

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
KEPING BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP
BAKTERI *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI



Oleh :
NAILIYATUL HIKMIYAH
NIM 19040087

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
KEPING BIJI KAKAO (*Theobroma cacao L.*) TERHADAP
BAKTERI *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh :
NAILIYATUL HIKMIYAH
NIM 19040087

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2023**

LEMBAR PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti
Seminar Hasil pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan
Universitas dr.Soebandi

Jember, 07 Agustus 2023

Pembimbing Utama,



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm.
NIDN. 0703068903

Pembimbing Anggota,



apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm.
NIDN. 0703028901

HALAMAN PENGESAHAN

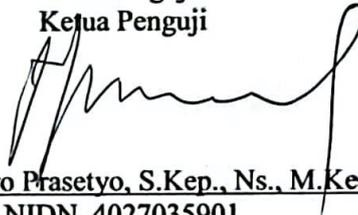
Skripsi yang berjudul *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Keping Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus* telah diuji dan disahkan oleh dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

Hari : Senin

Tanggal : 14 Agustus 2023

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua Penguji



Drs. Hendro Prasetyo, S.Kep., Ns., M.Kes.
NIDN. 4027035901

Penguji II



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm.
NIDN. 0703068903

Penguji III



apt. Dina Triangguluh Fauziah, M.Farm.
NIDN. 0703028901

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas dr. Soebandi



apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm.
NIDN. 0703068903

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Nailiyatul Hikmiyah

NIM : 19040087

Program Studi : Sarjana Farmasi

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau hasil tulisan orang lain.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain atau ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Jember, 07 Agustus 2023

Yang menyatakan,


(Nailiyatul Hikmiyah)

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL KEPING BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*

Oleh:

Nailiyatul Hikmiyah

NIM. 19040087

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm.

Dosem Pembimbing Anggota : apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm.

PERSEMBAHAN

Skripsi ini dengan sepenuh hati saya persembahkan kepada:

1. Allah SWT yang selalu memberikan kemudahan dan kelancaran dalam penyusunan skripsi ini.
2. Kedua orang tua saya yaitu bapak Khomisum dan ibu Muti'ah yang sangat berjasa dalam hidup saya, memberikan Suport, do'a dan kasih sayang serta keluarga besar terimakasih yang telah selalu memberikan doa dan dukungan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Ibu apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm selaku dosen pembimbing utama, Ibu apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm selaku dosen pembimbing anggota, dan Drs. Hendro Prasetyo, S.Kep., Ns., M.Kes. selaku dosen penguji saya yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam memberikan bimbingan dan arahan dalam proses penyusunan skripsi ini
4. Kepada segenap Ibu dan Bapak Dosen Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan banyak ilmu dan pengalaman selama perkuliahan
5. Almamater Universitas dr.soebandi
6. Support system Rif'ah Mualifah, Roudhotul Jannah, Malifah Ghilfani Saif, Teman-teman tim antibakteri, dan teman-teman kontrakan Khofidotur Rohmah, Khafifah Al Addawiah, Kunis Lili Windari, O'on Sekar Arum, Dyah fitri W.F, Faiqotul Himmah, Rahayu Harta Rinda

7. Kepada pihak yang tidak saya sebutkan satu persatu, terimakasih atas semua dukungan dan doanya baik secara langsung maupun tidak langsung
8. Terima Kasih untuk diri saya sendiri yang telah berjuang, dan berusaha pantang menyerah untuk menyelesaikan semua tahap perkuliahan hingga selesai.

MOTTO

“Hiduplah seakan kamu akan mati besok. Belajarlah seakan kamu akan hidup selamanya.” - Mahatma Gandhi

“Angin tidak berhembus untuk menggoyangkan pohonan, melainkan menguji kekuatan akarnya,” – Ali bin Abi Thalib

“The Whole purpose of education is to turn mirrors into windows.” – Sydney J. Harris

“The best way to get started is to quit talking and begin doing.” – Walt Disney

ABSTRAK

Hikmiyah, Nailiyatul* Setyaningrum, Lindawati** Trianggaluh Fauziah, Dina***. 2023. **Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Keping Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus***. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang: Biji Kakao mengandung senyawa polifenol cukup besar. Senyawa polifenol dari keping biji kakao mengandung senyawa komponen bioaktif yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia, seperti Sumber antioksidan, antikanker, antidiabetes, antihipertensi, antiinflamasi, dan antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol Keping biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan Soxhletasi

Metode: Desain penelitian ini menggunakan Deskriptif experimental dengan metode ekstraksi soxhletasi dan UAE menggunakan pelarut metanol. Ekstrak ditentukan kandungan golongan senyawanya dengan skrining fitokimia dengan pengujian alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin dan saponin. Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kakao dilakukan dengan metode sumuran

Hasil penelitian: Hasil penelitian ekstrak metanol biji kakao dengan metode soxhletasi dan UAE mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin dan saponin. Hasil uji antibakteri menggunakan metode UAE dengan konsentrasi 75% memiliki daya hambat yang lebih besar dengan rata-rata zona hambat 12,29 mm dibandingkan dengan metode soxhletasi konsentrasi 75% menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 10,097mm

Kesimpulan: Ekstrak metanol biji kakao yang diekstraksi dengan metode UAE dan Soxhletasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Kata Kunci: Biji kakao, soxhletasi, UAE, antibakteri, *Staphylococcus aureus*

*Peneliti

** Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Hikmiyah, Nailiyatul* Setyaningrum, Lindawati** Trianggaluh Fauziah, Dina***. 2023. **Antibacterial Activity Test of Methanol Extract of Cocoa Bean Chips (*Theobroma cacao* L.) Against *Staphylococcus aureus* bacteria.** Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

Introduction: Cocoa beans contain considerable polyphenolic compounds. Polyphenolic compounds from cocoa bean chips contain bioactive component compounds that have many benefits for human health, such as sources of antioxidants, anticancer, antidiabetic, antihypertensive, anti-inflammatory, and antibacterial. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of methanol extract of cocoa bean chips (*Theobroma cacao* L) extracted by UAE (Ultrasonic Assisted Extraction) and Soxhletasi methods

Method: This research design uses Descriptive experimental with oxhletation extraction method and UAE using methanol solvent. Extracts were determined by phytochemical screening by testing alkaloids, flavonoids, polyphenols, tannins and saponins. The antibacterial activity test of cocoa bean extract was carried out by the well method.

Research results: The results of the study of cocoa bean methanol extract by the soxhletasi method and UAE contain alkaloid compounds, flavonoids, polyphenols, tannins, and saponins. The results of antibacterial tests using the Soxhletation method with a concentration of 75% resulted in an average inhibitory zone of 10.097 and the UAE method with a concentration of 75% resulted in an average inhibitory zone of 12.29.

Conclusion: Methanol extract of cocoa beans extracted by UAE and Soxhletasi method has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: cocoa bean, soxhletasi, UAE, antibacterial, *Staphylococcus aureus*

*Author

** Advisor 1

***Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Keping Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*”.

Selama proses penyusunan penulis dibantu dan dibimbing oleh berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Andi Eka Pranata S.ST., S.Kep., Ns. M. Kes selaku Rektor Universitas dr. Soebandi.
2. apt. Lindawati Setyaningrum, M.Farm. selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dan pembimbing utama
3. apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi
4. Drs. Hendro Prasetyo, S.Kep., Ns., M.Kes. selaku ketua penguji
5. apt. Dina Trianggaluh Fauziah, M.Farm. selaku pembimbing anggota

Penulis tentu menyadari bahwa Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Penulis mengharapkan kritik serta saran dari semua pihak demi kesempurnaan Skripsi ini.

Semoga Skripsi ini dapat bermanfaat. Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih.

Jember, 07 Agustus 2023

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
SKRIPSI.....	vi
PERSEMBAHAN	vii
MOTTO.....	ix
ABSTRAK.....	x
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1. Tujuan Umum	6
1.3.2. Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat penelitian	7
1.5 Keaslian Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tumbuhan Kakao	9
2.3.1 Sejarah Tanaman Kakao	9
2.3.2 Klasifikasi Tanaman Kakao	9
2.3.3 Morfologi Tanaman Kakao.....	10
2.3.4 Kandungan dan Manfaat Biji Kakao	15

2.2	Skrining Fitokimia	19
2.3	Ekstraksi.....	19
2.3.1	Metode Ekstraksi.....	19
2.3.2	Pelarut	25
2.4	Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.4.1	Klasifikasi Ilmiah <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.4.2	Morfologi dan Karakteristik <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.4.3	Patogenitas <i>staphylococcus aureus</i>	27
2.5	Antibakteri.....	29
BAB 3 KERANGKA KONSEP		33
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	33
BAB 4 METODE PENELITIAN		34
4.1	Desain Penelitian	34
4.2	Populasi dan Sampel	34
4.2.1	Populasi Penelitian	34
4.2.2	Sampel Penelitian	35
4.3	Variabel Penelitian.....	35
4.3.1	Variabel Bebas	35
4.3.2	Variabel Terikat.....	35
4.4	Tempat Penelitian	36
4.5	Waktu Penelitian.....	36
4.6	Definisi Operasional	36
4.7	Teknik Pengumpulan Data	36
4.7.1	Determinasi Tanaman.....	36
4.7.2	Pembuatan Serbuk Simplisia dan Defating Biji Kakao.....	37
4.7.3	Ekstraksi sampel.....	37
4.7.4	Skrining Fitokimia.....	38
4.7.5	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	40
4.7.6	Pembuatan Media	40
4.7.7	Pembuatan Konsentrasi Sampel, Kontrol Positif dan Kontrol Negatif	41
4.7.8	Preparasi dan uji aktivitas antibakteri.....	42
4.8	Teknik Analisa Data	44
4.8.1	Pengumpulan Data	44
4.8.2	Analisa Data.....	44

BAB 5 HASIL PENELITIAN	45
5.1 Hasil Determinasi Tanaman Biji Kakao (<i>Theobroma cacao L</i>)	45
5.2 Hasil Ekstraksi Biji Kakao (<i>Theobroma cacao L</i>)	45
5.3 Skrining Fitokimia	46
5.4 Uji Antibakteri.....	47
5.5 Hasil Analisa Data.....	49
BAB 6 PEMBAHASAN	50
BAB 7 PENUTUP	55
7.1 Kesimpulan.....	55
7.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN.....	65

DAFTAR TABEL

Table 1.1 Keaslian Penelitian	8
Table 2.1 Klasifikasi Kategori Zona Hambat Antibakteri	32
Table 4.1 Definisi Operasional	36
Table 5.1 Hasil Ekstrak Kental dan % Rendemen.....	45
Table 5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia.....	46
Table 5.3 Hasil Pengujian Ekstrak Biji Kakao Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Table 5.2 Hasil Kategori Zona Hambat Pengujian Ekstrak Biji Kakao Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Biji Tanaman Kakao	9
Gambar 2.2 Akar Kakao	10
Gambar 2.3 Batang dan Cabang Kakao	11
Gambar 2.4 Daun Kakao	12
Gambar 2.5 Bunga Kakao	13
Gambar 2.6 Buah Kakao	14
Gambar 2.7 Biji Kakao	14
Gambar 2.8 Ekstraksi Maserasi	20
Gambar 2.9 Proses Perkolasi.....	20
Gambar 2.10 Alat Ekstraksi Refluks	21
Gambar 2.11 Alat Ekstrasi Soxhletasi	22
Gambar 2.12 Alat Ekstrasi Infusa.....	23
Gambar 2.13 Alat Ekstrasi Penyulingan	24
Gambar 2.14 Peralatan Proses Ekstraksi Ultrasonik	25
Gambar 2.15 Koloni Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada media MSA	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rencana Jadwal Penyusunan Skripsi	65
Lampiran 2. Surat Hasil Determinasi Tanaman.....	66
Lampiran 3. Dokumentasi Proses pembuatan serbuk kakao	67
Lampiran 4. Hasil Ekstraksi Biji Kakao	71
Lampiran 5. Perhitungan Hasil Ekstraksi.....	72
Lampiran 6. Skrining Fitokimia	73
Lampiran 7. Surat Keterangan Isolat <i>Staphylococcus aureus</i>	74
Lampiran 8. <i>Specification Muller-Hinton Agar</i>	77
Lampiran 9. Hasil <i>Mc Farland</i>	78
Lampiran 10. Perhitungan <i>Mc Farland</i> , peremajaan	79
Lampiran 11. Dokumentasi Uji Antibakteri.....	80
Lampiran 12. Hasil Uji Antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	82

DAFTAR SINGKATAN

BaCl₂ : Barium Klorida

FeCl₃ : Besi (III) Klorida

H₂SO₄ : Asam Sulfat

HCl : Hidrogen Klorida

KBM : Konsentrasi Bunuh Minimum

KHM : Konsentrasi Hambat Minimum

NA : *Nutrient Agar*

MHA : Mueller Hinton Agar

UAE : *Ultrasonic Assisted Extraction*

FeCl₃ : Besi (III) Klorida

Mg : Magnesium

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan yang terdiri dari ribuan pulau dengan ekosistem dan keanekaragaman hayati yang sangat beragam karena perpaduan antara benua Asia dan Australia. Tumbuhan Indonesia merupakan gudang senyawa bahan alam dengan berbagai struktur dan aktivitas farmakologis (Wahyuningsih dkk., 2016). Salah satu tanaman yang merupakan gudang senyawa alami adalah kakao. Di Indonesia kakao dilestarikan sebagai komoditas yang berperan penting dalam perekonomian. Indonesia adalah produsen kakao terbesar ketiga di dunia, setelah Pantai Gading dan Ghana di Afrika Barat (Kementerian pertanian republik Indonesia, 2019). Menurut Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Timur, hasil perkebunan kakao pada tahun 2017 Kabupaten Jember menduduki peringkat keempat dengan produksi sebanyak 2.921 ton, setelah Banyuwangi, Kediri dan Madiun. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia atau dikenal juga dengan PUSLITKOKA, terletak di Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember, Jawa Timur.

