

**PENGARUH METODE EKSTRAKSI KULIT BIJI KAKAO
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI *Streptococcus mutans***

SKRIPSI



**Oleh:
Dianty Bella Agustin
NIM 18040027**

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

**PENGARUH METODE EKSTRAKSI KULIT BIJI KAKAO
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI *Streptococcus mutans***

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh:
Dianty Bella Agustin
NIM 18040027

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
202**

LEMBAR PERSETUJUAN

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

Jember, Agustus 2022

Pembimbing Utama



Dr. apt. Nuri, M.Si
NIDN 0012046905

Pembimbing Anggota



Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN 0709129002

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “ Pengaruh Metode Ekstraksi Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Terhadap Uji Aktivitas Antibakteri *Streptococcus mutans*” telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

Hari : Senin

Tanggal : 05 September 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi

Universitas dr.Soebandi

Tim penguji
Ketua penguji,



Susilawati, M.Kes
NIDN 4003127401

Penguji II,



Dr. apt. Nuri, M.Si
NIDN 0012046905

Penguji III,



Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN 0709129002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,
Universitas dr. Soebandi



Henna Melty Purwina, S.Kep.,Ns.,M.Kep
NIDN 0706109104

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Dianty Bella Agustin

NIM : 18040027

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 dikemudian 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 sebenarnya-benarnya.

Jember, 05 September 2022

Yang menyatakan,



Dianty Bella Agustin
NIM 18040027

SKRIPSI

**PENGARUH METODE EKSTRAKSI KULIT BIJI KAKAO
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI *Streptococcus mutans***

Oleh:

Dianty Bella Agustin

NIM 18040027

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Nuri, M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadiran Allah yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis diberi kemudahan dalam menyelesaikan skripsi. Skripsi ini dipersembahkan kepada:

1. Orang tua penulis, yaitu bapak Hariyanto dan ibu Karsiyani beserta keluarga besar yang telah memberikan kasih sayang dan do'a yang terbaik sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Bapak apt Nuri, M.Si selaku dosen pembimbing 1 dan ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian dan kesabaran dalam memberikan bimbingan skripsi ini sehingga terselesaikan dengan baik.
3. Ibu Susilawati, M.Kes sebagai penguji yang telah banyak memberikan bantuan, saran dan waktunya dalam skripsi ini.
4. Seluruh pihak lembaga Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan fasilitas selama berjalannya penelitian sampai selesai.
5. Kepada teman seperjuangan dalam mengerjakan penelitian skripsi, Aprilia Permata Sanny, Beta Putri Ananda, Agustin Nourma Diana dan Maharani Fauziah yang selalu bahu membahu dan mampu menjadi tim yang baik untuk saya.
6. Kepada teman-teman farmasi dan semua teman yang terlibat secara langsung atau tidak langsung.

MOTTO

*“ So remember me, I will remember you
And be grateful to Me and do not deny Me”*

(Q.S Al-Baqoroh: 152)

“Patient has no limit, if there is a limit it means you are impatient”

(Gus Dur)

*“It’s not always easy, but that’s life.
Be strong because there are better days ahead.
Lets be grateful for what we have”*

(Mark Lee)

ABSTRAK

Agustin, Dianty Bella* Nuri** Purwanti, Aliyah***. 2022. Pengaruh Metode Ekstraksi Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Streptococcus mutans*. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang: Kulit biji kakao adalah bagian buah kakao yang membungkus biji kakao dan cenderung menjadi limbah industri coklat. Namun, kulit biji kakao mengandung senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin dan saponin yang bersifat antibakteri. Karies gigi merupakan penyakit gigi dan mulut yang disebabkan oleh bakteri *streptococcus mutans* dengan angka kejadian yang cukup besar di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi maserasi kinetik dan sonikasi terhadap kandungan senyawa kimia dan aktivitas antibakteri *streptococcus mutans*.

Metode: Ekstraksi kulit biji kakao dilakukan dengan metode maserasi kinetik dan sonikasi menggunakan pelarut etanol 70%, untuk mengetahui kandungan senyawa kimianya selanjutnya ekstrak diskriming fitokimia dan diuji aktivitas antibakterinya dengan metode sumuran.

Hasil Penelitian: Hasil metode ekstraksi maserasi kinetik dan sonikasi diketahui memiliki kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin dan saponin. Hasil uji antibakteri dengan metode ekstraksi sonikasi memiliki daya hambat yang lebih besar yaitu $8,44 \pm 1,53$ mm, sedangkan metode ekstraksi maserasi kinetik memiliki daya hambat sebesar $6,06 \pm 1,19$ mm.

Kesimpulan: Metode ekstraksi tidak mempengaruhi kandungan senyawa kimia tetapi mempengaruhi aktivitas antibakteri *streptococcus mutans* yang ditandai dengan adanya perbedaan diameter zona hambat pada uji antibakteri *streptococcus mutans*.

Kata Kunci: Kulit biji kakao, maserasi kinetik, sonikasi, *Streptococcus mutans*.

* Peneliti
** Pembimbing 1
*** Pembimbing 2

ABSTRACT

Agustin, Dianty Bella * Nuri** Purwanti, Aliyah***. 2022. The Effect of Cocoa Extraction Method (*Theobroma cacao* L) on the Antibacterial Activity of *Streptococcus mutans*. Thesis. Bachelor of Pharmacy Study Program, University of dr. Soebandi.

The Background: Cocoa bean shell is the part of the cocoa fruit that wraps the cocoa beans and tends to become waste of the chocolate industry. However, the cocoa bean shell contains chemical compounds such as alkaloids, flavonoids, polyphenols, tannins and saponins which are antibacterial. Dental caries is dental and oral disease which is caused by the bacterium *Streptococcus mutans* with a fairly large incidence in Indonesia. This research aims to determine the effect of kinetic and sonication maceration extraction methods on chemical compounds and antibacterial activity of *streptococcus mutans*.

The Method: Extraction of cocoa bean shell was carried out by kinetic maceration and sonication using 70% ethanol solvent, to know the chemical content of the compounds; the extract was screened for phytochemicals and tested for antibacterial activity using well difution method.

The Result: The result of the kinetic and sonication maceration extraction method was known to contain chemical compounds in the form of alkaloids, flavonoids, polyphenols, tannins and saponins. The results of the antibacterial test using the sonication extraction method had a greater inhibitory power of 8.44 ± 1.53 mm, while the kinetic maceration extraction method had an inhibitory power of 6.06 ± 1.19 mm.

The Conclusion: The extraction method does not affect the content of chemical compounds but it affects the antibacterial activity of *streptococcus mutans* which is indicated by the difference in the diameter of the inhibition zone in the *streptococcus mutans* antibacterial test.

Keywords: Cocoa bean shell, kinetic maceration, sonication, *Streptococcus mutans*.

* Researcher

** Advisor 1

*** Advisor 2

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, atas segala limpahan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi yang berjudul “Pengaruh Metode Ekstraksi Kulit Biji Kakao (*Theobroma cocoa* L) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Streptococcus mutans*” dengan tepat waktu.

Penyusunan Skripsi ini dapat terlaksana dengan baik berkat bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Drs. Said Mardijanto, S.Kep., Ns., M.M selaku Rektor Universitas dr. Soebandi
2. Ibu Hella Meldy Tursina, S.Kep., Ns., M.Kes selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
3. Ibu apt. Dhina Ayu Susanti, S.Farm., M.Kes selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi
4. Bapak Dr. apt. Nuri, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama
5. Ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota
6. Ibu Susilawati, M.Kes selaku Ketua Penguji

Penyusunan Skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan dan penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih.

Jember, 05 September 2022

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI	v
PERSEMBAHAN	vi
MOTTO	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.3.3 Bagi Peneliti	7
1.3.4 Bagi Masyarakat.....	8
1.3.5 Bagi Institusi	8
1.5 Keaslian Penelitian	8
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	10

2.1.1	Klasifikasi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	11
2.1.2	Morfologi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	12
2.1.3	Kandungan Kulit Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	17
2.2	Skrining Fitokimia	18
2.2.1	Metabolit Sekunder	19
2.3	Ekstraksi	21
2.4	Pelarut	25
2.5	Rendemen	26
2.6	Bakteri.....	26
2.6.1	Klasifikasi Berdasarkan Bentuk.....	27
2.6.2	Klasifikasi Berdasarkan Dinding Selnya.....	28
2.6.3	Fase Pertumbuhan Bakteri.....	29
2.6.4	Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri	31
2.7	<i>Streptococcus mutans</i>	34
2.7.1	Klasifikasi <i>Streptococcus mutans</i>	35
2.7.2	Morfologi <i>Streptococcus mutans</i>	36
2.7.3	Sifat Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	38
2.8	Antibakteri	39
2.9	Daya Hambat Bakteri	40
BAB 3.	KERANGKA KONSEP.....	41
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	41
3.2	Hipotesis Peneliti	42
BAB 4.	METODE PENELITIAN.....	43
4.1	Desain Penelitian	43
4.2	Populasi dan Sampel.....	43
4.2.1	Populasi	43
4.2.2	Sampel	43
4.3	Variabel Penelitian.....	44
4.4	Tempat penelitian	44
4.5	Waktu Penelitian.....	44

4.6 Definisi Operasional	45
4.7 Teknik Pengumpulan Data	46
4.7.1 Determnasi Tanaman	46
4.7.2 Pengolahan Serbuk Simplisia	46
4.7.3 Pembuatan Ekstrak	47
4.7.4 Skrining Fitokimia.....	48
4.7.5 Persiapan Media	49
4.7.6 Pembuatan Kontrol Positif dan Negatif.....	50
4.7.7 Preparasi dan Uji Aktivitas Antibakteri	50
4.8 Pengolahan dan Analisis Data	51
4.8.1 Pengolahan Data	51
4.8.2 Analisis Data	51
BAB 5. HASIL PENELITIAN	53
5.1 Identifikasi Tanaman	53
5.2 Ekstraksi	53
5.3 Skrining Fitokimia.....	53
5.4 Uji Antibakteri.....	55
5.5 Analisis Data.....	56
BAB 6. PEMBAHASAN.....	59
6.1 Ekstraksi Maserasi kinetik dan Sonikasi	59
6.2 Skrining Fitokimia.....	60
6.3 Uji Antibakteri	62
BAB 7. PENUTUP.....	66
7.1 Kesimpulan.....	66
7.2 Saran	66
DAFTAR PUSTAKA	67
LAMPIRAN.....	74

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	8
Tabel 2.1 Komposisi Kimia Kulit Biji Kakao.....	18
Tabel 2.2 Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri.....	41
Tabel 3.1 Kerangka Konsep.....	42
Tabel 4.1 Definisi Operasional	47
Tabel 5.1 Hasil Ekstrak Kental dan % Rendemen	53
Tabel 5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Metode Sonikasi.....	54
Tabel 5.3 Hasil Pengujian Ekstrak kulit Biji Kakao Terhadap Bakteri <i>S. mutans</i>	58
Tabel 5.4 Hasil Uji Asumsi ANOVA	58
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Kruskall Wallis</i>	60
Tabel 5.6 Hasil Uji Duncan.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Akar Kakao	11
Gambar 2.2 Batang dan Pohon Kakao	13
Gambar 2.3 Daun Kakao.....	13
Gambar 2.4 Bunga Kakao	15
Gambar 2.5 Buah Kakao	15
Gambar 2.6 Biji Kakao	16
Gambar 2.7 Kulit Biji Kakao	17
Gambar 2.8 Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri.....	30
Gambar 2.9 <i>Streptococcus mutans</i> di bawah Mikroskop Perbesaran 1000 Kali ...	35
Gambar 5.1 Hasil Uji Antibakteri	58

