

**AKTIVITAS ANTIJAMUR EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO  
(*Theobroma cacao* L.) DENGAN *NATURAL DEEP EUTECTIC  
SOLVENT* TERHADAP *Candida albicans***

**SKRIPSI**



**Oleh:  
Retno Triasih  
NIM 18040088**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI  
FAKULTAS ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI  
2022**

**AKTIVITAS ANTIJAMUR EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO  
(*Theobroma cacao* L.) DENGAN *NATURAL DEEP EUTECTIC  
SOLVENT* TERHADAP *Candida albicans***

**SKRIPSI**

Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



Oleh:  
**Retno Triasih**  
**NIM 18040088**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI  
FAKULTAS ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI  
2022**

## 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, 23 September 2022

Pembimbing Utama,



Lulut Sasmito, S.Kep.,Ns.,M. Kes  
NIDN. 4009056901

Pembimbing Anggota,



Aliyah Purwanti, M. Si  
NIDN. 0709129002

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul *Aktivitas Antijamur Ekstrak Kulit Biji Kakao (Theobroma cacao L.) dengan Natural Deep Eutectic Solvent Terhadap Candida albicans* telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

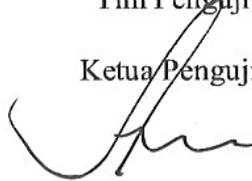
Hari : Jumat

Tanggal : 23 September 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi

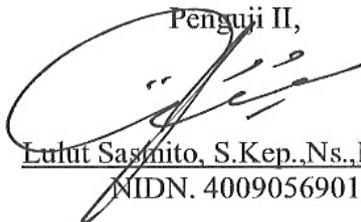
Tim Penguji

Ketua Penguji,



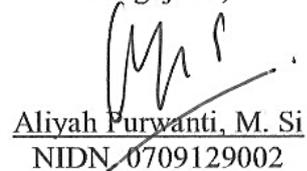
Syaiful Bachri, S.KM., M.Kes  
NIDN. 402001620

Penguji II,



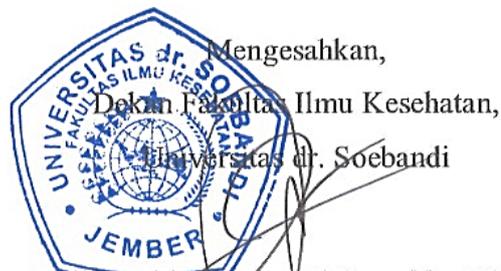
Lulut Sasmito, S.Kep.,Ns.,M. Kes  
NIDN. 4009056901

Penguji III,



Aliyah Purwanti, M. Si  
NIDN. 0709129002

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,  
Universitas dr. Soebandi



Hella Meldy Kursina, S.Kep., Ns., M.Kep  
NIDN. 0706109104

## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Retno Triasih  
NIM : 18040088  
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, 23 September 2022

Yang menyatakan,



Retno Triasih

# **SKRIPSI**

## **AKTIVITAS ANTIJAMUR EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao L.*) DENGAN *NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT* TERHADAP *Candida albicans***

Oleh:

Retno Triasih

NIM. 18040088

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Lulut Sasmito, S.Kep.,Ns.,M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

## **PERSEMBAHAN**

Dengan segenap usaha dan teriring ucapan syukur Penulis panjatkan kepada Allah SWT, karenaNyalah Penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini. Skripsi ini dengan sepenuh hati saya persembahkan kepada:

1. Kedua orangtua tercinta, Bapak H. Suroto, S.T., M.Si dan Ibu Hj. dr. Endang Sulistyowati Eko Rahayu, M.Kes., berkat cinta dan kasih sayang serta keteguhan dan kesabaran beliau, baik suka maupun duka dalam mendidik selama ini, dan tidak hentinya memberikan doa, semangat dan pengorbanan baik moril maupun materil kepada penulis selama ini.
2. Suami dan putra tercinta, Yuris Wicaksono Aji dan Muhammad Kenzie Xavier, kalian adalah sumber motivasi terbesar bagi Penulis.
3. Almamater Universitas dr. Soebandi.
4. Seluruh staff dan dosen pengajar Fakultas Ilmu Kesehatan Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.
5. Semua teman dan sahabat Penulis, yang tidak dapat dituliskan satu-persatu.

## **MOTTO**

“Apapun yang menjadi takdirmu, akan mencari jalannya menemukanmu”

(Ali bin Abi Thalib)

## ABSTRAK

Triasih, Retno\* Sasmito, Lulut\*\* Purwanti, Aliyah\*\*\*.2022. Aktivitas Antijamur Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan *Natural Deep Eutectic Solvent* Terhadap *Candida albicans*. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi.

**Latar Belakang:** Kulit biji kakao adalah limbah utama dari industri pembuatan coklat yang pemanfaatannya kurang dimaksimalkan. Salah satu tujuan terpenting dari *green chemistry* adalah menemukan *green solvent* untuk menggantikan pelarut organik yang saat ini digunakan. *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) adalah salah satu alternatif pelarut ramah lingkungan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antijamur dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* terhadap *Candida albicans*. **Metode:** Rancangan penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan dua jenis *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES), kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol menggunakan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), dilanjutkan dengan uji kandungan metabolit sekunder dan uji antijamur terhadap *Candida albicans* menggunakan metode sumuran dengan konsentrasi masing-masing pelarut yang digunakan adalah 100mg/mL dengan 6 kali replikasi. **Hasil Penelitian:** Hasil penelitian kandungan metabolit sekunder menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol sama-sama positif mengandung alkaloid, flavonoid dan saponin. Hasil uji antijamur menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol menghasilkan diameter zona hambat sebesar  $18,66 \pm 2,49$  mm dan  $16,31 \pm 2,85$  mm. **Kesimpulan:** Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*. Berdasarkan hasil uji statistik tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik pada ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

**Kata Kunci:** *Candida albicans*, kulit biji kakao, *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES), *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), *Theobroma cacao* L.

\*Peneliti

\*\*Pembimbing 1

\*\*\*Pembimbing 2

## ABSTRACT

Triasih, Retno\* Sasmito, Lulut\*\* Purwanti, Aliyah\*\*\*.2022. Antifungal Activity of Cocoa Bean Shell Extract (*Theobroma cacao L.*) with Natural Deep Eutectic Solvent against *Candida albicans*. Thesis. Pharmacy Undergraduate Study Program, Health Faculty University of dr. Soebandi.

**Introduction :** Cocoa bean shell is the main waste from the chocolate factory whose utilization is not maximize. One of the most important goals of green chemistry is to find a green solvent to replace the organic solvents currently in use Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) are an alternative to environmentally friendly solvents. This study aimed to test the antifungal activity of cocoa bean shell extract (*Theobroma cacao L.*) was extracted using Natural Deep Eutectic Solvent against *Candida albicans*. **Methods :** The design of this research used an experimental study with two different Natural Deep Eutectic Solvent (NADES), choline chloride-malic acid and choline chloride-glycerol with Ultrasound Assisted Extraction (UAE), followed by a secondary metabolite content test and an antifungal test against *Candida albicans* was tested using the well method with the concentration of each solvent used is 100mg/mL with 6 times replication. **Result :** The results of the secondary metabolite content showed that cocoa bean shell extract with NADES choline chloride-malic acid and choline chloride-glycerol were both positive for alkaloids, flavonoids, and saponins. The results of the antifungal test NADES choline chloride-malic acid and choline chloride-glycerol resulted in inhibition zone diameters of  $18.66 \pm 2.49$  mm and  $16.31 \pm 2.85$  mm. **Conclusion :** Cocoa bean shell extract (*Theobroma cacao L.*) using NADES choline chloride-malic acid and choline chloride-glycerol have antifungal activity against *Candida albicans*. Based on the results of statistical tests, there was no statistically significant difference in cocoa bean shell extract using NADES choline chloride-malic acid and NADES choline chloride-glycerol in inhibiting the growth of *Candida albicans*.

**Keywords :** *Candida albicans*, Cocoa Bean Shell, Natural Deep Eutectic Solvent (NADES), *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), *Theobroma cacao L.*

\* Researcher  
\*\* Advisor 1  
\*\*\* Advisor 2

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa atas segala berkat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antijamur Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan *Natural Deep Eutectic Solvent* terhadap *Candida albicans*”.

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

1. Drs. Said Mardijanto, S.Kep., MM selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kep selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. Apt. Dhina Ayu Susanti, M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
4. Lulut Sasmito, S.Kep., Ns., M. Kes selaku pembimbing utama
5. Aliyah Purwanti, S.T, M.Si selaku selaku pembimbing anggota
6. Syaiful Bachri, S.KM., M.Kes selaku ketua penguji

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga penulis mengharapkan kritik serta saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

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

Jember, 23 September 2022

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI</b> .....	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xviii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus .....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Bagi Ilmu Kefarmasian.....	7
1.4.2 Bagi Farmasi .....	7
1.4.3 Bagi Institusi Pendidikan.....	8
1.4.4 Bagi Peneliti.....	8
1.5 Keaslian Penelitian .....	8

<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>11</b>
2.1 Tanaman Kakao ( <i>Theobroma cacao</i> L.).....	11
2.1.1 Sejarah Tanaman Kakao .....	11
2.1.2 Taksonomi Tanaman Kakao .....	11
2.1.3 Morfologi Tanaman Kakao.....	12
2.1.4 Jenis Kakao Dunia .....	15
2.1.5 Manfaat Kakao.....	16
2.1.6 Kandungan Kakao.....	18
2.2 Ekstraksi .....	20
2.3 Pelarut.....	24
2.3.1 Pelarut Organik Konvensional.....	24
2.3.2 <i>Green Solvent</i> .....	24
2.4 Metabolit Sekunder.....	27
2.5 <i>Candida albicans</i> .....	30
2.5.1 Taksonomi <i>Candida albicans</i> .....	30
2.5.2 Morfologi <i>Candida albicans</i> .....	30
2.6 Antijamur.....	32
2.6.1 Metode Pengujian Aktivitas Antijamur .....	32
2.6.2 Senyawa Anti Jamur .....	33
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP.....</b>	<b>35</b>
3.1 Kerangka Konsep .....	35
3.2 Hipotesis .....	36
3.2.1 Hipotesis (H <sub>0</sub> ).....	36
3.2.2 Hipotesis (H <sub>a</sub> ) .....	37
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>39</b>
4.1 Desain Penelitian .....	39
4.2 Populasi dan Sampel.....	39
4.2.1 Populasi.....	39
4.2.2 Sampel .....	39
4.3 Tempat Penelitian.....	40
4.4 Waktu Penelitian.....	40

4.5	Variabel Penelitian .....	40
4.5.1	Variabel bebas.....	40
4.5.2	Variabel terikat .....	40
4.5.3	Variabel kontrol .....	41
4.6	Definisi Operasional .....	41
4.7	Teknik Pengumpulan Data .....	45
4.7.1	Determinasi Tanaman .....	46
4.7.2	Pengolahan Serbuk Simplisia .....	46
4.7.3	Penyiapan <i>Natural Deep Eutectic Solvent</i> (NADES) .....	46
4.7.4	Pembuatan Ekstrak .....	47
4.7.5	Uji Kandungan Metabolit Sekunder .....	48
4.7.6	Pembuatan Media <i>Saboraud Dextrose Agar</i> (SDA).....	49
4.7.7	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	49
4.7.8	Kontrol Negatif dan Kontrol Positif .....	49
4.7.9	Peremajaan Kultur Jamur <i>Candida albicans</i> .....	50
4.7.10	Persiapan Suspensi Jamur Uji.....	50
4.7.11	Uji Aktivitas Antijamur .....	51
4.8	Teknik Analisis Data .....	52
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>54</b>
5.1	Determinasi Tanaman.....	54
5.2	Kandungan Metabolit Sekunder .....	54
5.2.1	NADES kolin klorida-asam malat .....	54
5.2.2	NADES kolin klorida-gliserol .....	55
5.3	Uji Aktivitas Antijamur .....	55
5.3.1	NADES kolin klorida-asam malat .....	56
5.3.2	NADES kolin klorida asam gliserol .....	56
5.4	Analisis Data.....	56
<b>BAB 6</b>	<b>PEMBAHASAN .....</b>	<b>59</b>
6.1	Kandungan Metabolit Sekunder .....	59
6.1.1	NADES kolin klorida-asam malat .....	60
6.1.2	NADES kolin klorida-gliserol .....	62

6.2 Uji Aktivitas Antijamur .....	64
6.2.1 NADES kolin klorida-asam malat .....	65
6.2.2 NADES kolin klorida-gliserol .....	68
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>70</b>
7.1 Kesimpulan .....	70
7.2 Saran .....	71
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>72</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>79</b>

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	8
Tabel 2.1 Daftar <i>Natural Deep Eutectic Solvent</i> .....	26
Tabel 2.2 Klasifikasi Diameter Zona Hambat.....	33
Tabel 4.1 Definisi Operasional .....	41
Tabel 5.1 Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Biji Kakao.....	55
Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Zona Hambat Terhadap <i>Candida albicans</i> .....	56
Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro wilk</i> .....	57

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Tanaman Kakao.....	13
Gambar 2.2 Kulit Biji Kakao .....	18
Gambar 2.3 <i>Candida albicans</i> .....	31
Gambar 3.1 Kerangka Konsep .....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 Hasil Determinasi Tanaman .....	79
Lampiran 2 Hasil Uji Statistik.....	80
Lampiran 3 Dokumentasi .....	83
Lampiran 4 Perhitungan.....	88
Lampiran 5 Dokumentasi Seminar Proposal dan Seminar Hasil .....	89
Lampiran 6 Daftar Riwayat Hidup.....	90

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kulit biji kakao adalah salah satu produk samping utama dari industri pembuatan cokelat yang biasanya dibuang setelah pengupasan biji kakao. Limbah kulit biji kakao diproduksi di seluruh dunia lebih dari 700.000 ton setiap tahun (Rojo-Poveda *et al.*, 2021). Indonesia adalah salah satu negara penghasil kakao (*Theobroma cacao L.*) terbesar di dunia. Keberadaan limbah kulit biji kakao tidak dimanfaatkan dengan baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah industri pengolahan cokelat (Dewi *et al.*, 2021).

Penyakit infeksi merupakan masalah besar di Indonesia karena iklim panas dan lembab sehingga bakteri, kapang dan khamir dapat berkembang dengan baik. *Candida albicans* berperan terhadap 50% dari infeksi jamur akibat genus *Candida* (Ornay *et al.*, 2017). Penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Candida* disebut dengan kandidiasis (Supomo *et al.*, 2021). Diperkirakan bahwa sekitar 75% dari semua wanita menderita *Vulvovaginal Candidiasis* (VVC) setidaknya sekali seumur hidup, dengan 40-50% mengalami setidaknya satu episode infeksi tambahan dan sebagian kecil wanita (5–8%) menderita setidaknya empat VVC berulang per tahun (Mayer *et al.*, 2013).

Organisme jamur adalah patogen oportunistik yang umum ditemukan di berbagai bagian tubuh manusia seperti rongga mulut dan vagina. Studi terbaru telah mengungkapkan kebutuhan kritis untuk obat antijamur baru yang dikembangkan dari ekstrak tumbuhan obat karena kekhawatiran tentang resistensi patogen jamur terhadap obat komersial (Abdullah *et al.*, 2021).

Seiring perkembangan zaman yang semakin canggih, pemakaian dan pemanfaatan obat tradisional di Indonesia mengalami kemajuan yang sangat pesat. Obat-obat tradisional banyak digunakan masyarakat sebagai salah satu alternatif pengobatan (Supomo *et al.*, 2021).

Uji kualitatif komponen fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan suatu komponen fitokimia dalam ekstrak yang diujikan. Penentuan secara kualitatif dapat dilihat dari perubahan warna atau terbentuknya buih dan endapan jika sampel direaksikan dengan bahan kimia tertentu. Studi fitokimia ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan dua variasi pelarut yaitu aseton-air (7:3 b/v) dan etanol 70% menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Triterpenoid hanya teridentifikasi pada ekstrak yang menggunakan pelarut etanol 70% (Kayaputri *et al.*, 2014).

Metode ekstraksi terdiri dari metode ekstraksi konvensional dan metode ekstraksi modern. Metode ekstraksi konvensional diantaranya yaitu maserasi dan refluks. Sedangkan metode ekstraksi modern diantaranya yaitu ekstraksi *Microwave Assisted Extraction* (MAE) dan *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Kadar flavonoid daun iler (*Plectranthus scutellarioides*) dengan metode maserasi, refluks, *Microwave Assisted Extraction* dan *Ultrasound Assisted Extraction* berturut-turut sebesar 0,41%, 0,45%, 0,75%, dan 0,62%. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman yang diekstraksi menggunakan metode ekstraksi modern mampu mengekstrak senyawa aktif lebih banyak (Suhendar *et al.*, 2020).

Kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) diekstraksi menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% pada konsentrasi

ekstrak 75% dan 100% memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan anti jamur terhadap *Trichophyton rubrum* dengan kategori kuat dan sangat kuat, yaitu rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan adalah 26,92 mm dan 37,22 secara in vitro menggunakan metode difusi cakram (Hutasoit *et al.*, 2020).

Salah satu tujuan terpenting dari *green chemistry* adalah menemukan *green solvent* untuk ekstraksi senyawa bioaktif dari sumber alami untuk menggantikan pelarut organik berbahaya yang saat ini digunakan. Salah satu alternatif ramah lingkungan adalah *Deep Eutectic Solvent* (DES) dan khususnya *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) (Grozdanova *et al.*, 2020).

Senyawa aktif dari produk alam biasanya diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik konvensional seperti alkohol, etil asetat, kloroform, dan aseton. Pelarut organik konvensional biasanya mudah terbakar, mudah menguap, dan beracun (Wang *et al.*, 2021). Pengembangan alternatif pelarut *green solvent* sebagai pengganti pelarut organik konvensional telah lama dianggap sebagai salah satu tujuan utama kimia berkelanjutan. Pelarut *green solvent* dapat mengurangi pencemaran lingkungan dan risiko terhadap kesehatan manusia. Pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) dalam beberapa dekade terakhir, secara bertahap menarik minat dan perhatian dari bidang ilmiah dan industri (He *et al.*, 2020).

Tanaman buas-buas (*Premna odorata*) menunjukkan total fenol, total flavonoid dan aktivitas antijamur yang berbeda ketika diekstraksi dengan jenis pelarut yang berbeda. Ketiga pelarut DES yang diuji adalah asam laktat:glukosa (5:1), kolin klorida:asam malat (1:1) dan kolin klorida:asam levulinat (1:2). NADES kolin klorida-asam malat (1:1) mampu mengekstrak lebih banyak

senyawa bioaktif (total fenolik 3,58 mgGAE/100g dan total flavonoid 0,028 mgRE/100g) dan menunjukkan aktivitas antijamur kategori kuat (14,66 mm) pada konsentrasi 50mg/mL dan sangat kuat (28,66 mm) pada konsentrasi 100mg/mL terhadap *Candida albicans* (Abdullah *et al.*, 2021).

Tanaman ironwort (*Sideritis scardica*) dan daun sendok (*Plantago major*) diekstraksi menggunakan metode UAE dan menggunakan empat variasi pelarut NADES, yaitu asam sitrat-1,2-propanadiol (1:4), kolin klorida-gliserol (1:2), kolin klorida-glukosa (5:2), kolin klorida-1,2-propanadiol (1:3). Tanaman ironwort (*Sideritis scardica*) dan daun sendok (*Plantago major*) yang diekstraksi menggunakan NADES klorida-gliserol (1:2) menunjukkan aktivitas antimikroba dengan nilai *Minimum Inhibition Concentration*/MIC (23,75 dan 19,37 µg/ml), sedangkan yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 70% menunjukkan nilai MIC (>67,5 dan >69,3 µg/ml). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman yang diekstraksi menggunakan NADES memiliki daya hambat yang lebih baik daripada menggunakan pelarut organik konvensional (Grozdanova *et al.*, 2020).

Ekstraksi kulit biji kakao menggunakan 16 variasi pelarut DES dengan basis kolin klorida dikombinasikan dengan metode ekstraksi *Microwave-assisted Extraction* (MAE) menunjukkan jumlah senyawa bioaktif yang diekstraksi sangat bervariasi tergantung pada jenis pelarut. Kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida-gliserol (1:2) memiliki aktivitas antioksidan 41,997 dan 30,414 % DPPH (Pavlović *et al.*, 2020).

Penelitian tentang ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) pada aktivitas antijamur khususnya terhadap *Candida albicans* belum banyak diteliti. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk meneliti aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Candida albicans* yang diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida-gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Pengujian aktivitas antijamur menggunakan metode difusi sumuran dan parameter hasil pengujian adalah diameter zona hambat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- 1) Apa saja kandungan metabolit sekunder ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) yang diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida-gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)?
- 2) Apakah ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) yang diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida-gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*?
- 3) Apakah terdapat perbedaan aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) yang diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep*

*Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida-gliserol (1:2)?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antijamur dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) yang diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* terhadap *Candida albicans*.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

- 1) Mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE).
- 2) Mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida-gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE).
- 3) Menguji aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.

- 4) Menguji aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida-glisierol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.
- 5) Mengetahui perbedaan aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida-glisierol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Bagi Ilmu Kefarmasian**

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi dalam sebuah penelitian mengenai penggunaan pelarut *green solvent* yaitu *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) sebagai alternatif pengganti pelarut organik konvensional dalam proses ekstraksi kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) untuk uji aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*.

### **1.4.2 Bagi Farmasi**

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan farmasi dalam memaksimalkan aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Candida albicans*.

### 1.4.3 Bagi Institusi Pendidikan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi penambahan ilmu pengetahuan, khususnya bagi ilmu kefarmasian mengenai aktivitas antijamur, serta menjadi referensi bagi mahasiswa lain.

### 1.4.4 Bagi Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan bisa menambah wawasan, pengetahuan, dan pengalaman peneliti.

## 1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

<b>Nama Peneliti</b>	<b>Judul Penelitian</b>	<b>Hasil penelitian</b>
Indira Lanti Kayaputri; Debby M. Sumanti; Mohamad Djali; Rossi Indiarito; Dita Listya Dewi (2014)	Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao ( <i>Theobroma cacao</i> L.)	Pada jurnal tersebut menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan dua variasi pelarut yaitu aseton-air (7:3 b/v) dan etanol 70%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao pada setiap perlakuan mengandung komponen fitokimia diantaranya alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin, sedangkan triterpenoid hanya teridentifikasi pada ekstrak menggunakan pelarut etanol 70%.
Nika Pavlović; Stela Jokić; Martina Jakovljević; Marijana Blažić; Maja Molnar (2020)	<i>Green extraction methods for active compounds from food waste - Cocoa bean shell</i>	Pada jurnal tersebut menggunakan metode ekstraksi <i>microwave-assisted extraction</i> (MAE) dengan 16 variasi pelarut <i>Deep Eutetic Solvent</i> (DES). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kulit biji kakao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-asam malat (1:1) dan kolin klorida-gliserol (1:2) memiliki aktivitas antioksidan 41,997 dan 30,414 % DPPH.
Chintya Mei Desia Hutasoit; Yuni Setyaningsih; Andri Pramono (2020)	<i>Antifungal Effectiveness of Cacao Bean Shells Extract (Theobroma cacao L.) on Trichophyton Rubrum Growth In Vitro</i>	Pada jurnal tersebut menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasil penelitian menunjukkan pada konsentrasi

Nama Peneliti	Judul Penelitian	Hasil penelitian
		ekstrak 75% dan 100% memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan anti jamur terhadap <i>Trichophyton rubrum</i> dengan kategori kuat dan sangat kuat, yaitu rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan adalah 26,92 mm dan 37,22 secara in vitro menggunakan metode difusi cakram.
Tsvetinka Grozdanova; Boryana Trusheva; Kalina Alipieva; Milena Popova; Lyudmila Dimitrova; Hristo Najdenski; Maya M. Zaharieva; Yana Ilieva; Bela Vasileva; George Miloshev; Milena Georgieva; Vassya Bankova (2020)	<i>Extracts of medicinal plants with natural deep eutectic solvents: enhanced antimicrobial activity and low genotoxicity</i>	Tanaman ironwort ( <i>Sideritis scardica</i> ) dan daun sendok ( <i>Plantago major</i> ) yang diekstraksi menggunakan NADES klorida-gliserol (1:2) menunjukkan aktivitas antimikroba dengan nilai <i>Minimum Inhibition Concentration/MIC</i> (23,75 dan 19,37 µg/ml), sedangkan yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 70% menunjukkan nilai MIC (>67,5 dan >69,3 µg/ml).
Ahmad Kamis Abdullah; Ali Sami Dheyab; Raed Obaid Saleh (2021)	<i>Evaluation of anti-fungal activity derivative from Premna odorata Blanco extract by deep eutectic solvents</i>	Tanaman buas-buas ( <i>Premna odorata</i> ) menunjukkan total fenol, total flavonoid dan aktivitas antijamur yang berbeda ketika diekstraksi dengan jenis pelarut yang berbeda. Ketiga pelarut DES yang diuji adalah asam laktat:glukosa (5:1), kolin klorida:asam malat (1:1) dan kolin klorida:asam levulinat (1:2). NADES kolin klorida-asam malat (1:1) mampu mengekstrak lebih banyak senyawa bioaktif (total fenolik 3,58 mgGAE/100g dan total flavonoid 0,028 mgRE/100g) dan menunjukkan aktivitas antijamur kategori kuat (14,66 mm) pada konsentrasi 50mg/mL dan sangat kuat (28,66 mm) pada konsentrasi 100mg/mL terhadap <i>Candida albicans</i> dengan menggunakan metode difusi cakram.

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya adalah penggunaan pelarut ekstraksi yaitu *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), dan metode pengujian aktivitas antijamur menggunakan difusi sumuran dengan mikroba uji yaitu *Candida albicans*.

## **BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)**

#### **2.1.1 Sejarah Tanaman Kakao**

Indonesia adalah satu-satunya produsen kakao terbesar di Benua Asia. Budidaya kakao di Indonesia dimulai sejak tahun 1980-an, kakao jenis *criollo* merupakan salah satu jenis kakao yang pertama kali dibudidayakan di Indonesia. Sulawesi utara, tepatnya Minahasa merupakan daerah yang pertama kali mengusahakan kakao di Indonesia. Tanaman kakao yang ditanam di Indonesia berasal dari biji kakao yang dibawa oleh bangsa Portugis pada saat melakukan penaklukan di Kepulauan Sangir, yang kemudian melanjutkan perjalanan ke Manado, kemudian di situlah awal mula tanaman kakao ditumbuhkan di Indonesia. Kuat dugaan bahwa bangsa Portugis pada zaman itu memonopoli pasar atas perdagangan kakao (Karim *et al.*, 2020).

#### **2.1.2 Taksonomi Tanaman Kakao**

Dalam taksonomi, tanaman kakao diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvales/Columniferae
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L. (Tjitrosoepomo, 2007)

### 2.1.3 Morfologi Tanaman Kakao

Kakao merupakan tanaman berkeping dua, kakao memiliki bagian tanaman lengkap mulai dari akar, batang, daun, bunga dan buah, serta biji. Morfologi dari tanaman kakao adalah sebagai berikut:

#### 1) Batang Kakao

Tanaman kakao pada umur tiga tahun dapat mencapai tinggi 1,8 hingga 3 m dan pada umur 12 tahun tanaman kakao mencapai tinggi 4,5-7 m. Tinggi tanaman kakao termasuk beragam, hal tersebut dikarenakan intensitas cahaya atau naungan pada lingkungan tanaman kakao serta faktor tumbuh lainnya. Tanaman kakao merupakan tanaman golongan dimorfisme yang dapat diartikan mempunyai dua tunas vegetatif. Kedua bentuk tunas tersebut memiliki nama yang berbeda yaitu tunas *ortotrop* atau tunas air (wiwilan) dan tunas *plagiotrop* (cabang kipas atau fan). Kedua tunas tersebut dibedakan pada arah pertumbuhan mata tunas, dimana tunas air tumbuh ke atas dan tunas cabang kipas ke samping. Setelah mencapai ketinggian 0,9-1,5 m tanaman kakao yang berasal dari biji akan berhenti tumbuh dan membentuk *lorquette*. *Lorquette* merupakan cabang dari pola percabangan ortotropik hingga plagiotropik dan hanya terdapat pada tanaman kakao. Pada pembentukannya *lorquette* diawali dengan pertumbuhan ortotropik yang tidak berfungsi lagi atau berhenti karena ruasnya tidak terjadi pemanjangan.



Gambar 2.1 Tanaman Kakao  
Sumber: (Banon, 2020)

## 2) Daun Kakao

Karena sifatnya yang bercabang, daun tanaman kakao memiliki sifat dimorfik. Hal ini ditunjukkan pada tunas ortotropik yang memiliki panjang tangkai daun sebesar 7,5-10 cm, sedangkan pada tunas plagiotropik panjang tangkai daun berkisar 2,5 cm. Bentuk tangkai adalah silindris dan bersisik halus, tergantung pada jenis tanaman kakao. Ciri khusus daun kakao ialah adanya dua ruas (*artikulasi*) yang terdapat pada pangkal dan ujung tangkai daun tanaman kakao. Helai daun berbentuk bulat memanjang atau lonjong, pada ujung daun tanaman berbentuk meruncing (*acuminatus*), serta pada pangkal daunnya meruncing (*acutus*). Tulang daun memiliki susunan berbentuk menyirip dan tulang daun menjorok ke permukaan bawah helai daun. Tepi daun berbentuk rata, daging daun tipis, tetapi bersifat kuat seperti perkamen.

## 3) Akar Kakao

Tanaman kakao adalah tumbuhan yang memiliki akar permukaan yang berarti sebagian besar akar lateral (*horizontal*) tumbuh di area permukaan tanah, kurang lebih 0-30 cm dari permukaan tanah.

#### 4) Bunga Kakao

Tanaman kakao memiliki sifat *cauliflory*, yang bertarti bunga tanaman tumbuh dan berkembang dari ketiak daun pada batang maupun cabang. Pada tempat tumbuhnya bunga semakin bear dan lebat atau biasa disebut bantalan bunga (*cushiol*). Bunga tanaman kakao memiliki rumus  $K5C5A5 + 5G$  (5) yang berarti bunganya tersusun atas lima kelopak yang berdiri sendiri-sendiri. Bunga kakao berwarna putih, ungu atau kemerahan. Warna bunga ini khas untuk setiap kultivar. Tangkai bunga kecil, tetapi panjang (1-1,5 cm). kelopak bunga mempunyai panjang berkisar 6-8 mm, terdiri dari dua bagian. Bagian alasnya berbentuk seperti cakar dan biasanya terdapat dua garis berwarna merah, ujungnya tipis, fleksibel dan seperti lembaran berwarna putih.

#### 5) Buah dan Biji Kakao

Warna buah tanaman kakao bervariasi, tetapi pada dasarnya hanya memiliki dua warna. Buah yang saat muda berwarna hijau atau agak putih hijau saat matang akan menguning, sedangkan buah yang masih muda saat berwarna merah setelah masak berwarna jingga. Kulit buah memiliki alur dalam dan dangkal yang bergantian. Pada jenis *criollo* dan *trinitario*, alurnya bening, kulit buahnya tebal, tetapi lembut dan permukaannya kasar. Sebaliknya, pada tipe *forastero*, permukaan kulitnya halus, tipis, tetapi tangguh. Buah akan matang setelah enam bulan. Benih tersusun dalam lima baris mengelilingi poros buah. Jumlahnya bervariasi yaitu 20-50 butir per buah. Bila dipotong melintang, tampak bahwa benih tersusun dari dua kotiledon yang terlipat dan pangkalnya menempel pada sumbu institusional

(sumbu embrio). Wana kotiledon putih untuk jenis *criollo* dan ungu untuk jenis *forastero*. Bijinya dibungkus dengan daging buah berwarna putih, berasa manis dan asam, serta diduga mengandung penghambat perkecambahan (Tyasmoro *et al.*, 2021).

#### **2.1.4 Jenis Kakao Dunia**

Berdasarkan jenisnya, terdapat 3 (tiga) jenis kakao dunia yang populer dan dibutuhkan pasar global yaitu jenis *criollo*, *forastero* dan *trinitary*.

##### 1) *Criollo*

*Criollo* yang berarti “penduduk asli” yang berasal dari Amerika Tengah. Namun, kakao jenis ini, hanya ada sekitar 1% kakao *criollo* dari total produksi kakao di seluruh dunia. Jenis kakao ini memiliki kandungan lemak yang tinggi dengan kualitas lemak yang bagus, berbanding lurus dengan harga yang juga cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena kakao jenis ini sudah langka ketersediaannya di pasar global, dari segi on-farm, kakao jenis ini rentan terhadap hama penyakit. Dalam satu buah kakao, dapat menghasilkan sekitar 30 biji.

##### 2) *Forastero*

*Forastero* memiliki arti “orang asing” atau pendatang. Kakao jenis ini diperkirakan berasal dari lembah Amazon. Kakao jenis *forastero* memiliki kualitas lebih rendah dibandingkan jenis *criollo*. Walaupun pada kenyataannya, pasar global membutuhkan kakao ini dalam jumlah yang banyak yakni 80% kebutuhan kakao dunia terutama industri membutuhkan

jenis *forastero*. Dalam satu buah kakao, bijinya diperkirakan antara 35-50 biji.