Kakao adalah salah satu produk utama Jember. Salah satu potensi pemanfaatan tanaman kakao dalam bidang kesehatan terletak pada keping biji kakao. Kandungan senyawa bioaktif pada biji kakao, terutama polifenol cukup besar. Senyawa polifenol yang terdapat pada keping biji kakao telah diteliti mengandung senyawa aktif biologis yang mempunyai

banyak manfaat bagi kesehatan manusia seperti Sumber antioksidan, antikanker, antidiabetes, antihipertensi, antiinflamasi, dan antibakteri

Staphylococcus aureus merupakan penyebab utama infeksi bernanah pada rongga hidung dan kulit pada manusia. *Staphylococcus aureus* masuk ke dalam tubuh melalui folikel rambut, jarum suntik, saluran cerna, dan saluran pernafasan. *Staphylococcus aureus* adalah patogen utama pada manusia, dan kebanyakan orang pernah menderita infeksi *Staphylococcus aureus* dengan berbagai tingkat keparahan, mulai dari keracunan makanan hingga infeksi kulit ringan sampai parah yang dapat mengancam jiwa (Setiyo and Rochmah, 2020).

Staphylococcus aureus dapat menginfeksi manusia dengan toksin pada makanan yang tidak diolah dan diawetkan dengan baik dan menyebabkan keracunan jika dikonsumsi oleh manusia (Puspitasari dkk, 2020).

Menurut Budaraga and Putra, (2019) Nilai zona hambat dalam asap cair buah kakao dengan kelembaban 10% terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah 25,1mm. Sementara nilai zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* 32,6mm. Bakteri *Escherichia coli* menunjukkan resisten lebih kuat dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus*. Dari tersebut dapat dinyatakan zona hambat *Escherichia coli* lebih kecil dari zona hambat *Staphylococcus aureus*.

Menurut Mulyatni dkk, (2012) Ekstrak kulit buah kakao paling efektif menghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan

KHM 8% (g/mL), dibandingkan dengan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* yang memiliki KHM masing-masing 16% (g/mL) dan 32% (g/mL).

Infeksi bakteri dapat diatasi dengan penggunaan obat antibakteri. Penggunaan obat-obatan kimia dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping seperti iritasi kulit, resistensi antibiotik, dan dapat menimbulkan kerusakan organ (Nuraeni and Kodir, 2021). Berbagai penelitian bertujuan untuk mencari alternatif obat antibakteri untuk pengobatan infeksi bakteri. Antibakteri ini diharapkan berasal dari bahan alam yang melimpah dan mudah didapat, dan dapat diperbaharui, serta memiliki risiko efek samping yang lebih rendah (Lestari dkk, 2021)

Ekstraksi adalah proses pemisahan senyawa aktif biologis dalam suatu bahan untuk memperoleh zat terpisah dengan menggunakan pelarut. Metode ekstraksi yang umum digunakan meliputi: maserasi, infusa, dekok, soxhletasi, perlokasi, refluks, destilasi, lawan arah (countercurrent, ultrasonik, gelombang mikro *microwave assisted extraction* (MAE) (Hujjatusnaini dkk, 2021). memilih metode ekstraksi yang tepat, mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap kualitas dan kuantitas kandungan senyawa kimia yang diekstraksi dalam simplisia. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat menjadi kunci keefektifan ekstraksi zat aktif dari bahan alam (Nazrun dkk., 2021). Pada penelitian ini menggunakan 2 metode ekstraksi pada keping biji kakao, yaitu metode ekstraksi *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dan Soxhletasi.

Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dipilih karena metode UAE mempunyai proses ekstraksi yang cepat, dapat dilakukan pada suhu rendah yaitu suhu ruangan, menggunakan lebih sedikit pelarut, dan dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat sensitive terhadap panas. Metode ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang lebih efektif untuk mengurangi ukuran partikel ekstrak (Putri and Prahasti, 2022).

Metode soxhletasi dipilih karena Soxhletasi merupakan metode panas yang dapat mengekstrak lebih banyak minyak, menggunakan lebih sedikit pelarut dan waktu ekstraksi lebih singkat (Pratama dkk, 2017). Menurut penelitian Candra dkk, (2021) menunjukkan bahwa jumlah total fenolik dan flavonoid yang diperoleh dengan metode ekstraksi soxhlet jauh lebih tinggi dibandingkan dengan maserasi, sonikasi, dan refluks.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mandhaki dkk, (2021) pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun kakao terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan proses ekstraksi secara maserasi. Uji antibakteri dilakukan dengan uji difusi cakram, menunjukkan bahwa fraksi etanol dan fraksi diklorometana mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan terdapat zona hambat di sekitar kertas cakram, sedangkan fraksi n-heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Menurut hasil penelitian Alouw dkk, (2022) Uji antibakteri ekstrak etanol daun kersen terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol.

Pengujian antibakteri dilakukan dengan uji difusi sumuran bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun kersen menunjukkan diameter zona hambat yang terbentuk semakin besar karena semakin banyak mengandung senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan berbagai metode diatas dipilih metode sumuran karena Keuntungannya adalah lebih luas zona hambat yang terbentuk mudah diukur, karena bakteri beraktivitas tidak hanya pada permukaan atas nutrien agar, tetapi juga dibawahnya (Nurhayati dkk, 2020). Berdasarkan penelitian (Nurhayati dkk, 2020) menunjukkan bahwa efek antibakteri metode sumuran lebih tinggi terhadap bakteri *Escherichi coli* maupun *Staphylococcus aureus* dari pada metode cakram.

uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dan parameter hasil pengujian adalah diameter zona hambat. Adapun klasifikasi kategori zona hambat antibakteri menurut (Wahyuningsih, Auliah and Salwi, 2020) ≥ 20 mm Sangat kuat, 10-20 mm Kuat, 5-10 mm Sedang, ≤ 5 mm Lemah.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Kandungan senyawa kimia apa saja yang terdapat pada ekstrak metanol keping biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan Soxhletasi?
- 2) Apakah ekstrak metanol biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan Soxhletasi mempunyai aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol keping biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan Soxhletasi terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode sumuran.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1) Untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak metanol keping biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan Soxhletasi.
- 2) Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol Keping biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi

dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan Soxhletasi terhadap daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1. Bagi Peneliti

Meningkatkan pengetahuan dan pengalaman mengenai metode ekstraksi yang efektif terhadap aktivitas antibakteri ekstrak keping biji kakao menggunakan pelarut metanol dengan metode Soxhletasi dan UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) untuk menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

1.4.2. Bagi peneliti lain

Dapat memberikan informasi sebagai dasar bahan pertimbangan dan referensi tambahan untuk penelitian selanjutnya untuk pencarian antibakteri dari bahan alam.

1.4.3. Bagi Masyarakat

Dapat memberikan informasi baru tentang manfaat dan kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak metanol keping biji kakao.

1.4.4. Bagi Institusi

Diharapkan dapat memberikan tambahan informasi bagi mahasiswa yang ingin melakukan penelitian lebih lanjut.

1.5 Keaslian Penelitian

Table 1.1 Keaslian Penelitian

PENELITI	JUDUL PENELITIAN	KEASLIAN PENELITIAN	
		Persamaan	Perbedaan
Dame J Pohan, Angela P Kakerissa, Evy S Arodes (2020)	Uji Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (<i>Theobroma Cacao</i> L.) Sebagai Antibakteri Dalam Berbagai Konsentrasi pada <i>Streptococcus Pyogenes</i>	1) Menggunakan sampel biji kakao	1) Menggunakan pelarut etanol 2) Menggunakan metode Kirby- Beuer (cakram) 3) Menggunakan bakteri <i>Streptococcus Pyogenes</i> 4) Menggunakan metode ekstraksi maserasi
(Kevin and Kadiwijati, 2018)	Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Ekstrak Metanol Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i>) Terhadap Aktivitas Antibakteri Pada Bacteri <i>Propionibacterium acnes</i> dan <i>Staphylococcus epidermidis</i> Secara in Vitro	1) Menggunakan sampel biji kakao 2) Menggunakan pelarut metanol	1) Menggunakan metode Kirby- Beuer (cakram) 2) <i>Propionibacterium acnes</i> dan <i>Staphylococcus epidermidis</i> 3) Menggunakan metode ekstraksi maserasi
Nurul Hafidhah, Rachmi Fanani Hakim, Fakhurrrazi (2017)	Pengaruh Ekstrak Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Terhadap Pertumbuhan <i>Enterococcus faecalis</i> Pada Berbagai Konsentrasi	1) Menggunakan sampel biji kakao	1) Menggunakan pelarut etanol 96% 2) Menggunakan metode spread plate (cawan sebar) 3) Menggunakan bakteri <i>Enterococcus faecalis</i> 4) Menggunakan metode ekstraksi maserasi

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Kakao

2.3.1 Sejarah Tanaman Kakao

Tanaman kakao bukan berasal dari Indonesia melainkan dari Amerika Selatan dan tumbuh di hutan hujan tropis. Tanaman kakao (*Theobroma Cacao*) mempunyai arti makanan bagi Tuhan (Sutomo dkk, 2017). Suku Indian Maya dan suku Aztec adalah Orang pertama yang menggunakan kakao sebagai bahan makanan dan minuman (Kementerian pertanian republik Indonesia, 2019).

Tanaman kakao masuk ke Indonesia oleh orang Spanyol sekitar tahun 1650 melalui Sulawesi dan kemudian meluas ke Minahasa. Sejak tahun 1970, adanya diversifikasi budaya dengan beberapa perkebunan besar budidaya kakao telah mendapat perhatian lebih luas di seluruh Nusantara (Sugiharti, 2016).



Gambar 2.1 Biji Tanaman Kakao
Sumber: Kementerian pertanian republik Indonesia, 2019)

2.3.2 Klasifikasi Tanaman Kakao

Klasifikasi tanaman kakao berdasarkan taksonomi (Riyanti, 2022) sebagai berikut:

Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Malvales
Family : Sterculiaceae
Genus : *Theobroma*
Species : *Theobroma cacao* L.

2.3.3 Morfologi Tanaman Kakao

Tanaman kakao termasuk dalam famili Sterculiaceae. Tanaman Kakao merupakan tumbuhan Angiospermae yang terdiri dari akar, batang, daun, bunga, buah dan biji.

1) Akar (radix)



Gambar 2.2 Akar kakao
(Suyono. and Carnovia, 2019)

Untuk memperkuat berdirinya tanaman kakao, akarnya menyerap air dan unsur hara yang terlarut dalam tanah serta mengangkut air dan unsur hara ke tempat yang memerlukannya. Tanaman kakao mempunyai akar tunggang dan akar serabut serta tumbuh sekitar 30cm di atas permukaan tanah. Pertumbuhan

akarnya mencapai 8m ke samping dan 15m ke bawah. Ketebalan daerah perakarannya 30-50cm (Martono, 2014).

Perkembangan akar kakao bervariasi sesuai dengan kondisi tanah. Pada dataran tinggi, terutama di lereng gunung, akar tunggang tumbuh panjang dan akar lateralnya menembus sangat dalam ke tanah. Sebaliknya, pada tanah liat yang permukaan airnya tinggi, setiap tahun, akar tunggang tidak tumbuh terlalu dalam, sedangkan akar lateral tumbuh dekat dengan tanah (Suyono, and Carnovia, 2019).

2) Batang (caulis)



Gambar 2.3 Batang dan Cabang Kakao
(Suyono. and Carnovia, 2019)

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berkembang biak dengan biji membentuk batang utama sebelum tumbuh beberapa cabang primer. Letak cabangnya disebut jorket dengan tinggi 1,2-1,5m di atas permukaan tanah. Jorket tumbuh 3-6 cabang yang arah tumbuhnya condong ke samping membentuk sudut 0-60 dengan mendatar (Suyono and Carnovia, 2019). Jorket tidak ditemukan pada tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berkembang biak

secara vegetatif. Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) mempunyai 2 bentuk cabang yaitu cabang orthotrop dan cabang plagiotrop. Cabang orthotrop adalah cabang yang tumbuh ke atas, sedangkan cabang plagiotrop tumbuh menyamping (Martono, 2014).

3) Daun (folium)



Gambar 2.4 Daun Kakao
(Sumber : Suyono. and Carnovia, 2019)

Warnanya bervariasi dari kecokelatan, coklat, coklat kemerahan, merah kecokelatan, kemerahan, merah, merah muda, merah cerah, panjang daun 10-48cm dan lebar 4- 20cm. Permukaan atas daun tua berwarna hijau bergelombang, sedangkan permukaan bawah daun tua berwarna hijau muda bergelombang dan kasar. Daun kakao merupakan daun tunggal (folium simplex), hanya terdapat satu helaian daun perbatang. Tangkai daun (petiolus) berbentuk silindris, bersisik halus (tergantung jenisnya), pangkal membulat, ujung runcing dengan panjang $\pm 25\text{--}28\text{mm}$ dan diameter $\pm 3\text{--}7,4\text{mm}$. Warna tangkai daun bervariasi yaitu hijau, hijau kekuningan, dan hijau kecokelatan. Ujung daun berwarna

hijau kekuningan, dan hijau kecokelatan. Bentuk daunnya bulat dan lonjong (oblongus). Ujung daun (apex folii) meruncing (acuminatus) dan pangkal daunnya bulat memanjang (oblongus). (Martono, 2014).

4) Bunga (flos)



Gambar 2.5 Bunga Kakao
(Suyono. and Carnovia, 2019)

Bunga kakao tergolong bunga sempurna yang terdiri dari 5 helai daun kelopak (calyx) berwarna merah muda dan 10 helai benang sari (androecium) (Martono, 2014). Bunga kakao berwarna putih, ungu atau kemerahan. Warna yang kuat terdapat pada benang sari dan kelopak bunga. Warna bunga ini khas untuk setiap varietas. Tangkai bunganya kecil namun panjang (1-1,5 cm). Panjang daun mahkotanya 6-8mm dan terdiri dar 2 bagian. Bagian pangkal berbentuk seperti kuku binatang (Claw) dan biasanya mempunyai dua garis berwarna merah. Ujungnya berupa lembaran tipis, fleksibel, dan berwarna putih (Suyono and Carnovia, 2019).

5) Buah (fructus)



Gambar 2.6 Buah Kakao
(Suyono and Carnovia, 2019)

Bentuk buah dan warnanya sangat bervariasi, tergantung pada varietas. Namun pada dasarnya warnanya hanya ada 2 jenis yaitu: buah muda berwarna hijau/hijau agak putih sedangkan ketika sudah matang berwarna kuning dan buah muda berwarna merah sedangkan ketika sudah matang berwarna oranye. Buah kakao akan matang sekitar 5-6bulan, tergantung pada ketinggian tanam. Pada saat buah matang, ukuran buah yang terbentuk cukup bervariasi, berkisar 10-30cm, diameter 7-15cm, namun tergantung pada varietas dan faktor lingkungan selama proses perkembangan buah (Romadon, 2019).