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi	78
Lampiran 2 Hasil Mc Farland	79
Lampiran 3 Hasil Uji Statistik.....	80
Lampiran 4 Dokumentasi	82
Lampiran 5 Gambar	88

DAFTAR SINGKATAN

UAE	: <i>Ultrasonic Assistend Extraction</i>
NaCl	: Natrium Klorida
GTF	: <i>Glucosyitransferase</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimum
KBM	: Konsentrasi Bunuh Minimum
HCl 2N	: Asam Klorida
FeCl ₃	: Besi (III) Klorida
DMSO	: Dimetil Sullfoksida
NA	: <i>Nutrient Agar</i>
BaCl ₂	: Barium Klorida
H ₂ SO ₄	: Asam Sulfat
DNA	: Asam Deoksiribonukleat

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki jutaan jenis flora yang luasnya dapat menempatkan Indonesia di urutan ketiga sebagai hutan tropika setelah Brazil dan Zaine (Andini, 2017). Kakao (*Theobroma cacao* L) merupakan salah satu tanaman dari jutaan jenis flora yang dilestarikan untuk dijadikan komoditas yang berperan penting dalam perekonomian Indonesia. Di Indonesia, kakao menjadi urutan ketiga terbesar di dunia dengan produksi yang dikeluarkan sebesar 240.000 ton setelah Pantai Gading dan Gana di Afrika Barat (Aryani *et al.*, 2018). Menurut Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Timur, pada tahun 2017 Kabupaten Jember menempati urutan ke sembilan yang mengeluarkan produksi sebesar 2.921 ton.

Jember merupakan salah satu kota di bagian Jawa Timur yang memproduksi sekitar 2.000 ton kakao. Di Kecamatan Jenggawah terdapat Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia atau disebut PUSLITKOKA yang berdiri sejak 1911 (Felicia *et al.*, 2016). Hasil perkebunan pada PUSLITKOKA ini dapat diolah menjadi suatu produk seperti makanan, minuman, permen atau sabun yang dipasarkan dengan nama *Vicco* (berbahan dasar coklat). Produk – produk *Vicco* ini diambil dari biji kakao yang telah melewati proses yang panjang dimulai dari proses penanaman biji kakao, perawatan pohon, panen biji kakao hingga proses fermentasi (Felicia *et al.*, 2016).

Dalam suatu pengolahan yang dapat dimanfaatkan dari bagian tanaman kakao ini adalah bagian bijinya yang juga merupakan bahan dasar dari pembuatan coklat. Dalam pengolahan biji kakao menjadi produk coklat menghasilkan limbah kulit biji kakao sekitar 15 persen dari total berat biji kakao (Utami *et al.*, 2017). Namun, masyarakat seringkali menganggap bahwa hanya biji kakao yang memiliki manfaat sedangkan kulit biji kakao hanya sebagai limbah dan pakan ternak. Keberadaan limbah tersebut sering kali tidak dimanfaatkan secara baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah industri pengolahan coklat (Yumas, 2017).

Kulit biji kakao mengandung senyawa aktif yang tidak berbeda jauh dengan kandungan yang terdapat pada kulit buah kakao dan biji kakao itu sendiri. Kulit biji kakao mengandung senyawa polifenol, flavonoid, terpenoid/steroid dan tanin terkondensasi atau terpolimerasi seperti katekin dan antosianin. Senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam kulit biji kakao tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri (Yumas, 2017). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa ekstrak kulit biji kakao memiliki aktivitas antibakteri. Menurut penelitian yang dilakukan Leman & Waworuntu (2016) hasil uji ekstrak etanol kulit biji kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan perbedaan diameter zona hambat yang dibentuk sampel pada lima kali pengulangan.

Streptococcus mutans merupakan salah satu mikroflora normal di dalam rongga mulut manusia. Bakteri ini berperan penting dalam metabolisme sukrosa menjadi asam laktat, yang menyebabkan demineralisasi email gigi. Bakteri ini

merupakan bakteri yang paling utama sebagai penyebab karies gigi (Mahardhika and Laif, 2015).

Kesehatan gigi dan mulut telah berkembang menjadi masalah yang serius. Hal ini disebabkan karena tingkat pengetahuan masyarakat akan pentingnya menjaga kesehatan gigi dan mulut masih kurang. Dampak dari rendahnya pengetahuan tersebut yaitu masalah penyakit gigi dan mulut meningkat. Karies gigi dan penyakit periodontal merupakan penyakit gigi dan mulut yang memiliki angka kejadian yang cukup besar dimasyarakat (Zaenab *et al.*, 2004). Berdasarkan *The Global Burden of Disease Study 2016* masalah kesehatan gigi dan mulut khususnya karies gigi merupakan penyakit yang dialami hampir setengah populasi penduduk dunia (3,58 miliar jiwa).

Streptococcus mutans adalah bakteri utama penyebab karies gigi. bakteri ini dapat dengan mudah melekat pada permukaan gigi (Forssten *et al.*, 2010). *Streptococcus mutans* menghasilkan asam, sehingga dengan mudah membentuk plak dan menyebabkan terjadinya karies gigi. Saat ini, prosedur pemeliharaan kebersihan rongga mulut dengan menyikat gigi saja tidak cukup, sehingga penambahan zat antibakteri pada produk kesehatan gigi dan mulut juga dinilai penting (Roeslan, 2002). Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai zat antibakteri adalah ekstrak kulit biji kakao (Amina, 2020).

Kulit biji kakao memiliki kandungan senyawa kimia yang berpotensi sebagai zat antibakteri karena adanya kandungan polifenol dan termasuk golongan flavonoid yang mampu merusak dinding sel bakteri yang mengandung peptidoglikan. Aktivitas antibakteri dari kulit biji kakao berkaitan erat dengan

dengan kandungan senyawa kimia yang dimiliki oleh kulit biji kakao. Salah satu faktor kandungan senyawa kimia merupakan karakteristik dari tumbuhan kakao. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketinggian tempat menyebabkan perbedaan karakter morfologi dan anatomi kakao tetapi untuk kualitas biji disebabkan oleh faktor naungan. Tanaman kakao yang tumbuh ternaung secara morfologi menghasilkan kualitas biji lebih baik (Farhanandi and Indah, 2022).

Metode ekstraksi dapat mempengaruhi konsentrasi dan efek terapi pada ekstrak, karena beberapa kandungan senyawa kimia pada simplisia bersifat stabil dan juga dapat terurai, tergantung dari metode ekstraksi yang digunakan (Djamal, 2010). Metode ekstraksi juga sangat mempengaruhi kualitas dan kuantitas kandungan senyawa kimia yang diekstraksi dari kulit biji kakao. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat menjadi kunci utama keefektifan dan efisien untuk memperoleh senyawa aktif (Hidayatiandri and Mahardika, 2021).

Pada penelitian ini menggunakan dua metode ekstraksi pada kulit biji kakao, yaitu metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi, sehingga dari perbedaan tersebut dapat diketahui metode ekstraksi yang lebih baik dalam menghasilkan ekstrak yang memiliki daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Metode maserasi kinetik dipilih karena pengadukan pada proses ekstraksi dilakukan dengan kecepatan yang konstan (Fauzana *et al.*, 2010). Pengadukan tersebut bertujuan untuk memperbanyak kontak antara bahan dengan pelarut dan mendapatkan derajat homogenitas yang tinggi, semakin cepat putaran pengaduk maka semakin besar perpindahan panas yang terjadi pada waktu tertentu dan

semakin besar kontak bahan dengan pelarut maka hasil yang diperoleh akan semakin meningkat (Agoes, 2007). Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi dilakukan pada suhu ruang sehingga cocok untuk senyawa yang tidak tahan pemanasan dan mudah menguap, prosedur dan peralatan sederhana sedangkan kelemahannya yaitu penyariannya kurang sempurna (Fauzana *et al.*, 2010).

Metode ekstraksi sonikasi dipilih karena prosesnya lebih cepat karena dinding sel bahan dipecah oleh getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada didalamnya dapat berdifusi dengan mudah (Mason *et al.*, 1996). Keuntungan dari ekstraksi sonikasi yaitu proses ekstraksi relatif lebih cepat sedangkan kelemahannya yaitu harga yang mahal (Ulilalbab, 2012).

Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah etanol 70% yang bertujuan untuk menarik semua komponen kimia yang terkandung di dalam kulit biji kakao, karena pelarut etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non polar hingga polar dan memiliki indeks polaritas sebesar 5,2 (Snyder, 1997). Proses ekstraksi biji kakao ini menggunakan pelarut etanol karena flavonoid yang terkandung dalam kulit biji kakao umumnya lebih mudah larut dalam pelarut polar dikarenakan memiliki ikatan dengan gugus gula dan senyawa aktifnya dan dapat diekstraksi dengan etanol 70% (Padmasari *et al.*, 2013).

Pada penelitian sebelumnya Yumas (2017) melakukan sebuah penelitian pemanfaatan limbah kulit ari biji kakao sebagai sumber antibakteri *Streptococcus mutans* menggunakan satu metode ekstraksi yaitu maserasi. Penelitian lain dari

Suci (2017) yang dilakukan pada kulit biji kakao hanya melihat pengaruh maserasi terhadap karakteristik komponen polifenol. Sehingga sejauh ini, belum ada penelitian yang melakukan pengujian terhadap pengaruh perbedaan metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi.

Berdasarkan uraian di atas mendorong peneliti untuk melakukan pengujian pengaruh perbedaan metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi terhadap kandungan senyawa kimia ekstrak etanol kulit biji kakao dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian adalah:

1. Apakah metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi mempengaruhi hasil persen rendemen ekstrak etanol kulit biji kakao?
2. Apakah metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi mempengaruhi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol kulit biji kakao?
3. Apakah metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi mempengaruhi aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi secara maserasi kinetik dan sonikasi pada ekstrak etanol kulit biji kakao terhadap aktivitas pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus yang diharapkan pada penelitian ini yaitu ditujukan untuk:

1. Mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi secara sonikasi terhadap hasil persen rendemen pada ekstrak kulit biji kakao.
2. Mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi secara maserasi kinetik terhadap hasil persen rendemen pada ekstrak kulit biji kakao.
3. Mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi secara maserasi kinetik terhadap kandungan senyawa kimia pada ekstrak kulit biji kakao.
4. Mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi secara sonikasi terhadap kandungan senyawa kimia pada ekstrak kulit biji kakao.
5. Mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi maserasi kinetik terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
6. Mengetahui pengaruh dari metode ekstraksi sonikasi terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini yaitu:

1.4.1 Bagi Peneliti

Hasil penelitian ini dapat menambah pengetahuan dan wawasan mengenai pengaruh dari metode ekstraksi terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus Mutans*.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat luas tentang manfaat senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol kulit biji kakao.