### 3) *Trinitario*

Disebut *trinitario*, karena kakao jenis ini pertama kali dibudidayakan di Trinidad. Pada tahun 1727, kakao jenis *criollo* hampir punah akibat serangan hama. Kakao jenis ini muncul memenuhi kebutuhan pasar dunia 10-15%. Dalam satu buah, biji kakao ini menghasilkan 30-40 biji (Tyasmoro *et al.*, 2021).

## 2.1.5 Manfaat Kakao

Kebutuhan masyarakat dunia akan produk kakao dirasakan terus meningkat sepanjang tahunnya, yaitu sekitar 3% per tahun. Aneka produk kakao yang terdiri atas *cocoa liquor*, *cocoa butter* dan *cocoa powder* biasa digunakan sebagai bahan dasar pembuatan makanan seperti *snack*, *confectionery*, *bakery*, minuman/*beverages* dan yang saat ini sedang tren adalah sebagai bahan terapi (*spa therapy* dan *aroma therapy*). Selain rasa dan aromanya yang dapat membuat *addict*, coklat memiliki manfaat untuk kesehatan karena kandungan senyawa flavonoid (*polyphenol*) sebagai antioksidan tinggi dapat menurunkan risiko penyakit jantung, kanker dan stroke. Selain itu produk kakao juga mengandung *phenylethylamine* yang dapat menstimulasi perasaan positif dan gembira (Prawoto *et al.*, 2008).

Kandungan coklat antara lain terdiri dari jenis alkaloid seperti teobromin, anandamida dan fenetilamina yang diketahui memberikan efek fisiologis bagi tubuh. Kandungan nutrisi lainnya dalam biji coklat antara lain protein sebanyak

5,5 g (9%), karbohidrat 14%, serta kandungan lemak yang cukup besar, yaitu 52,9 g (31%), energi 504 kal, kalsium 98 mg, fosfor 446 mg, serta vitamin A 60 SI. Protein dalam coklat kaya dengan asam amino triptofan, *tyrosin* serta fenilalanin (Arianto, 2018)

Manfaat coklat untuk menjaga kesehatan tubuh maupun perawatan kecantikan, berikut diantaranya.

1) Memperpanjang umur

Studi epidemiologis yang dilakukan terhadap mahasiswa Universitas Harvard Amerika Serikat menemukan bahwa kebiasaan makan coklat bisa memperpanjang harapan hidup. Hal ini karena adanya kandungan antioksidan fenol dalam coklat yang berkhasiat.

2) Mencegah risiko penyakit kanker dan jantung coroner

Kandungan senyawa aktif memberikan manfaat coklat karena mampu meningkatkan fungsi kekebalan tubuh yang sekaligus menekan oksidasi kolesterol LDL (kolesterol jahat) sehingga berguna menangkal risiko penyakit kanker maupun jantung coroner yang mematikan.

3) Memperbaiki *mood* dan mencerdaskan otak

Coklat juga memberikan efek yang disebut *chocolate craving* atau 'ketagihan' karena adana kandungan *phenylethylamine* yang merangsang meningkatnya penyerapan triptofan ke dalam otak untuk diolah menjadi *dopamine*. *Dopamine* inilah yang memberikan efek perasaan senang dan memperbaiki *mood* atau suasana hati, termasuk seperti perasaan sedang jatuh

cinta. Selain meningkatkan gairah, otak pun akan terasa lebih fokus dalam berfikir.

4) Menghaluskan kulit dan anti penuaan dini

Flavanols dalam coklat berkhasiat dalam melindungi tubuh dari paparan sinar ultraviolet matahari, menjaga kelembaban kulit, meningkatkan elastisitas kulit, maupun melancarkan regenerasi sel-sel kulit. Karena itu coklat sangat baik untuk membuat kulit lebih segar, lebih halus, sekaligus menghilangkan noda hitam dan flek pada wajah (Arianto, 2018).

### 2.1.6 Kandungan Kakao

Komponen biji kakao yang berguna untuk bahan pangan adalah daging biji (*nib*), sedangkan kulit biji merupakan limbah yang saat ini banyak dimanfaatkan sebagai campuran pakan ternak, sebab adanya *shell* atau kulit yang terikat dalam produk kakao akan memberikan *flavour* inferior. Oleh karena itu kulit biji perlu dikupas sehingga terpisah antara kulit dengan *nib* kakao (Hasyim, 2015). Bagian dari biji kakao dapat dilihat pada gambar 2.2



Gambar 2.2 Kulit Biji Kakao  
(Sumber: Hasyim, 2015)

Kulit biji kakao mengandung komponen polifenol yang berpotensi sebagai antimikroba untuk menghambat pertumbuhan berbagai jenis mikroorganisme diantaranya khamir patogen. Hasil identifikasi LC-MS/MS ekstrak kulit biji kakao menunjukkan adanya lima senyawa yang memiliki intensitas yang paling tinggi pada komponen senyawa Hordenine, Picrasidine P, Irilone, 5,7,8,4'-*Tetrahydroxy flavone*, dan Flazin. Senyawa tersebut berperan sebagai antimikroba (Fahmi, 2019).

Kulit biji kakao sekitar 10-17% dari total berat biji kakao kaya akan protein, serat, mineral, vitamin, metilxantin dan polifenol. Rasio *theobromin*/kafein menurut varietasnya terbukti paling tinggi untuk *Forastero*, diikuti *Nacional*, *Trinitario* dan *Criollo*. Selain itu, biji kakao dan produk turunannya kaya akan polifenol dan flavanol. Senyawa tersebut merupakan metabolit sekunder tumbuhan yang memiliki beberapa manfaat yaitu sebagai antioksidan dan bertindak sebagai kemopreventer terhadap beberapa penyakit seperti kanker, diabetes, stres oksidatif, penyakit kardiovaskular, dan penyakit radang usus (Rojo-Poveda *et al.*, 2021).

Kulit biji kakao mengandung senyawa biokimia seperti katekin, *epicatechins*, *procyanidins*, dan *methylxanthines*, kafein (1,3,7-*trimethylxanthine*), teofilin (1,3-dimetilxantin), dan teobromin (3,7-dimetilxantin). Dari hasil penelitian *Pressurized Liquid Extraction* (PLE) kulit kakao kaya akan sumber flavanol dan alkaloid, dengan *epicatechins* dan *theobromine* sebagai senyawa utama (Okiyama *et al.*, 2018). Ekstraksi kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan *green extraction* yaitu *subcritical water extraction* (SWE) mengandung senyawa

teobromin, teofilin, kafein, katekin, epikatekin, asam galat dan klorogenat (Jokić *et al.*, 2018).

## 2.2 Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian merupakan proses pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Beberapa metode ekstraksi antara lain maserasi, perkolasi, refluks, *soxhletasi*, infusa, dekok, destilasi, *ultrasonic*, gelombang mikro (*microwave assisted extraction*, MAE) dan ekstraksi gas superkritis (*supercritical gas extraction*, SGE) (Hanani, 2020).

Teknik ekstraksi ideal adalah teknik ekstraksi yang mampu mengekstraksi bahan aktif yang diinginkan sebanyak mungkin, cepat, mudah dilakukan, murah, ramah lingkungan dan hasil yang diperoleh selalu konsisten jika dilakukan berulang-ulang (Kumoro, 2015). Ekstraksi bahan aktif dari tumbuhan dapat dilakukan dengan berbagai teknik. Ada beberapa metode ekstraksi, yaitu :

### a) Ekstraksi cara dingin

Selama proses ekstraksi berlangsung, tidak dilakukan pemanasan yang bertujuan agar senyawa yang diinginkan tidak menjadi rusak (Matheos, 2021)

#### 1) Maserasi

Metode ekstraksi maserasi, proses ekstraksi tidak menggunakan pemanasan hanya melibatkan polaritas pelarut untuk menarik senyawa aktif. Mekanisme kerja ekstraksi maserasi yaitu melakukan perendaman pada suhu kamar dan sesekali dikocok untuk menarik senyawa aktif keluar dari dalam sel (Suhendar *et al.*, 2020).

## 2) Perkolasi

Perkolasi adalah cara ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru dengan mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna. Cara ini memerlukan waktu lebih lama dan pelarut yang lebih banyak. Untuk meyakinkan perkolasi sudah sempurna, perkolat dapat diuji adanya metabolit dengan pereaksi yang spesifik (Kumoro, 2015).

## b) Ekstraksi cara panas

Pada metode ini melibatkan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung, yang bertujuan untuk mempercepat proses ekstraksi dibandingkan dengan cara dingin (Matheos, 2021)

### 1) Refluks

Metode ekstraksi refluks, proses ekstraksi menggunakan pemanasan pada 50° C. Mekanisme kerja dari ekstraksi refluks yaitu pelarut yang digunakan akan menguap pada suhu yang digunakan, tetapi akan didinginkan dengan kondensor sehingga pelarut dalam bentuk uap akan mengembun pada kondensor dan turun lagi kedalam wadah reaksi sehingga pelarut akan tetap ada selama reaksi berlangsung (Suhendar *et al.*, 2020).

### 2) Sokletasi (*Soxhlet*)

Sokletasi adalah ekstraksi yang umumnya dilakukan dengan alat khusus dengan menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin baru (kondensor) (Matheos, 2021).

3) Infusa

Infusa adalah cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut air, pada suhu 96-98°C selama 15-20 menit (dihitung setelah suhu 96°C tercapai). Bejana infusa tercelup dalam tangas air. Cara ini sesuai untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun.

4) Dekok

Dekok adalah cara ekstraksi yang mirip dengan infusa, hanya saja waktu ekstraksinya lebih lama yaitu 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air (Hanani, 2020).

c) Esktraksi modern

1) *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)

Metode UAE, mekanisme ekstraksi yang melibatkan getaran gelombang ultrasonik dengan frekuensi diatas 20 kHz (20000 Hz) dan dibantu dengan sedikit pemanasan yaitu 40°C. Gelombang ultrasonik dapat memecahkan dinding sel yang akan membantu terlepasnya senyawa aktif keluar. Getaran frekuensi pada UAE yaitu 20000 Hz dalam 1 detik (Suhendar *et al.*, 2020).

Teknik ekstraksi ini dilakukan dengan bantuan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20 kHz hingga 2000 kHz untuk meningkatkan permeabilitas sel tanaman dan membangkitkan kavitasi. Seperti gelombang pada umumnya, gelombang ultrasonik bergerak melalui suatu media dengan mekanisme kompresi dan ekspansi. Langkah ekspansi menarik molekul-molekul pelarut, sedangkan langkah kompresi menekan molekul-molekul pelarut untuk bergerak menjauh. Langkah ekspansi menghasilkan gelembung-gelembung

dalam cairan pelarut sehingga menyebabkan penurunan tekanan. Proses ini menghasilkan sebuah fenomena yang disebut kavitasi, yang berarti pembentukan, pertumbuhan dan pemecahan gelembung. Dengan adanya energi ultrasonik, maka ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik mempunyai kelebihan dalam mengeluarkan senyawa organik dan non-organik dari tanaman (Kumoro, 2015).

## 2) *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Metode MAE, mekanisme ekstraksi yang melibatkan gelombang elektromagnetik pada 2500 MHz (2,5 GHz). Semakin tinggi gelombang elektromagnetik pada MAE maka suhu yang dihasilkan semakin panas. Energi yang dihasilkan pada MAE yaitu energi radiasi dan energi rotasi. Maka dari itu, adanya radiasi gelombang mikro dan getaran yang berotasi akan mengakibatkan tekanan pada dinding sel meningkat, kemudian sel membengkak (*swelling*) dan senyawa aktif yang keluar semakin banyak (Suhendar *et al.*, 2020).

*Microwave Assisted Extraction* (MAE) adalah metode ekstraksi yang memanfaatkan gelombang mikro untuk mengekstraksi senyawa-senyawa bahan alam. Pada umumnya teknologi ini cocok untuk pengambilan senyawa yang bersifat *termolabil* (Sasongko *et al.*, 2018). Keuntungan dari MAE adalah lebih singkatnya waktu yang diperlukan untuk ekstraksi, pelarut yang digunakan lebih sedikit, yield yang dihasilkan lebih tinggi kecepatan ekstraksi lebih tinggi, dan biaya lebih rendah (Sasongko *et al.*, 2018).

## 2.3 Pelarut

### 2.3.1 Pelarut Organik Konvensional

Pelarut organik berdasarkan konstanta dielektriknya dapat dibedakan menjadi dua yaitu pelarut polar dan non polar. Konstanta dielektrik dinyatakan sebagai gaya tolak menolak antara dua partikel yang bermuatan listrik dalam suatu molekul. Semakin tinggi konstanta dielektriknya maka pelarut bersifat semakin polar (Verdiana *et al.*, 2018).

Pelarut polar adalah pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang tinggi serta dapat menyari senyawa yang bersifat polar pada suatu tumbuhan. Pelarut yang bersifat polar antara lain air, metanol, etanol dan asam asetat. Pelarut semi polar adalah pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah dari pelarut polar tetapi lebih tinggi dari pelarut non polar. Pelarut yang bersifat semi polar antara lain aseton, etil asetat dan kloroform. Pelarut non polar adalah pelarut yang hampir tidak polar, biasa digunakan untuk menyari senyawa metabolit yang tidak larut dalam pelarut polar. Pelarut yang bersifat non polar antara lain n-heksan dan eter (Supomo *et al.*, 2021).

### 2.3.2 *Green Solvent*

Pemilihan pelarut dengan pendekatan penerapan prinsip *green chemistry* dalam mengeksplorasi kandungan dan potensi senyawa aktif dari bahan alam terus meningkat (Huang *et al.*, 2019). *Deep Eutectic Solvent* (DES) adalah campuran eutektik dari dua atau tiga komponen penyusun, umumnya berinteraksi melalui ikatan hidrogen, yang memiliki titik leleh lebih rendah daripada masing-masing komponen bila digabungkan pada rasio molar yang tepat. Komponen dari

campuran cairan bening ini adalah *hydrogen bond acceptor* (HBA) dan *hydrogen bond donor* (HBD) (Hikmawanti *et al.*, 2021).

Abbott (2003), memperoleh DES pertama kali dari interaksi antara *choline chloride* (*melting point* 302 °C) dengan urea (*melting point* 133 °C). Kombinasi kedua bahan awal yang berbentuk padatan pada molar rasio tertentu ini menghasilkan campuran eutektik yang mana berbentuk cair pada suhu lingkungan (*melting point* 12 °C untuk molar rasio 2:1) (Gama *et al.*, 2018).

Kolin klorida adalah HBA yang paling banyak digunakan dalam pembuatan DES. Selain itu, betaine merupakan analog dari kolin klorida yang sering digunakan. Namun, pembuatan DES dengan betaine dianggap relatif sulit jika dibandingkan dengan menggunakan kolin klorida (Hikmawanti *et al.*, 2021).

Garam amonium kuaterner kolin klorida adalah salah satu senyawa yang paling umum digunakan dalam pembuatan DES. Sebagai *hydrogen bond acceptor* (HBA), anion klorida dari kolin klorida berinteraksi dengan *hydrogen bond donor* (HBD), sehingga berdasarkan ikatan hidrogen yang terbentuk antara dua molekul, terjadi penurunan titik leleh yang signifikan dari campuran yang diperoleh (Jurić *et al.*, 2021).

Pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) adalah turunan baru dari DES (Hikmawanti *et al.*, 2021). NADES merupakan cairan yang terbuat dari metabolit utama (gula, alkohol, asam organik, asam amino, dan amina) yang diikat oleh interaksi intermolekul yang kuat, terutama ikatan hidrogen (Hardianti *et al.*, 2018).

Campuran eutektik dengan komponen asam organik umumnya memiliki polaritas tertinggi, diikuti oleh yang berbasis asam amino. Campuran NADES dengan komponen polialkohol dan gula memiliki polaritas yang lebih rendah. Salah satu kelemahan NADES jika dibandingkan dengan pelarut konvensional adalah viskositasnya tinggi. Viskositas NADES dipengaruhi oleh ikatan hidrogen dan interaksi *van der Waals*. Viskositas tinggi NADES dapat mengurangi koefisien difusi analit, menyebabkan perpindahan massa yang rendah dan waktu ekstraksi yang lama. Kondisi ini dapat mempengaruhi kelarutan senyawa target dalam NADES dan berdampak pada efektivitas ekstraksi. Permasalahan tersebut dapat diselesaikan dengan dua cara, yaitu dengan menambahkan air dan dengan menaikkan suhu (Hikmawanti *et al.*, 2021).

