis bertujuan untuk melarutkan lemak atau minyak sehingga lebih mudah bereaksi dengan basa alkali. Sampel dipanaskan bertujuan untuk mempercepat reaksi dengan membantu minyak untuk larut (Suroso, 2013).

Kelembaban akan menyebabkan pembentukan dari reaksi hidrolisis yang reaksinya dapat dipercepat dengan panas dan tekanan. Titrasi asam lemak bebas akan mengidentifikasi semua material asam pada minyak. Material yang diidentifikasi meliputi logam pengkilat, asam yang larut dari pemutihan, keasaman antoksidan, penambahan emulsifier, dan bahan asam lainnya. (O'Brien, 2002).

Enzim lipase pada minyak dapat menyebabkan terjadinya reaksi hidrolisis pada trigliserida yang kemudian asam lemak bebas dan gliserol (Gunawan dkk, 2003). Minyak buah mentah memiliki kadar FFA yang tinggi jika biji telah rusak dilapangan atau dalam penyimpanan. Biji dan

dan enzim lipase buah sangat aktif terhadap kelembaban, dan menginisiasi proses hidrolisis yang meningkatkan kandungan FFA (O'Brien, 2002).

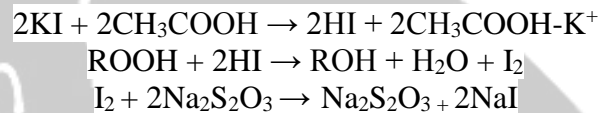
Asam lemak bebas juga terbentuk karena adanya reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi terjadi akibat adanya pemutusan ikatan rangkap menghasilkan asam bebas (Gunawan dkk., 2003). Pemantauan kandungan FFA selama proses dan setelah seluruh proses termasuk penyimpanan akan memberikan hasil kontrol proses yang mengidentifikasi potensi masalah serta tindakan korektif dapat dimulai tepat waktu (O'Brien, 2002).

3. Bilangan Peroksida

Bilangan peroksida merupakan adalah suatu nilai terpenting untuk menentukan besarnya kerusakan minyak akibat oksidasi. Pengujian bilangan peroksida digunakan untuk mengetahui seberapa besar tingkat oksidasi pada minyak tak jenuh. Nilai bilangan peroksida yang kecil mengindikasikan semakin baik kualitas dari minyak tersebut dan sebaliknya semakin besar nilai peroksida maka semakin buruk kualitas minyak tersebut (Silalahi dkk., 2017).

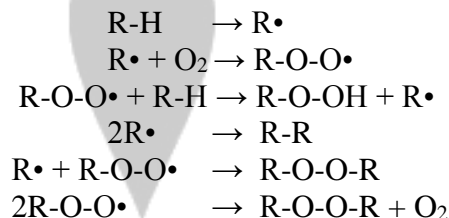
Bilangan peroksida merupakan salah satu metode analisis yang sering digunakan untuk menentukan kualitas dari minyak atau lemak. Bilangan peroksida menghitung konsentrasi dari bahan (miliekuivalen

peroksida per 1000 g sampel) yang mengandung potasium iodida menjadi iodin (O'Brien, 2002). Reaksi yang terjadi pada pengujian bilangan peroksida adalah sebagai berikut :



Gambar 7. Reaksi pengujian bilangan peroksida (Warner dan Eskin, 1994).