1.4.3 Bagi Institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai sumber informasi dan tambahan pengetahuan bagi mahasiswa yang akan melakukan penelitian lebih lanjut.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Nama Penulis	Tahun Terbit	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Medan Yumas	2017	Pemanfaatan Limbah Kulit Ari Biji Kakao (<i>Theobroma Cacao</i> L) Sebagai Sumber Antibakteri <i>Streptococcus mutans</i>	Ekstrak limbah kulit ari biji kakao diekstraksi menggunakan metode maserasi ekstrasksi dengan pelarut etanol 96% berpotensi sebagai senyawa aktif antibakteri terhadap <i>Streptococcus mutans</i>
Suci Rahma Ajiaviaty, Indira Lanti Kayaputri, Yana Cahyana, Moh. Djali	2019	Pengaruh Maserasi Terhadap Karakteristik Komponen Polifenol Kulit Buah Kakao Dan Kulit Biji Kakao	Berdasarkan nilai signifikansi pada uji korelasi didapatkan bahwa tidak ada pengaruh waktu maserasi

Nama Penulis	Tahun Terbit	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Alissa Amanda, Tamara Yuanita, Galih Sampoerno.	2021	<i>The Difference Of Antibacterial Power Between Cocoa Peel (Theobroma Cacao L) Ekstract 65% Compared To Chlorhexidine Digluconate 2% Against Streptococcus mutans (In Vitro)</i>	Ada perbedaan dalam aktivitas antibakteri antara ekstrak kulit kakao 6% dan kloroheksidin diglukonat 2% terhadap bakteri <i>Streptococcus mutans</i> . kloroheksidin diglukonat 2% memiliki daya hambat lebih besar daripada ekstrak kulit kakao 6% terhadap <i>Streptococcus mutans</i>

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yaitu membandingkan dua metode ekstraksi yaitu metode ekstraksi maserasi kinetik dan sonikasi, sedangkan untuk persamaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yaitu menggunakan ekstrak kulit biji kakao sebagai antibakteri *Streptococcus mutans*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L)

Kakao (*Theobroma cacao* L) merupakan satu dari beberapa jenis tanaman budidaya yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Indonesia menjadi urutan nomer 3 dengan penghasil kakao terbanyak yaitu sebesar 17,0% setelah Pantai Gading dan Ghana (18,2%), terdapat 22 jenis genus *Theobroma*, famili *Sterculiaceae*, hanya *Theobroma cacao* L dan *Theobroma grandiflorum* yang dibudidayakan secara komersil (Martono, 2014).

2.1.1 Klasifikasi Kakao (*Theobroma cacao* L)

Tanaman kakao yang mempunyai nama ilmiah *Theobroma cacao* L. termasuk dalam famili *Sterculiaceae* dan merupakan tanaman asli Amerika utara, tapi kebanyakan tanaman kakao sudah banyak di budidayakan pada daerah tropis. Tanaman kakao memiliki klasifikasi sebagai berikut (Prawoto dan Winarsih, 2010):

Devisi : Spermatophyta
Subdevisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledone
Subkelas : Dialypetalae
Bangsa : Malvales
Suku : Sterculiaceae
Marga : *Theobroma*
Jenis : *Theobroma Cacao* L.

2.1.2 Morfologi Kakao (*Theobroma cacao* L)

Tanaman kakao atau yang sering dikenal dengan *Theobroma cacao* L. merupakan tanaman tahunan yang mana termasuk dalam sekelompok tanaman *caulifloris*, dimana bunga dan buahnya dapat muncul atau tumbuh pada batang dan cabangnya. Tanaman tersebut secara garis besar dapat dibagi dalam dua bagian menurut perkembangbiakannya yaitu pada bagian vegetatif meliputi daun, batang serta akar dan bagian generatifnya meliputi buah dan bunga (Siregar *et al.*, 2010).

a. Akar (*radix*)



Gambar 2.1 Akar Kakao
(Suyono and Carnovia, 2018)

Tanaman kakao memiliki akar tunggang atau di sebut dengan *radix primaria*. Tanaman kakao yang sudah tumbuh dan mencapai umur 1 sampai 2 minggu pada akar tunggangnya akan tumbuh akar-akar cabang. Cabang-cabang yang muncul pada akar tunggang akan bercabang kembali dan pada bagian akhirnya akan tumbuh akar rambut yang mana berguna dalam penyerapan unsur hara yang terkandung dalam tanah. Akar kakao juga dapat tumbuh mencapai kedalaman 15 meter ke arah bawah. Bahkan ada yang menyebar ke samping

yang memiliki panjang sekitar 8 meter. Sebagaimana besar perkembangan akar lateral berkembang di dekat permukaan tanah, pada jarak 0 sampai 30cm. presentase penyebaran akar mencapai 56% akar lateral pada bagian 0 sampai 10cm, 26% pada bagian 11 sampai 20cm, 14% pada bagian 21 sampai 30cm serta 4% yang dapat tumbuh dalam bagian 30 cm dari permukaan tanah. Jangkauan akar lateral pada tanaman kakao jauh melebihi proyeksi tajuk. Pada ujung akar akan membentuk cabang-cabang kecil yang tersusun secara acak (Siregar dan Syarief, 2013).

Perkembangan akar pada tanaman kakao di pengaruhi oleh keadaan tanah, air yang ada dalam tanah, dan aerasi di dalam tanah. Pada daerah lereng-lereng gunung yang memiliki kandungan air yang mendalam pada tanahnya, akar tunggang yang tumbuh akan panjang dan akar lateral yang terbentuk masuk sangat jauh ke dalam tanah. Sebaliknya pada keadaan permukaan air yang tanahnya tinggi, akar tunggang tidak tumbuh mendalam sehingga akar lateral pun tumbuh dan berkembang di sekitar permukaan tanah (Yusuf *et al.*, 2019).

b. Batang (*caulis*)

Tanaman kakao yang ditumbuhkan melalui biji akan membentuk batang utama sebelum membentuk cabang primer dengan tinggi yang baik mencapai 1,2 sampai 1,5 meter dari permukaan tanah. Tanaman kakao juga dapat tumbuh dengan ketinggian batang sekitar 8 sampai 10 meter, namun pertumbuhan akan lebih pendek apabila ditanam tanpa adanya pohon pelindung.

Batang merupakan suatu bagian yang utama dalam tanaman. Pada bagian batang akan tumbuh cabang, daun, dan buah kakao yang sifatnya dimorfisme

yaitu memiliki dua macam percabangan atau tumbuhnya tunas, terdapat dua jenis yaitu tunas ortotrop dimana tumbuhnya tunas ke bagian atas dan tunas plagiotrop yang arah tumbuhnya ke samping (Susanto, 2010).



Gambar 2.2 Batang dan Pohon Kakao
(Suyono and Carnovia, 2018)

c. Daun (*folium*)



Gambar 2.3 Daun Kakao
(Suyono and Carnovia, 2018)

Daun dari kakao memiliki panjang sekitar 10 sampai 48 cm, lebar 4 sampai 20 cm dengan permukaan bagian atas daun berwarna hijau tua, bergelombang, permukaan bagian bawah daun berwarna hijau muda, kasar dan bergelombang, tepi daun memiliki visual rata sampai agak bergelombang. Susunan tulang daun

yang dimiliki daun kakao ini berbentuk menyirip dengan hanya memiliki satu ibu tulang daun dari pangkal hingga ke ujung daun dan alur dari tulang daun ini tampak jelas (Martono, 2014). Tangkai daun berbentuk silinder dan bersisik halus tergantung pada tipenya. Salah satu sifat khusus daun kakao yaitu terdapat dua persendian (*articulation*) yang terletak di pangkal dan ujung tangkai daun. Dengan persendian ini dilaporkan daun mampu membuat gerakan untuk menyesuaikan dengan arah datangnya sinar matahari (Riono, 2020). Menurut Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (2012) Pada tunas ortotrop memiliki tangkai daun yang panjang mencapai 7,5 sampai 10 cm namun pada tunas plagiotrop memiliki tangkai daun yang panjangnya mencapai sekitar 2,5 cm.

d. Bunga (*flos*)



Gambar 2.4 Bunga Kakao
(Suyono and Carnovia, 2018)

Bunga tanaman kakao terbentuk atau tumbuh di segala cabang dan batang. Bunga kakao memiliki tipe seks hemaprodit yang dimana pada setiap bunga mengandung benang sari dan serbuk sari. Bunga kakao termasuk bunga sempurna,

yaitu tersusun atas kelopak sebanyak 5 helai, benang sari (*androecium*) sebanyak 10 helai, bunga memiliki diameter 1,5 cm. memiliki tangkai bunga yang panjangnya sekitar 2 sampai 4 cm. tanaman kakao yang tumbuh dalam keadaan normal memiliki bunga sebanyak 5000 sampai 12000 pertahun namun hanya 5% yang dapat menjadi buah. Daun kelopak bunga berbentuk lanset yang panjangnya sekitar 6 sampai 8 cm, kelopak bunga yang berwarna putih namun pada ujungnya cenderung berwarna ungu (Lukito, 2004).

e. Buah (*fructus*)

Buah kakao terbagi menjadi 4 macam berdasarkan bentuknya yaitu *Angoleta* (buah berbentuk oblong), *Cundeamor* (buah ellips), *Amelonada* dan *Calabecil* (berbentuk bulat). Permukaan dari buah ini bisa halus, agak halus, agak kasar dan kasar dengan alur yang pendek, sedang dan dalam. Panjang buah bisa mencapai 16,2 –20,50 cm dengan diameter 8–10,07 cm.



Gambar 2.5 Buah Kakao
(Suyono and Carnovia, 2018)

secara umum hanya memiliki dua macam warna yaitu pada saat buah masih hijau memiliki warna hijau atau keputihan, dan kalau sudah masak mempunyai warna kuning serta ada yang ketika masih mudah berwarna merah dan pada saat matang berwarna orange (Martono, 2014).

Buah kakao terbentuk setelah 14 hari adanya penyerbukan bunga. Buah akan berkembang sampai waktunya panen sekitar 143 hari dengan mencapai perkembangan fisik yang maksimal. Setelah itu, buah tidak lagi bertambah besar ataupun panjang. Buah mengalami masak yang optimal setelah 170 hari yang ditandai pada perubahan warna kulit buah sesuai dengan varietasnya. Menurut Sunanto (1992) dalam Martono (2014) butuh waktu sekitar 5,5 bulan untuk pertumbuhan buah kakao jika pohon terdapat di daerah dataran rendah dan 6 bulan di dataran tinggi.

f. Biji (*semen*)



Gambar 2.6 Biji Kakao
(Suyono dan Carnovia, 2018)

Biji (*semen*) kakao terbagi menjadi tiga bagian yaitu kotiledon (87,10%), kulit biji (12%) dan lembaga (0,9%). Biji kakao berbentuk bulat oval agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm, biji kakao juga diselimuti lendir berwarna putih. Biji kakao tidak memiliki masa dormansi sehingga benih tidak mungkin untuk disimpan dalam waktu yang agak lama. Saat penyimpan benih, membutuhkan temperature antara 4-15°C dapat merusak benih dan kecambah (Martono, 2014).