Tabel 2.1 Daftar *Natural Deep Eutectic Solvent*

Kombinasi	Molar Rasio (HBA:HBD)
<i>Choline chloride:Acetamide</i>	1:2
<i>Choline chloride:Butan 1,4-diole</i>	1:2
<i>Choline chloride:Ethylene glycol</i>	1:1
<i>Choline chloride:Fructose</i>	1:1
<i>Choline chloride:Glycerole</i>	1:2
<i>Choline chloride:Glucose</i>	1:1
<i>Choline chloride:Malic acid</i>	1:1
<i>Choline chloride:Xylitole</i>	1:1
<i>Choline chloride:Levulinic acid</i>	1:1
<i>Choline chloride:Citric acid</i>	1:1
<i>Choline chloride:Malonic acid</i>	1:1
<i>Choline chloride:Lactic acid</i>	1:1
<i>Choline chloride:Oxalic acid</i>	1:1
<i>Choline chloride:Sorbitol</i>	1:1
<i>Choline chloride:Urea</i>	1:2
<i>Choline chloride:Tartaric acid</i>	1:1

Sumber: (Pavlović *et al.*, 2020)

Komponen NADES dapat dipilih tidak hanya untuk menyempurnakan karakteristik fisikokimia pelarut tetapi juga untuk meningkatkan aktivitas biologis senyawa aktif terlarut. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa NADES mempertahankan atau bahkan meningkatkan aktivitas biologis zat terlarut. Oleh karena itu, NADES dapat berfungsi sebagai bahan aktif dan ekstraknya dapat langsung digunakan sebagai bagian dari formulasi kosmetik atau farmasi, melewati kesulitan pemulihan zat terlarut (Grozdanova *et al.*, 2020).

Ekstrak peppermint dalam NADES yang mengandung komponen asam organik seperti asam malat dan asam sitrat menunjukkan aktivitas antimikroba yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak lain terhadap bakteri gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Salmonella enterica*) dan bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*).

NADES murni yang mengandung kedua jenis asam menunjukkan aktivitas antimikroba yang tinggi terhadap bakteri uji. Hal ini diduga karena sifat asam NADES (pH rendah) yang mempengaruhi pH optimal untuk pertumbuhan bakteri. Sebaliknya, NADES murni yang mengandung gula dan alkohol sebagai HBD tidak menghasilkan efek antimikroba terhadap *E. coli* dan *S. aureus* (Jurić *et al.*, 2021).

#### **2.4 Metabolit Sekunder**

Metabolit primer merupakan senyawa esensial dalam proses kehidupan makhluk hidup yang langsung terlibat dalam proses pertumbuhan normal, perkembangan dan reproduksi (Manurung, 2021). Polisakarida, protein, lemak

dan asam nukleat merupakan penyusun utama makhluk hidup, karena itu disebut metabolit primer. Keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat yang dilakukan oleh organisme untuk kelangsungan hidupnya disebut proses metabolisme primer (Kristanti *et al.*, 2019).

Senyawa golongan metabolit sekunder adalah senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme (Dewi *et al.*, 2016). Metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesis melewati proses biosintesis yang digunakan untuk menunjang kehidupan namun tidak vital (jika tidak ada tidak mati) sebagaimana gula, asam amino dan asam lemak. Metabolit ini memiliki aktivitas farmakologi dan biologi. Metabolit sekunder pada bidang farmasi digunakan dan dipelajari sebagai kandidat obat atau senyawa penuntun (*lead compound*).

Metabolit sekunder terdiri dari tiga kelompok utama yaitu terpen, senyawa fenol dan produk sekunder mengandung nitrogen. Pemanfaatan metabolit sekunder oleh manusia adalah sebagai bahan obat-obatan, kosmetik, parfum, aroma, bumbu, bahan rekreasi dan relaksasi (Manurung, 2021).

Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan dengan karakteristik memiliki cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi (OH). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar di alam. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon yang membentuk susunan C6-C3-C6 (Julianto, 2019).

Tanin adalah suatu senyawa fenolik yang memberikan rasa pahit dan sepat/kelat, dapat bereaksi dan menggumpalkan protein atau senyawa organik lainnya yang mengandung asam amino dan alkaloid. Senyawa-senyawa Tanin

ditemukan pada banyak jenis tumbuhan. Senyawa ini berperan penting untuk melindungi tumbuhan dari pemangsa oleh herbivora dan hama, serta sebagai agen pengatur dalam metabolisme tumbuhan (Julianto, 2019).

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam cincin heterosiklik (Vinolina, 2021). Alkaloid adalah senyawa bahan alam (*natural product*) yang memiliki unsur nitrogen dalam struktur kimianya, biasanya dalam struktur heterosiklik (Sukadirman, 2020). Alkaloid merupakan senyawa organik yang sangat beragam yang mengandung gugus amina sekunder, tersier atau siklik. Alkaloid mengandung satu atau lebih atom nitrogen dan umumnya merupakan bagian dari sistem siklik. Alkaloid pada umumnya bersifat toksik bagi manusia dan memiliki efek fisiologis dan neurologis (Jayanegara *et al.*, 2019).

Senyawa terpena merupakan kelompok senyawa organik hidrokarbon yang melimpah yang dihasilkan oleh berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini pada umumnya memberikan bau yang kuat dan dapat melindungi tumbuhan dari herbivora dan predator. Terpenoid juga merupakan komponen utama dalam minyak atsiri dari beberapa jenis tumbuhan dan bunga. Minyak atsiri digunakan secara luas untuk wangi-wangian parfum, dan digunakan dalam pengobatan seperti aromaterapi (Julianto, 2019).

## **2.5 *Candida albicans***

### **2.5.1 Taksonomi *Candida albicans***

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Ascomycota
Subdivisi	: Ascomycotina
Kelas	: Ascomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Candida albicans</i> (Hameed <i>et al.</i> , 2018)

### **2.5.2 Morfologi *Candida albicans***

Jamur atau fungi didefinisikan sebagai suatu jenis organisme eukariotik yang mempunyai inti sel dan organel-organel. Susunan jamur terdiri dari hifa yang berupa benang-benang panjang bersel tunggal. Kumpulan hifa yang terdapat pada jamur disebut dengan miselium yang merupakan massa benang dalam jumlah besar yang terbentuk dari belitan hifa pada proses pertumbuhan jamur. Identifikasi jamur cenderung mudah dilakukan dengan melihat warna miseliumnya (Rahmawati, 2020). Gambar *Candida albicans* dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 *Candida albicans*

Sumber: (Jawetz *et al.*, 2020)

Perbesaran Mikroskop 400x

*Candida albicans* didalam biakan atau jaringan tumbuh sebagai sel ragi berbentuk oval dan bertunas (ukuran 3-6 $\mu$ m). *Candida* juga membentuk pseudohifa saat tunas-tunasnya terus tumbuh tetapi gagal melepaskan diri sehingga menghasilkan rantai-rantai sel panjang yang menyempit atau mengecil di bagian sekat antar sel. Tidak seperti spesies *Candida* yang lain, *Candida albicans* bersifat dimorfik. Selain ragi dan pseudohifa, *Candida albicans* juga bisa menghasilkan hifa sejati. Dimedium agar atau dalam 24 jam di suhu 37°C atau suhu ruang, spesies *Candida albicans* membentuk koloni lembut berwarna krem dengan bau beragi. Pseudohifa tampak sebagai sebetuk pertumbuhan ke bawah permukaan agar. Ada dua uji morfologi sederhana yang membedakan *Candida albicans* dengan spesies *Candida* lainnya. *Candida albicans* setelah diinkubasi di dalam serum selama sekitar 90 menit pada suhu 37°C, sel ragi *Candida albicans* akan mulai membentuk hifa sejati atau tabung-tabung germinal dan pada medium yang kurang bernutrisi *C.albicans* menghasilkan klamidospora bulat berukuran besar (Jawetz *et al.*, 2020).

## 2.6 Antijamur

### 2.6.1 Metode Pengujian Aktivitas Antijamur

Aktivitas antimikroba diukur secara *in vitro* untuk menentukan potensi suatu obat antimikroba dalam larutan. Pengukuran aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu diantara dua metode utama yaitu dilusi (pengenceran) atau difusi. Uji dilusi memiliki keunggulan, yaitu memungkinkan dilaporkannya hasil kuantitatif, menunjukkan jumlah obat tertentu untuk menghambat (KHM) atau membunuh (KBM) mikroorganisme uji (Jawetz *et al.*, 2020).

Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk analisis aktivitas antimikroba. Ada tiga cara dari metode difusi yang dapat dilakukan yaitu metode sumuran, metode cakram, dan metode silinder. Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan mikroba. (Nurhayati *et al.*, 2020).

Metode difusi sumuran (*well diffusion method*) juga digunakan untuk mengevaluasi aktivitas agen antimikroba. Sama dengan metode difusi cakram, permukaan media Agar diinokulasi mikroorganisme. Sumuran berukuran 6 sampai 8 mm dibuat secara aseptik pada media Agar yang telah diinokulasi mikroorganisme dengan alat pembuat lubang sumuran yaitu *cork borer*. Agen antimikroba dimasukkan kedalam sumuran dengan volume 20 sampai 100 mL, kemudian diinkubasi. Agen antimikroba akan berdifusi dalam media Agar dan menghambat pertumbuhan mikroba uji. Pengamatan dilakukan dengan mengamati

zona bening yang terbentuk disekeliling sumuran (Idroes *et al.*, 2019). Kategori kekuatan daya antijamur berdasarkan Davis and Stout (1971) dalam Kandoli, Abijulu and Leman (2016), terdapat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Klasifikasi Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat	Kategori
$\geq 20\text{mm}$	Sangat kuat
10-20mm	Kuat
5-10mm	Sedang
$\leq 5\text{mm}$	Lemah

Sumber: (Kandoli, Abijulu and Leman, 2016)

### 2.6.2 Senyawa Anti Jamur

Senyawa yang dapat berkhasiat sebagai antijamur yaitu alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid dan triterpenoid (Utami, Auliah and Dini, 2022). Senyawa antijamur mempunyai berbagai mekanisme penghambatan terhadap sel jamur (Ningsih, 2017).

Aktivitas antijamur senyawa alkaloid adalah dengan menghambat sistem respirasi sel serta proliferasi pembentukan protein, sehingga mengakibatkan kematian jamur. Komponen penyusun peptidoglikan pada dinding sel dirusak oleh senyawa alkaloid sehingga komponen tersebut tidak berbentuk utuh lagi. Dampak lain dengan adanya alkaloid adalah kebocoran membran sel dan hilangnya beberapa bahan intrasel seperti elektrolit (terutama senyawa kalium) dan molekul-molekul lainnya (Swandiyasa, Puspawati and Asih, 2019).

Flavonoid sangat dikenal sebagai antioksidan yang memberikan efek sebagai antibakteri dan antijamur. Aktivitas antijamur pada senyawa flavonoid memiliki gugus hidroksil yang bekerja dengan cara membentuk kombinasi dengan fosfolipid dari membran sel jamur yang mengakibatkan sel jamur rusak, sehingga

dapat menghambat pertumbuhan sel dan meningkatkan permeabilitas membran serta sel jamur terdenaturasi (Agustina *et al.*, 2021).

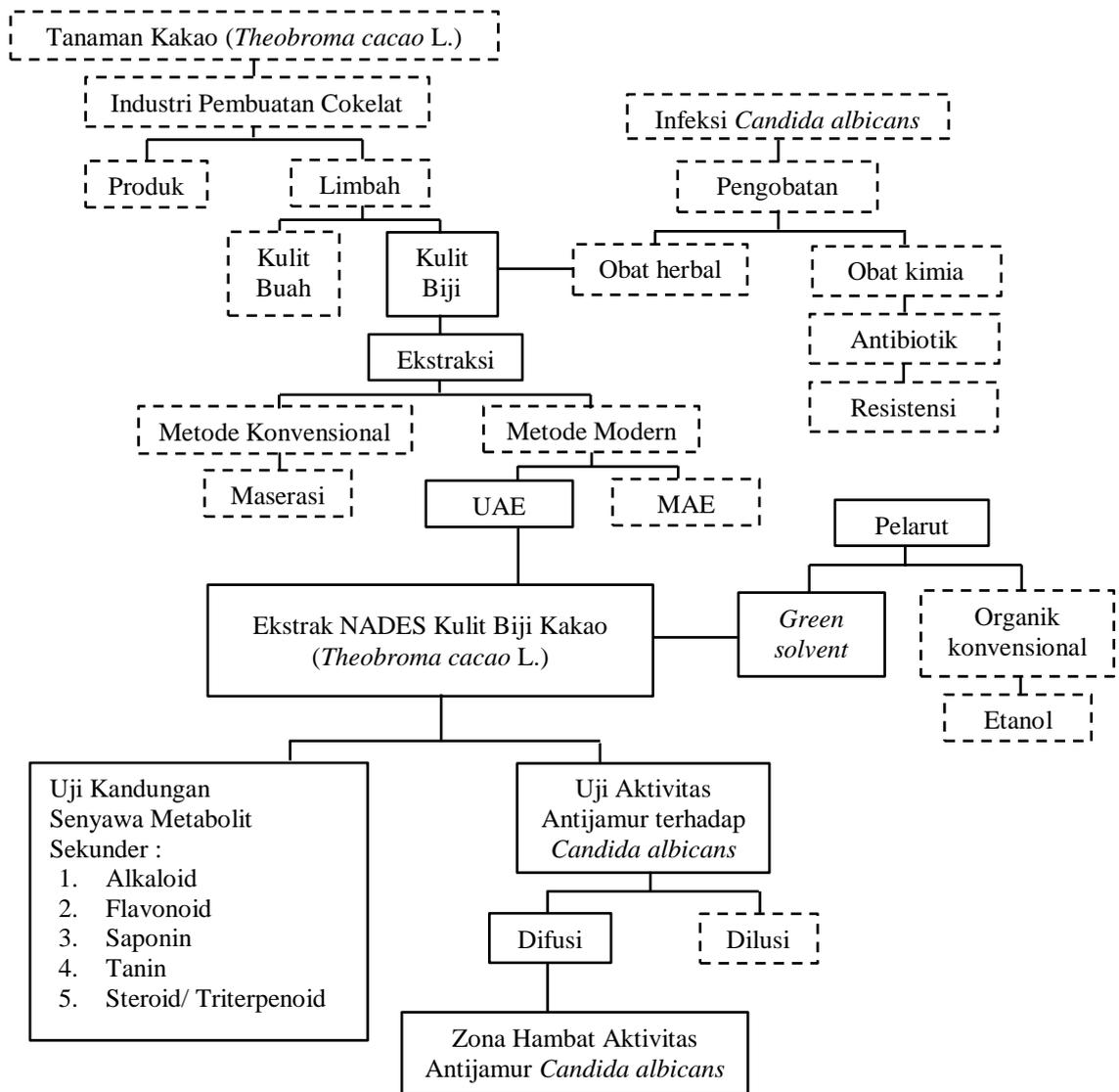
Mekanisme antijamur yang dimiliki tanin yaitu kemampuannya menghambat sintesis kitin yang digunakan untuk pembentukan dinding sel pada jamur dan merusak membran sel sehingga pertumbuhan jamur terhambat. Selain itu, tanin juga bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel jamur (Utami, Auliah and Dini, 2022).

Senyawa saponin sebagai antifungi dapat merusak protein dan enzim yang terdapat pada sel jamur serta mampu berdifusi dengan membran luar dan dinding sel jamur yang kemudian dapat mengganggu kestabilan sel. Mekanisme senyawa saponin dalam menghambat pertumbuhan jamur ialah dengan meningkatkan permeabilitas dinding sel jamur yang mengakibatkan cairan sel yang mengandung enzim, protein dan materi metabolisme tertarik keluar sel dan menyebabkan pertumbuhan jamur menjadi terganggu

Terpenoid memiliki sifat hidrofobik yang menyebabkan terpenoid dapat masuk ke dalam membran lipid. Mekanisme kerja terpenoid ialah gugus hidroksil yang menyebabkan efek toksik. Pemisahan ion  $H^+$  dari gugus  $OH^-$  menyebabkan terjadi pertukaran ion  $H^+$  dan kation seperti  $K^+$  melewati membran yang akhirnya mengganggu pH dan meningkatkan  $K^+$  melewati membran sel. Sifat antifungal terpenoid, yaitu kemampuan terpenoid melewati dinding sel jamur dan berada di antara rantai asam lemak lipid bilayer, mengganggu pembentukan lipid, dan mengubah struktur membran sel. Senyawa lipofilik tersebut berpenetrasi ke dalam sel dan mengganggu biosintesis ergosterol (Balafif, Satari and Dhianawaty, 2017).

## BAB 3 KERANGKA KONSEP

### 3.1 Kerangka Konsep



**Keterangan :** \_\_\_\_\_ = Variabel yang diteliti  
 - - - - - = Variabel yang tidak diteliti

Gambar 3.1 Kerangka Konsep

## 3.2 Hipotesis

Hipotesis adalah jawaban sementara terhadap masalah yang menjadi objek dalam penelitian.