Oksidasi lipid umumnya disebabkan oleh kemunduran dan pembentukan hidroperoksida dari reaksi antara oksigen dan asam lemak tak jenuh yang merupakan produk utama dari reaksi ini. Hidroperoksida tidak memiliki *flavor* dan bau namun mudah rusak menjadi bentuk aldehid yang kemudian menghasilkan *flavor* yang tidak disukai bau tidak sedap. Tingginya bilangan peroksida biasanya menunjukkan penilaian *flavor* yang rendah, namun rendahnya bilangan peroksida tidak selalu mengindikasikan *flavor* yang baik (O'Brien, 2002). Reaksi pembentukan hidroperoksida pada lemak dalam saat proses oksidasi adalah sebagai berikut :



Gambar 8. Reaksi pembentukan hidroperoksida pada lemak (Hashemi dkk., 2017)

4. Bilangan Iod

Bilangan iod merupakan bilangan yang menunjukkan banyaknya gram iodium yang dapat diadisi oleh 100 gram lemak tak jenuh. Semakin banyak iodium yang diadisi menunjukkan semakin banyak ikatan rangkap pada lemak sehingga semakin besar nilai bilangan iodiumnya (Sumardjo, 2008). Bilangan iodin merupakan metode yang sederhana dan cepat untuk mengetahui kandungan kimia dari minyak atau lemak namun tidak dapat menunjukkan asam lemak spesifik yang terkandung. Analisis bilangan iodin sangatlah akurat dan menunjukkan nilai yang hampir teoritis kecuali dalam hal ikatan rangkap terkonjugasi atau ketika ikatan ganda yang mendekati grup karboksil. Kegunaan dari bilangan iod yaitu untuk kontrol proses dan spesifikasi dari suatu produk (O'Brien, 2002).

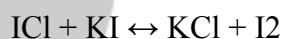
Bilangan iod dapat menunjukkan derajat ketidakjenuhan dan ketengikan dari minyak kelapa. Ketengikan menandakan terjadinya penurunan mutu dari minyak itu sendiri. Akan tetapi, bau dan rasa yang tidak enak tidak selalu menandakan penurunan mutu dari minyak. Bau yang timbul dipengaruhi juga oleh jenis asam lemak yang dibebaskan selama proses kerusakan terjadi. Minyak dengan kandungan asam lemak tidak jenuh lebih mudah mengalami oksidasi sedangkan minyak yang mengandung asam lemak jenuh lebih mudah mengalami hidrolisis (Syah, 2005).

Prosesur pengujian bilangan iod yaitu sampel minyak dilarutkan dalam pelarut dan direaksikan dengan iodin klorida atau iodin bromida sebagai predeterminan. Potasium iodida ditambahkan untuk mereduksi kelebihan idodin bromida menjadi iodin bebas. Iodin yang tidak bereaksi lalu dititrasi dengan sodium tiosulfat dengan pati digunakan sebagai indikator sebagai penanda titik akhir reaksi (Owusu-Apenten, 2000)

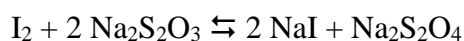
Bilangan iod yang tinggi menunjukkan banyaknya ikatan ganda C=C. Kenaikan dalam bilangan iod menunjukkan makin rentan minyak mengalami ketengikan oksidasi karena ketidakjenuhan yang tinggi. Asam klemak bereaksi dengan halogen (iodin) menghasilkan penambahan halogen pada C=C bagian ikatan rangkap. Dalam reaksi ini, iodin monoklorida atau iodin bromida beraksi dengan ikatan tidak jenuh untuk memproduksi dihalogenasi ikatan tunggal yang satu karbon telah mengikat sebuah atom iodin (Mondal dan Mondal, 2019).



Setelah reaksi selesai, banyaknya iodin yang telah bereaksi diukur dengan penambahan larutan potasium iodida pada produk reaksi :



Hal ini menyebabkan sisa ICl yang tidak bereaksi membentuk iodin molekuler. I₂ yang dibebaskan adalah yang dititrasi dengan larutan standar *sodium thiosulfat* 0,1 N.



Asam lemak jenuh tidak akan memberikan reaksi halogenasi. Pati digunakan sebagai indikator pada reaksi agar iodine/yodium yang dibebaskan akan bereaksi dengan pati untuk memberi produk berwarna ungu/biru agar titik akhir dapat diamati (Mondal dan Mondal, 2019).