6) Biji (semen)



Gambar 2.7 Biji Kakao
(Suyono and Carnovia, 2019)

Biji kakao (semen) terbagi menjadi 3 bagian yaitu kotiledon (87,10%), kulit biji (12%) dan sekam (0,9%). Biji kakao berbentuk bulat, lonjong, agak pipih, berukuran 2,5x1,5cm. Biji kakao juga dilapisi lendir berwarna putih. Biji kakao tidak mempunyai masa dormansi, sehingga tidak mungkin menyimpan benihnya dalam waktu lama. Menyimpan benih pada suhu 4-15°C dapat merusak benih dan kecambah (Martono, 2014). Biji kakao tersusun dalam 5 baris mengelilingi poros buah dan jumlahnya bervariasi yaitu 20–50biji per buah (Setiyono, 2014).

2.3.4 Kandungan dan Manfaat Biji Kakao

Biji kakao yang tidak difermentasi mengandung berbagai senyawa polifenol, sekitar 60% dari total polifenol dalam biji kakao merupakan monomer flavanol (epikatekin, katekin) dan oligomer prosianidin (dimer dan dekamer) dengan konsentrasi yang bervariasi (Attahmid, Rauf and Yusuf, 2021).

Senyawa polifenol pada tanaman kakao telah diteliti dan dilaporkan mengandung senyawa bioaktif yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia, seperti

1) Antioksidan

Menurut Wicaksana, (2022), biji kakao mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan rata-rata IC_{50} sebesar $8,25 \pm 19,67$. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa biji kakao yang diolah menjadi produk seperti coklat atau minuman coklat,

mengandung sumber antioksidan berupa katekin, epikatekin dan prosianidin. Antioksidan ini mampu mengurangi sejumlah gugus radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas adalah molekul yang keberadaannya tidak stabil akibat proses metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, sinar ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lainnya. Mengonsumsi makanan atau minuman yang mengandung antioksidan dapat mengurangi kemungkinan terkena penyakit degeneratif dan memperlambat penuaan. Antioksidan ini merangsang respon imun dalam tubuh, sehingga mampu menghambat tumbuhnya radikal bebas dan menjaga kelenturan pembuluh darah. Dengan demikian dapat diartikan bahwa konsumsi antioksidan secara langsung dapat melindungi sel dan jaringan tubuh dari serangan radikal bebas (Towaha, 2014).

2) Antikanker

Gugus fenol yang terdapat pada biji kakao yaitu senyawa flavanol dan prosianidin yang memiliki menghambat pertumbuhan sel kanker dan biosintesis poliamin berperan penting dalam pencegahan sel kanker. Senyawa prosianidin ini dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim ornithine dekarboksilase dan s-adenosil metionin dekarboksilat yang berperan dalam biosintesis poliamin pada sel kanker (Towaha, 2014)

3) Antidiabetes

Diabetes Mellitus adalah penyakit kronis yang terjadi ketika tubuh tidak dapat memproduksi cukup insulin atau tidak dapat menggunakan insulin, dan didiagnosis dengan memantau peningkatan kadar glukosa darah (Azis dkk, 2020). Konsumsi 100g cokelat hitam (dark chocolate) yang kaya polifenol setiap hari dapat meningkatkan kadar insulin yang berfungsi dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah, sehingga mencegah dan mengurangi timbulnya diabetes melitus. Produk cokelat yang kaya polifenol sangat bermanfaat bagi penderita diabetes, karena dapat mengurangi resistensi insulin dan meningkatkan sensitivitas insulin pada tubuh sehingga insulin dapat diproduksi kembali secara bertahap (Towaha, 2014).

4) Anti hipertensi

Hipertensi merupakan suatu kelainan pada sistem peredaran darah, yaitu suatu kondisi dimana tekanan darah seseorang lebih tinggi dari normal sehingga mengakibatkan peningkatan angka kesakitan (morbiditas) dan kematian (mortalitas) (Chasanah and Syarifah, 2017). Senyawa polifenol yang pada cokelat dapat merangsang sel endothelium vaskular dalam tubuh untuk melepaskan senyawa NO yang bertanggung jawab untuk meningkatkan sistem peredaran darah. Nitrat Oksida memberi

sinyal bahwa otot-otot disekitar pembuluh darah untuk lebih rileks, dan menyebabkan peningkatan aliran darah (Towaha, 2014).

5) Anti inflamasi

Anti-inflamasi merupakan obat yang mengurangi tanda dan gejala peradangan. Senyawa polifenol pada kakao memiliki anti inflamasi. Mekanisme anti-inflamasi senyawa polifenol terjadi melalui penghambatan jalur metabolisme asam arakhidona, pembentukan prostaglandin dan pelepasan histamin pada saat inflamasi (Towaha, 2014).

6) Anti bakteri

Dalam penelitian Sudibyo, 2012 menunjukkan bahwa senyawa fenolik pada kakao yang dapat digunakan sebagai antimikroba juga dapat melawan beberapa bakteri patogen pada bahan pangan, namun juga dapat melawan beberapa bakteri karsinogenik. Kemampuan senyawa bioaktif ini untuk menembus dinding sel bakteri secara langsung berhubungan dengan aktivitas antimikrobanya (Sudibyo, 2012).

Hasil penelitian Dame dkk, 2020 ekstrak biji kakao efektif menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi. Sifat antimikroba pada ekstrak biji kakao juga disebabkan oleh adanya beberapa senyawa antimikroba seperti katekin, flavonoid, tanin dan antosianin (Sepriyani, 2020).

2.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah suatu metode untuk mempelajari komponen senyawa aktif dalam suatu sampel, yaitu struktur kimianya, biosintesis, penyebarannya alamiah dan aktivitas biologisnya, isolasi dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari berbagai jenis tanaman. Sampel tanaman yang digunakan dapat berupa daun, batang, buah, biji, bunga, umbi dan akarnya yang mempunyai khasiat obat dan digunakan sebagai bahan baku pembuatan obat modern dan tradisional (Agustina dkk , 2016).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu metode pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa (analit) dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai (Leba, 2017).

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik atau memisahkan senyawa dari suatu campuran atau simplisia. Beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan yaitu: maserasi, perlokasi, refluks, soxhletasi, infusa, dekok, destilasi, lawan arah (countercurrent, ultrasonik, gelombang mikro (microwave assisted extraction, MAE). Dan ekstraksi gas superkritis (supercritical gas extraction, SGE) (Hujjatusnaini, dkk, 2021).

2.3.1 Metode Ekstraksi

Adapun beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan untuk proses penentuan senyawa yaitu:

1) Maserasi



Gambar 2.8 Ekstraksi Maserasi
(Sumber : Wicaksana, 2022)

Maserasi adalah salah satu jenis ekstraksi padat-cair yang paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan merendam dalam pelarut yang sesuai pada suhu kamar untuk melarutkan analit dalam sampel. Sampel biasanya direndam selama 3-5 hari, sambil sesekali diaduk untuk mempercepat proses pelarutan analit. Ekstraksi dilakukan berulang kali sampai analit terekstraksi secara sempurna. Indikasi bahwa semua analit telah terekstraksi secara sempurna adalah pelarut yang digunakan tidak warna (Leba, 2017).

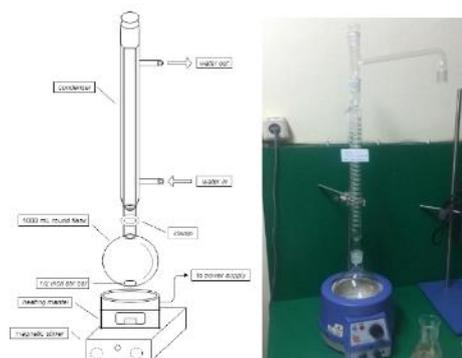
2) Perkolasi



Gambar 2.9 Proses Perkolasi
(Sumber: Rosselita, 2020)

Perkolasi adalah jenis ekstraksi padat-cair dimana pelarut dialirkan secara perlahan pada sampel dalam perlokator. Pada ekstraksi jenis ini, pelarut ditambahkan terus menerus, sehingga proses ekstraksi selalu dilakukan dengan pelarut baru. Pola penambahan pelarut menggunakan pola tetesan pelarut dari bejana terpisah, yang diatur dengan banyaknya pelarut yang keluar atau dilakukan dengan sesekali menambahkan pelarut dalam jumlah besar (Leba, 2017). Metode ini memerlukan waktu yang lebih lama dan pelarut yang lebih banyak. Untuk mengetahui perlokasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan pereaksi yang spesifik (Hujjatusnain dkk, 2021).

3) Refluks

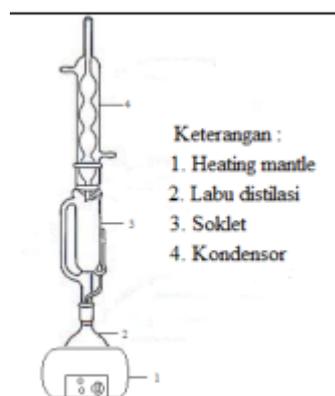


Gambar 2.10 Alat Ekstraksi Refluks
(Sumber: Hidayat dkk., 2019)

Metode ini digunakan jika dalam sintesisnya menggunakan pelarut yang mudah menguap. Pada kondisi ini jika dilakukan pemanasan biasa maka pelarut akan menguap sebelum reaksi selesai. Prinsip dari metode refluks adalah pelarut volatil yang

digunakan menguap pada suhu tinggi, namun akan didinginkan oleh kondensor sehingga pelarut yang sebelumnya berbentuk uap mengembun di kondensor dan turun lagi ke dalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung. Pada saat yang sama aliran gas N₂ diatur sedemikian rupa sehingga tidak ada uap air atau gas oksigen yang dapat masuk, terutama senyawa organologam untuk sintesis senyawa anorganik karena sifatnya reaktif (Sudarwati and Fernanda, 2019).

4) Soxhletasi (Soxhlet)



Gambar 2.11 Alat Ekstraksi Soxhletasi
(Sumber: Dewi dkk., 2018)

Soxhletasi adalah suatu metode atau proses pemisahan suatu komponen yang terkandung dalam suatu zat padat dengan cara penyaringan berulang-ulang menggunakan pelarut tertentu, sehingga seluruh komponen yang diinginkan terisolasi. Soxhletasi digunakan pada pelarut organik tertentu. Dengan pemanasan, uap yang timbul setelah pendinginan terus menerus membasahi sampel, pelarut secara berkala dimasukkan kembali ke dalam labu

berisi senyawa kimia yang akan diisolasi. Pelarut yang telah membawa senyawa kimia pada labu distilasi yang diuapkan dengan rotary evaporator sehingga pelarut tersebut dapat diangkat lagi bila suatu campuran organik berbentuk cair atau padat ditemui pada suatu zat padat, maka dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut yang diinginkan (Sudarwati and Fernanda, 2019)

5) Infusa

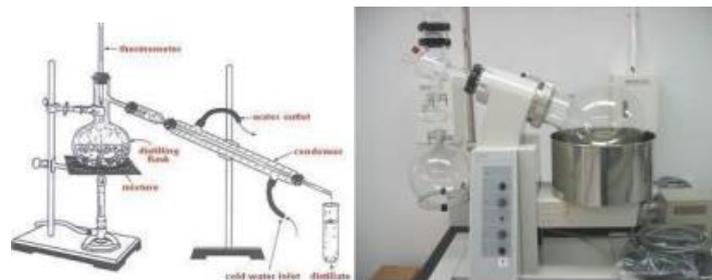


Gambar 2.12 Alat Ekstraksi Infusa
(Sumber : Leonardy dkk, 2019)

Infusa merupakan metode ekstraksi yang menggunakan air sebagai pelarut. Selama proses infusa, suhu pelarut air harus mencapai 90°C selama 15 menit. Perbandingan berat bahan dan air adalah 1:10, yaitu jika berat bahan 100g maka volume pelarut air 1000ml. Cara yang umum dilakukan adalah dengan memanaskan bahan dalam panci dengan air secukupnya selama 15menit mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk. Saring selagi panas menggunakan kain flannel dan tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume yang

diinginkan. Jika bahan mengandung minyak atsiri,, saring setelah dingin (Sudarwati and Fernanda, 2019).

6) Destilasi (Penyulingan)

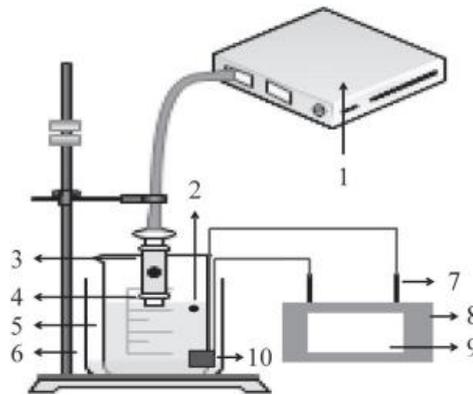


Gambar 2.13 Alat Ekstraksi Destilasi
(Sumber : Setiawan, 2018)

Destilasi adalah suatu metode pemisahan zat cair dari suatu campuran berdasarkan perbedaan titik didih atau kemampuan suatu zat untuk menguap. Ketika zat cair dipanaskan sampai titik didih, uap mengalir ke alat pendingin (kondensor) dan mengumpulkan air yang terkondensasi sebagai zat cair. Kondensor digunakan air yang mengalir sebagai pendingin (Setiawan, 2018).

Zat yang titik didihnya lebih rendah akan lebih banyak menguap. Pada proses pendinginan, senyawa dan uap air mengembun dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang terekstrak. Metode ini biasa digunakan untuk mengekstraksi minyak atsiri dari tumbuhan (Hujjatusnaini dkk, 2021). Destilasi dibedakan menjadi beberapa macam, yaitu: Destilasi konvensional (sederhana), Destilasi fraksional atau destilasi bertingkat, Destilasi vakum, Destilasi Uap, Destilasi azeotrop dan Destilasi ekstraktif (Setiawan, 2018).

7) Ultrasonik



Gambar 2.14 Peralatan Proses Ekstraksi Ultrasonik
(Sumber: Sholihah, Ahmad and Budiastira, 2017)

Ekstraksi ultrasonik menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-2000 KHz sehingga permeabilitas dinding sel meningkat dan isi sel keluar. Frekuensi getaran mempengaruhi hasil ekstraksi (Hujjatusnaini dkk, 2021). Proses ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik lebih cepat dibandingkan metode konvensional. Medium yang dilewati akan mengalami getaran yang disebabkan oleh gelombang elektronik. Getaran yang disebabkan oleh gelombang ultrasonik memastikan pengadukan yang intens dalam proses ekstraksi (Setyantoro dkk, 2019).