### 3.2.1 Hipotesis (H0)

- 1) Tidak terdapat kandungan metabolit sekunder pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) berupa senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid.
- 2) Tidak terdapat kandungan metabolit sekunder pada ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) berupa senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid.
- 3) Tidak terdapat aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.
- 4) Tidak terdapat aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.

- 5) Tidak terdapat perbedaan aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida–gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.

### 3.2.2 Hipotesis (Ha)

- 1) Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) mengandung metabolit sekunder berupa senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid.
- 2) Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) mengandung metabolit sekunder berupa senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid.
- 3) Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) mempunyai aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*.
- 4) Ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin

klorida–gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) mempunyai aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*.

- 5) Terdapat perbedaan aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) pada konsentrasi 100 mg/mL menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) kolin klorida–asam malat (1:1) dan kolin klorida–gliserol (1:2) dengan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) terhadap *Candida albicans*.

## **BAB 4 METODE PENELITIAN**

### **4.1 Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian *true* eksperimental laboratorium menggunakan proses ekstraksi dengan pelarut NADES menggunakan metode UAE. Proses uji antijamur menggunakan metode difusi sumuran. Desain penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dan untuk mengetahui aktivitas antijamur dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode sumuran terhadap *Candida albicans*.

### **4.2 Populasi dan Sampel**

#### **4.2.1 Populasi**

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas: objek/subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2009). Populasi pada penelitian ini adalah kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Kabupaten Jember.

#### **4.2.2 Sampel**

Sampel adalah suatu bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak NADES kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.).

### **4.3 Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi.

### **4.4 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Agustus sampai dengan September 2022.

### **4.5 Variabel Penelitian**

Variabel penelitian adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari orang, objek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2009).

#### **4.5.1 Variabel bebas**

Variabel independen sering disebut sebagai variabel *stimulus*, *prediktor*, *antecedent*. Dalam bahasa Indonesia sering disebut sebagai variabel bebas. Variabel bebas adalah merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2009). Variabel bebas pada penelitian ini adalah pelarut yang diujikan, yaitu : NADES kolin klorida-asam malat (1:1) dan NADES kolin klorida-gliserol (1:2)

#### **4.5.2 Variabel terikat**

Variabel dependen sering disebut sebagai variabel *output*, kriteria, konsekuen. Dalam bahasa Indonesia sering disebut sebagai variabel terikat. Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya

variabel bebas (Sugiyono, 2009). Variabel terikat pada penelitian ini adalah kandungan metabolit sekunder dan aktivitas antijamur.

#### 4.5.3 Variabel kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat konstan/ tetap sehingga pengaruh variabel independen terhadap dependen tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti. Variabel kontrol sering digunakan oleh peneliti, bila akan melakukan penelitian yang bersifat membandingkan (Sugiyono, 2009).

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah :

- 1) Metode ekstraksi UAE
- 2) Suhu ekstraksi yaitu 40°C
- 3) Waktu ekstraksi 60 menit
- 4) Frekuensi ekstraksi 53 kHz
- 5) Metode pengujian aktivitas antijamur difusi sumuran
- 6) Kepadatan mikroba uji 0,5 *Mc Farland*

#### 4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional merupakan uraian tentang batasan variabel yang diteliti atau tentang apa yang telah diukur oleh variabel yang bersangkutan. Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Definisi Operasional

Nama variabel	Definisi Operasional	Indikator	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Alkaloid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang bersifat	Positif bila pada pereaksi <i>Dragendorff</i> akan terbentuk endapan	Penambahan pereaksi <i>Dragendorff</i> dan <i>Mayer</i>	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar	“1” = Positif (+) “2” = Negatif (-)	nominal

Nama variabel	Definisi Operasional	Indikator	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
	basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam cincin heterosiklik	berwarna jingga sedangkan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan kuning		observasi		
Flavonoid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa polifenol dengan struktur C6-C3-C6	Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga	Penambahan serbuk Mg dan HCl, kemudian dikocok kuat-kuat	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Saponin	Adalah senyawa metabolit sekunder memiliki rasa pahit, membentuk buih dalam larutan cair dan menyebabkan hemolisa sel darah merah	Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit	Penambahan air panas lalu didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik lalu ditambahkan 1 tetes HCl	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Tanin	Adalah senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa polifenol, struktur kimia tanin adalah kompleks dan tidak sama.	Positif bila terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan	Penambahan beberapa tetes larutan FeCl <sub>3</sub> 1%.	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Steroid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang merupakan	Positif adanya steroid ditunjukkan oleh adanya warna biru atau hijau	Ekstrak ditetesi CH <sub>3</sub> COOH glasial sebanyak 10 tetes dan	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal

Nama variabel	Definisi Operasional	Indikator	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
	terpenoid lipid yang ditandai oleh sterana inti dan tambahan kelompok fungsional.		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit			
Triterpenoid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon asiklik yaitu skualena	Positif triterpenoid ditunjukkan oleh adanya warna merah atau ungu	ekstrak ditetesi CH <sub>3</sub> COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Identifikasi kandungan metabolit sekunder menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol						
Alkaloid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam cincin heterosiklik	Positif bila pada pereaksi <i>Dragendorff</i> akan terbentuk endapan berwarna jingga sedangkan pereaksi <i>Mayer</i> akan terbentuk endapan kuning yang menandakan positif adanya alkaloid	Penambahan pereaksi <i>Dragendorff</i> dan <i>Mayer</i>	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Flavonoid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa polifenol dengan	Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga	Penambahan serbuk Mg dan HCl, kemudian dikocok kuat-kuat	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal

Nama variabel	Definisi Operasional	Indikator	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
struktur C6-C3-C6						
Saponin	Adalah senyawa metabolit sekunder memiliki rasa pahit, membentuk buih dalam larutan cair dan menyebabkan hemolisa sel darah merah	Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit	Penambahan air panas lalu didinginkan, kemudian dikocok kuatkuat selama 10 detik lalu ditambahkan 1 tetes HCl	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Tanin	Adalah senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa polifenol, struktur kimia tanin adalah kompleks dan tidak sama.	Positif bila terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan	Penambahan beberapa tetes larutan FeCl <sub>3</sub> 1%.	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Steroid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang merupakan terpenoid lipid yang ditandai oleh sterana inti dan tambahan kelompok fungsional.	Positif adanya steroid ditunjukkan oleh adanya warna biru atau hijau	ekstrak ditambahkan CH <sub>3</sub> COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal
Triterpenoid	Adalah senyawa metabolit sekunder yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan	Positif triterpenoid ditunjukkan oleh adanya warna merah atau ungu	ekstrak ditetesi CH <sub>3</sub> COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat sebanyak 2 tetes.	Tabung reaksi, pipet tetes, dan lembar observasi	“1” = Positif (+) “2” = negatif (-)	nominal

Nama variabel	Definisi Operasional	Indikator	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
	isoprene dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon asiklik yaitu skualena		Larutan dikocok perlahan			
Aktivitas antijamur menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat						
Konsentrasi 100 mg/mL	Zona hambat yang diukur dari daerah sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan jamur	Terdapat zona bening disekitar sumuran pada media dalam ukuran mm (milimeter)	Pengukuran diameter zona hambat pada area jernih disekitar sumuran	Jangka sorong dan lembar observasi	Diameter zona hambat (mm)	Rasio
Aktivitas antijamur menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol						
Konsentrasi 100 mg/mL	Zona hambat yang diukur dari daerah sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan	Terdapat zona bening disekitar sumuran pada media dalam ukuran mm (milimeter)	Pengukuran diameter zona hambat pada area jernih disekitar sumuran	Jangka sorong dan lembar observasi	Diameter zona hambat (mm)	Rasio

#### 4.7 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data adalah suatu proses pendekatan pada subjek dan proses pengumpulan karakteristik subjek yang diperlukan dalam suatu penelitian. Teknik pengumpulan data pada penelitian ini adalah data primer yaitu data yang diperoleh secara langsung dari sumber penelitian.

#### 4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dilakukan untuk mengetahui jenis tumbuhan secara spesifik yang dilakukan di Laboratorium Biologi Politeknik Negeri Jember.

#### 4.7.2 Pengolahan Serbuk Simplisia

Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dilepas dari biji kakaonya dan dibersihkan dan dialiri dengan air mengalir lalu ditiriskan. Kemudian dilanjutkan pengeringan menggunakan cahaya matahari selama dua hari. Kulit biji kakao dianggap kering apabila sudah rapuh (diremas menjadi hancur), kemudian simplisia yang telah kering dihaluskan dan disimpan dalam wadah plastik untuk mencegah pengaruh lembab dan pengotor lainnya.

#### 4.7.3 Penyiapan *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES)

Penyiapan pelarut NADES pada penelitian ini merujuk pada prosedur yang dilakukan oleh Pavlović (2020), Pembuatan NADES dipilih dengan menggunakan metode pemanasan dan pengadukan.

##### 1) NADES Kolin Klorida-Asam Malat

Kolin klorida ditimbang sebanyak 139,62 g (1 mol) dan asam malat sebanyak 134,09 g (1 mol), kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan dipanaskan diatas *hot plate* pada suhu 80 °C dengan kecepatan *stirrer* (350 rpm). Akuades sebanyak 50 % ditambahkan untuk mengurangi viskositas NADES. Pemanasan dilakukan sampai diperoleh larutan yang stabil (ditandai dengan campuran tetap bening, tidak mengendap, mengkristal ataupun berubah warna).

## 2) NADES Kolin Klorida-Gliserol

NADES Kolin klorida-gliserol dibuat dengan perbandingan mol 1:2. Kolin klorida berbentuk serbuk ditimbang sebanyak 139,62 g (1 mol). Gliserol yang dibutuhkan yaitu sebanyak 184 g (2 mol). Gliserol berbentuk cair dengan massa jenis 1,26 g/cm<sup>3</sup> (1 cm<sup>3</sup> setara dengan 1 mL), maka volume gliserol yang dibutuhkan adalah 146 mL. Kolin klorida dan gliserol kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan dipanaskan diatas *hot plate* pada suhu 80 °C dengan kecepatan *stirrer* (350 rpm). Akuades sebanyak 50 % ditambahkan untuk mengurangi viskositas NADES. Pemanasan dilakukan sampai diperoleh larutan yang stabil (ditandai dengan campuran tetap bening, tidak mengendap, mengkristal ataupun berubah warna).

### 4.7.4 Pembuatan Ekstrak

Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada penelitian ini yaitu 100 mg/mL. Simplisia kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) ditimbang masing-masing sebanyak 10 g kemudian ditambahkan 100 mL pelarut NADES. Ekstraksi dilakukan dengan *Ultrasonic bath* dengan frekuensi 53 kHz dengan suhu 40°C selama 60 menit, kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat selanjutnya digunakan untuk uji kandungan metabolit sekunder dan uji aktivitas antijamur. Ekstrak NADES yang akan digunakan untuk uji aktivitas antijamur kemudian dipisahkan lemaknya/*defatting* (Adrianto, 2012), dengan menambahkan pelarut n-heksana sebanyak volume ekstrak tersebut kedalam corong pisah dan dikocok, dari proses pemisahan ini didapatkan ekstrak NADES kulit biji kakao bebas lemak.

#### 4.7.5 Uji Kandungan Metabolit Sekunder

Masing-masing uji kandungan metabolit sekunder ekstrak NADES kulit biji kakao dilakukan tiga kali pengulangan.

##### 1) Uji alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak diuapkan di atas cawan porselin. Residu yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 M. Larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama berfungsi sebagai blanko, ditambahkan dengan 3 tetes HCl 2 M. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi *Dragendorff* dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi *Mayer*. Pada pereaksi *Dragendorff* akan terbentuk endapan berwarna jingga sedangkan pereaksi *Mayer* akan terbentuk endapan kuning yang menandakan positif adanya alkaloid.

##### 2) Uji flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan dengan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.

##### 3) Uji saponin

Sebanyak 2-3 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik lalu ditambahkan 1 tetes HCl 2 N. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit.

#### 4) Uji tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan dengan beberapa tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin.

#### 5) Uji steroid/Terpenoid

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial sebanyak 10 tetes dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Wahid *et al.*, 2020).

#### **4.7.6 Pembuatan Media *Saboraud Dextrose Agar* (SDA)**

Pembuatan media agar dilakukan dengan mencampur 6,5 g SDA dengan 100 mL akuades dalam erlenmeyer 250 mL. Medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna. Kemudian didiamkan dan disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 2 atm (Shinta, 2021).

#### **4.7.7 Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan detergen kemudian dikeringkan. Sterilisasi alat dan media pertumbuhan jamur dilakukan dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara dipijarkan pada nyala api bunsen (Amelia *et al.*, 2022).

#### **4.7.8 Kontrol Negatif dan Kontrol Positif**

Pembuatan larutan kontrol akan dilakukan dengan cara pembuatan larutan kontrol positif, yaitu larutan ketokonazol 2 % yang merupakan derivat imidazol sediaan 200 mg yang digerus dan dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 10

mL, serta kontrol negatif menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol.

#### **4.7.9 Peremajaan Kultur Jamur *Candida albicans***

*Candida albicans* dari kultur murni diremajakan dengan cara memindahkan satu jarum inokulasi kedalam media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) steril yang baru ke dalam cawan petri steril dan diinkubasi ke dalam incubator selama 24 jam

#### **4.7.10 Persiapan Suspensi Jamur Uji**

Kepadatan suspensi jamur uji sesuai dengan standar *Mc Farland* 0,5. Standar *Mc Farland* 0,5 dibuat dengan cara larutan  $\text{BaCl}_2$  1 % sebanyak 0,05 ml dicampur dengan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 % sebanyak 9,95 ml dalam labu ukur dan dihomogenkan. Suspensi ini digunakan sebagai larutan standar kekeruhan suspensi jamur (Amelia *et al.*, 2022).

Biakan *Candida albicans* yang berumur 24 jam diambil menggunakan kawat ose, kemudian dicampurkan ke dalam tabung reaksi yang berisi cairan NaCl 0,9 % sebanyak 10 mL. Suspensi jamur dihomogenkan dengan divortex selama lebih kurang 10 detik, lalu dituangkan ke dalam kuvet sebanyak 7 mL. Kuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometer untuk diukur kekeruhannya dengan panjang gelombang 530 nm dan angka absorbansi 0,5 – 0,6 yang berarti setara dengan standar *Mc Farland* 0,5 ( $1-5 \times 10^6$ ) yang mengandung kira-kira 1.000.000-5.000.000 (CFU/mL) (Shinta, 2021) (Bastian, 2022).

#### 4.7.11 Uji Aktivitas Antijamur

Pengujian aktivitas antijamur dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan metode difusi sumuran. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) steril yang sudah cair dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan menjadi padat. Setelah memadat, satu *swab* suspensi jamur *Candida albicans* yang sudah sesuai standar *Mc Farland* 0,5 disebar ke permukaan medium agar steril secara merata menggunakan kapas lidi steril dengan teknik *streaking* (Paramesti, 2017). Media SDA yang telah diinokulasi mikroba uji dibuat lima lubang sumuran dengan *cork bore* steril ukuran 6 mm. Pada tiap cawan petri dan lubang sumuran selanjutnya diteteskan sebanyak 50  $\mu$ L masing-masing konsentrasi ekstrak, kontrol positif (ketokonazol), dan kontrol negatif (pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan kolin klorida-gliserol). Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). Uji aktivitas antijamur dilakukan dalam enam kali pengulangan. Diameter zona hambat diukur menggunakan rumus : 
$$\frac{(Dv-Dc)+(Dh-Dc)}{2}$$

Keterangan :

Dv = diameter vertikal

Dh = diameter horizontal

Dc = diameter cakram/sumuran (Winastri *et al.*, 2020)

#### 4.8 Teknik Analisis Data

Pengujian data dilakukan menggunakan perangkat lunak program *Statistic Product and Service Solutions* (SPSS). Data metabolit sekunder yang didapat pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan antara dua jenis perlakuan ekstraksi, yaitu ekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan ekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol.

Data uji aktivitas antijamur dianalisis menggunakan uji komparatif *one way* ANOVA, karena untuk mengetahui perbedaan rata-rata pada setiap kelompok dimana terdapat satu faktor yaitu jenis pelarut yang digunakan (NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol).

Syarat uji ANOVA adalah normalitas dan homogenitas variansinya. Apabila data terdistribusi normal dan data pengujian homogenitas variansi terdistribusi homogen, maka diuji dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Apabila data tidak terdistribusi normal dan/atau data pengujian homogenitas variansi tidak terdistribusi homogen maka diuji dengan *Kruskall-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat adanya perbedaan bermakna pada masing-masing kelompok uji dengan tingkat kepercayaan sebesar 95 %.

ANOVA adalah singkatan dari analisis variansi, yaitu model yang berfungsi untuk mendeteksi perbedaan kelompok pada variabel terikat tunggal. ANOVA biasa dikenal dengan istilah “Uji F”. Pengujian menggunakan ANOVA ini tergolong dalam uji komparatif yang bertujuan membandingkan apakah rata-rata

(*mean*) tiga kelompok atau lebih yang diuji berbeda secara signifikan atau tidak.