5. Angka Lempeng Total

Angka lempeng total merupakan parameter umum yang digunakan untuk menunjukkan derajat kontaminasi makanan. ALT dapat diartikan sebagai jumlah *Colony Forming Unit* (CFU) bakteri pada setiap gram atau setiap milliliter makanan (Puspandari dan Isnawati, 2015). Prinsip dari angka lempeng total yaitu berdasarkan hitungan sel yang hidup dengan cara mengencerkan sampel asli di tabung pengenceran, diikuti dengan pengenceran beberapa seri yang disiapkan ke dalam cawan dengan teknik *pour plate* atau *spread plate* (Goldman dan Green, 2008).

Pengujian diawali dengan pengenceran sampel agar suspensi tidak terlalu pekat ataupun *spreader* sehingga bakteri lebih menyebar dan hasil perhitungan lebih akurat juga memudahkan memperoleh jumlah mikrobial (Harti, 2015). Sampel diencerkan menggunakan *buffered peptone water* (BPW) yang bersifat non-selektif yang terdiri dari pepton, sodium klorida, disodium hidrogen fosfat, potassium dihidrogen fosfat dan air destilasi dengan pH akhir $7,2 \pm 0,2$. Pepton berfungsi sebagai penyedia nitrogen esensial dan nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan, sodium

klorida sebagai penyedia elektrolit esensial dan mengatur keseimbangan osmotik sedangkan disodium fosfat dan monopotasium fosfat sebagai larutan penyangga untuk mempertahankan pH dalam kisaran yang ditentukan (Harrigan, 1990).

Metode *pour plate* merupakan metode yang menggunakan penuangan dan penyebaran medium pada sampel yang telah diencerkan. Koloni yang tumbuh dan yang diamati pada cawan petri dihitung sebagai jumlah koloni yang membentuk unit (CFU) dengan asumsi bahwa setiap koloni dipisahkan dan dibentuk oleh sel mikroba tunggal yang hidup (Goldman dan Green, 2008). Kelebihan dari metode ini yaitu dapat menumbuhkan bakteri yang bersifat aerob maupun anaerob (Taylor, 1992). Metode perhitungan dengan *pour plate* lebih disukai pada metode inokulasi permukaan, karena memberikan hasil yang lebih tinggi (Buchbinder dkk., 1951).

Media yang digunakan dalam pengujian ALT yaitu media PCA (*Plate Count Agar*). PCA direkomendasikan untuk penentuan kadar mikroorganisme dalam makanan, air, air limbah dan juga dari sampel klinis dengan mengandung *casein enzymic hydrolyzate*, ekstrak ragi, dekstrosa, agar dan pH akhir $7,0 \pm 0,2$. *Casein enzymic hydrolyzate* menyediakan asam amino dan zat nitrogen kompleks lainnya yang dibutuhkan bakteri. Ekstrak ragi memasok vitamin B kompleks sebagai

sumber energi. PCA juga cocok untuk menghitung jumlah bakteri ruang steril (Buchbinder dkk., 1951).

6. Angka Kapang Kamir

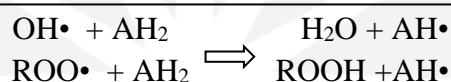
Keberadaan jamur merupakan salah satu indikator yang menunjukkan rendahnya kualitas suatu bahan pangan. Jamur dapat menyebabkan kerusakan, kebusukan atau penyakit yang timbul karena adanya mikotoksin dari jamur (Carrillo-Inungaray dkk., 2014). Media alami yang sering digunakan untuk menumbuhkan jamur yang adalah media agar dekstrosa kentang (*potato dextrose agar/ PDA*). Media ini digunakan untuk mengisolasi jaringan jamur atau spora, membuat biakan murni jamur, dan membuat perbanyakan biakan murni untuk jamur. Media PDA mengandung ekstrak kentang sebagai sumber karbohidrat, *dextrose* sebagai penambah nutrisi dan agar sebagai bahan pematat dan media tumbuh yang baik karena mengandung air yang cukup (Sinaga, 2005).