2.3.2 Pelarut

Pelarut adalah cairan atau gas yang melarutkan padatan, cairan atau gas, sehingga menghasilkan larutan. Pelarut yang paling umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang umum digunakan adalah bahan kimia organik (mengandung karbon,)

disebut juga pelarut organik. Pelarut biasanya mempunyai titik didih yang rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan zat terlarutnya. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih banyak (Saputri, 2016).

Ekstraksi pelarut didasarkan pada polaritas zat dalam pelarut selama ekstraksi. Senyawa polar hanya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol dan air. Senyawa non-polar hanya dapat larut dalam pelarut non-polar, seperti eter, kloroform dan n-heksana (Saputri, 2016).

Pada penelitian ini, digunakan zat metanol sebagai pelarutnya. Pemilihan metanol sebagai pelarut didasarkan pada hasil penelitian (Kusuma dkk, 2022) bahwa ekstrak metanol batang pelawan mempunyai daya hambat paling besar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan ekstrak n-heksana dan ekstrak etil asetat. Dalam penelitian Hartati dkk, 2013 mengenai aktivitas antioksidan dan antibakteri pada tanaman mahoni dengan pelarut metanol, etanol, dan aseton menunjukkan bahwa pelarut metanol dan aseton ekstrak biji mahoni mempunyai kemampuan yang lebih besar dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Metanol dianggap sebagai pelarut yang cocok karena metanol merupakan pelarut polar, mampu memisahkan senyawa kimia lebih baik dibandingkan etanol. Pelarut metanol mempunyai kemampuan menarik senyawa non-polar sampai senyawa polar, sehingga

penggunaan pelarut ini diharapkan mampu menyari metabolit sekunder pada biji kakao seperti flavanoid, saponin dan tanin (Kevin and Kadiwijati, 2018).

2.4 Bakteri *Staphylococcus aureus*

2.4.1 Morfologi dan Karakteristik *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram-positif, berbentuk kokus berukuran sekitar 1µm yang terlihat seperti kelompok anggur ketika diperiksa dibawah mikroskop. *Staphylococcus aureus* tidak aktif bergerak (nonmotil), tidak menghasilkan spora dan bersifat katalase positif. Bakteri ini tahan panas hingga 50⁰C, memiliki kandungan garam yang tinggi dan tahan kekeringan. Koloni *Staphylococcus aureus* berukuran besar dan berwarna bening, berdiameter 6-8mm. Banyak strain koloni bakteri ini menghasilkan pigmen yang berwarna kuning gading atau jingga. *Staphylococcus aureus* tersebar luas di alam dan ada yang hidup sebagai flora normal pada manusia yang terdapat di aksila, daerah inguinal dan perineal, dan lubang hidung (nares) bagian anterior. Sekitar 25-30% *Staphylococcus aureus* ditemukan di rongga hidung dan kulit pada manusia (Soedarto, 2015).

2.4.2 Patogenitas *staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah penyebab utama infeksi bernanah pada manusia dan ditemukan di rongga hidung dan kulit. *Staphylococcus aureus* masuk ke dalam tubuh melalui jarum suntik folikel rambut, atau melalui saluran pernafasan. *Staphylococcus aureus*

adalah patogen utama pada manusia, dan kebanyakan orang pernah menderita infeksi *Staphylococcus aureus* dengan berbagai tingkat keparahan, mulai dari keracunan makanan hingga infeksi kulit ringan sampai parah yang dapat mengancam jiwa (Setiyo and Rochmah, 2020).

Staphylococcus aureus dapat menginfeksi manusia dengan toksin pada makanan yang tidak diolah dan diawetkan dengan baik dan menyebabkan keracunan jika dikonsumsi oleh manusia (Puspitasari dkk, 2020).

2.4.3 Klasifikasi Ilmiah *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* menurut (Soedarto, 2015) sebagai berikut :

Domain : Bacteria
Kingdom : Eubacteria
Pylum : Firmicutes
class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Staphylococcaceae
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*



Gambar 2.15 Koloni Bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MSA (Lasmini dkk, 2022)

2.5 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang dalam konsentrasi kecil dapat menghambat bahkan membunuh proses kehidupan mikroorganisme (Menon and satria, 2017). Mekanisme kerja antibakteri bermacam-macam, di antaranya penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan integritas dinding sel, penghambatan protein dinding sel, penghambatan sintesis asam nukleat, dan penghambatan metabolisme sel mikroba (Purnamaningsih, Kalor and Atun, 2017)

Pengujian antibakteri dapat dilakukan di laboratorium menggunakan beberapa metode pengujian, diantaranya yaitu:

1) Metode Dilusi

(1) Metode Dilusi Cair

Metode dilusi cair/broth dilution test (serial dilution) mengukur MIC/KBM (minimum inhibitory concentration atau kadar bunuh minimum). Metode yang digunakan adalah membuat serangkaian pengenceran zat antimikroba dalam media cair yang ditambahkan mikroba uji. Kadar terkecil pada larutan uji antimikroba yang terlihat

jernih tanpa pertumbuhan mikroba uji disebut KHM. Larutan KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang dalam media cair tanpa penambahan mikroba uji atau antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap jernih setelah inkubasi disebut KBM (Pajan, 2016).

(2) Metode Dilusi Padat

Metode dilusi padat/solid dilution test serupa dengan metode dilusi cair, perbedaannya hanya terletak pada media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi zat antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Sindi, 2022).

2) Metode Difusi

Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk analisis aktivitas antimikroba.

(1) Metode Disc Diffusion

Metode disc diffusion (tes Kirby dan Bauer) untuk mengetahui aktivitas zat antimikroba. Disc diffusion adalah piringan yang berisi zat antimikroba yang ditempatkan pada media agar yang diinokulasi mikroorganisme yang berdifusi dalam media agar. Area jernih menunjukkan bahwa zat antimikroba pada permukaan media agar menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Sindi, 2022).

(2) E-Test

Metode E-test digunakan untuk mengestimasi KHM (kadar hambat minimum) atau MIC (minimum inhibitory concentration), yaitu konsentrasi minimum suatu zat antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Sindi, 2022).

(3) Ditch-Plate Technique

Pada pengujian ini sampel uji berupa zat antimikroba dimasukkan ke dalam sumuran yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri yang bagian tengahnya memanjang, dan mikroba uji (maksimum 6 macam) disebarkan ke sumur yang berisi zat antimikroba (Raisita, 2018).

(4) Cup-Plate Technique

Metode ini sama dengan metode disc diffusion, dibuat sebuah lubang pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan zat antimikroba diberikan kedalam lubang tersebut (Sindi, 2022).

(5) Gradient-Plate Technique

Dalam metode ini, konsentrasi zat antimikroba dalam media agar secara teoritis bervariasi dari 0 hingga maksimum. Media agar dicairkan dengan larutan uji, Campuran tersebut kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan diletakkan dalam posisi miring. Nutrisi kedua selanjutnya di atasnya (Raisita, 2018).

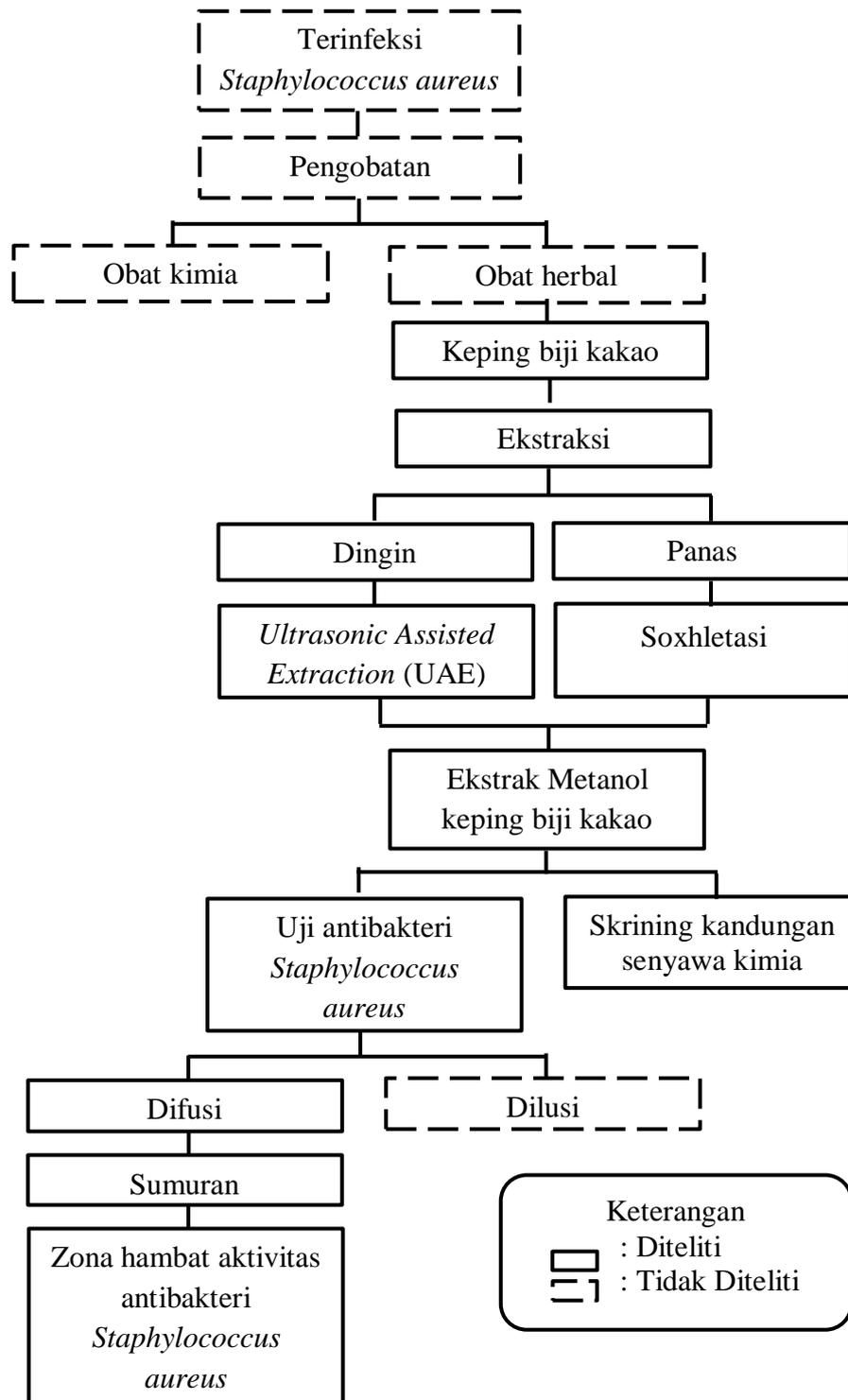
Kategori Pengukuran rata-rata zona hambat diinterpretasi menurut (Wahyuningsih, Auliah and Salwi, 2020)

Tabel 2.1 Klasifikasi Kategori Zona Hambat Antibakteri

Daya Hambat Antibakteri	Kategori Daya Hambat Antibakteri
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

BAB 3 KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol keping biji kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan penelitian Deskriptif eksperimental dengan pelarut metanol menggunakan 2 metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dan Soxhletasi. Pada proses uji antibakteri menggunakan metode difusi sumuran. Tujuan dari desain penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak keping biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi sumuran.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah suatu wilayah umum yang terdiri dari Obyek/subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian diambil kesimpulannya (Garaika and Darmanah, 2017). Populasi penelitian ini adalah biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diambil dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang berlokasi di Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember, Jawa Timur.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik suatu populasi (Garaika and Darmanah, 2017). Sampel yang digunakan adalah ekstrak metanol keping biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah segala sesuatu dalam bentuk apapun yg dipilih peneliti untuk diteliti guna diperoleh informasi tentang hal tersebut dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2016).

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas atau independent ialah variabel yang mempengaruhi variabel terikat (Nasution, 2017). Variabel bebas pada penelitian ini ialah metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode UAE dan Soxhletasi

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat atau dependent ialah variabel yang dijadikan faktor yang dipengaruhi oleh variabel bebas (Nasution, 2017). Variabel terikat pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia dan aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan sehingga antara variabel bebas dan terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang diteliti (Nasution, 2017). Variabel kontrol pada penelitian ini adalah Suhu ekstraksi, Waktu ekstraksi, pelarut.

4.4 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi Jember.

4.5 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Juli 2023.

4.6 Definisi Operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Indikator	Alat ukur	Cara ukur	Skala	Hasil ukur
Kandungan Senyawa Kimia	uji kandungan senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, dan polifenol	Perubahan warna menunjukkan positif atau negatif	Tabung reaksi dan pipet tetes	Dengan menambahkan beberapa reagen yang sesuai	Nominal	Warna, Endapan, dan busa
Aktivitas antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	Zona hambat yang berada di sekeliling sumuran tidak ditemukan adanya pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i>	Zona hambat antibakt yang ≥ 20 mm Sangat kuat, 10-20 mm Kuat, 5-10 mm Sedang, ≤ 5 mm Lemah.	Jangka sorong	Mengukur diameter zona hambat pada area jernih di sekitar piringan.	Ordinal	Terbentuknya diameter zona hambat di sekitar sumuran dinyatakan dalam satuan mm.

4.7 Teknik Pengumpulan Data

4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi keping biji kakao dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember Tujuan determinasi untuk mengetahui

kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Diniatik, 2015).

4.7.2 Pembuatan Serbuk Simplisia dan Defating Biji Kakao

Biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dipisahkan dari kulit biji lalu dibersihkan dan difermentasi. Kemudian dikeringkan dengan oven suhu 70°C. Selanjutnya biji kakao dijadikan pasta. Setelah itu masukkan kedalam kantong dan masukkan lagi kedalam kantong dan masukkan lagi kedalam tabung pengempa untuk dipress dengan tekanan 3000 psi. Biji kakao yang telah dipress kemudian dihaluskan menggunakan mesin dan menghasilkan serbuk simplisia. (Pusat penelitian kopi dan kakao, 2022).