Biji kakao ini termasuk tanaman *calflori* yaitu dimana buah dan bunga tumbuh hanya pada batang dan cabang tanaman saja. Pada tiap batang pohon

teradapat 20-5 butir biji yang tersusun dalam 5 baris dan menyatu dengan bagian buah (Suyono dan Carnovia, 2018). Kriteria biji kakao dengan kualitas terbaik yaitu masak penuh (kering, berwarna coklat, berbau asam, tiadk purple dan slaty ketika dibelah), berat kering tidak lebih dari 1 gram, ukuran yang sama dan cangkang yang tidak pecah (Dian, 2012).

g. Kulit biji



Gambar 2.7 Kulit biji kakao
(Suyono dan Carnovia, 2018)

Kulit biji kakao adalah kulit tipis, lunak dan agak berlendir yang meyelubungi keping biji kakao. presentasi berkisar 10-16% dari keseluruhan bagian biji kakao kering (Fowler, 2019).

3.1.3 Kandungan Kulit Biji Kakao

Tabel 2.1 Komposisi kimia kulit biji kakao

Komposisi	Kulit biji (%)
Air	3,8
Lemak	3,4
Abu	8,4
Nitrogen	
• N total	2,8
• N protein	2,1

• Theobromin	1,3
• Kafein	0,1
Karbohidrat	
• Glukosa	0,1
• Pati	-
• Pektin	8,0
• Serat kasar	18,6
• Selulosa	13,7
• Pentosa	7,1
• Gum	9,0
Tanin	
• Asam asetat	0,1
• Asam sitrat	0,7
• Asam oksalat	0,3

Sumber: Martono (2014).

Pada kulit biji kakao mengandung karbohidrat dan serat kasar dengan kandungan sebesar lebih dari 70% berat kering. Serat kasar pada kulit biji kakao memiliki kandungan sebesar 18,44% berat kering. Terdapat juga kandungan lemak pada kulit biji kakao sebesar 1,79% berat kering. Kandungan lemak setiap buah berbeda-beda tergantung pada jenis kakao (Utami *et al.*, 2017).

Pada kulit biji kakao mengandung sejumlah komponen fungsional yaitu theobromine, kafein, dan polifenol. Senyawa-senyawa tersebut pada umumnya merupakan hasil metabolit sekunder suatu tanaman. Secara fitokimia pada kulit biji kakao mengandung berbagai komponen seperti halnya alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin yang terdapat dalam jumlah yang berbeda-beda, serta terdapat juga triterpenoid (Kayaputri *et al.*, 2014).

3.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan cara untuk mengidentifikasi suatu senyawa yang tidak tampak melalui suatu tes atau pemeriksaan yang dapat dengan cepat memisahkan antara bahan alam yang memiliki kandungan senyawa kimia tertentu

dengan bahan yang alam yang tidak memiliki kandungan fitokimia. Skrining fitokimia ialah tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti (Khotimah, 2016).

2.2.1 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan metabolit khas tumbuhan yang dihasilkan oleh organ tetapi tidak digunakan secara langsung sebagai sumber energi pada tumbuhan (Taiz and Zeiger, 1998). Metabolit sekunder tumbuhan terbentuk dari reaksi metabolisme sekunder zat organik primer seperti karbohidrat, protein dan lemak (Anggarwulan and Solichatun, 2001). Metabolit sekunder adalah senyawa yang disintesis oleh tanaman dan diklasifikasikan menjadi lima kelompok: glikosida, terpenoid, fenol, flavonoid, dan alkaloid (Vickery, 1981).

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa turunan fenol yang bersifat bakteriostatik. Flavonoid memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri yang dapat dibagi tiga, yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel, dan menghambat metabolisme energi. Sintesis asam nukleat dihambat dengan cara menumpuk basa asam nukleat yang dilakukan oleh cincin A dan cincin B pada flavonoid dalam proses interkelas atau ikatan hidrogen sehingga menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid menghambat fungsi membran sel bakteri karena mengganggu integritas membran sel dengan cara berikatan secara kompleks dengan protein ekstraseluler yang bersifat larut (Ginting, 2020).

b. Alkaloid

Alkaloid adalah sekelompok senyawa yang tersebar luas di sebagian besar tanaman. Semua alkaloid mengandung setidaknya satu atom nitrogen dasar dan membentuk cincin heterosiklik (Harbourne, 1984). Alkaloid dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu. Kandungan alkaloid tanaman ini bisa mencapai 10-15%. Alkaloid sebagian besar beracun, tetapi beberapa sangat berguna dalam pengobatan. Alkaloid yang tidak berwarna, biasanya aktif secara optik, sebagian besar merupakan senyawa kristal, tetapi hanya sedikit yang berbentuk cair seperti nikotin pada suhu kamar (Sabirin, *et al.*, 1994).

c. Saponin

Saponin bersifat bakterisida karena bekerja pada membran sitoplasma. Saponin memiliki surfaktan seperti deterjen yang dapat mengurangi tegangan permukaan dan meningkatkan permeabilitas sel sensitif terhadap membran bakteri. Saponin kemudian dapat mengikat sitoplasma dan mengganggu stabilitas membran dan kebocoran sitoplasma, menyebabkan sitoplasma keluar dari sel dan mengakibatkan kematian sel (Ginting, 2020).

d. Tanin

Tanin juga dikenal sebagai asam tanat dan asam galotanat, mengandung senyawa polifenol yang sulit diisolasi. Hal ini karena substrat sulit untuk mengkristal dan mudah teroksidasi dan berpolimerisasi dalam larutan, sedangkan memiliki kelarutan yang sangat buruk dalam pelarut. Tanin memiliki efek bakteriostatik dan bakterisida menghambat pembentukan sel bakteri dengan menghambat enzim DNA topoisomerase dan *reverse transcriptase*. Selain itu,

tanin juga mempengaruhi polipeptida pada dinding sel, sehingga pembentukan dinding sel tidak sempurna (Ginting, 2020).

2.3 Ekstraksi

Menurut Departemen Kesehatan RI (2006), ekstraksi merupakan proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simpisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Pemroduksian bahan – bahan alam untuk dijadikan sebuah keluaran obat terbaru membutuhkan proses yang saintifikasi agar obat tradisional yang telah jadi lebih dipercaya sebab tidak hanya berdasarkan pengalaman saja tetapi juga didasarkan ilmu - ilmu ilmiah (Mukhriani, 2014).

Adapun beberapa jenis ekstraksi yang dapat digunakan untuk proses penentuan senyawa menurut Marjoni (2016) yaitu:

a. Ekstraksi Secara Dingin

Ekstraksi secara dingin dapat dilakukan dengan beberapa cara berikut ini, yaitu:

1. Maserasi

Maserasi adalah metode pemisahan komponen tanpa pemanasan atau hanya merendam bahan dalam pelarut pada suhu kamar (Susanty & Bachmid, 2016). Maserasi dilakukan dengan merendam simplisia tanaman dengan pelarut tertentu dalam wadah tertutup rapat tanpa celah dan menempatkannya pada suhu kamar (Mukhrani, 2014). Waktu terbaik untuk proses perendaman dapat dilakukan 24-48 jam untuk mendapatkan hasil yang baik. (Chairunnisa *et al.*, 2019).

Beberapa modifikasi metode ekstraksi maserasi sebagai berikut:

a) Remaserasi

Simplisia di maserasi dengan pelarut pertama, setelah diendapkan, tuangkan dan diperas, ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut kedua.

b) Maserasi dengan mesin pengaduk

Penggunaan mesin pengaduk yang berputar secara *kontinu* dapat mempersingkat waktu maserasi menjadi 6-24 jam. Melalui pengadukan proses ekstraksi secara intensif dapat memberikan hasil ekstraksi yang lebih baik.

c) Maserasi melingkar

Pada metode ini, pelarut secara berkesinambungan mengalir dan menyebar melalui serbuk simplisia dan melarutkan zat aktif yang terdapat dalam simplisia.

d) Maserasi melingkar bertingkat

Metode ini ditujukan untuk memperbaiki metode maserasi melingkar dimana pada maserasi melingkar, proses ekstraksi tidak berjalan sempurna.

e) Ekstraksi turbo

Metode ini menggunakan alat pencampuran yang berputar cepat dan dilengkapi dengan pengaduk. Simplisia dicampurkan dengan pelarut alat pencampur yang berputar sangat cepat, dan dilengkapi pemukul.

f) *Ultrasonic – assistend Extraction* (UAE)

Ultrasonic – assistend Extraction (UAE) atau disebut juga sonikasi, merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menambahkan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi 20kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *Ultrasonic* dan *Ultrasound*. Untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan

sel dapat menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi.

Keuntungan dari metode maserasi adalah lebih sederhana karena tidak perlu menggunakan panas, dan pelarut dipilih sesuai dengan kepolaran dan kelarutan zat, sehingga pemisahannya mudah dan proses perendaman berlangsung lama akan mengekstrak banyak senyawa (Susanty & Bachmid, 2016). Selain kelebihan tersebut, maserasi memiliki kelemahan yaitu memakan waktu, dan karena tidak semua senyawa larut pada suhu kamar, suhu harus dimodifikasi untuk lebih mengoptimalkan proses maserasi (Chairunnisa *et al.*, 2019).

2. Perkolasi

Perkolasi adalah proses penyarian zat aktif secara dingin dengan cara mengalirkan pelarut secara kontinu pada simplisia selama waktu tertentu. Prinsip dari perkolasi merupakan penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara yang mengalirkan suatu pelarut melalui serbuk simplisia yang telah terlebih dahulu dibasahi selama waktu tertentu, kemudian ditempatkan dalam suatu wadah berbentuk silinder yang diberi sekat berpori pada bagian bawahnya. Pelarut dialirkan secara vertikal dari atas kebawah melalui serbuk simplisia dan pelarut akan melarutkan zat aktif dalam sel – sel simplisia yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh.

b. Ekstraksi Secara Panas

Ekstraksi secara panas dapat dilakukan dengan beberapa cara berikut ini, yaitu:

1. Seduhan

Merupakan metode ekstraksi paling sederhana hanya dengan merendam simplisia dengan dengan air panas selama waktu tertentu (5-10 menit).

2. *Coque* (penggodokan)

Merupakan proses penyarian dengan cara menggodok simplisia menggunakan api langsung dan hasilnya dapat langsung digunakan sebagai obat baik secara keseluruhan termasuk ampasnya atau hanya hasil godokannya saja.

3. Infusa

Infusa merupakan sediaan cairan sediaan cair yang dibuat dengan cara menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit.

4. Dekokta

Proses penyarian secara dekokta hampir sama dengan infusa, perbedaannya hanya terletak pada lamanya waktu pemanasan. Waktu pemanasan pada dekokta lebih lama dibanding metode infusa, yaitu 30 menit dihitung setelah suhu mencapai 90°C.

5. Refluks

Refluks merupakan proses ekstraksi dengan pelarut pada titik didih pelarut selama waktu dan jumlah pelarut tertentu dengan adanya pendingin balik (Kondensor). Proses ini umumnya dilakukan 3-5 kali pengulangan pada residu pertama, sehingga termasuk proses ekstraksi yang cukup sempurna.

6. *Soxhletasi*

Proses *Soxhletasi* merupakan proses ekstraksi panas menggunakan alat khusus berupa ekstraktor *soxhlet*. Suhu yang digunakan lebih rendah dibandingkan dengan metode refluks.

7. Digestasi

Digestasi adalah proses ekstraksi yang cara kerjanya hampir sama dengan maserasi. Hanya saja digestasi menggunakan pemanasan rendah pada suhu pada

suhu 30-40°C. Metode ini biasanya digunakan untuk simplisia yang tersari baik pada suhu biasa.