E. Antioksidan, DPPH dan Mekanisme Penghambatan Radikal Bebas

Antioksidan merupakan senyawa dapat yang menghambat proses oksidasi. Senyawa antioksidan menghambat dan memperlambat reaksi oksidasi dengan melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas agar radikal bebas lebih stabil (Haila, 1999). Sumber antioksidan alami yang efektif dan aman untuk digunakan dapat diperoleh dari bahan yang

mengandung polifenol, vitamin C, beta karoten dan lain-lain. Polifenol dapat menangkap dan mengikat radikal bebas dari ion-ion logam yang rusak. Keberadaan senyawa fenol seperti flavonoid dan asam fenolat diketahui dapat bekerja sebagai antioksidan (Ayucitra dkk., 2011).

Senyawa fenol dapat bekerja sebagai antioksidan disebabkan adanya struktur gugus hidroksil terikat dengan posisi dan jumlah gugus hidroksil akan mempengaruhi aktivitas antioksidan (Dewi dkk., 2014). Senyawa fenolik dalam minyak atsiri akan bekerja sebagai penangkap radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$) serta radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$). Mekanisme reaksi radikal peroksil ($\text{ROO}\cdot$) dan hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dengan antioksidan pada minyak atsiri yaitu sebagai berikut:



$\text{OH}\cdot$ yang terperangkap antioksidan diregenerasi menjadi H_2O dan $\text{ROO}\cdot$ yang tertangkap AH diregenerasi menjadi ROOH. Selama tahap propagasi, antioksidan dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari minyak dengan cara mendonasikan hidrogen agar mencegah radikal lemak tidak aktif melakukan tahap propagasi yang menyebabkan kerusakan pada lemak. Kemampuan antioksidan untuk mendonasikan hidrogen mempengaruhi aktivitasnya (Utami, 2011).

Antioksidan alami juga dapat dipengaruhi oleh adanya senyawa terpenoid. Terpen merupakan salah satu antioksidan primer yang dapat

menyumbang ion H^+ sehingga dapat menstabilkan radikal bebas (Hanjaya dkk., 2018). Flavonoid, minyak atsiri dan terpenoid dalam daun salam selain berfungsi sebagai antioksidan juga berperan sebagai antimikrobia dengan menunjukkan aktivitas penghambat terhadap beberapa bakteri patogen seperti *E. coli* dan *S. aureus* (Hasanah, 2015).

Metode *folin ciocalteau* adalah metode yang didasarkan oleh kemampuan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan reagen *folin ciocalteau*. Inti aromatis yang terdapat pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi *fosfomolibdat fosfotungstat* (asam heteropoli) menjadi *molybdenum-tungsten* yang berwarna biru (Febrinda dkk, 2013). Suasana basa akan menyebabkan fenolik bereaksi dengan reagen *folin ciocalteau* sehingga terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Pengukuran absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 - 765 nm (Alfian dan Susanti, 2012).

Pengujian DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) merupakan salah satu metode kolorimetri yang cepat dan efektif untuk memperkirakan aktivitas antioksidan /antiradikal. Radikal DPPH stabil pada suhu ruang, mengandung nitrogen organik, berwarna ungu gelap, larut dalam pelarut metanol, etanol atau derivat alkohol lainnya dan memiliki absorbansi yang kuat pada λ maks 517 nm (Reynertson 2007, Molyneux, 2004). Warnanya ungu tua pada larutan DPPH disebabkan oleh elektron yang tidak

Gambar 10. Reaksi asam askorbat dan DPPH (Hashemi., 2017)

F. Hipotesis

1. Penambahan minyak daun salam (*Syzygium polyanthum*) dapat mempengaruhi sifat kimia, mikrobiologi dan organoleptik VCO.
2. Terdapat konsentrasi penambahan minyak daun salam paling baik dalam menjaga kualitas VCO.