Terdapat beberapa syarat untuk uji ANOVA , yaitu:

- 1) Variabel bebas (X) berada pada skala nominal atau ordinal
- 2) Variabel terikat (Y) berada pada skala interval atau rasio
- 3) Data sampel berdistribusi normal
- 4) Populasi bersifat homogen

ANOVA terbagi menjadi dua jenis, yaitu ANOVA satu arah (*one way ANOVA*) dan ANOVA dua arah (*two way ANOVA*). ANOVA satu arah digunakan untuk menguji hipotesis komparatif k sampel apa bila pada masing-masing sampel hanya terdiri atas satu kategori saja. ANOVA dua arah digunakan untuk menguji hipotesis komparatif k sampel apabila terdapat kategorisasi terhadap sampel. ANOVA dipakai untuk menguji perbandingan variabel tergantung (Y) ditinjau dari variabel bebas (X) (Febriani *et al.*, 2018).

Analisis varian atau ANOVA dua arah (*two way ANOVA*) secara prinsip sama dengan ANOVA satu arah (*one way ANOVA*), perbedaannya adalah pada jumlah faktor yang dilibatkan, pada ANOVA satu arah hanya ada satu faktor, sedangkan pada ANOVA dua arah terdiri dari dua faktor (Muhid, 2019).

## **BAB 5 HASIL PENELITIAN**

### **5.1 Determinasi Tanaman**

Hasil identifikasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Biologi Politeknik Negeri Jember dengan nomor surat 119/PL17.8/PG/2022 menyatakan bahwa tumbuhan yang digunakan merupakan tumbuhan kakao (*Theobroma cacao* L.). Hasil identifikasi tumbuhan dapat dilihat pada lampiran 1.

### **5.2 Kandungan Metabolit Sekunder**

Kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam penelitian ini diambil dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang terdapat pada kebun renteng, kecamatan Jenggawah, kabupaten Jember. Sampel yang digunakan adalah sampel kering yang kemudian diekstraksi menggunakan pelarut NADES yang berbeda yaitu NADES Kolin klorida-asam malat dan NADES Kolin klorida-gliserol. Ekstrak NADES yang didapatkan berupa ekstrak cair. Ekstrak NADES tersebut kemudian dilakukan analisis kualitatif kandungan metabolit sekunder, meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid.

#### **5.2.1 NADES kolin klorida-asam malat**

Hasil kandungan metabolit sekunder kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat positif mengandung alkaloid, flavonoid, dan saponin, sedangkan ketiga senyawa lainnya yaitu tanin, steroid dan triterpenoid menunjukkan hasil yang negatif. Hasil dari uji kandungan metabolit sekunder ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terlihat pada Tabel 5.1.

### 5.2.2 NADES kolin klorida-glisерol

Hasil kandungan metabolit sekunder kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-glisерol positif mengandung alkaloid, flavonoid, dan saponin, sedangkan ketiga senyawa lainnya yaitu tanin, steroid dan triterpenoid menunjukkan hasil yang negatif. Hasil dari uji kandungan metabolit sekunder ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terlihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Kandungan metabolit sekunder ekstrak kulit biji kakao

No.	Identifikasi	Ekstrak NADES Kolin klorida-asam malat	Ekstrak NADES Kolin klorida-glisерol
1	Alkaloid ➔ <i>Dragendorff</i> ➔ <i>Mayer</i>	+ -	+ -
2	Flavonoid	+	+
3	Saponin	+	+
4	Tanin	-	-
5	Steroid	-	-
6	Triterpenoid	-	-

Keterangan : (+) = positif mengandung metabolit sekunder

(-) = negatif mengandung metabolit sekunder

### 5.3 Uji Aktivitas Antijamur

Uji aktivitas antijamur pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Uji antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Candida albicans* menggunakan pelarut NADES yang berbeda yaitu NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-glisерol menunjukkan bahwa ekstrak yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat memiliki rata-rata diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-glisерol.

### 5.3.1 NADES kolin klorida-asam malat

Diameter zona hambat ekstrak kulit biji kakao menggunakan NADES kolin klorida-asam malat memiliki rata-rata sebesar  $18,66 \pm 2,49$  mm. Hasil uji aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Candida albicans* dapat dilihat pada Tabel 5.2.

### 5.3.2 NADES kolin klorida asam gliserol

Diameter zona hambat ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol memiliki rata-rata sebesar  $16,31 \pm 2,85$  mm. Hasil uji aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Candida albicans* dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil pengukuran zona hambat terhadap *Candida albicans*

Ekstrak	Diameter zona hambat (mm)						Rata-rata diameter zona hambat (mm) $\pm$ SD
	Replikasi						
	I	II	III	IV	V	VI	
Kulit biji kakao dengan pelarut Nades Kolin klorida-asam malat	21,48	20,43	19,39	16,11	15,14	19,4	$18,66 \pm 2,49$
Kulit biji kakao dengan pelarut Nades Kolin klorida-gliserol	15,58	20,46	11,73	15,75	17,01	17,37	$16,31 \pm 2,85$
Kontrol (+) Ketokonazol 2 %	25,2	34,96	33,41	28,21	28,64	28,74	$29,86 \pm 3,64$
Kontrol (-) Nades Kolin klorida-asam malat	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol (-) Nades Kolin klorida-gliserol	0	0	0	0	0	0	0

## 5.4 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini diawali dengan analisis normalitas dan homogenitas sebagai syarat untuk melakukan uji beda *One Way ANOVA*. Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan *Shapiro wilk*, normalitas data dilakukan bertujuan untuk melihat apakah data yang diperoleh melalui penelitian berdistribusi normal atau tidak. Berdasarkan hasil uji normalitas *Shapiro wilk*

yang dilakukan (Lampiran 2) menunjukkan bahwa data yang didapat pada penelitian ini memiliki distribusi normal karena nilai signifikansi ( $p > 0,05$ ). Hasil uji normalitas *Shapiro wilk* dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas *Shapiro wilk*

	Perlakuan	Signifikansi
Diameter Zona Hambat	NADES kolin klorida-asam malat	0.380
	NADES kolin klorida-gliserol	0.770
	Kontrol (+)	0.449

Uji selanjutnya adalah uji homogenitas data menggunakan uji *Levene test* dengan  $p > 0,05$  (Lampiran 2). Uji homogenitas data dilakukan bertujuan untuk melihat apakah data yang didapat dari hasil penelitian ini homogen atau tidak. Berdasarkan hasil uji *Levene test* menunjukkan nilai *sig.* 0,001. Hal ini membuktikan bahwa data pada penelitian ini adalah tidak homogen, karena nilai *sig.*  $< 0,05$ .

Setelah diketahui bahwa data terdistribusi normal dan tidak homogen, maka data telah tidak memenuhi syarat untuk uji parametrik menggunakan uji *One Way Anova*. Apabila data tidak terdistribusi normal dan/atau data pengujian homogenitas variansi tidak terdistribusi homogen maka diuji dengan *Kruskall-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk melihat adanya perbedaan bermakna pada masing-masing kelompok uji dengan tingkat kepercayaan sebesar 95 %.

Uji *Kruskal Wallis* adalah salah satu uji statistik non parametrik yang dapat digunakan untuk menguji apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok variabel independen dengan variabel dependennya (Jamco and A. M. Balami, 2022). Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* (lampiran 2) menunjukkan nilai

*Asymp. Sig.* 0,00 ( $p < 0,05$ ). Hal ini membuktikan bahwa setiap kelompok perlakuan memberikan perbedaan yang bermakna dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Uji selanjutnya adalah uji beda *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan pada kelompok perlakuan ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol. Berdasarkan hasil uji beda *Mann-Whitney* (lampiran 2) diketahui nilai *Asymp. Sig. (2-tailed)* sebesar 0,262 lebih besar dari nilai probabilitas 0,05. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik pada kelompok perlakuan ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

## BAB 6 PEMBAHASAN

### 6.1 Kandungan Metabolit Sekunder

Pada penelitian ini penggunaan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES) sebagai *green solvent* dikombinasikan dengan metode ekstraksi non-konvensional yaitu *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), sehingga diharapkan dapat diperoleh kondisi ekstraksi yang efisien, mudah, cepat dan ramah lingkungan. UAE adalah salah satu metode ekstraksi dengan memanfaatkan energi gelombang ultrasonik. Pada saat ekstrak disonikasi, gelombang ultrasonik memecah dinding sel dan melepaskan isi sel. UAE memanfaatkan efek kavitasi, yaitu pembentukan, pertumbuhan dan pecahnya *microbubble* (gelembung mikro) yang melepaskan sejumlah energi (Sasongko *et al.*, 2018)

Uji kualitatif komponen fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan suatu komponen fitokimia dalam ekstrak yang diujikan. Penentuan secara kualitatif dapat dilihat dari perubahan warna atau terbentuknya buih dan endapan jika sampel direaksikan dengan bahan kimia tertentu (Kayaputri *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini dilakukan analisis kualitatif kandungan metabolit sekunder, meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan dua macam NADES, yaitu NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol menunjukkan hasil yang sama, yaitu positif mengandung alkaloid, flavonoid dan saponin. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Kayaputri *et al.*, 2014) ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan

triterpenoid. Hal ini karena etanol memiliki kelebihan yaitu etanol lebih mudah berpenetrasi ke membran sel untuk mengekstrak bahan dari tanaman, juga hampir semua komponen aktif tanaman yang bersifat antimokroba paling sering diekstrak menggunakan etanol.

### **6.1.1 NADES kolin klorida-asam malat**

Hasil uji kualitatif kandungan metabolit sekunder dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat positif mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid dan saponin. Sedangkan ketiga senyawa lainnya yaitu tanin, steroid dan triterpenoid menunjukkan hasil yang negatif.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kulit biji kakao yang diekstrak menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat positif mengandung alkaloid. Alkaloid dapat dideteksi dengan pereaksi *Dragendorff*. Pereaksi *Dragendorff* merupakan campuran dari bismut nitrat yang bereaksi dengan kalium iodida menghasilkan endapan hitam bismuth (III) iodida, kemudian endapan tersebut larut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat (Andika, Halimatussakdiah and Amna, 2020). Senyawa alkaloid berinteraksi dengan ion tetraiodomerkurat (II) sehingga membentuk senyawa kompleks dan mengendap. Hal ini dikarenakan ion merkuri merupakan ion logam berat yang mampu mengendapkan senyawa alkaloid yang bersifat basa (Sulistyarini, Sari and Wicaksono, 2019). Terbentuknya endapan dan perubahan warna saat penambahan reagen *Dragendorff* mengindikasikan keberadaan alkaloid dalam sampel.

Flavonoid diuji keberadaannya menggunakan Mg dan HCl pekat. Senyawa flavonoid akan tereduksi dengan Mg dan HCl sehingga menghasilkan warna merah, kuning atau jingga (Sulistyarini, Sari and Wicaksono, 2019). Hasil pengujian flavonoid menunjukkan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak kulit biji kakao. Terbentuknya warna jingga setelah sampel direaksikan dengan asam klorida dan serbuk magnesium mengindikasikan keberadaan flavonoid (Kayaputri *et al.*, 2014).

Tujuan penambahan serbuk Mg dan HCl pekat pada uji reaksi warna untuk senyawa flavonoid adalah untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium. Serbuk Mg dan HCl bereaksi membentuk gelembung yang merupakan gas H<sub>2</sub> (Dewi, Saptawati and Rachma, 2021).

Uji kandungan saponin ekstrak NADES kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) secara kualitatif menunjukkan respon positif terhadap keberadaan saponin. Keberadaan saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit (Wahid and Safwan, 2020).

Saponin adalah senyawa yang memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik. Gugus hidrofilik berikatan dengan air, dan gugus hidrofobik berikatan dengan udara sehingga membentuk buih ketika dikocok. Penambahan HCl 2N bertujuan agar tingkat kepolaran bertambah, sehingga gugus hidrofilik memiliki ikatan yang lebih kuat dan busa yang terbentuk stabil. Gugus polar menghadap ke luar dan gugus non polar menghadap ke dalam pada struktur misel dan keadaan ini yang membentuk busa (Dewi, Saptawati and Rachma, 2021).

Pengujian tanin dapat dilakukan dengan uji reaksi warna dengan penambahan  $\text{FeCl}_3$  (Sulistyarini, Sari and Wicaksono, 2019). Tanin juga merupakan salah satu senyawa organik polifenol yang jika direaksikan dengan besi akan menghasilkan warna yang gelap (Andika, Halimatussakdiah and Amna, 2020). Senyawa tanin dengan  $\text{FeCl}_3$  akan terhidrolisis membentuk warna biru kehitaman (Sulistyarini, Sari and Wicaksono, 2019).

Hasil uji tanin dengan  $\text{FeCl}_3$  pada ekstrak kulit biji kakao dengan pelarut NADES Kolin klorida-asam malat negatif mengandung tanin karena hasil yang diperoleh adalah berwarna kuning.

#### **6.1.2 NADES kolin klorida-gliserosol**

Hasil uji kualitatif kandungan metabolit sekunder dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserosol positif mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid dan saponin. Sedangkan ketiga senyawa lainnya yaitu tanin, steroid dan triterpenoid menunjukkan hasil yang negatif.

Alkaloid dapat dideteksi dengan pereaksi *Dragendorff*. Pereaksi *Dragendorff* mengandung logam-logam bismut nitrat dan kalium iodida. Ion logam  $\text{K}^+$  dari reagen *Dragendorff* akan membentuk ikatan dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid berwarna coklat muda sampai kuning yang mengendap (Kayaputri *et al.*, 2014).

Hasil uji alkaloid kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserosol pada pereaksi *Dragendorff* positif mengandung alkaloid karena terbentuk endapan berwarna jingga, sedangkan pada pereaksi *Mayer* tidak dijumpai sama

sekali adanya kandungan alkaloid karena tidak adanya endapan berwarna putih. Perbedaan yang ditemukan dari hasil pengujian yang dilakukan adalah tidak adanya senyawa alkaloid pada pereaksi *Mayer*, sedangkan ditemukannya senyawa alkaloid pada pereaksi *Dragendorff*.

Kesanggupan alkaloid pada pereaksi yang digunakan untuk bergabung dengan logam yang memiliki berat atom tinggi seperti bismuth, merkuri, tungsten atau iod. Pereaksi *Mayer* mengandung merkuri klorida dan kalium iodida, sedangkan pereaksi *Dragendorff* mengandung merkuri klorida dan bismuth nitrat dalam nitrit berair. Perbedaan pada pereaksi tersebut ditunjukkan dalam hal sensitifitas yang berbeda terhadap gugus alkaloid. Dilihat dari popularitasnya, pereaksi *Mayer* kurang sensitif dibandingkan pereaksi *Dragendorff*. Hal ini terbukti dengan tidak dijumpainya endapan berwarna putih pada pengujian (Tarakanita, Satriadi and Jauhari, 2019)

Uji flavonoid dilakukan dengan menambah Mg dan HCl pekat pada sampel ekstrak. Penambahan HCl pekat digunakan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan tergantikan oleh  $H^+$  dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat dapat menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Ikalinus, Widyastuti and Eka Setiasih, 2015). Hasil pengujian flavonoid menunjukkan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak kulit biji kakao.

Pengujian senyawa saponin dilakukan dengan memanaskan sampel yang ditambahkan dengan air hingga mendidih selama 5 menit, setelah dingin sampel

di kocok dengan kuat sehingga terbentuk busa kemudian ditambahkan HCl 2M (Nugrahani, Andayani and Hakim, 2016). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak mengandung saponin karena terbentuk busa yang stabil selama 10 menit.

Pengujian senyawa tanin menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna hijau kehitaman pada saat penambahan FeCl<sub>3</sub> 1% (Nugrahani, Andayani and Hakim, 2016) Hasil uji tanin dengan FeCl<sub>3</sub> pada ekstrak kulit biji kakao dengan pelarut NADES Kolin klorida-gliserol negatif mengandung tanin karena hasil yang diperoleh adalah berwarna kuning.

## 6.2 Uji Aktivitas Antijamur

Penentuan diameter zona hambat ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Candida albicans* dilakukan dengan metode difusi agar yang menggunakan metode lubang sumuran. Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat memiliki rata-rata diameter zona hambat  $18,66 \pm 2,49$  mm, sedangkan ekstrak yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol memiliki diameter zona hambat  $16,31 \pm 2,85$  mm.