4.7.3 Ekstraksi sampel

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode UAE dan Soxhletasi, adapun langkah kerjanya sebagai berikut:

1) Ekstraksi Metode Soxhletasi

Alat sokletasi dipasang, kemudian serbuk biji kakao 100 gram dibungkus dengan kertas saring, diikat dengan benang, dimasukkan kedalam labu alas bulat pada soklet menggunakan 300 mL pelarut metanol. Sokletasi dilakukan pada suhu 70°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary

evaporator pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental (Puspitasari and Prayogo, 2017; Mangiwa and Maryuni, 2020).

2) Ekstraksi Metode UAE

Sebanyak 100 gram serbuk biji kakao ditimbang masukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian tambahkan 500 mL pelarut metanol, dilanjutkan ekstraksi selama 15 menit menggunakan ultrasonic crusher. Setelah proses ekstraksi, dilakukan proses filtrasi atau yang disebut dengan penyaringan untuk memisahkan filtrat dan ampas. Penyaringan dilakukan dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring lalu dicatat volume hasil ekstraksi dan filtratnya disimpan pada suhu ruang sampai digunakan (Mansinhos dkk., 2021)

4.7.4 Skrining Fitokimia

1) Uji Alkaloid

Masukkan 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi, larutkan dengan 5 mL HCl 2N, kemudian dibagi menjadi 3 tabung. Tambahkan pereaksi Mayer pada tabung ke 1, Tambahkan pereaksi Dragendorff pada tabung ke 2, Tambahkan pereaksi Wagner pada tabung ke 3. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk endapan putih pada tabung 1, terbentuk endapan kuning kejinggaan pada tabung 2, dan terbentuk endapan merah kecoklatan pada tabung 3 (Hafiz dkk, 2020)

2) Uji Flavonoid

Masukkan 0,5 gram ekstrak biji kakao ke dalam tabung reaksi tambahkan 5 mL air, didihkan kurang lebih 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 2 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok hingga homogen. Hasil dinyatakan positif apabila terjadi perubahan warna kuning sampai jingga (Hafiz dkk, 2020)

3) Uji Tanin

Masukkan 2 ml ekstrak biji kakao ke dalam tabung reaksi lalu tambahkan 2 mL FeCl_3 . Hasil dinyatakan positif jika berubah warna hitam kehijauan (Herman dkk., 2020)

4) Uji Saponin

Masukkan 0,5 gram ekstrak biji kakao ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 5 mL air panas dikocok kuat selama kurang lebih 10 detik. Busa yang stabil akan terbentuk selama kurang lebih 10 menit dan busa tersebut tidak hilang. Dinyatakan positif saponin apabila terdapat busa yang stabil (Hafiz dkk, 2020)

5) Uji Polifenol

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan 2 tetes FeCl_3 . Terjadinya perubahan warna hijau atau biru yang kuat menunjukkan adanya kandungan fenol (Manongko, dkk, 2020).

4.7.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum pembuatan media dan pengujian antibakteri, alat-alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan. Pertama alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu dengan detergen kemudian dikeringkan. Sterilisasi alat dan media pertumbuhan bakteri dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara dipijarkan pada nyala api Bunsen (Amelia dkk., 2022).

4.7.6 Pembuatan Media

1) Pembuatan Media Agar Miring Nutrient Agar (NA)

Ditimbang media nutrient agar sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambah akuades sampai 50 ml. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer hot plate di atas penangas air sampai mendidih. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Nutrient Agar dituangkan ke dalam 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil, kemudian didiamkan pada suhu ruang \pm 30 menit hingga media memadat pada kemiringan 30°. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Nurhamidin dkk, 2021)

2) Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Sebanyak 6,8 gram Mueller Hinton Agar (MHA) dilarutkan dalam 200mL, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dihomogenisasi dengan stirrer dalam penangas air hingga

mendidih. Media yang telah homogen diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Gunawan dkk., 2019)

4.7.7 Pembuatan Konsentrasi Sampel, Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Larutan ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao*) konsentrasi 75% Untuk pembuatan larutan uji ekstraknya Ambil 3,75 g ekstrak kental biji kakao (*Theobroma cacao*), larutkan dalam DMSO 10% hingga tanda batas labu ukur 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 75 g/mL. Kontrol negatif merupakan metode perlakuan yang tidak menimbulkan zona hambat pada uji pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kontrol Negatif yang digunakan yaitu DMSO 10% karena tidak memiliki efek antibakteri. Pembuatan kontrol negatif DMSO dengan cara mengambil 10ml DMSO ditambahkan aquades sampai 100ml masukkan labu takar sehingga didapat larutan kontrol negatif DMSO 10% (Bulu, dkk, 2019).

Kontrol positif merupakan metode perlakuan yang menghasilkan zona hambat pada uji pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu levofloxacin 5µg/disc karena mempunyai sensitifitas baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Cara pembuatannya yaitu sebanyak 0,5mg dilarutkan dalam aquades 100ml (Khinanty, 2015)

4.7.8 Preparasi dan uji aktivitas antibakteri

1) Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Diambil bakteri uji dengan kawat ose steril, lalu diinokulasi ke dalam agar miring dengan cara menggores. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Nurhamidin dkk, 2021)

2) Pembuatan standar Mc.Farland

(1) Pembuatan Larutan BaCl₂ 1%.

Timbang 1 gram BaCl₂. Larutkan dalam labu ukur 100ml aquadest sampai tanda batas dan homogenkan. Pindahkan larutan ke dalam botol reagent yang bertutup rapat dan gelap. Simpan larutan BaCl₂ 1% dalam kulkas (Rosmania and Yanti, 2020).

(2) Pembuatan Larutan H₂SO₄ 1%

Siapkan labu ukur 100ml yang diisi ± 50ml aquadest. Pipet asam sulfat pekat sebanyak 1,02ml, masukan ke dalam labu ukur 100 ml melalui dinding secara mengalir. Tambahkan aquadest sampai tanda batas. Kemudian pindahkan larutan ke dalam botol reagent yang bertutup rapat. Larutan H₂SO₄ 1% disimpan pada suhu ruang (Rosmania and Yanti, 2020).

(3) Pembuatan Larutan McFarland 0,5.

Dipipet larutan BaCl₂ 1 % sebanyak 0,05 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dipipet larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 ml. Dicampurkan kedalam tabung reaksi yang sudah berisi larutan BaCl₂ 1%. Kemudian di vortex sampai tercampur sempurna. Penyimpanan larutan di dalam kulkas (Rosmania and Yanti, 2020).

(4) uji densitas standart Mc Farland

Mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 625 nm pada rentang 0,08 - 0,13 (Dalynn, 2014)

3) Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Mengambil bakteri uji yang telah diinokulasi menggunakan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% hingga kekeruhan sama dengan standar kekeruhan Mc. Farland. (Muljono dkk, 2016)

4) Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media Muller Hinton Agar dengan cara mengambil 100 µl dan diratakan dengan batang L. masing-masing cawan petri dibagi menjadi 3 bagian dan membuat lubang tegak lurus pada media. Selanjutnya lubang diisi dengan kontrol positif, kontrol negatif dan diambil ekstrak biji kakao sebanyak 40 µl konsentrasi 75%, yang sudah diekstraksi menggunakan metode

UAE dan soxhletasi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap metode ekstraksi yang digunakan. Selanjutnya cawan petri diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam (Agustin, 2022).

4.8 Teknik Analisa Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Aktivitas antibakteri diukur dengan mengukur diameter zona hambat *Staphylococcus aureus* menggunakan jangka sorong dalam satuan mm. adanya zona hambat ditandai dengan tidak ditemukan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada sekeliling sumuran

4.8.2 Analisa Data

Analisa data penelitian ini untuk identifikasi senyawa kimia dan analisis pada uji antibakteri *Staphylococcus aureus* dari ekstrak metanol keping biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan metode soxhletasi dan UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) yaitu dengan menggunakan analisis deskriptif

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Determinasi Tanaman Biji Kakao (*Theobroma cacao L*)

Determinasi dilakukan di UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu Politeknik Negeri Jember. Hasil determinasi menunjukkan bahwa biji kakao yang digunakan dalam penelitian dapat dipastikan tanaman yang diteliti adalah spesies *Theobroma cacao L.* dari family Sterculiaceae. Hasil identifikasi biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat dilihat pada lampiran 1.

5.2 Hasil Ekstraksi Biji Kakao (*Theobroma cacao L*)

Pada penelitian yang telah dilakukan dengan metode ekstraksi Soxhletasi dan UAE, masing-masing replikasi 3 kali dengan melarutkan 100 gram simplisia dalam pelarut metanol sebanyak 300 ml (Soxhletasi) dan 500 ml (UAE). Didapatkan rata-rata rendemen metode ekstraksi soxhletasi sebesar 3,81%, sedangkan pada metode ekstraksi UAE didapatkan rata-rata rendemen sebesar 4,18%. Hasil dari ekstraksi biji kakao dengan metode soxhletasi dan UAE ditunjukkan pada tabel di bawah ini:

Table 5.1 Hasil Ekstrak Kental dan % Rendemen

Metode Ekstraksi	Replikasi	Hasil Ekstrak Kental	Rata-rata ekstrak kental	% Rendemen	Rata-rata % Rendemen
Soxhletasi	1	3,75 gram	3,81 gram	3,75%	3,81±0,0022
	2	4,06 gram		4,06%	
	3	3,63 gram		3,63%	
UAE	1	4,19 gram	4,18 gram	4,19%	4,18±0,0012
	2	4,05 gram		4,05%	
	3	4,29 gram		4,29%	

5.3 Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia terhadap ekstrak metanol biji kakao dengan metode ekstraksi Soxhletasi dan UAE dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada biji kakao. Skrining fitokimis yang dilakukan meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan polifenol. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol biji kakao dapat dilihat pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia

Senyawa	Pereaksi	Hasil Menurut Literatur	Hasil pengamatan		kesimpulan
			Soxhletasi	UAE	
Alkaloid	Dragendroff	Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk endapan putih	+	+	Endapan kuning kejinggaan
	Mayer	Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk endapan kuning kejinggaan	+	+	Endapan putih
	Wagner	Hasil dinyatakan positif apabila terdapat endapan merah kecoklatan	+	+	Endapan merah kecoklatan
Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl	Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk warna kuning sampai jingga	+	+	Terjadinya perubahan warna jingga
Polifenol	FeCl ₃	Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk warna hijau atau biru yang kuat	+	+	Terjadinya perubahan warna biru
Tanin	FeCl ₃	Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk hitam kehijauan	+	+	Terjadinya perubahan hitam kehijauan
Saponin	Akuades	Hasil dinyatakan positif apabila terdapat busa yang stabil	+	+	Terbentuk busa 2 cm

5.4 Uji Antibakteri

Sebelum pengujian antibakteri dilakukan pengujian standar McFarland untuk menentukan konsentrasi bakteri pada saat pengujian. Hasil Uji McFarland 0,5 dengan panjang gelombang 625nm, didapat hasil absorbansi 0,091 dan untuk absorbansi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* didapat hasil absorbansi 0,091. Hasil pengujian McFarland dapat dilihat pada lampiran 8.

Pada pengujian aktivitas antibakteri biji kakao terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, perlakuan dibagi menjadi 3, yaitu ekstrak biji kakao (Soxhletasi/UAE), kontrol positif Levofloxacin dan kontrol negatif DMSO 10%. Hasil uji antibakteri biji kakao terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa ekstrak metanol biji kakao dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil uji antibakteri *Staphylococcus aureus* metode ekstraksi UAE memiliki zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan metode ekstraksi Soxhletasi. Zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* metode ekstraksi UAE dengan konsentrasi 75% memiliki rata-rata sebesar 12,29 mm \pm , sedangkan zona hambat bakteri *Staphylococcus aureus* metode ekstraksi soxhletasi konsentrasi 75% dengan rata-rata sebesar 10,097 mm. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kakao dapat dilihat pada tabel 5.3 dan lampiran 9.

Tabel 5.3 Hasil Pengujian Ekstrak Biji Kakao Terhadap Bakteri
Staphylococcus ureus

sampel	konsentrasi	replikasi	Zona Hambat (mm)	Rata- rata ± SD
Ekstrak Soxhletasi	75%	1	10,12	10,097 ± 0,83
		2	10,92	
		3	9,25	
levofloxacin (Kontrol positif)	0,5%	1	18,86	18,02 ± 0,85
		2	18,04	
		3	17,16	
DMSO (Kontrol Negatif)	10%	1	0	0
		2	0	
		3	0	
Ekstrak UAE	75%	1	12,83	12,29 ± 0,86
		2	11,3	
		3	12,74	
levofloxacin (Kontrol positif)	0,5%	1	18,38	18,4 ± 0,51
		2	18,92	
		3	17,9	
DMSO (Kontrol Negatif)	10%	1	0	0
		2	0	
		3	0	

5.5 Hasil Analisa Data

Hasil pengukuran zona hambat tersebut dilanjutkan dengan analisis deskriptif.

Tabel 5.4 Hasil Kategori zona Hambat Pengujian Ekstrak Biji Kakao Terhadap Bakteri *Staphylococcus ureus*

Sampel	konsentrasi	replikasi	Zona Hambat (mm)	Rata-rata \pm SD	Kategori Zona Hambat
Ekstrak Soxhletasi	75%	1	10,12	10,097 \pm 0,83	Kuat
		2	10,92		
		3	9,25		
levofloxacin (Kontrol positif)	0,5%	1	18,86	18,02 \pm 0,85	Kuat
		2	18,04		
		3	17,16		
DMSO (Kontrol Negatif)	10%	1	0	0	-
		2	0		
		3	0		
Ekstrak UAE	75%	1	12,83	12,29 \pm 0,86	Kuat
		2	11,3		
		3	12,74		
levofloxacin (Kontrol positif)	0,5%	1	18,38	18,4 \pm 0,51	Kuat
		2	18,92		
		3	17,9		
DMSO (Kontrol Negatif)	10%	1	0	0	-
		2	0		
		3	0		

BAB 6 PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menggunakan sampel biji kakao yang didapatkan dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri biji kakao terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan dua metode ekstraksi yaitu soxhletasi dan UAE dengan konsentrasi 75%. Sebelum dilakukan penelitian, sampel yang digunakan terlebih dahulu dilakukan uji determinasi, dengan tujuan untuk mengetahui secara jelas identitas pasti tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Diniatik, 2015). Hasil determinasi dari UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah biji kakao (*Theobroma cacao L.*).