2.4 Pelarut

Pelarut merupakan zat yang ada pada larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat yang lainnya dianggap sebagai zat terlarut. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi harus merupakan pelarut yang terbaik untuk zat aktif yang terdapat dalam sampel atau simplisia, sehingga dapat memisahkan zat aktif yang terkandung dalam simplisia dan senyawa lain yang terdapat dalam simplisia tersebut (Marjoni, 2016).

Kandungan senyawa yang terdapat di dalam tanaman dapat ditarik oleh suatu pelarut saat proses ekstraksi. Pemilihan pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi (Harbone, 1987). Proses ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut saat ekstraksi. Senyawa polar hanya akan larut pada pelarut polar, seperti etanol, metanol, butanol dan air. Senyawa non polar juga hanya akan larut pada pelarut non polar, seperti eter, kloroform dan n-heksan.

Jenis-jenis pelarut yang dapat berinteraksi dengan zat terlarut salah satunya adalah etanol. Etanol disebut juga etil alkohol, alkohol murni, alkohol absolut, atau alkohol saja, merupakan sejenis cairan yang gampang menguap, mudah terbakar, tak berwarna dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan

dalam kehidupan sehari-hari (Rifdah, 2016). Keuntungan dari penggunaan etanol adalah ekstrak yang didapatkan lebih spesifik dan bertahan lama (Marjoni, 2016).

Konsentrasi yang lebih tinggi dari senyawa flavonoid terdeteksi dengan etanol 70% karena polaritasnya lebih tinggi dari daripada etanol murni (Tiwari *et al*, 2011).

2.5 Rendemen

Rendemen adalah perbandingan berat kering ekstrak dengan jumlah bahan baku. Nilai rendemen berkaitan dengan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung. Semakin tinggi rendemen maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik yang terdapat pada bahan baku (Senduk *et al*, 2020).

Rendemen ekstrak etanol kulit biji kakao yang didapatkan dihitung dengan rumus sebagai berikut (Dewi *et al*, 2021):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

2.6 Bakteri

Bakteri merupakan uniseluler, yang pada umumnya tidak berklorofil, namun ada juga yang berklorofil dan produksi aseksualnya yaitu dengan pembelahan selnya. Bakteri memiliki ukuran yang sangat kecil yang mana hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Bakteri sendiri dibagi menjadi tiga, yaitu basil yang kebanyakan bakteri berbentuk basil dengan ukuran 0,3-1 μm , panjang 1,5-4 μm namun ada yang sampai 8 μm . Bentuk coccus yang mempunyai ukuran rata-rata

1µm. Bentuk spiral yang mempunyai ukuran sekitar 0,5-1 µm, panjang 2-5 µm namun ada juga yang sampai 10µm (Fifendy, 2017).

Bakteri merupakan salah satu penyebab utama dalam berbagai macam penyakit. Bakteri pada umumnya dapat ditanggulangi dengan pemberian vaksin dan zat antibiotik, namun dengan seiringnya perkembangan waktu bakteri mulai bermutasi dan menyebabkan kekebalan terhadap vaksinasi sehingga memerlukan zat vaksin dan antibiotik yang baru. Racun yang ada dalam bakteri dapat dikeluarkan atau dilepaskan pada saat sel bakteri mengalami pembelahan atau dapat juga dengan menginduksi kepekaan terhadap antigeniknya, seperti halnya pada penyakit karang gigi. Salah satu penyebab karang gigi adalah bakteri *Streptococcus mutans*.

Bakteri berdasarkan bentuk sel dan dinding selnya di klasifikasikan sebagai berikut:

2.6.1 Klasifikasi Berdasarkan Bentuk

Berdasarkan bentuknya bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri *coccus*, *bacilli*, dan spiral. Pada bakteri *coccus* mempunyai bentuk bulat atau bujur telur (Hasanuddin, 2017). Jenis bakteri tersebut biasanya dapat tumbuh atau hidup sendiri namun juga dapat hidup dengan bakteri jenis lain. Dua *coccus* yang bergabung dapat disebut dengan *diplococcic*, sementara empat *coccus* yang bergabung disebut tetrad yang sampai membentuk kotak. Susunan yang umum dalam bakteri jenis ini yaitu terlihat seperti rantai bakteri yang biasanya disebut dengan *streptococci*.

Bacilli atau *bacillus* merupakan kelompok bakteri yang berbentuk batang. Kebanyakan bakteri jenis ini berbentuk batang tunggal, namun ada juga *diplobacilli* yang berpasangan dan *streptobacilli* yang berantai. Spiral atau juga disebut dengan bakteri yang berbentuk melengkung. apabila lengkungannya kurang dari setengah lingkaran, dan bentuk spiral maka di sebut vibrio namun apabila lengkungannya melebihi setengah lingkaran, dan jika spiralnya halus dan lentur disebut *spirochaeta*, dan apabila spiralnya tebal dan kaku disebut *spirillum* (Aminah and Nur, 2018). Pada jenis spiral dibagi menjadi vibrio, spirilla dan spirochetes. Pada jenis vibrio memiliki bentuk seperti koma, spirilla berbentuk spiral yang kaku, dan spirochetes berbentuk seperti spiral yang fleksibel.

2.6.2 Klasifikasi Berdasarkan Dinding Selnya

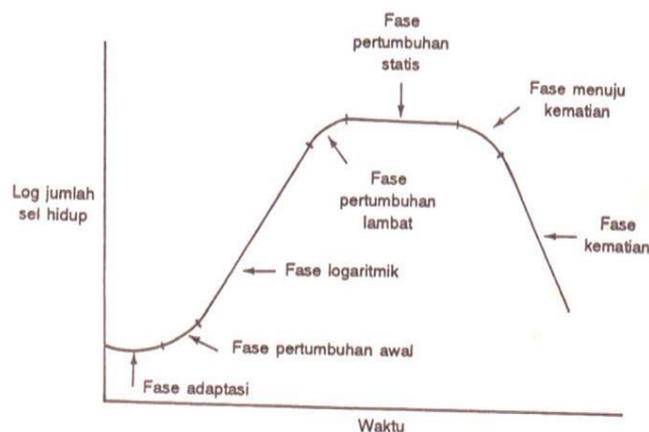
Berdasarkan atas susunan dinding sel bakteri dikelompokkan menjadi dua bagian yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Pengelompokan tersebut diperoleh dari pewarnaan gram yang menghasilkan dua jenis bakteri. Sehingga susunan dinding selnya akan tahan terhadap perlakuan panas dan senyawa antibiotika (Fardiaz, 2014).

Bakteri gram positif merupakan salah satu jenis bakteri yang setelah diwarnai dengan menggunakan pewarna dasar warnanya tidak akan terhapus baik dengan menggunakan alkohol namun akan berwarna violet karena telah diwarnai dengan menggunakan Kristal violet, dan tidak akan menyerap warna kontras. Pada dinding sel bakteri gram positif adalah polisakarida hal tersebut tidak lain karena pada dinding selnya mengandung peptidoglikan serta asam teikoat dan asam teukorunat (Helmiyati and Nurrahman, 2010).

Bakteri gram negatif merupakan suatu jenis bakteri yang apabila diberikan warna dasar makan setelah diberi warnanya akan terhapus, sehingga akan menyerap pewarna safranin atau karbol fushin yang digunakan sebagai pewarna kontras, sehingga preparat akan berwarna merah (Suharman, 2020).. Dinding sel bakteri gram negatif pada daerah luar merupakan komponen yang tersusun atas fosfolipid dan beberapa protein yang dikenal dengan auto layer (Helmiyati and Nurrahman, 2010).

2.6.3 Fase Pertumbuhan Bakteri

Pada kehidupan bakteri mengalami beberapa fase pertumbuhan dalam suatu medium pertumbuhan yang melibatkan adanya interval waktu yang digambarkan dalam pertumbuhan untuk suatu sel bakteri. Fase lag atau di kenal juga dengan fase penyesuaian dimana pada fase tersebut merupakan suatu masa dimana sel mengalami kekurangan metabolit dan enzim dalam keadaan yang kurang diuntungkan dalam perkembangbiakannya, perlu adanya penyesuaian diei terhadap lingkungannya. Enzim-enzim serta zat yag terkumpul dan terbentuk sampai memperoleh konsentrasi yang dapat memungkinkat mengalami pertumbuhan dimulai kembali (Tjahjadi, 2007). Pada saat benih diambil akan memerlukan waktu dalam pertumbuhannya pada fase ini di perlukan penyesuaian yang panjang hal tersebut sesuai dengan massa yang diperlukan oleh setiap mutan dalam inoculum untuk dapat tumbuh dan berkembang biak sehingga pada akhirnya dapat terlihat adanya penambahan sel.



Gambar 2.8 Kurva Pertumbuhan Sel Bakteri
(Fardiaz, 1989)

Fase pertumbuhan awal, setelah mengalami fase adaptasi atau penyesuaian, maka sel akan mengalami pembelahan dengan kecepatan yang masih rendah hal tersebut karena sel baru selesai melakukan adaptasi terhadap lingkungan baru (Boleng, 2015).

Fase tetap atau dapat di sebut juga dengan eksponensial, pada fase tersebut sel-sel telah mencapai keadaan yang stabil. Sel baru telah terbentuk dengan kecepatan yang konstan, namun bahan baru yang terbentuk masih memiliki sifat katalis, sehingga massa bertambah secara eksponensial. Pertambahannya mengikuti kurva logaritmik, karena sel membutuhkan energi lebih banyak jika dibandingkan dengan fase lainnya (Boleng, 2015).

Fase pertumbuhan diperlambat, dimana pada fase tersebut penambahan sel bakteri mengalami keterlambatan hal tersebut tidak lain karena faktor nutrient yang sudah berkurang, adanya hasil metabolisme yang sifatnya beracun bagi pertumbuhan sel. Pada fase tersebut pertumbuhan tidak berjalan dengan stabil, sel

yang tumbuh jumlahnya lebih banyak dari sel yang mati dengan grafik yang masih naik (Boleng, 2015).

Fase pertumbuhan stasioner maksimum, dimana pada fase tersebut jumlah sel tetap artinya sel yang mengalami kematian dan kehidupan atau yang tumbuh sama. Ukuran sel lebih kecil hal tersebut dikarenakan jumlah nutrisi yang sudah berkurang, zat makanan akan habis meskipun demikian sel akan tetap membelah. Sel mengalami ketahanan yang lebih tinggi terhadap keadaan lingkungan yang buruk seperti halnya panas yang tinggi, dingin, radiasi dan adanya bahan kimia. (Boleng, 2015). Fase menuju kematian, dimana pada fase ini sel bakteri mengalami kematian. Hal tersebut tidak lain karena nutrisi sudah habis, energi cadangan yang diberikan habis, zat-zat toksik dari hasil metabolit semakin banyak.

Fase kematian, pada fase tersebut sel-sel akan mengalami kematian yang cepat. Hal tersebut tidak lain karena tidak ada sisa dari nutrient, energi cadangan dan mulai banyaknya metabolit yang sifatnya toksik, sehingga meracuni sel-sel bakteri (Boleng, 2015).