Hasil uji beda *Mann-Whitney* (lampiran 2) diketahui nilai Asymp. Sig. (2-tailed) sebesar 0,262 lebih besar dari nilai probabilitas 0,05. Maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik pada kelompok perlakuan ekstrak kulit biji kakao menggunakan pelarut NADES kolin

klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

Hasil uji metabolit sekunder dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan dua macam pelarut NADES yang berbeda yaitu NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol menunjukkan keduanya positif mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid dan saponin. Aktivitas antijamur dari ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Candida albicans* menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol diduga disebabkan adanya senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antijamur seperti alkaloid, flavonoid dan saponin.

### **6.2.1 NADES kolin klorida-asam malat**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-asam malat memiliki rata-rata diameter zona hambat lebih besar daripada ekstrak yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-gliserol. Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat memiliki rata-rata diameter zona hambat  $18,66 \pm 2,49$  mm.

Aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat memiliki rata-rata diameter zona hambat lebih besar dari NADES kolin klorida-gliserol dalam menghambat

pertumbuhan jamur *Candida albicans* meskipun secara statistik dianggap tidak terdapat perbedaan secara bermakna.

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Gama, Pratama (2018) juga mengindikasikan bahwa ekstrak yang diekstraksi menggunakan NADES yang tersusun dari asam organik memiliki aktivitas antimikroba lebih tinggi daripada NADES yang mengandung alkohol, amino dan gula. Pengaruh dari sebuah gugus hidroksil tambahan pada asam organik sebagai HBD meningkatkan aktivitas antimikroba.

Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Abdullah, Dheyab and Saleh (2021) mengenai aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* menggunakan pelarut NADES juga menunjukkan bahwa tanaman yang diekstrak menggunakan NADES kolin klorida-asam malat memiliki aktivitas antijamur lebih baik.

Hasil dari uji metabolit sekunder ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-asam malat positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan saponin. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antijamur.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Jalianto (2015) menunjukkan bahwa senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, dan terpenoid memiliki aktivitas antijamur. Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa mengandung satu atau lebih atom nitrogen yang bergabung dalam bentuk siklik. Mekanisme hambatan jamur senyawa alkaloid dengan cara memanfaatkan sifat basa, dimana alkaloid memiliki pH >7 dan pahit. Sifat basa ini memungkinkan akan menghambat pertumbuhan jamur, karena jamur *Candida albicans* mampu hidup pada pH 3,8 –

6,5. Senyawa ini bekerja dengan merusak lapisan dinding sel sehingga tidak terbentuk lagi secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel (Hardani *et al.*, 2020).

Flavonoid memiliki gugus hidroksil yang dapat menyebabkan perubahan komponen organik pada sel mikroba serta transfer nutrisi yang terganggu dan berakibat toksik terhadap jamur (Hardani *et al.*, 2020). Senyawa flavonoid dapat berperan sebagai antijamur dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut yang menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel jamur. Selain itu, flavonoid juga dapat merusak membran sel jamur yang akan mempengaruhi proses pertumbuhan jamur karena membran sel merupakan tempat terjadinya beberapa reaksi enzimatik sel. Selain itu, senyawa fenolik dapat berperan sebagai antijamur dengan mendenaturasi ikatan protein pada membran sel yang menyebabkan membran sel menjadi lisis pada kadar yang rendah. Sedangkan pada kadar yang tinggi, senyawa fenolik akan menyebabkan koagulasi protein yang menyebabkan kematian sel (Sri Pragita *et al.*, 2020).

Saponin mempunyai efektifitas sebagai anti jamur. Mekanisme anti jamur saponin yaitu dengan menurunkan tegangan permukaan membrane sterol dari dinding sel jamur permeabilitasnya meningkat. Efek utama saponin terhadap jamur yaitu terlepasnya protein dan enzim dari dalam sel jamur sehingga lama kelamaan jamur akan mati (Hardani *et al.*, 2020)

### 6.2.2 NADES kolin klorida-gliserol

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-gliserol memiliki rata-rata diameter zona hambat lebih kecil daripada ekstrak yang diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-asam malat. Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES NADES kolin klorida-gliserol memiliki diameter zona hambat  $16,31 \pm 2,85$  mm.

Aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol memiliki rata-rata diameter zona hambat lebih kecil dari NADES kolin klorida-asam malat dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* meskipun secara statistik dianggap tidak terdapat perbedaan secara bermakna.

Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Grozdanova (2020), menunjukkan bahwa tanaman yang diekstrak menggunakan pelarut NADES berbasis asam memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* lebih baik daripada menggunakan NADES kolin klorida-gliserol.

Ekstrak kulit biji kakao memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*, karena adanya kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid dan saponin yang berperan sebagai senyawa antijamur. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antijamur dengan mekanisme yang berbeda-beda.

Flavonoid dapat menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel. Gugus hidroksil yang terdapat dalam senyawa flavonoid menyebabkan timbulnya efek toksik pada jamur (Octaviani and Fadila, 2018).

Alkaloid termasuk senyawa metabolit sekunder dalam kulit biji kakao yang juga berfungsi sebagai antijamur, mekanisme aktivitas antijamur alkaloid yaitu dengan cara menyisip diantara dinding sel dan DNA kemudian mencegah replikasi DNA jamur sehingga pertumbuhan jamur akan terganggu (Komala, Yulianita and Siwi, 2020).

Saponin mempunyai aktivitas sebagai antijamur dengan mekanisme kerjanya yaitu dengan cara merusak membran sel, sehingga menyebabkan kebocoran sel berupa keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel jamur yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida yang akhirnya memacu kematian sel (Yuliana, Leman and Anindita, 2015)

## **BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- 7.1.1 Ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat memiliki kandungan metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, dan saponin.
- 7.1.2 Ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol memiliki kandungan metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, dan saponin.
- 7.1.3 Ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*.
- 7.1.4 Ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-gliserol memiliki aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans*.
- 7.1.5 Tidak terdapat perbedaan aktivitas antijamur dari ekstrak kulit biji kakao yang diekstraksi menggunakan pelarut NADES kolin klorida-asam malat dan NADES kolin klorida-gliserol terhadap *Candida albicans*.

## 7.2 Saran

- 7.2.1 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi kandungan metabolit sekunder kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) menggunakan metode lain.
- 7.2.2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam memaksimalkan aktivitas antijamur ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Candida albicans* sehingga dapat bermanfaat khususnya di bidang kefarmasian.
- 7.2.3 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan beberapa teknik ekstraksi kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*), sehingga diharapkan mendapat hasil ekstraksi yang jauh lebih efektif.
- 7.2.4 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengujian aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* dengan variasi pelarut NADES yang digunakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A. K., Dheyab, A. S. and Saleh, R. O. (2021) 'Evaluation of anti-fungal activity derivative from *Premna odorata* Blanco extract by deep eutectic solvents', *Plant Science Today*, 8(4), pp. 917–921. doi: 10.14719/PST.2021.8.4.1381.
- Adrianto, K. (2012) *Efek Antibakteri Polifenol Biji Kakao pada Streptococcus mutans*, Universitas Jember.
- Agustina, E. *et al.* (2021) 'Uji aktivitas antijamur ekstrak black garlic terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*', *Bioma : Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(2), pp. 143–157. doi: 10.26877/bioma.v10i2.6371.
- Amelia, R. *et al.* (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. doi: 10.37874/ms.v7i1.295.
- Andika, B., Halimatussakdiah and Amna, U. (2020) 'Analisis Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Gulma Siam (*Chromolaena odorata* L.) di Kota Langsa, Aceh', *QUIMICA: Jurnal Kimia Sains dan Terapan*, 2(2), pp. 1–6. doi: 10.33059/jq.v2i2.2647.
- Arianto, Y. C. . (2018) *56 Makanan Ajaib dan Manfaatnya untuk Kesehatan dan Kecantikan*. Venom Publisher. Available at: [https://www.google.co.id/books/edition/56\\_Makanan\\_Ajaib\\_dan\\_Manfaatnya\\_untuk\\_Ke/CPBjDwAAQBAJ?hl=id&gbpv=0](https://www.google.co.id/books/edition/56_Makanan_Ajaib_dan_Manfaatnya_untuk_Ke/CPBjDwAAQBAJ?hl=id&gbpv=0).
- Balafif, F. F., Satari, M. H. and Dhianawaty, D. (2017) 'Aktivitas Antijamur Fraksi Air Sarang Semut *Myrmecodia pendens* Pada *Candida albicans* ATCC 10231', *Majalah Kedokteran Bandung*, 49(1), pp. 28–34. doi: 10.15395/mkb.v49n1.984.
- Banon, L. S. (2020) *Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri Patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella sp.** Universitas Padjadjaran.
- Bastian (2022) *Ubi Kayu : Medium Alternatif Untuk Isolasi Jamur *Trichophyton rubrum**. Tangerang Selatan: Pascal Books.
- Dewi, E. R. O. and Usman, U. (2016) 'Uji Fitokimia dan Uji Antibakteri dari Akar Mangrove *Rhizopora apiculata* terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*', *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 3. doi: 10.25026/mpc.v3i2.106.

- Dewi, I. G. A. M., Ganda Putra, G. P. and Wrasati, L. P. (2021) 'Karakteristik Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Sumber Antioksidan pada Perlakuan Suhu dan Waktu Maserasi', *JURNAL REKAYASA DAN MANAJEMEN AGROINDUSTRI*, 9(1). doi: 10.24843/jrma.2021.v09.i01.p01.
- Dewi, I. S., Saptawati, T. and Rachma, F. A. (2021) 'Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) Phytochemical Screening of Tamarillo Peel and Seeds Ethanol Extracts (*Solanum Betaceum* Cav.)', *Prosiding Seminar Nasional UNIMUS*, 4, pp. 1210–1218.
- Fahmi, E. (2019) *Uji Efektivitas Antikapang Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Pertumbuhan Berbagai Jenis Khamir*. Universitas Padjadjaran.
- Febriani, N. S. and Dewi, W. W. A. (2018) *Teori dan Praktis: Riset Komunikasi Pemasaran Terpadu*. Universitas Brawijaya Press.
- Gama, G. R. F. and Pratama, Z. A. (2018) *Antimicrobial Testing of Dissolved Curcuminoids in Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)*. Sepuluh Nopember Institute Of Technology.
- Grozdanova, T. *et al.* (2020) 'Extracts of medicinal plants with natural deep eutectic solvents: enhanced antimicrobial activity and low genotoxicity', *BMC Chemistry*. Springer International Publishing, 14(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s13065-020-00726-x.
- Hameed, A. R., Ali, S. M. and Ahmed, L. (2018) 'Biological Study of Candida Species and Virulence Factor Endocrinology View project Prevalance Dyslipidemia in DM Patient View project', *IJARJET*, 1(4), pp. 8–16.
- Hanani, E. (2020) *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hardani, R. *et al.* (2020) 'Uji Anti Jamur Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)', *Jurnal IPA & Pembelajaran IPA*, 4(1), pp. 92–102. doi: 10.24815/jipi.v4i1.16579.
- Hardianti, M. F. and Tonica, W. W. (2018) *Kurkuminoid Natural Deep Eutetic Solvent Secara Spektrofotometri Uv-Vis Dalam Stability Test of Kurkuminoids in Natural Deep Eutetic Solvent ( Nades ) By Spektrofotometri Uv-Vis*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- He, X. *et al.* (2020) 'Green and Efficient Ultrasonic-Assisted Extraction of Bioactive Components from *Salvia miltiorrhiza* by Natural Deep Eutectic Solvents', *Molecules*, 25(1), p. 140.

- Hikmawanti, N. P. E. *et al.* (2021) 'Natural deep eutectic solvents (Nades): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development', *Plants*, 10(10). doi: 10.3390/plants10102091.
- Huang, J. *et al.* (2019) 'Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products', *Journal of Chromatography A*, 1598. doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.046.
- Hutasoit, C. M. D., Setyaningsih, Y. and Pramono, A. (2020) 'Antifungal Effectiveness of Cacao Bean Shells Extract (*Theobroma cacao* L.) on *Trichophyton rubrum* Growth In Vitro', *Biomedika*, 12(2), pp. 65–71. doi: 10.23917/biomedika.v12i2.10176.
- Idroes, R. *et al.* (2019) *Skrining Aktivitas Tumbuhan yang Berpotensi sebagai Bahan Anti Mikroba di Kawasan Ie Brôk (Upflow Geothermal Zone) Aceh Besar*. Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Ikalinus, R., Widyastuti, S. and Eka Setiasih, N. (2015) 'Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa Oleifera*)', *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1), p. 77.
- Jalianto (2015) *Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Biji Buah Langsung (Lansium domesticum Corr.) terhadap Jamur Candida albicans secara In Vitro*. Universitas Tanjungpura.
- Jamco, J. C. S. and A. M. Balami (2022) 'Analisis Kruskal-Willis untuk Mengetahui Konsentrasi Belajar Mahasiswa Berdasarkan Bidang Minat Program Staudi Statistika FMIPA UNPATI', *Jurnal Matematika, Statistika dan Terapannya*, 1(1), pp. 39–44.
- Jawetz, Melnick and Adelberg (2020) *Jawetz, Melnick, and Adelberg Medical Microbiology*. 27th edn. Edited by and S. M. Carroll, K. C., S. A. Morse, T. Mietzner. EGC.
- Jayanegara, A. *et al.* (2019) *Komponen Antinutrisi pada Pakan*. PT Penerbit IPB Press.
- Jokić, S. *et al.* (2018) 'Separation of active compounds from food by-product (Cocoa Shell) using subcritical water extraction', *Molecules*, 23(6). doi: 10.3390/molecules23061408.
- Julianto, T. S. (2019) *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.

- Jurić, T. *et al.* (2021) 'The evaluation of phenolic content, in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Mentha piperita* extracts obtained by natural deep eutectic solvents', *Food Chemistry*, 362(January). doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130226.
- Kandoli, F., Abijulu, J. and Leman, M. (2016) 'Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Durian (*Durio Zybethinus*) terhadap Pertumbuhan *Candida Albicans* secara In Vitro', *Pharmacon*, 5(1), pp. 46–52.
- Karim, I. *et al.* (2020) *Agribisnis Kakao*. Sleman: Deepublish.
- Kayaputri, I. L. *et al.* (2014) 'Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)', *Chimica et Natura Acta*, 2(1), pp. 83–90. doi: 10.24198/cna.v2.n1.9140.
- Komala, O., Yulianita and Siwi, F. R. (2020) 'AKTIVITAS ANTIJAMUR EKSTRAK ETANOL 50% DAN ETANOL 96% DAUN PACAR KUKU *Lawsonia inermis* L TERHADAP *Trichophyton mentagrophytes*', *Ekologia*, 19(1), pp. 12–19. doi: 10.33751/ekol.v19i1.1657.
- Kristanti, A. N. *et al.* (2019) *Fitokimia*. Airlangga University Press.
- Kumoro, A. . (2015) *Teknologi Ekstraksi Senyawa Bahan Aktif dari Tanaman Obat*. Yogyakarta: Plantaxia.
- Manurung, H. (2021) *Tabat Barito (Ficus Deltoidea Jack) Kajian Budidaya, Kandungan Metabolit Sekunder, Bio-Aktivitas, Prospek Fitofarmakologis*. Deepublish.
- Matheos, A. S. (2021) *Uji Aktivitas Antijamur Candida Albicans Ekstrak Etanol Batang Tulak (Schefflera arboricola) Asal Lembor Manggarai Barat Nusa Tenggara Timur*. Universitas Nusa Cendana.
- Mayer, F. L., Wilson, D. and Hube, B. (2013) 'Candida albicans pathogenicity mechanisms', *Virulence*, 4(2). doi: 10.4161/viru.22913.
- Muhid, A. (2019) *Analisis Statistik 5 Langkah Praktis Analisis Statistik dengan SPSS for Windows*. 2nd edn. Edited by D. N. Hidayat. Sidoarjo: Zifatama Jawa.
- Ningsih, D. R. (2017) 'Ekstrak Daun Mangga (*Mangifera indica* L.) Sebagai Antijamur Terhadap Jamur *Candida albicans* dan Identifikasi Golongan Senyawa', *Jurnal Kimia Riset*, 2(1). doi: 10.20473/jkr.v2i1.3690.
- Nugrahani, R., Andayani, Y. and Hakim, A. (2016) 'SKRINING FITOKIMIA DARI EKSTRAK BUAH BUNCIS (*Phaseolus vulgaris* L) DALAM

- SEDIAAN SERBUK', *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 2(1). doi: 10.29303/jppipa.v2i1.38.
- 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). doi: 10.24198/jthp.v1i2.27537.
- Octaviani, M. and Fadila, F. (2018) 'Uji Aktivitas Antijamur Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Jamur *Candida albicans*', *Jurnal Katalisator*, 3(2), p. 125. doi: 10.22216/jk.v3i2.3309.
- Okiyama, D. C. G. *et al.* (2018) 'Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent', *Food Research International*, 114. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.055.
- Ornay, A. K. De, Prehananto, H. and Dewi, A. S. S. (2017) 'Daya Hambat Pertumbuhan *Candida albicans* dan Daya Bunuh *Candida albicans* Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.)', *Jurnal Wiyata*, 4(1).
- Paramesti, S. (2017) *Perbandingan Efektivitas Antifungi Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*) dan Nistatin dengan Metode Difusi Cakram terhadap *Candida albicans**. Airlangga. doi: 10.46638/jmi.v3i1.49.
- Pavlović, N. *et al.* (2020) 'Green extraction methods for active compounds from food waste - Cocoa bean shell', *Foods*, 9(2), pp. 1–14. doi: 10.3390/foods9020140.
- Prawoto, A. *et al.* (2008) *Panduan Lengkap Kakao*. Edited by T. Wahyudi, T. . Panggabean, and Pujianto. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahmawati, D. (2020) *Mikrobiologi Farmasi*. Edited by D. Rachmawati. Yogyakarta: PUSTAKA BARU PRESS.
- Rojo-Poveda, O. *et al.* (2021) 'Chemometric classification of cocoa bean shells based on their polyphenolic profile determined by rp-hplc-pda analysis and spectrophotometric assays', *Antioxidants*, 10(10). doi: 10.3390/antiox10101533.
- Sasongko, A. *et al.* (2018) 'Aplikasi Metode Nonkonvensional Pada Ekstraksi Bawang Dayak', *JTT (Jurnal Teknologi Terpadu)*, 6(1), p. 8. doi: 10.32487/jtt.v6i1.433.
- Shinta, D. G. (2021) *Uji Daya Hambat Ekstrak Biji Buah Durian (*Durio zibethinus* Murray) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans**, Jkk. Universitas Sumatera Utara.