Tahap pertama pada penelitian ini setelah sampel di dapat dilakukan ekstraksi serbuk biji kakao. Ekstraksi adalah suatu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa (analit) dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai (Leba, 2017). Metode Ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Soxhletasi dan UAE, Pelarut yang digunakan ialah metanol karena metanol merupakan pelarut polar yang memiliki kemampuan lebih baik dalam penarikan senyawa kimia dibandingkan dengan etanol. Pelarut metanol mempunyai kemampuan untuk menarik senyawa non-polar sampai dengan senyawa polar, sehingga penggunaan pelarut ini diharapkan mampu menyari metabolit sekunder seperti

flavanoid, tanin dan saponin yang terkandung dalam biji kakao (Kevin and Kadiwijati, 2018). Pada penelitian ini menggunakan perbandingan Soxhletasi 1:3 yaitu 100 gram sampel dan 300ml pelarut sedangkan metode UAE 1:5 yaitu 100 gram sampel dan 500ml pelarut, metode soxhletasi 3 kali replikasi dilakukan selama 6 hari dengan setiap harinya 7 siklus, 1 replikasinya selama 2 hari. Sedangkan metode UAE dilakukan selama 4 hari dengan setiap 1 kali UAE max 50 ml (8 gram serbuk biji kakao dan 40 ml pelarut metanol). Hasil dari ekstraksi UAE kemudian dilakukan penyaringan agar ampas biji kakao dapat terpisah. Hasil yang diperoleh dari kedua metode tersebut diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator pada suhu dibawah titik didih yaitu 50⁰C yang bertujuan agar dapat melindungi senyawa yang terkandung dalam pelarut. Hasil biji kakao yang diekstraksi dengan 3 kali replikasi didapatkan total rata-rata ekstrak kental metode soxhletasi 3,81 gram dengan rata-rata rendemen 3,81% dan total rata-rata metode UAE 4,18 gram dengan rata-rata rendemen 4,18%. Hasil rendemen tersebut berkaitan dengan senyawa aktif dalam sampel, sehingga semakin meningkat rendemen maka semakin banyak senyawa aktif yang terkandung dalam sampel. Menurut Harbone (1987) bahwa tingginya rendemen yang dihasilkan menunjukkan tingginya senyawa aktif dalam sampel. Presentase hasil rendemen dikatakan baik apabila rendemen mendekati 10% yang berarti senyawa metabolit yang diekstraksi berhasil terekstraksi, sehingga besar kecilnya nilai rendemen akan mempengaruhi aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini didapatkan hasil rendemen tidak mendekati 10% yaitu rata-rata rendemen metode soxhletasi 3,81% dan metode UAE 4,18% sehingga senyawa bioaktif tidak terekstrak optimal.

Pemilihan metode ekstraksi yang tepat mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap kualitas dan kuantitas kandungan senyawa kimia yang diekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat menjadi kunci keefektifan ekstraksi zat aktif dari bahan alam (Nazrun dkk., 2021). Pada penelitian ini menggunakan metode Soxhletasi karena termasuk metode panas yang sedikit menggunakan pelarut, dapat mengekstrak minyak lebih banyak, dan waktu ekstraksi lebih singkat (Pratama dkk, 2017) dan metode UAE dipilih karena memiliki proses ekstraksi yang cepat, dapat dilakukan pada suhu rendah yaitu suhu ruangan, lebih sedikit menggunakan pelarut, dan dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil. Metode ultrasonik merupakan metode ekstraksi yang lebih efektif untuk mengurangi ukuran partikel ekstrak (Putri and Prahasti, 2022).

Hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan uji identifikasi metabolit sekunder yaitu alkaloid dengan penambahan reagen dragendorf, mayer dan wagner. Flavonoid dengan penambahan serbuk mg dan HCl, Polifenol dengan penambahan FeCl₃, Tannin dengan penambahan FeCl₃, dan saponin dengan penambahan aquades. Uji identifikasi bertujuan untuk mengetahui komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel setelah proses penyaringan dan penguapan. Hasil yang didapat dari pengujian dua metode tersebut adalah pada reagen dragendorf terdapat endapan kuning kejinggaan, pada reagen meyer terdapat endapan putih dan reagen wegner terdapat endapan merah kecoklatan, hasil tersebut menunjukkan positif mengandung alkaloid. Pada reagen mg dan HCl terjadi perubahan warna jingga menunjukkan positif mengandung flavonoid. Pada

reagen FeCl_3 terjadi perubahan warna biru menunjukkan positif mengandung polifenol, pada reagen FeCl_3 juga terjadi perubahan warna hitam kehijauan menunjukkan positif mengandung tannin dan pada penambahan aquades terbentuk busa 2 cm menunjukkan positif mengandung saponin.

Tahap selanjutnya yaitu uji aktivitas antibakteri yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak biji kakao terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini menggunakan ekstrak metanol biji kakao konsentrasi 75% dengan kontrol positif levofloxacin karena memiliki sensitifitas baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan kontrol negatif DMSO 10% karena tidak memiliki efek antibakteri dan dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar serta larut dalam berbagai pelarut organik dan air karena termasuk senyawa organosulfur (Hidayah dkk., 2016). Metode yang digunakan untuk menghambat aktivitas antibakteri adalah metode sumuran. metode sumuran dipilih karena memiliki keunggulan dalam memudahkan pengukuran luas zona hambat yang terbentuk karena bakteri yang bekerja tidak hanya pada permukaan atas nutrisi agar tetapi juga bekerja hingga ke permukaan bawah (Nurhayati dkk, 2020). Dengan 3 kali replikasi, Metode ini dilakukan untuk mengetahui besarnya diameter zona hambat yang terbentuk pada *Staphylococcus aureus* setelah masa inkubasi selama 24 jam. Zona hambat merupakan daerah atau wilayah jernih yang tampak di sekeliling sumuran. Semakin besar diameter zonanya, berarti semakin besar daya antibakterinya (Elya dkk., 2016). Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu MHA (Mueller Hinton Agar) merupakan media pertumbuhan dan sebagai sumber nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak metanol biji kakao dengan metode soxhletasi dan UAE dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Kandungan biji kakao dapat menghambat pertumbuhan bakteri di media, Terbukti dengan adanya zona hambat di sekitar sumuran dan zona hambat tersebut diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian milimeter (mm). menurut (Wahyuningsih, Auliah and Salwi, 2020), adapun klasifikasi kategori zona hambat antibakteri ≥ 20 mm Sangat kuat, 10-20 mm Kuat, 5-10 mm Sedang, ≤ 5 mm Lemah.

Dari hasil pengukuran diameter zona hambat pada tabel 5.4 diperoleh rata-rata zona hambat pada ekstrak soxhletasi 75% tergolong kategori kuat, ekstrak UAE 75% tergolong kategori kuat, Kontrol positif (levofloxacin) tergolong kategori kuat, Fontrol negatif (DMSO) Tidak memiliki zona hambat.

Metode UAE memiliki daya hambat yang lebih besar dengan rata zona hambat 12,29 mm, dibandingkan dengan metode soxhletasi dengan rata-rata zona hambat 10,097 mm, hal tersebut dikarenakan pada metode UAE menghasilkan rendemen yang lebih besar daripada metode soxhletasi. Semakin besar zona hambat yang terbentuk, maka semakin besar juga metabolit sekunder yang dikandungnya seperti alkaloid, tannin, saponin, steroid dan flavonoid sehingga aktivitas antibakterinya semakin besar (Hidayah dkk, 2016).

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Kandungan senyawa dari ekstrak metanol biji kakao dengan metode UAE dan Soxhletasi antara lain adalah Alkaloid, Flavonoid, Polifenol, Tanin, dan Saponin.
2. Ekstrak metanol biji kakao yang diekstraksi dengan metode UAE dan Soxhletasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dibuktikan dengan rata-rata diameter zona hambat pada metode UAE 12,29 mm tergolong kategori kuat dan soxhletasi 10,097 mm tergolong kategori kuat.

7.2 Saran

1. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap ekstrak biji kakao dengan pelarut lain dan metode ekstraksi lain
2. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan bakteri gram negatif dan metode uji aktivitas antibakteri lainnya
3. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut pembuatan formulasi ekstrak biji kakao untuk pengobatan yang disebabkan bakteri *Staphylococcus aureus*.
4. Dapat dijadikan tambahan pengetahuan dan referensi potensi antibakteri serta dapat dikembangkan oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Kab. Jember dengan memanfaatkan kandungan senyawa biji kakao untuk

dijadikan produk baru yang bermanfaat selain produk makanan seperti formulasi sabun dari ekstrak biji kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, D.B. (2022) Pengaruh Metode Ekstraksi Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L*) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Streptococcus Mutans*.
- Agustina, S., Ruslan and Wiraningtyas, A. (2016) ‘Skrining Fitokimia Tanaman Obat Di Kabupaten Bima’, *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal Of Applied Chemistry)*, 4(1), pp. 71–76.
- Alouw, G., Fatimawali, F. and Lebang, J.S. (2022) ‘Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Pseudomonas aeruginosa* Dengan Metode Ddifusi Sumuran’, *Jurnal Farmasi Medica/Pharmacy Medical Journal (PMJ)*, 5(1), p. 36. Available at: <https://doi.org/10.35799/pmj.v5i1.41430>.
- Amelia, R. Asih, N.M. Lati, P. Sulastri, L. (2022) ‘Aktivitas Antifungi Ekstrak NADES Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis L*) Dan Daun Alpukat (*Persea americana*) Terhadap *Pityrosporum Ovale*’, *Medical Sains : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 7(1), pp. 135–144. Available at: <https://doi.org/10.37874/ms.v7i1.295>.
- Attahmid, N.F.U., Rauf, A. and Yusuf, M. (2021) ‘Formulasi minuman imunomodulator dari biji kakao pilihan klon Sulawesi Barat dengan penambahan kayu manis (*Cinnammomum cassia*)’, 21(2).
- Azis, W.A., Muriman, L.Y. and Burhan, S.R. (2020) ‘Hubungan Tingkat Pengetahuan dengan Gaya Hidup Penderita Diabetes Mellitus’, *Jurnal Penelitian Perawat Profesional*, 2(1), pp. 105–114. Available at: <https://doi.org/10.37287/jppp.v2i1.52>.
- Budaraga, I.K. and Putra, D.P. (2019) ‘Liquid Smoke Antimicrobial Test of Cocoa Fruit Peel Against *Eschericia coli* and *Staphylococcus aureus* Bacteria’, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 365(1). Available at: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/365/1/012049>.
- Bulu, A.T.I., Sunarni1, T. and Merari, J. (2019) ‘Uji Aktivitas Insektisida Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksan, Fraksi Kloroform, Dan Fraksi Air Dari Biji Pala (*Myristica fragrans Houtt*) Terhadap *Anopheles aconitus*’, 2(4), pp. 1–16.
- Candra, L.M.M., Andayani, Y. and Wirasisya, D.G. (2021) ‘Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Kandungan Fenolik Total dan Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*)’, *Jurnal Pijar Mipa*, 16(3), pp. 397–405. Available at: <https://doi.org/10.29303/jpm.v16i3.2308>.
- Chasanah, S.U. and Syarifah, N. (2017) ‘Hubungan Karakteristik Individu Penderita Hipertensi Dengan Derajat Hipertensi di Puskesmas Depok II

- Sleman Yogyakarta', *Jurnal Formil (Forum Ilmiah) KesMas Respati*, 2(1), pp. 1–9.
- Dalynn, B. (2014) 'McFarland Standard', in *Dalynn Biological*. Canada. Available at: http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf.
- Dame J Pohan, Angela P Kakerissa, E.S.A. (2020) 'Effectiveness Test of Cocoa Seed (*Theobroma Cacao L.*) Extract as an Antibacterial in Various Concentrations on *Streptococcus pyogenes*', *Majalah Kedokteran UKI 2020 Vol XXXVI*, XXXVI(1), pp. 8–13.
- Dewi, A.T., Romadhoni, F., Qadariyah, L., Mahfud. (2018) 'Potensi Klorofil Ekstrak Mikroalga Hijau (*Chlorella sp.*) dan Daun Suji (*Pleomele angustifolia*) Menggunakan Metode Soxhlet sebagai Dye Sensitizer pada Dye Sensitized Solar Cells (DSSC)', *Jurnal Teknik ITS*, 7(1), pp. 124–126. Available at: <https://doi.org/10.12962/j23373539.v7i1.28744>.
- Diniatik (2015) 'Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanolik Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol (Bl.) Hook f. & Th.*) Dengan Metode Spektrofotometri', *Pharmaqueous : Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(1), pp. 46–56. Available at: <https://doi.org/10.36760/jp.v3i1.269>.
- Elya, B., Kusuma, I.M., Jufri, M., Handayani, R.. (2016) 'Antibacterial tests against acne in vitro, the physical stability and patch test using cream containing ethyl p-methoxycinnamate extracted from *Kaempferia galanga L.*, Rhizoma', *Research Journal of Medicinal Plant*, 10(8), pp. 426–434. Available at: <https://doi.org/10.3923/rjmp.2016.426.434>.
- Garaika, D. and Darmanah, S.E., M. (2017) *Metodologi Penelitian*.
- Hafiz Ramadhan, Muhammad Arsyad and Putri Indah Sayakti (2020) 'Skrining fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Biji Kalangkala (*Litsea angulata Bl.*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat *Propionibacterium acnes*', *Borneo Journal of Pharmascientech*, 4(1), pp. 60–70. Available at: <https://doi.org/10.51817/bjp.v4i1.283>.
- Hartati Salleh, L., Azis, A.A., Azizi, M.c.Y.. (2013) 'Pengaruh Jenis pelarut Ekstraksi Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni Jacq*) Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Antibakteri', *Bionature*, 14(1), pp. 11–15. Available at: <http://eprints.unm.ac.id/id/eprint/14541>.
- Hayati, L.N., Tyasningsih, W., Praja, R.N., Chusniati, S., Yunita, M.N., Wibawati, P.A.. (2019) 'Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* pada Susu Kambing Peranakan Etawah Penderita Mastitis Subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi', *Jurnal Medik Veteriner*, 2(2), p. 76. Available at: <https://doi.org/10.20473/jmv.vol2.iss2.2019.76-82>.