2.6.4 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Beberapa faktor yang dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri sebagai berikut:

a. Nutrisi

Nutrisi merupakan dimana semua organisme akan membutuhkan nutrisi dalam pertumbuhannya. Nutrisi digunakan dalam kebutuhan untuk energi, nitrogen, karbon, beberapa unsur logam seperti Na, Ca, Mg, Zn, Pb dan Co serta

sebagai vitamin. Nutrient yang masuk dalam bakteri melalui beberapa cara yaitu difusi, transport aktif dan difusi dipercepat serta translokasi (Boleng, 2015).

b. Air

Air sangat dibutuhkan dalam perkembangbiakan sel. Sel berguna dalam mengisi sitoplasma yang merupakan komponen terbesar dalam dinding sel, sebagai bahan reaktan dalam berbagai reaksi biokimia (Boleng, 2015).

c. pH

Pertumbuhan bakteri sangat bergantung pada pH yang ada dalam media meskipun terdapat perlakuan pH yang berbeda setiap jenis bakteri, secara umum pH yang dibutuhkan oleh kelompok bakteri berkisar antara 6,5 sampai 7,5. Terdapat juga bakteri yang dapat tumbuh pada keadaan sangat asam dan sangat basah (alkalin). Memperthankan pH dapat dilakukan dengan pemberian bahan penyangga seperti KH_2PO_4 . Namun juga dapat dengan penggunaan bahan pepton yang terdapat dalam nutrient yang berfungsi juga sebagai larutan penyangga (Boleng, 2015).

d. Suhu

Pertumbuhan sel bakteri dibutuhkan suhu yang baik. Hal tersebut tidak lain karena suhu dapat berpengaruh terhadap kerja enzim dan ketahanan sel bakteri. Bakteri berdasarkan suhu pertumbuhan dikelompokkan sebagai bakteri psikrofilik, dengan suhu pertumbuhan antara -5 sampai 30°C suhu optimum 10 sampai 20°C ; bakteri mesofilik, dengan suhu pertumbuhan antara 10 sampai 45°C suhu optimum 20 sampai 40°C ; bakteri termofilik, dengan suhu pertumbuhan

antara 25 sampai 80°C suhu optimum sekitar 50 sampai 60°C. sel bakteri yang memiliki spora dapat hidup dalam perlakuan suhu tinggi (Boleng, 2015).

e. Oksigen

Oksigen sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Berdasarkan pada kebutuhan akan oksigen bakteri dapat dikelompokkan atas lima yaitu anaerob obligat, yang hanya dapat tumbuh di bawah kondisi tanpa adanya oksigen, dimana oksigen sendiri bersifat toksik terhadap sel bakteri jenis ini. Anaerob aerotoleran, dimana pada keadaan ini bakteri tidak akan mati karena adanya oksigen, namun bakteri dapat hidup secara optimum tanpa adanya oksigen. Anaerob fakultatif, dimana pada keadaan ini bakteri dapat tumbuh dengan baik pada keadaan adanya oksigen ataupun bahkan tanpa oksigen. Aerob obligat, dimana pada keadaan ini bakteri hanya bisa tumbuh dalam keadaan oksigen yang mencukupi. Organisme mikrofilik, dimana dapat tumbuh dengan baik pada oksigen yang rendah, namun pada oksigen yang tinggi akan menghambat pertumbuhannya (Boleng, 2015).

f. Komponen Antimikroba

Pada medium perkembangbiakan bakteri adanya mikroba dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri. Mikroba yang ada dalam medium sendiri dapat melalui beberapa cara seperti terdapat secara alami dalam media, dapat terbentuk dari adanya pengolahan oleh jasad renik selama fermentasi makanan.

Kondisi lain, beberapa jenis bakteri membutuhkan garam yang tinggi dalam pertumbuhannya seperti halnya pada bakteri halofilik. Suatu kelompok bakteri yang dapat tumbuh dengan syarat adanya garam NaCl yang tinggi. Halofilik

fakultatif adalah kelompok bakteri yang dapat tumbuh dengan atau adanya garam NaCl. Terdapat pula bakteri yang dapat tumbuh dengan kondisi cahaya yang terpenuhi, seperti halnya pada bakteri sulfur ungu, bakteri sulfur hijau dan bakteri nonsulfur ungu, dimana bakteri-bakteri tersebut mempunyai klorofil yang mampu mengabsorpsi cahaya sebagai bentuk proses fermentasinya (Boleng, 2015).

2.7 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans salah satu jenis bakteri anaerob fakultatif yang mempunyai bentuk bulat dengan ciri khas yang membentuk pasangan atau seperti rantai dalam masa pertumbuhannya (Adiguna and Santoso, 2017). Pada umumnya dapat ditemukan pada rongga mulut manusia yang menjadi salah satu penyebab kerusakan gigi. Mikroba tersebut pertama kali dikemukakan oleh J. Kilian Clarke tahun 1924. Kesehatan manusia sendiri secara keseluruhan individu dapat di pengaruhi oleh *S. mutans* yang dapat mengakibatkan kerusakan pada gigi (Andries, Gunawan and Supit, 2014).

Streptococcus mutans merupakan salah satu jenis bakteri yang mempunyai sifat kariogenik karena dapat menempel pada permukaan gigi (Rahman, Haniastuti and Utami, 2017). *Streptococcus mutans* dapat hidup pada suhu sekitar 18 sampai 40°C atau juga dapat di kategorikan sebagai bakteri mesofilik. penamaan *Streptococcus mutans* sendiri diambil pada saat pengamatan mikrobiologi dengan pengecatan gram yang mendapati bahwa bakteri tersebut mempunyai bentuk oval dan lain dari bentuk spesies *Streptococcus* yang lain (Fatmawati and Widowati, 2011).

2.7.1 Klasifikasi *Streptococcus mutans*



Gambar 2.9 *Streptococcus mutans* di bawah mikroskop perbesaran 1000 kali
(Apriliani S, 2020)

Adapun klasifikasi ilmiah *Streptococcus mutans* (Zelnicek, 2016).

Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>Streptococcus mutans</i>

2.7.2 Morfologi *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans mempunyai komposisi kapsul yang tersusun dari polisakarida dengan sub unit structural glukosa (dextran). *Streptococcus mutans* merupakan salah satu bakteri kokus gram-positif. Biasanya tidak bergerak aktif, tidak membentuk spora, membentuk rantai dua atau lebih. Mempunyai bentuk bulat dengan diameter 0,5 sampai 0,7 mm. Pada bentuknya terkadang terdapat pemanjangan menjadi batang pendek, tersusun berpasangan sampai membentuk rantai pendek. Susunan rantai panjang pada *Streptococcus mutans* berada dalam

media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*). Namun apabila ditanam di media akan terlihat sebagai rantai pendek dengan bentuk sel tidak beraturan (Downer *et al.*, 2006).

Streptococcus mutans masuk dalam kelompok *Streptococcus viridian* yang termasuk dalam anggota flora normal rongga mulut dengan sifat α -hemolitik dan komensal oportunistik (Aas *et al.*, 2008). Dinding sel *Streptococcus mutans* mempunyai beberapa karakter yaitu surface protein antigen I/II yang mempunyai fungsi sebagai media pelekatan, serotip yang tersusun atas 6 serotip berfungsi dalam spesifik adherence yaitu berupa serotip c, glucan binding protein atau yang dikenal dengan BGP sebagai akumulasi (Hayati *et al.*, 2014).

Streptococcus mutans seperti bakteri gram positif yang lain, dimana tersusun atas dinding sel dan membran protoplasma. Matriks dinding selnya terdiri atas peptidoglikan rantai silang yang mempunyai komposisi gula amino N-asetil, asam N-asetilnuramik serta beberapa peptid. Namun pada struktur antigenik dinding sel *Streptococcus mutans* terdiri dari antigen protein, polisakarida yang spesifik dan asam lipotekoat. Antigen-antigen tersebutlah yang dapat menentukan imonogenitas *Streptococcus mutans* (Zhang *et al.*, 2002).

Streptococcus mutans secara serologis dibedakan menjadi delapan serotip yang mana hal tersebut dilihat dari adanya spesifitas karbohidrat pada dinding selnya yaitu serotip a yang dikenal dengan *Streptococcus crietus*, serotip b yang dikenal dengan *Streptococcus ratius*, serotip c, e, dan f yang di kenal dengan *streptococcus mutans*. Serotip d dan g dikenal dengan *Streptococcus sobrinus*, serta serotip h yang dikenal dengan *Streptococcus downer* (Chu *et al.*, 2006).

Pada awalnya terdapat tiga gen dalam mengikat protein glukan yang telah diisolasi, akan tetapi pada skuensing genom telah menemukan gen potensial keempat yaitu *gbpd*. Gen yang terkait dengan produksi ekstraseluler glukan, adhesin, toleransi asam, protease, dan hemolisin disangka telah terdiedintifikasi. Pada rantai UA159 secara alami telah mengandung semua gen penting. Pada *Streptococcus mutans* tidak ditemukan adanya genom bakteriofag (Ajdjić *et al.*, 2002).

Streptococcus mutans tersusun atas DNA melingkar, yang mempunyai kurang lebih tiga yang terkait erat, namun plasmidnya berbeda. Ukuran plasmid serupa, sekitar 5,6 kilobase. Plasmid dalam *Streptococcus mutans* sangat berperan penting dalam ketahanan pada antibiotic tertentu atau juga pada logam berat, produksi bakteriosin, kekebalan, dan aksesori jalur katabolik serta mekanisme untuk kegiatan transfer konjugasi (Kandala *et al.*, 2011).

2.7.3 Sifat Bakteri *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans memiliki sifat asidogenik dimana dapat menghasilkan asam dan bersifat asidurik (Banas, 2004), yaitu dapat tinggal pada lingkungan asam dan menghasilkan polisakarida yang lengket dan disebut dengan dextran. Sehingga dengan adanya dextran tersebut terciptanya lingkungan yang lengket dan menjadikan bakteri lain dapat menuju ke email gigi, dan bahkan terdapat asam yang melarutkan email gigi (Maksum, 2009).

Streptococcus mutans memiliki enzim *glucosyltransferase* (GTF) yang mampu memanfaatkan sukrosa untuk mensintesis molekul glukosa dengan berat molekul yang tinggi terdiri dari ikatan glukosa alfa 1-6 dan alfa 1-3 dalam

metabolism karbohidrat yang menyebabkan polimerase glukosa (Toar *et al.*, 2013). Hal tersebut yang dapat membentuk plak gigi. Dextran dengan bakteri yang lain melekat erat pada enamel gigi sehingga membentuk plak pada gigi. Hal tersebut merupakan tahap pembentukan lubang pada gigi yang biasanya lebih dikenal dengan karies gigi. Suatu individu yang punya oral sehat akan mempunyai 10.000 CFU per ml *Streptococcus mutans* dimulutnya. *Streptococcus mutans* memiliki tiga faktor virulensi yaitu glycans dimana tidak dapat larut dalam air, toleran terhadap asam dan mampu dalam menghasilkan asam laktat (Sidhu *et al.*, 2015).

2.8 Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu senyawa yang digunakan untuk menghambat bakteri. Antibakteri biasanya terdapat dalam suatu organisme sebagai metabolit sekunder. Mekanisme senyawa antibakteri secara umum dilakukan dengan cara merusak dinding sel, mengubah permeabilitas membran, mengganggu sintesis protein, dan menghambat kerja enzim. Senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel antara lain fenol, flavonoid dan alkaloid. Senyawa fitokimia tersebut berpotensi sebagai antibakteri alami pada bakteri patogen. (Septiani *et al.*, 2017).