- Sri Pragita, A. *et al.* (2020) ‘Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kulit dan Kayu Sakit Ranting Sengon Terhadap Bakteri dan’, *Jamur Jurnal Analisis Kesehatan*, 9(2), p. 41.
- Sugiyono (2009) *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: ALFABETA.
- Suhendar, U. *et al.* (2020) ‘Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides*)’, *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(1), pp. 76–83. doi: 10.33751/jf.v10i1.2069.
- Sukadirman (2020) *Buku Ajar Farmakognosi*. Airlangga University Press.
- Sulistiyarini, I., Sari, D. A. and Wicaksono, T. A. (2019) ‘Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*)’, *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, pp. 56–62.
- Supomo, S. *et al.* (2021) ‘Aktivitas Anti Jamur Fraksi Aktif Ekstrak Etanol Umbi Bawang Rambut (*Allium Chinense* G.Don) terhadap Jamur *Candida Albicans*’, *Jl-KES (Jurnal Ilmu Kesehatan)*, 4(2). doi: 10.33006/ji-kes.v4i2.188.
- Supomo, Sa’adah, H. and Syamsul, E. S. (2021) *Khasiat Tumbuhan Akar Kuning Berbasis Bukti*. Nas Media Pustaka.
- Swandiyasa, K., Puspawati, N. M. and Asih, I. A. R. A. (2019) ‘POTENSI EKSTRAK DAUN CENDANA (*Santalum album* L.) SEBAGAI SENYAWA PENGHAMBAT JAMUR *Candida albicans*’, *Jurnal Kimia*, p. 159. doi: 10.24843/jchem.2019.v13.i02.p06.
- Tarakanita, D., Satriadi, T. and Jauhari, A. (2019) ‘Potensi Keberadaan Fitokimia Kamalaka (*Phyllanthus emblica*) Tempat Tumbuh Berdasarkan Perbedaan Ketinggian’, *Jurnal Sylva Scientiae*, 02(4), pp. 645–654. Available at: <https://ppjp.ulm.ac.id/journals/index.php/jss/article/view/1845>.
- Tjitrosoepomo, G. (2007) *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. 9th edn. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Tyasmoro, S. Y., Permanasari, P. N. and Saitama, A. (2021) *Teknologi produksi tanaman perkebunan*. Malang: UB Press.
- Utami, N., Auliah, A. and Dini, I. (2022) ‘Studi Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder beberapa Ekstrak Tai Anging (*Usnea* sp.) dan Uji Bioaktivitasnya terhadap (*Candida albicans*)’, *Chemica: Jurnal Ilmiah Kimia dan Pendidikan Kimia*, 23(1), p. 90. doi: 10.35580/chemica.v23i1.34077.

- Verdiana, M., Widarta, I. W. R. and Permana, I. D. G. M. (2018) 'Pengaruh Jenis Pelarut pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.)', *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 7(4). doi: 10.24843/itepa.2018.v07.i04.p08.
- Vinolina, N. S. (2021) *Pegagan (Centella asiatica L. Urban) dan Metabolit Sekundernya*. Edited by J. Simarmata. Yayasan Kita Menulis.
- Wahid, A. R. and Safwan, S. (2020) 'Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Terhadap Ekstrak Tanaman Ranting Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.)', *Lambung Farmasi: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 1(1). doi: 10.31764/lf.v1i1.1208.
- Wang, R. *et al.* (2021) 'Customized deep eutectic solvents as green extractants for ultrasonic-assisted enhanced extraction of phenolic antioxidants from dogbane leaf-tea', *Foods*, 10(11). doi: 10.3390/foods10112527.
- Winastri, N. L. A. P., Muliastri, H. and Hidayati, E. (2020) 'Aktivitas Antibakteri Air Perasan dan Rebusan Daun Calincing (*Oxalis corniculata* L.) terhadap *Streptococcus mutans*', *Berita Biologi*, 19(2). doi: 10.14203/beritabiologi.v19i2.3786.
- Yuliana, S. R. I., Leman, M. A. and Anindita, P. S. (2015) 'UJI DAYA HAMBAT SENYAWA SAPONIN BATANG PISANG (*Musa paradisiaca*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Candida albicans*', *e-GIGI*, 3(2). doi: 10.35790/eg.3.2.2015.10486.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1: Hasil Determinasi

	<div style="float: right; border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;">           Kode Dokumen : FR-AUK-064            Revisi : 0         </div> <p> <b>KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,            RISET DAN TEKNOLOGI</b>  <b>POLITEKNIK NEGERI JEMBER</b>  <b>UPT. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU</b>            Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531            E-mail : <a href="mailto:Polije@polije.ac.id">Polije@polije.ac.id</a> Web Site : <a href="http://www.Polije.ac.id">http://www.Polije.ac.id</a> </p>
<hr/> <p><b><u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN</u></b></p> <p>No: 119/PL.17.8/PG/2022</p>	
<p>Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi S1 Farmasi No: 1577/FIKES.UDS/U/VI/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:</p>	
<p>Nama : Retno Triasih            NIM : 18040088            Jur/Fak/PT : Prodi S1 Farmasi/ Universitas dr. Soebandi</p>	
<p>maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:  <i>Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Malvales; Famili: Sterculiaceae; Genus: Theobroma; Spesies: Theobroma cacao, L.</i></p>	
<p>Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.</p>	
<p>Jember, 13 Juli 2022            Kepala UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu              Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM            NIP. 197106212001121001</p>	

## Lampiran 2: Hasil Uji Statistik

### Deskriptif Data Penelitian

#### Descriptives

Diameter\_Zona\_Hambat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					NADES kolin klorida-asam malat	6		
NADES kolin klorida-gliserol	6	16.3167	2.85162	1.16417	13.3241	19.3093	11.73	20.46
kontrol (+) ketokonazol 2%	6	29.8667	3.63876	1.48552	26.0480	33.6853	25.20	35.00
kontrol (-) Nades kolin klorida-asam malat	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
kontrol (-) Nades kolin klorida-gliserol	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	30	12.9683	11.93502	2.17903	8.5117	17.4249	.00	35.00

### Uji normalitas

#### Tests of Normality<sup>c,d</sup>

	Perlakuan	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diameter_Zona_Hambat	NADES kolin klorida-asam malat	.901	6	.380
	NADES kolin klorida-gliserol	.954	6	.770
	kontrol (+) ketokonazol 2%	.912	6	.449

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

c. Diameter\_Zona\_Hambat is constant when Perlakuan = kontrol (-) Nades kolin klorida-asam malat. It has been omitted.

d. Diameter\_Zona\_Hambat is constant when Perlakuan = kontrol (-) Nades kolin klorida-gliserol. It has been omitted.

## Uji homogenitas

**Test of Homogeneity of Variances**

Diameter\_Zona\_Hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.410	4	25	.001

Uji *Kruskall wallis***Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank
Diameter_Zona_Hambat	NADES kolin klorida-asam malat	6	19.67
	NADES kolin klorida-gliserol kontrol (+) ketokonazol 2%	6	17.33
	kontrol (-) Nades kolin klorida-asam malat	6	6.50
	kontrol (-) Nades kolin klorida-gliserol	6	6.50
	Total	30	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Diameter_Zona _Hambat
Chi-Square	27.013
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Perlakuan

Uji *Mann Whitney***Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter_Zona_Hambat	NADES kolin klorida-asam malat	6	7.67	46.00
	NADES kolin klorida-gliserol Total	6	5.33	32.00

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Diameter_Zona _Hambat
Mann-Whitney U	11.000
Wilcoxon W	32.000
Z	-1.121
Asymp. Sig. (2-tailed)	.262
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Perlakuan

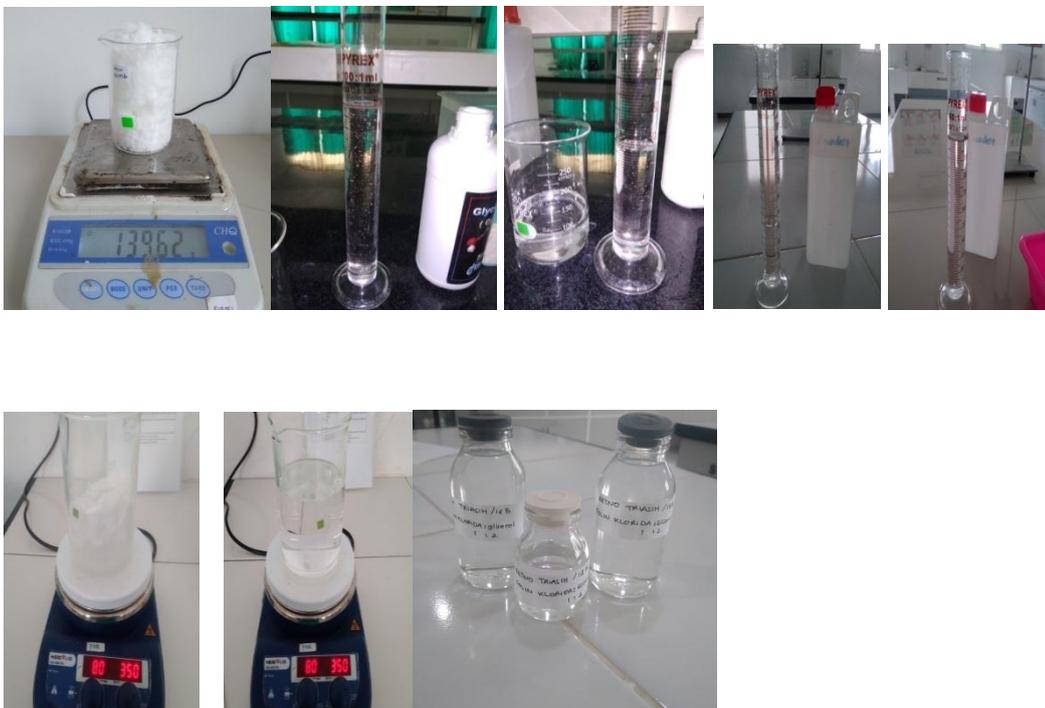
b. Not corrected for ties.

### Lampiran 3: Dokumentasi

#### a. Pembuatan NADES kolin klorida-asam malat



#### b. Pembuatan NADES kolin klorida-gliseryl



## c. Ekstraksi

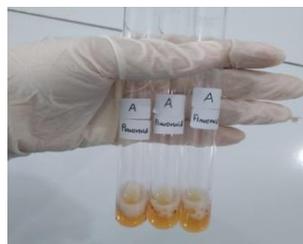


## d. Hasil uji metabolit sekunder ekstrak Kulit biji kakao dengan pelarut NADES Kolin klorida-asam malat

## Alkaloid



## Flavonoid



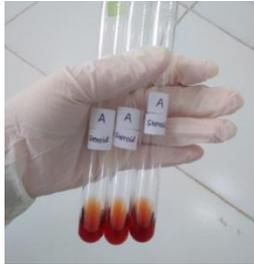
## Saponin



## Tanin



Steroid



triterpenoid



e. Hasil uji metabolit sekunder ekstrak Kulit biji kakao dengan pelarut NADES Kolin klorida-glisserol

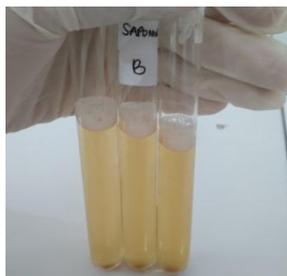
Alkaloid



Flavonoid



Saponin



Tanin



Steroid



Triterpenoid



f. Pembuatan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA)



g. Sterilisasi alat dan bahan menggunakan Autoklaf



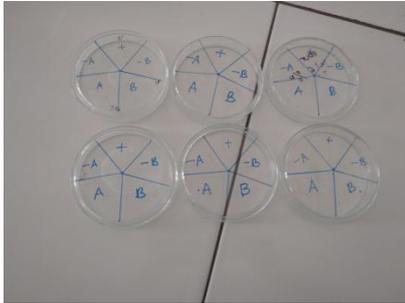
h. Peremajaan jamur *Candida albicans*



i. pembuatan standard Mc Farland dan suspensi jamur sesuai standard Mc Farland



j. Membagi cawan petri menjadi lima bagian



k. Pembuatan kontrol positif ketokonazol 2%



l. Proses Uji Aktivitas Antijamur



## Lampiran 4: Perhitungan

### 1. Perhitungan NADES kolin klorida-asam malat

- Kolin klorida ditimbang sebanyak 139,62 g (1 mol)
- Asam malat sebanyak 134,09 g (1 mol)
- Akuades sebanyak 50% volume yang didapatkan

### 2. Perhitungan NADES kolin klorida-gliserol

- NADES Kolin klorida-gliserol dibuat dengan perbandingan mol 1:2
- Kolin klorida ditimbang sebanyak 139,62 g (1 mol)
- Gliserol sebanyak 184 g (2 mol)  
Gliserol berbentuk cair dengan massa jenis  $1,26 \text{ g/cm}^3$  ( $1 \text{ cm}^3$  setara dengan 1 mL), maka volume gliserol yang dibutuhkan adalah 146 mL.
- Akuades sebanyak 50% volume yang didapatkan

### 2. Perhitungan *Mc Farland* 0,5

$\text{BaCl}_2$  1% = 1 gram  $\text{BaCl}_2$  dilarutkan dalam 100 mL akuades

- Dipipet sebanyak 0,05 mL = 50  $\mu\text{L}$

$\text{H}_2\text{SO}_4$  1% = 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dilarutkan dalam 100 mL akuades

- Dipipet sebanyak 9,95 mL = 9 mL + 950  $\mu\text{L}$

### 2. Perhitungan media SDA

65 gram dilarutkan kedalam 100 mL akuades

## Lampiran 5: Dokumentasi Seminar Proposal dan Seminar Hasil

<p><b>AKTIVITAS ANTIJAMUR EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO</b> <i>(Theobroma cacao L.) DENGAN NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT TERHADAP <i>Candida albicans</i></i></p> <p><b>PROPOSAL SKRIPSI</b> Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)</p>  <p>Oleh: Retno Triasih NIM 18040088</p> <p><b>PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI</b> <b>FAKULTAS ILMU KESEHATAN</b> <b>UNIVERSITAS dr. SOEBANDI</b> 2022</p>	
<p><b>AKTIVITAS ANTIJAMUR EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO</b> <i>(Theobroma cacao L.) DENGAN NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT TERHADAP <i>Candida albicans</i></i></p> <p><b>SKRIPSI</b> Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)</p>  <p>Oleh: Retno Triasih NIM 18040088</p> <p><b>PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI</b> <b>FAKULTAS ILMU KESEHATAN</b> <b>UNIVERSITAS dr. SOEBANDI</b> 2022</p>	

**Lampiran 6: Halaman Riwayat Hidup****A. Biodata Pribadi**

Nama : Retno Triasih

Tempat/Tanggal Lahir : Lumajang, 14 Agustus 1991

Alamat : Jl. Karimata Gg. Bukit Permai No. 2A, Jember

Jenis Kelamin : Perempuan

E-mail : retnofarmasi22@gmail.com

No. Hp : 081237712121

Agama : Islam

Status : Menikah

Kewarganegaraan : Indonesia

**B. Riwayat Pendidikan**

1998-2004 : SD Sumbersari 3 Jember

2004-2007 : SMPN 2 Jember

2007-2010 : SMAN 1 Arjasa

2018-sekarang : Universitas dr. Soebandi