- Herman Septriyanti, I. Ramadhani, T.R. Ade, P. Yulis, R. Putra, A.Y.. (2020) 'Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*)', *JEDCHEM (Journal Education and Chemistry*, 2(2), pp. 57–61.
- Hidayah, N. Hisan, A.K. Solikin, A. Irawati, I. Mustikaningtyas, D. (2016) 'Uji Efektivitas Ekstrak Sargassum muticum Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*', *Journal of Creativity Student*, 1(2). Available at: <https://doi.org/10.15294/jcs.v1i2.7794>.
- Hidayat, N. Yati, K. Krisanti, E.A. Gozan, M.. (2019) 'Extraction and antioxidant activity test of black Sumatran incense', *AIP Conference Proceedings*, 2193(December). Available at: <https://doi.org/10.1063/1.5139354>.
- Hujjatusnaini, N., Indah, B., Afitri, E., Widyastuti, R. and Ardiansyah, A. (2021) Buku Referensi Ekstraksi., Insitut Agama Islam Negeri Palangkaraya Fakuktas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan MIPA-Program Studi Tadris Biologi.
- Kementerian pertanian republik Indonesia (2019) *Hulu Hilir Kakao*. Pusat Perpustakaan dan Penyebaran Teknologi Pertanian.
- Kevin and Kadiwijati, L.R. (2018) 'Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Ekstrak Metanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) terhadap Aktivitas Antibakteri pada Bacteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* secara In Vitro'.
- Khinanty, N. (2015) Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Pelepah Pisang Ambon (*Musa paradisiaca Linn .*) terhadap *Propionibacterium acnes*, *Jurnal Cerebellum*.
- Kusuma, G.F., Mahardika, R.G. and Sari, F.I.P. (2022) 'Ekstrak Batang Pelawan (*Tristanopsis merguensis Griff.*) sebagai Antibakteri pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*', *Stannum : Jurnal Sains dan Terapan Kimia*, 4(2), pp. 40–46. Available at: <https://doi.org/10.33019/jstk.v4i2.3063>.
- Laia, H.C.G. Yusliana. Daeli, Pieter J. Sarwendah. Chiuman, L. (2019) 'Uji Antibakteri Air Perasan Daging Buah Nanas (*Ananas Comosus (L) Merr*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*', *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 15(2), p. 170. Available at: <https://doi.org/10.24853/jkk.15.2.170-177>.
- Lasmini, T., Hartini, H., Saphira, A., Lincy Dos Marlina, B., & Margaretta, T. S. (2022). Identifikasi *Staphylococcus aureus* Pada SWAB Rongga Hidung Penjamah Makanan Di Jalan Durian Kota Pekanbaru. *Prosiding Asosiasi Institusi Pendidikan Tinggi Teknologi Laboratorium Medik Indonesia*, 1, 281-292.
- Leba, M.A.U. (2017) *ekstraksi*. DEEPUBLISH.

- Leonardy, C., Nurmainah and Riza, H. (2019) 'Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Infusa Kulit Buah Nanas (*Ananas comosus* (L .) Merr) pada Variasi Usia Kematangan Buah', *Jurnal untan*, pp. 1–15.
- Lestari, E.D., Tivani, I. and Susiyarti (2021) 'Perbandingan Efektivitas Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* secara In Vitro', *parapemikir : Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(x).
- Mandhaki, N., Huda, C. and Putri, A.E. (2021) 'Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro', *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(2), pp. 188–193. Available at: <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i2.269>.
- Mangiwa, S. and Maryuni, A.E. (2020) 'Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Sifat Fisik dan Kimia Ekstrak Biji Kopi Sangrai', *Jurnal Kimia*, 4(1), pp. 31–40.
- Manongko, P.S., Sangi, M.S. and Momuat, L.I. (2020) 'Uji Senyawa Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)', *Jurnal MIPA*, 9(2), p. 64. Available at: <https://doi.org/10.35799/jmuo.9.2.2020.28725>.
- Mansinhos, I. Gonçalves, S. Rodríguez-Solana, R. Ordóñez-Díaz, J.L. Moreno. Rojas, J.M. Romano, A.. (2021) 'Ultrasonic-assisted extraction and natural deep eutectic solvents combination: A green strategy to improve the recovery of phenolic compounds from *lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (chaytor) franco', *Antioxidants*, 10(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox10040582>.
- Martono, B. (2014) 'Karakteristik Morfologi Dan Kegiatan Plasma Nutfah Tanaman Kakao', *Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao*, pp. 15–28.
- Menon, S. and satria, A. (2017) 'Mengkaji aktivitas antibakteri nasturtium officinale dan ekstrak etanol Pilea melastomoides terhadap *Escherichia coli*', *Farmaka Suplemen*, 15(1), pp. 63–69.
- Muljono, P., Fatimawali and Manampiring, A.E. (2016) 'Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun mayana jantan (*Coleus atropurpureus* Benth) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus* Sp. dan *Pseudomonas* Sp.', *Jurnal e-Biomedik*, 4(1), pp. 164–172. Available at: <https://doi.org/10.35790/ebm.4.1.2016.10860>.
- Mulyatni, A., Budiani, A. and Taniwiryo, D. (2012) 'Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*', *E-Journal Menara Perkebunan*, 80(2), pp. 77–84. Available at: <https://doi.org/10.22302/ppbbi.jur.mp.v80i2.39>.

- Nasution, S. (2017) 'Variabel penelitian', *Raudhah*, 05(02), pp. 1–9. Available at: <http://jurnaltarbiyah.uinsu.ac.id/index.php/raudhah/article/view/182>.
- Nazrun. Hidayatiandri, N. Susanti. Mahardika, R.G.. (2021) 'Potensi *Stenochlaena palustris* Burm. Sebagai Agen Antiinflamasi Berdasarkan Metode Ekstraksi PEF (*Pulsed Electric Field*): Sebuah Kajian Naratif', *Jurnal Sains dan Edukasi Sains*, 4(2), pp. 66–74. Available at: <https://doi.org/10.24246/juses.v4i2p66-74>.
- Nuraeni Anisa Dwi and Kodir, R.A. (2021) 'Uji Aktivitas Antibakteri *Propionibacterium acnes* Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Karuk (*Piper sarmetosum* Roxb. Ex. Hunter) serta Analisis KLT Bioautografi', *Jurnal Riset Farmasi*, 11(1), pp. 9–15. Available at: <https://doi.org/10.29313/jrf.v1i1.26>.
- Nurhamidin, A.P.R., Fatimawali, F. and Antasionasti, I. (2021) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak n-Heksan Biji Buah Langsung (*Lansium domesticum* Corr) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Klebsiella pneumoniae*', *Pharmakon*, 10(1), p. 748. Available at: <https://doi.org/10.35799/pha.10.2021.32772>.
- Nurhayati, L.S., Yahdiyani, N. and Hidayatulloh, A. (2020) 'Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram', *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), p. 41. Available at: <https://doi.org/10.24198/jthp.v1i2.27537>.
- Pajan, S. A. (2016). Potensi antibakteri air perasan bawang putih (*Allium sativum* L) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Pharmakon*, 5(4).
- Pratama, R.N., Widarta, I.W.R. and Darmayanti, L.P.T. (2017) 'Pengaruh Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi Dengan Metode Soxhletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.)', *Media Ilmiah Teknologi Pangan*, 4(2), pp. 85–93.
- Pratiwi, S.T. (2008) *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Puji Rahayu Ningsih (2018) Terapi Shalawat Untuk Mengurangi Tingkat Agresivitas Remaja Di Dusun Krajan Desa Rejosari Kecamatan Kalidawir Kabupaten Tulungagung. Institut Agama Islam Negeri (IAIN) Tulungagung
- Purnamaningsih, N., Kalor, H. and Atun, S. (2017) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923', *Jurnal Penelitian Saintek*, 22.
- Puspitasari, A.D. and Prayogo, L.S. (2017) 'Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*)', *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*,

1(2), pp. 1–8.

- Puspitasari, D.R.A., Sari, N.L.P.A. and Monika, N.L.G.M. (2020) ‘Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Cabe Jawa (*Piper retrofractum*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*’, *Jurnal Pharmactive*, 1(1), pp. 7–10. Available at: <https://ejournal.akademikesehatanbintangpersada.ac.id/index.php/jpharmactive/article/view/4/4>.
- Putri, K.K.Z. and Prahasti, A.E. (2022) ‘Pengaruh Metode Maserasi dan Ultrasonik terhadap Ukuran Partikel Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao*) metode maserasi dan ultrasonik’, *Faculty of Dentistry, Trisakti University, Jakarta, Indonesia*, 4(1), pp. 4–6.
- Raisita, F. (2018). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Cengkeh Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Klebsiella pneumonia* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Semarang).
- Riyanti, A. (2022) Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao L.*) Pada Jenis Dan Dosis Limbah Pertanian Sebagai Media Tanam. Universitas Muhammadiyah Makassar.
- Romadon, A. (2019) Pemberian Tanah Mineral Dan Zeolit Untuk Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao L.*) Di Media Tanah Gambut. Universitas Batang. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-76887-8%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/978-3-319-93594-2%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00007-3%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/s41559-019-0877-3%0Aht>.
- Rosmania, R. and Yanti, F. (2020) ‘Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri’, *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), p. 76. Available at: <https://doi.org/10.56064/jps.v22i2.564>.
- Rosselita, p. d. (2020) Pembuatan Liqueur Beraroma Buah Carica dengan Metode Perkolasi.
- Saputri, I.A. (2016) ‘Pengaruh Waktu dan Temperatur Terhadap ekstraksi Saponin Buah Mengkudu Sebagai Bahan baku Pembuatan Deterjen’, *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 152(3), p. 28. Available at: file:///Users/andreataquez/Downloads/guia-plan-de-mejora-institucional.pdf%0Ahttp://salud.tabasco.gob.mx/content/revista%0Ahttp://www.revistaalad.com/pdfs/Guias_ALAD_11_Nov_2013.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.60060.%0Ahttp://www.cenetec.
- Setiawan, T. (2018) ‘Rancang Bangun Alat Destilasi Uap Bioetanol Dengan Bahan Baku Batang Pisang’, *Jurnal Media Teknologi*, 4(2), pp. 119–128.

- Setiyo, C. and Rochmah, J. (2020) *Bakteriologi Dasar*.
- Setiyono, R.T. (2014) 'Bahan Tanaman Unggul Mendukung Bioindustri Kakao Superior Planting Materials To Support Cacao Bioindustry', *Inovasi Teknologi Bioindustri Kakao*, pp. 3–14.
- Setyantoro, M.E., Haslina, H. and Wahjuningsih, S.B. (2019) 'Pengaruh Waktu Ekstraksi Dengan Metode Ultrasonic Terhadap Kandungan Vitamin c, Protein, Dan Fitokimia Ekstrak Rambut Jagung (*Zea mays L.*)', *Jurnal Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian*, 14(2), p. 53. Available at: <https://doi.org/10.26623/jtphp.v14i2.2445>.
- Sholihah, M., Ahmad, U. and Budiastira, I.W. (2017) 'Aplikasi Gelombang Ultrasonik untuk Meningkatkan Rendemen Ekstraksi dan Efektivitas Antioksidan Kulit Manggis', *Jakarta*, 5, pp. 161–168.
- SINDI, N. A. (2022). Uji Efektivitas Sediaan Spray Hand Sanitizer Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium Polyanthum Leaves*) Dengan Metode Difusi Cakram (Doctoral dissertation, Stikes_Banyuwangi).
- Soedarto (2015) *Mikrobiologi Kedokteran*. Available at: http://www.joi.isoss.net/PDFs/Vol-7-no-2-2021/03_J_ISOSS_7_2.pdf.
- Sudarwati, T.P.L. and Fernanda, M.A.H.F. (2019) Aplikasi Pemanfaatan Daun Pepaya (*Carica papaya*) Sebagai Biolarvasida Terhadap Larva *Aedes aegypti*, *Nucl. Phys.* Edited by E.N.R. Hariyati. Graniti.
- Sudibyoy, A. (2012) 'Peran Cokelat sebagai Produk Pangan Derivat Kakao yang Menyejahterakan', *Jurnal Riset, Industri*, VI(1), pp. 23–40.
- Sugiharti, E. (2016) *budidaya kakao.pdf*.
- Sugiyono (2016) *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.
- Sutomo, N., Hariyadi, B.W. and Ali, M. (2017) 'Budidaya Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*)', *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health: Second Edition*, 2, pp. 921–939. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch43>.
- Suyono. and Carnovia, C. (2019) 'Sistem Pendukung Keputusan Menentukan Hama Penyakit', *Jurnal Sistem Informasi dan Telematika ISSN*, 10, pp. 78–87.
- Towaha, J. (2014) 'Kandungan Senyawa Polifenol Pada Biji Kakao Dan Kontribusi Terhadap kesehatan', *Sirinov*, 2(no 1), pp. 1–16.
- Wahyuningsih Darajati Pratiwi, S. Herwinda, E. Radiansyah, A.D. Nalang, V.S

- Nooryanto, B. Rahajoe, J.S. Ubaidillah, R. Maryanto, I. Kurniawan, R. Prasetyo, T.A. Rahim, A. Jefferson, J. Hakim, F. (2016) Indonesia Biodiversity Strategi and Action Plan 2015-2020, *Kementerian Perencanaan dan pembangunan Nasional/BAPPENAS*.
- Wahyuningsih, S., Auliah, N. and Salwi, S. (2020) 'Mouthwash Jus Buah Nanas (*Ananas comosus L. Merr*) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*', *Jurnal Kesehatan*, 13(2), p. 171. Available at: <https://doi.org/10.24252/kesehatan.v13i2.16423>.
- Wicaksana, A.P. (2022) *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Keping Biji Coklat (Theobroma cacao L.) Dengan Metode DPPH (1, 1-Diphenyl-2-Picryl Hidrazil)*. Universitas dr.Soebandi Jember.