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

a. Metode Dilusi

Metode ini merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktifitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi

Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) (Fatisa, 2013). Keuntungan utama dari metode dilusi dapat memperkirakan konsentrasi senyawa uji dalam medium agar atau suspensi *broth*, biasanya digunakan untuk penentuan nilai KHM. Pada metode dilusi agar, medium diinokulasi dengan organisme uji dan sampel yang diuji campur dengan inokulum. Material yang diinokulasi dan pertumbuhan mikroorganisme dapat terlihat dan dibandingkan dengan kultur kontrol yang tidak mengandung sampel uji. Pengujian diulang dengan variasi dilusi sampel uji dalam medium kultur dan menentukan dilusi yang paling tinggi dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme sampel (Rahman *et al.*, 2011). Dalam tabung uji, berbagai konsentrasi senyawa uji dicampur dengan suspensi bakteri pada beberapa tabung, konsentrasi terendah menyebabkan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme sesuai dengan nilai KHM. Pada uji mikrodilusi cair, mikroorganisme yang tumbuh di sumur plat, dimana berbagai konsentrasi senyawa uji ditambahkan. Pertumbuhan mikroorganisme ditunjukkan oleh adanya kekeruhan dalam sumur (Choma *et al.*, 2010).

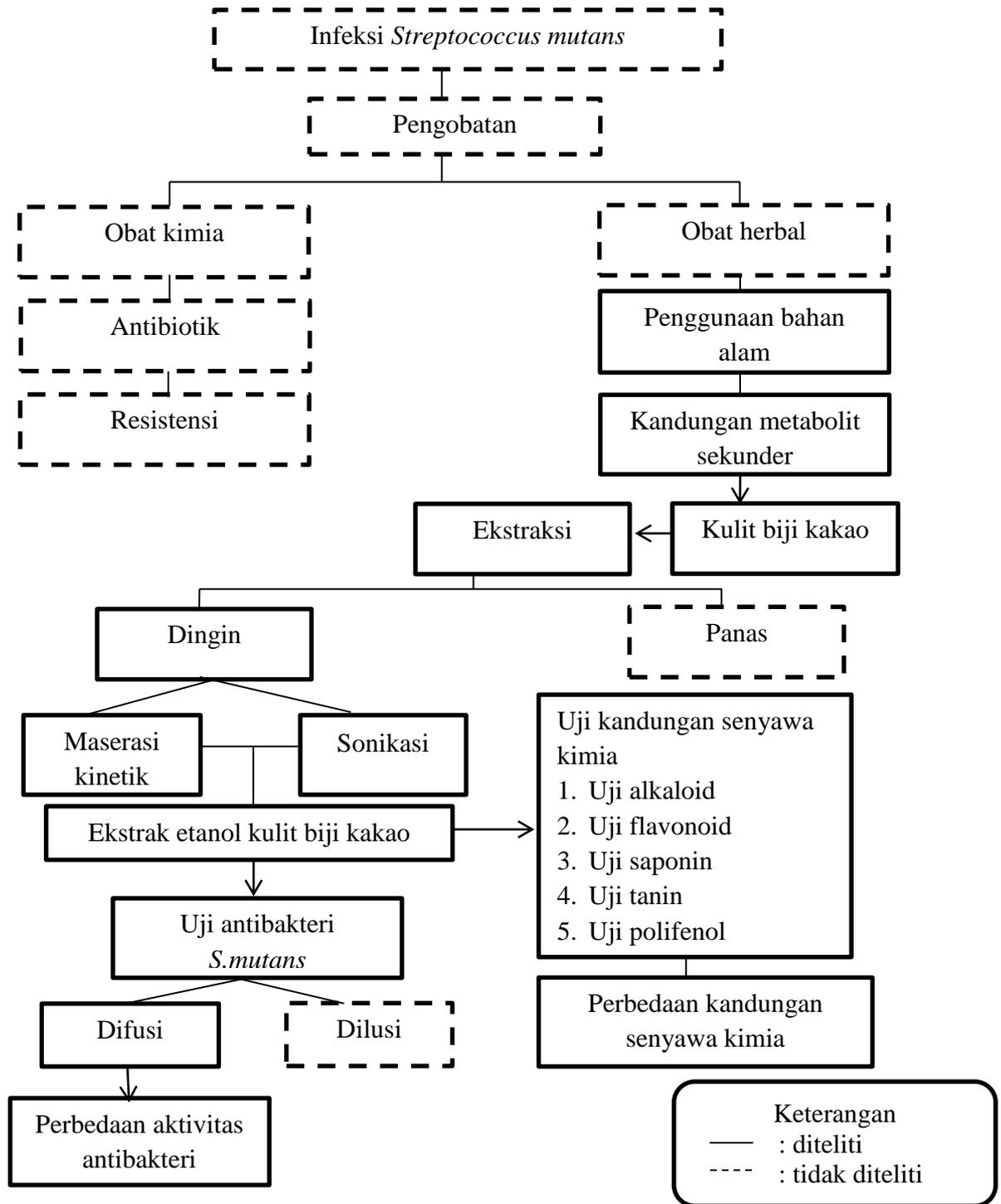
b. Metode Difusi

Metode difusi dibagi lagi menjadi tiga, yaitu difusi cakram, difusi silinder dan *hole plate*. Dalam prosedur cakram, kertas cakram (berdiameter 6 mm) yang mengandung senyawa uji ditempatkan pada permukaan agar yang sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Senyawa uji berdifusi ke medium agar menyebabkan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme. Cawan petri diletakkan pada suhu kamar sebelum inkubasi, kemudian zona hambat diukur. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan secara visual, karena

konsentrasi senyawa uji terendah, yang dapat menyebabkan zona hambat pertumbuhan dapat dikenali. Namun, metode difusi kurang cocok untuk menentukan nilai KHM dari pada dilusi, karena tidak mungkin mengukur jumlah senyawa uji yang berdifusi kedalam medium agar (Chorma *et al.*, 2010).

BAB 3. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis adalah jawaban sementara terhadap masalah penelitian yang kebenarannya harus diuji secara empiris. Hipotesis merupakan keterangan sementara dari hubungan fenomena-fenomena yang kompleks. Oleh Karena itu, perumusan hipotesis sangat penting dalam sebuah penelitian. Hipotesis dalam penelitian ini yaitu:

Ho: Tidak ada pengaruh dari metode maserasi kinetik dan sonikasi ekstrak kulit biji kakao terhadap kandungan senyawa kimia dan tidak ada pengaruh aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

H₁: Ada pengaruh dari metode maserasi kinetik dan sonikasi ekstrak kulit biji kakao terhadap kandungan senyawa kimia dan ada pengaruh aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain Penelitian yang digunakan pada penelitian ini ialah secara eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh variabel *independent* terhadap variabel *dependent*. Variabel *independent* pada penelitian ini ialah ekstrak etanol kulit biji kakao yang diekstraksi dengan metode maserasi kinetik dan sonikasi, sedangkan variabel *dependent* pada penelitian ini kandungan senyawa kimia ekstrak dan aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas objek atau subjek yang mempunyai kuantitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiono, 2016). Populasi pada penelitian ini adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Kebun Renteng Kecamatan Rambipuji Kabupaten Jember.

4.2.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi yang ingin diteliti oleh peneliti. Menurut Sugiyono (2011), Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi. Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga memperoleh informasi tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulannya. Variabel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu variabel *independent* dan variabel *dependent*, adapun penjelasannya sebagai berikut:

1. Variabel *independent*/variabel bebas adalah variabel yang berperan memberi pengaruh kepada variabel lain (Haqul, 1989). Variabel *independent* pada penelitian ini ialah metode ekstraksi yang digunakan, yaitu metode maserasi kinetik dan sonikasi.
2. Variabel *dependent*/variabel terikat adalah variabel yang dijadikan sebagai faktor yang dipengaruhi oleh sebuah atau sejumlah variabel lain (Haqul, 1989). Variabel *dependent* dari penelitian ini ialah rendemen ekstrak kulit biji kakao, kandungan senyawa kimia ekstrak dan aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans*.

4.4 Tempat Penelitian

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

4.5 Waktu Penelitian

Waktu penelitian ini akan dilakukan pada rentang waktu bulan April - Agustus 2022.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional merupakan suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel dengan cara memberikan arti atau menspesifikasikan kegiatan ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk mengukur variabel tertentu. Definisi operasional digunakan untuk memberikan batasan dan pengertian yang jelas tentang variabel sehingga dapat menghindari terjadinya kesalah fahaman mengenai data yang dikumpulkan (Nazir, 1999). Adapun definisi operasional dari penelitian ini sebagai berikut :

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
1	Rendemen ekstrak etanol kulit biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	Hasil perbandingan berat ekstrak dengan jumlah bahan baku.	Neraca analitik	Menghitung persen rendemen hasil ekstrak	Rendemen ekstrak kulit biji kakao yang didapatkan dihitung dengan rumus : $\frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100 \%$	Rasio
2	Skrining fitokimia	Uji kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin dan saponin	Tabung reaksi dan pipet tetes	Dengan menambahkan beberapa reagen yang sesuai	Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna jingga, Adanya senyawa polifenol ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat, Jika berubah warna jingga menunjukkan adanya flavonoid, Adanya senyawa	Nominal

					saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1 cm, Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin.	
3	Aktivitas antibakteri <i>Streptococcus mutans</i>	Zona hambat yang berada di sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan <i>Streptococcus mutans</i>	Jangka sorong	Mengukur diameter zona hambat pada area jernih di sekitar piringan.	Terbentuknya diameter zona hambat di sekitar sumuran dinyatakan dalam satuan 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 penelitian (Sugiono, 2018).

4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L) akan dilakukan di Politeknik Negeri Jember. Tujuan determinasi untuk mengetahui kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian (Diniatik, 2015).

4.7.2 Pengolahan Serbuk Simplisia

Kulit biji kakao dilepas dari biji kakaonya dan dibersihkan dan dialiri dengan air mengalir lalu ditiriskan. Kemudian simplisia dikeringkan dengan

oven 4 sampai 5 hari dengan suhu 40°C - 50°C. Kulit biji kakao yang telah kering diblender dan menghasilkan serbuk simplisia kulit biji kakao (Leman dan Waworuntu, 2016).