Lampiran 2. Surat Hasil Determinasi Tanaman



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
UPA. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 88/PL17.8/PG/2023

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 2197/FIKES.UDS/U/V/2023 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Nailiyatul Hikmiah
NIM : 19040087
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 16 Mei 2023
Ka. UPA. Pengembangan Pertanian Terpadu

If Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM
NIP. 197106212001121001

Lampiran 3. Dokumentasi Proses pembuatan serbuk kakao



Pemecah dan pemisah biji kakao



Pemeras lender biji kakao pra fermentasi



Fermentasi biji kakao



Sangrai biji kakao



Biji kakao



Pemisah kulit dan nub



Pembuatan pasta biji kakao



Defating (penghilangan lemak kakao)



Pemisah lemak dan bungkil



Pembubukan biji kakao



Pengayakan bubuk biji kakao



Sangrai bubuk biji kakao



Bubuk biji kakao

Lampiran 4. Hasil Ekstraksi Biji Kakao

Ekstraksi Soxhletasi



Penimbangan Ekstrak
(Replikasi 3x)



Proses Ekstraksi Soxhletasi



Pengentalan ekstrak

Ekstrak Kental



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Ekstraksi UAE



1 replikasi 100 gram



Alat UAE



Setiap 1 kali ekstraksi UAE
8gram (1 replikasi = 13 kali
Ekstraksi UAE)
Penimbangan Ekstrak
(Replikasi 3x)



Proses Ekstraksi UAE



Pengentalan ekstrak

Ekstrak Kental



Replikasi 1



Replikasi 2



Replikasi 3

Lampiran 5. Perhitungan Hasil Ekstraksi

- Soxhletasi

Bobot simplisia awal = 100 gram

$$\begin{aligned}
 1. \quad \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{3,75 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% = 3,75\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \quad \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{4,06 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% = 4,06\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \quad \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{3,63 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% = 3,63\%
 \end{aligned}$$

- UAE

Bobot simplisia awal = 100 gram

$$\begin{aligned}
 1. \quad \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{4,19 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% = 4,19\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \quad \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{4,05 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% = 4,05\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \quad \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\
 &= \frac{4,29 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100\% = 4,29\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 6. Skrining Fitokimia**Soxhletasi****Alkaloid****Flavonoid****Polifenol****Tannin****Saponin**

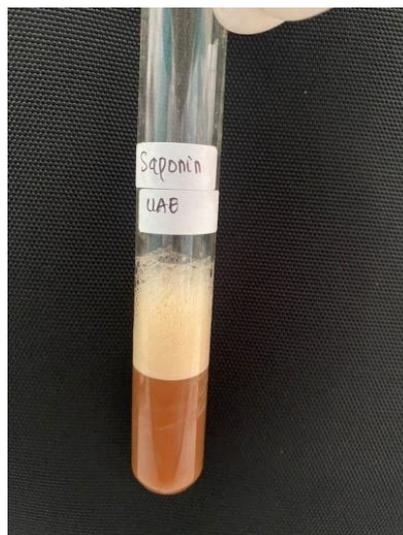
UAE



Alkaloid

Flavonoid

Polifenol



Tanin

Saponin

Lampiran 7. Surat Keterangan Isolat *Staphylococcus aureus*



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Bumi Tegalboto Jember 68121
Telepon: 0331-332988, 330738 Fax: 0331-334988 Laman: www.fkip.unej.ac.id

SURAT KETERANGAN ISOLAT

No: 009/ISOLAT/VI/2023

Diberikan kepada : Nailiyatul Hikmiyah
Asal Instansi : Universitas dr. Soebandi

Menyatakan bahwa;

Isolat bakteri yang dibeli merupakan isolat *Staphylococcus aureus*

Isolat	Media	Kemasan	Warna koloni	Bentuk sel (gram)
<i>S. aureus</i>	MSA (Mannitol Salt Agar)	Tube (tabung reaksi/agar slant)	Koloni bewarna putih/kekuningan, dengan adanya perubahan warna pada medium dari merah menjadi kuning	Coccus, gram +

Jember, 6 Juni 2023
Kepala Laboratorium P. Biologi,

Kamalita Ekri, S.Pd., M.Pd.
NIP. 19840223 201012 2 004

Lampiran 8. Specification Muller-Hinton Agar



Specification

1.05437.0500 MUELLER-HINTON agar for testing the sensitivity of clinically important pathogens

Specification	
Appearance (clearness)	clear to opalescent
Appearance (colour)	yellowish-brown
pH-value (25 °C)	7.2 - 7.6
Solidification behaviour (2 hrs., 40 °C)	liquid

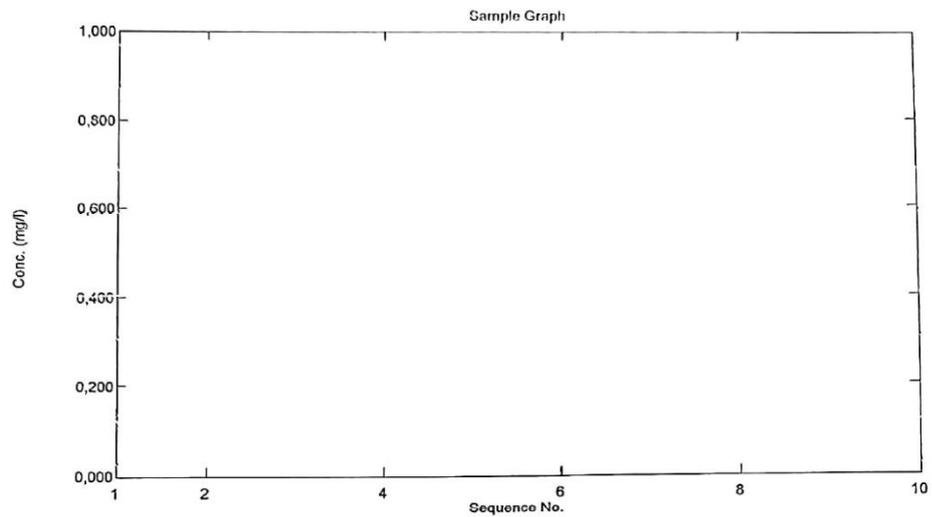
Specification		
Inhibition zone diameter/Ampicillin 10 µg (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	16 - 22	mm
Inhibition zone diameter/Tetracyclin 30 µg (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	18 - 25	mm
Inhibition zone diameter/Gentamicin 10 µg (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	19 - 26	mm
Inhibition zone diameter/Polymyxin B 300 U/IE (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	12 - 17	mm
Inhibition zone diameter/SXT 1.25 µg + 23.75 µg (Escherichia coli ATCC 25922 (WDCM 00013))	24 - 32	mm
Inhibition zone diameter/Ampicillin 10 µg (Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034))	27 - 35	mm
Inhibition zone diameter/Tetracyclin 30 µg (Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034))	19 - 28	mm
Inhibition zone diameter/Gentamicin 10 µg (Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034))	19 - 27	mm
Inhibition zone diameter/Polymyxin B 300 U/IE (Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034))	7 - 13	mm
Inhibition zone diameter/SXT 1.25 µg + 23.75 µg (Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034))	24 - 32	mm
Inhibition zone diameter/Gentamicin 10 µg (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025))	16 - 23	mm
Inhibition zone diameter/SXT 1.25 µg + 23.75 µg (Enterococcus faecalis ATCC 33186)	≥ 20	mm

Incubation: 24 hrs.; 35 °C; aerobic.

Lampiran 9. Hasil *Mc Farland***Sample Table Report**

12/06/2023 13:33:15

File Name: C:\Users\ACER\Documents\bakteri tim\NL.pho



Sample Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL625,0	Comments
1	StandartMcFa	Unknown		*****	0.091	
2	Aureus	Unknown		*****	0.091	
3						

Lampiran 10. Perhitungan

- a. Perhitungan Konsentrasi ekstrak

$$\text{Konsentrasi } 75\% = \frac{75}{100} 5\text{ml} = 3,75 \text{ gram} \rightarrow \text{ad } 5 \text{ ml aquadest}$$

- b. Perhitungan Kontrol Positif

$$5\mu\text{g/disc} \rightarrow 0,5\text{mg dalam } 100 \text{ ml aquades}$$

- c. Perhitungan McFarland 0,5

- Asam Sulfat 1% = 9,95 mL

- BaCl 1% = 0,05 mL

BaCl 1% 1 gram \rightarrow 100 mL

X gram \rightarrow 100 mL

X = 1 gram dalam 100 mL aquades

H₂SO₄ 1% 1mL \rightarrow 100 mL

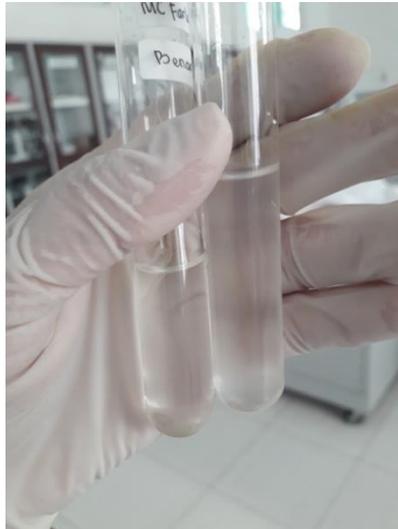
X gram \rightarrow 100 mL

X= 1 mL dalam 100 mL aquades

Lampiran 11. Dokumentasi Uji Antibakteri



Sterilisasi



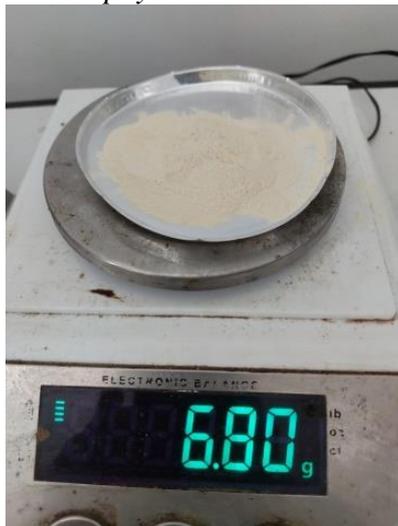
Mc Farland dan Suspensi *Staphylococcus aureus*



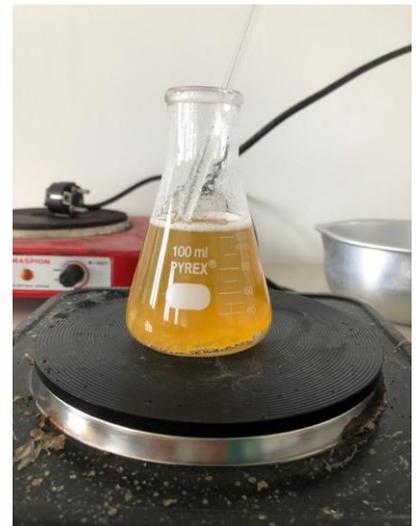
Media NA



Peremajaan bakteri



Penimbangan media MHA



Media MHA



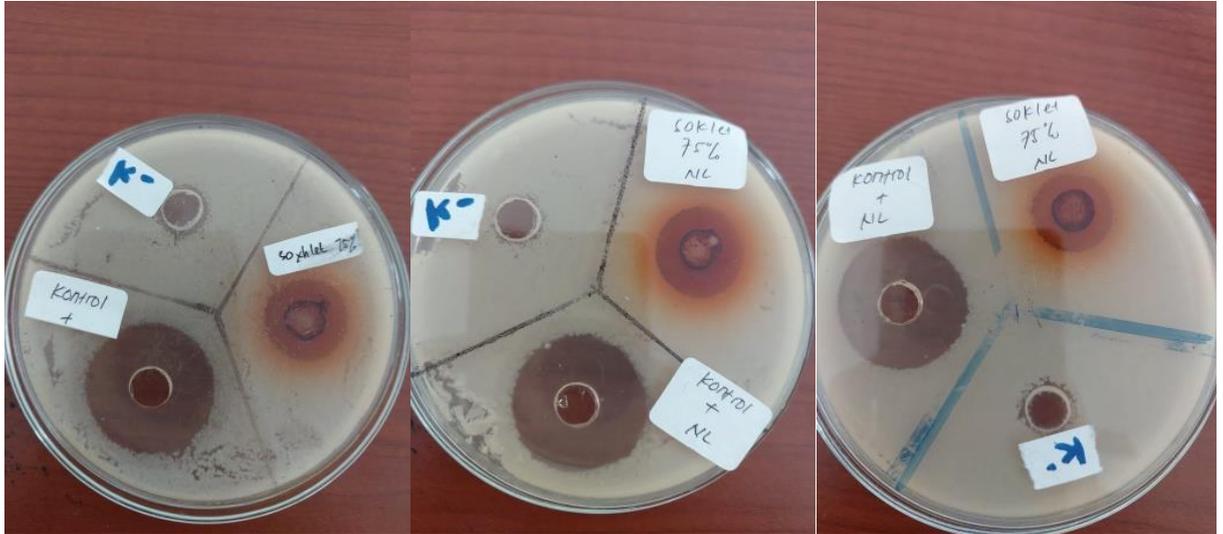
Pengujian Antibakteri



Inkubasi Bakteri

Lampiran 12. Hasil Uji Antibakteri *Staphylococcus aureus*

Soxhletasi

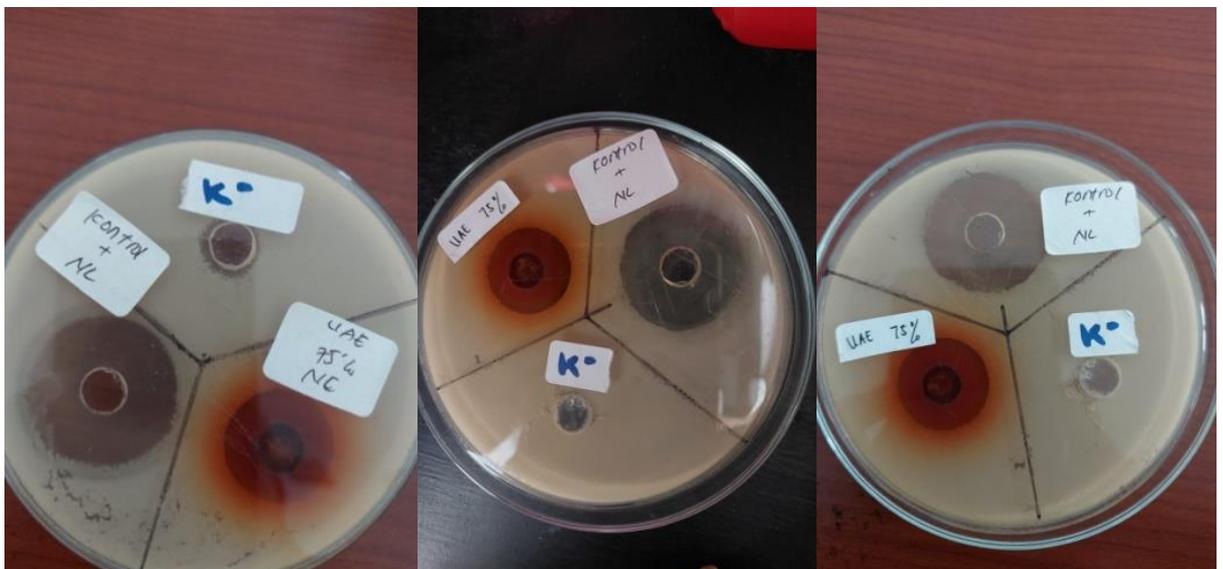


Replikasi 1

Replikasi 2

Replikasi 3

UAE



Replikasi 1

Replikasi 2

Replikasi 3