4.7.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi kinetik dan sonikasi, adapun langkah kerjanya sebagai berikut:

a. Maserasi kinetik

Sebanyak 50 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*, kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 300 ml dengan replikasi 4 kali. Pengadukan dilakukan dengan bantuan *magnetic stirrer* di atas *hotplate* selama 24 jam. Ekstrak yang diperoleh disaring. Kemudian seluruh filtrat dipekatkan atau dihilangkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* sampai sepertiga bagian volume dengan kecepatan 40 rpm dan suhu 50°C, kemudian dipekatkan di atas *waterbath* 60°C sampai diperoleh ekstrak etanol kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L).

b. Sonikasi

Sebanyak 50 gram dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 300 ml dengan replikasi 4 kali, selanjutnya ditutup dengan aluminium foil lalu dimasukkan ke dalam sonikator selama 30 menit. kemudian dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan 40 rpm dan suhu 40°C, kemudian dipekatkan di atas *waterbath* 60°C sampai diperoleh ekstrak etanol kulit biji kakao. Metode sonikasi yang dilakukan

mengacu pada penelitian Klen dan Vodopivec (2012). Rendemen ekstrak yang diperoleh dihitung dengan rumus sebagai berikut (Dewi *et al.*, 2021):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

4.7.4 Skrining Fitokimia

Masing- masing uji skrining fitokimia ekstrak etanol kulit biji kakao dilakukan 3 kali pengulangan.

a. Uji Alkaloid

Ditimbang 0,5 gram ekstrak ditambahkan 1 ml HCl 2 N dan 9 ml akuades, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring sampai didapat filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff, akan terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan (Fitriyanti *et al.*, 2020).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah 5 ml etilasetat kemudian dipanaskan beberapa menit lalu disaring dengan kertas saring kedalam tabung reaksi. Filtrat yang disaring ditambah magnesium lalu ditetesi dengan HCl 2N. jika berubah warna menjadi kuning sampai jingga menunjukkan hasil positif flavonoid (Fitriyanti *et al.*, 2020).

c. Uji Polifenol

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 3-4 tetes FeCl₃ terjadinya perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat menunjukkan adanya kandungan fenol (Fitriyanti *et al.*, 2020).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah etanol sampai sampel terendam semuanya. Kemudian sebanyak 1 ml larutan dipindahkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 . Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman (Fitriyanti *et al.*, 2020).

e. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan air hangat di dalam tabung reaksi, dikocok kuat hingga terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, busa tidak hilang (Fitriyanti *et al.*, 2020).

4.7.5 Persiapan Media

Sebelum melakukan pembuatan media dan pengujian antibakteri alat-alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas yang memiliki presisi dan media pertumbuhan bakteri disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Laoli, 2018).

a. *Nutrient Agar*

Ditimbang media nutrient agar sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambah akuades sampai 50 ml. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer hot plate*. Sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 5 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media agar miring digunakan untuk inokulum suspensi bakteri uji.

b. *Muller Hinton agar*

Sebanyak 8,5 gram Media *Muller Hinton Agar* dilarutkan dalam 250 ml akuades dipanaskan sampai larut. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Selanjutnya dibagi ke dalam 8 cawan petri.

4.7.6 Pembuatan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan DMSO 10%. Diambil 10 ml DMSO 100% kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan akuades sampai volume 100 ml. (Nurjanah *et al.*, 2018). Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu klorheksidin 0,2% sebanyak 20 ul (Susanti *et al.*, 2019).

4.7.7 Preparasi dan Uji Aktivitas Antibakteri

a. Peremajaan *Streptococcus mutans*

Peremajaan bakteri menggunakan agar miring NA dengan mengambil satu ose bakteri menggunakan ose steril yang sudah dipanaskan dengan cara pemijaran kemudian digoreskan pada permukaan agar miring dengan cara zig-zag dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

b. Pembuatan Standar *Mc Farland* 0,5

Cara pembuatan *Mc Farland* 0,5 dengan cara BaCl₂ 1% sebanyak 0,03 ml dicampur dengan 9,95 ml H₂SO₄ 1%. Kemudian uji densitas standart *Mc Farland* dengan mengukur absorbansinya dengan alat spektrofotometer.

c. Pembuatan Suspensi dan Uji Kekeruhan Bakteri *Streptococcus mutans*

Biakan bakteri *Streptococcus mutans* di dalam media NA yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil satu ose koloni, kemudian dimasukkan ke

dalam NaCl steril 10 ml kemudian divortex, selanjutnya kekeruhannya dibandingkan dengan tabung reaksi yang berisi standar *Mc Farland* 0,5.

d. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

Suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dimasukkan ke dalam 8 cawan petri yang berisi media *Muller Hinton agar* dengan cara mengambil 100 µl dan diratakan dengan batang L. Tiap cawan petri dibagi menjadi 4 bagian pada sumuran yang telah dibuat, kemudian dimasukkan kontrol positif, kontrol negatif dan diambil ekstrak kulit biji kakao sebanyak 20 µl konsentrasi 40% dan 60% yang sudah diekstraksi menggunakan metode maserasi kinetik dan sonikasi. Replikasi dilakukan sebanyak empat kali untuk setiap metode ekstraksi yang digunakan. Selanjutnya cawan petri diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

4.8.1 Pengolahan Data

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat bakteri *Streptococcus mutans* diukur menggunakan jangka sorong dalam satuan mm. Zona hambat yang merupakan zona bening pada sekeliling sumuran dimana tidak ditemukan pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

4.8.2 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian diolah menggunakan uji statistik SPSS yaitu dimulai dengan uji normalitas dengan uji *shapiro-wilk* dan dilanjutkan dengan uji homogenitas yaitu uji *levene*. Data yang didapat tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), maka dilanjutkan uji non parametrik yaitu uji *kruskall wallis* dan

dilakukan uji lanjutan Duncan untuk mengetahui perbedaan daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* terhadap ekstrak etanol kulit biji kakao.

BAB 5. HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman kulit biji kakao dilakukan di Politeknik Negeri Jember. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L). Hasil identifikasi tanaman kulit biji kakao (*Theobroma cacao* L) dapat dilihat pada lampiran 1.

5.2 Ekstraksi

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan baik pada metode ekstraksi maserasi kinetik maupun sonikasi sama melarutkan 50 gram simplisia dalam pelarut etanol 70% sebanyak 300 ml dengan replikasi 4 kali.

Tabel 5.1 Hasil Ekstrak Kental dan % Rendemen

Metode Ekstraksi	Replikasi	Hasil Ekstrak Kental	% Rendemen	Rata-rata % Rendemen
Sonikasi	1	5,45 gram	10,90%	11,08%±0,006
	2	5,35 gram	10,80%	
	3	5,39 gram	10,70%	
	4	5,94 gram	11,90%	
Maserasi kinetik	1	5,14 gram	10,80%	10,48%±0,004
	2	5,28 gram	10,60%	
	3	5,31 gram	10,60%	
	4	4,95 gram	9,90%	

5.3 Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol kulit biji kakao dengan metode ekstraksi maserasi kinetik dan sonikasi dilakukan untuk mendapatkan informasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalamnya. Adapun pemeriksaan yang dilakukan meliputi pemeriksaan golongan senyawa

alkaloid, flavonoid, tanin, polifenol dan saponin. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit biji kakao dapat dilihat pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Kental Maserasi Kinetik dan Sonikasi

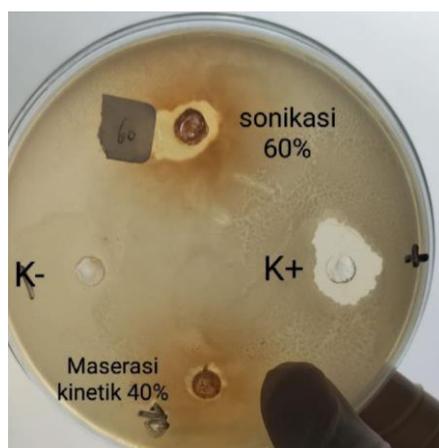
Senyawa	Pereaksi	Hasil Menurut Literatur	Maserasi kinetik		Sonikasi	
			Hasil Pengamatan	Kesimpulan	Hasil Pengamatan	Kesimpulan
Alkaloid	<i>Dragendroff</i>	Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat atau keoklatan (Fitriyanti <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk endapan jingga	+	Terbentuk endapan jingga	+
Flavonoid	Serbuk Mg dan HCl	Jika berubah warna menjadi kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid	Terbentuk warna jingga	+	Terbentuk warna jingga	+
Polifenol	FeCl ₃	Adanya senyawa polifenol ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat (Fitriyanti <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk warna hitam pekat	+	Terbentuk warna hitam pekat	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Fitriyanti <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk warna hijau kehitaman	+	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
Saponin	Akuades	Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1 cm (Fitriyanti <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk busa 1 cm	+	Terbentuk busa 1 cm	+

Keterangan : (+) mengandung senyawa kimia

5.4 Uji Antibakteri

Uji kekeruhan *Mc Farland 0,5* mendapatkan hasil absorbansi 0,107 dan untuk absorbansi bakteri mendapatkan hasil absorbansi 0,104. Hal ini dapat dilihat pada lampiran 2.

Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit biji kakao dapat menghambat bakteri *Streptococcus mutans*. Hasil uji antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao dapat dilihat pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Hasil Uji Antibakteri

Hasil uji antibakteri metode sonikasi memiliki daya hambat yang lebih besar dibandingkan dengan metode maserasi kinetik. Zona hambat metode sonikasi konsentrasi 40% rata-rata sebesar $1,93 \pm 0,71$ mm, konsentrasi 60% rata-rata sebesar $8,44 \pm 1,53$ mm, sedangkan metode maserasi kinetik konsentrasi 40% tidak memiliki zona hambat, konsentrasi 60% memiliki rata-rata sebesar $6,06 \pm 1,19$ mm. Hasil uji antibakteri berupa hasil uji pengukuran zona hambat untuk masing-masing metode ekstraksi dapat dilihat pada tabel 5.3

Tabel 5.3 Hasil Pengujian Ekstrak Kulit Biji Kakao Terhadap Bakteri
Streptococcus mutans

Sampel	Konsentrasi	Replikasi	Zona Hambat (mm)	Rata- rata \pm SD
Ekstrak Sonikasi	40%	1	1,86	1,93 \pm 0,71
		2	1,08	
		3	1,95	
		4	2,81	
	60%	1	8,42	8,44 \pm 1,53
		2	6,38	
		3	10,03	
		4	8,93	
Ekstrak Maserasi kinetik	40%	1	0	0
		2	0	
		3	0	
		4	0	
	60%	1	7,62	6,06 \pm 1,19
		2	4,83	
		3	6,26	
		4	5,54	
Klorheksidin (Kontrol Positif)	0,2%	1	10,59	13,71 \pm 3,22
		2	12,58	
		3	18,19	
		4	13,41	
DMSO (Kontrol Negatif)	10%	1	0	0
		2	0	
		3	0	
		4	0	

5.5 Analisis Data

Hasil asumsi uji *one way* ANOVA pada uji normalitas memenuhi asumsi *one way* ANOVA, tetapi pada uji homogenitas tidak memenuhi syarat uji *one way* ANOVA dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil Uji Asumsi ANOVA

Variabel	Uji Normalitas (Shapiro Wilk)	Kesimpulan	Asumsi ANOVA	Uji Homogenitas	Kesimpulan	Asumsi ANOVA
Ekstrak maserasi kinetik konsentrasi 40%	-	-	-	-	-	-
Ekstrak maserasi kinetik konsentrasi 60%	0,872	Normal	Memenuhi			
Ekstrak sonikasi konsentrasi 40%	0,810	Normal	Memenuhi	0,027	Tidak homogen	Tidak memenuhi
Ekstrak sonikasi konsentrasi 60%	0,773	Normal	Memenuhi			
Kontrol positif	0,549	Normal	Memenuhi			
Kontrol negatif	-	-	-	-	-	-

Maka, dilanjutkan dengan uji non parametrik *Kruskall Wallis* yang menunjukkan $p < 0,05$ yang artinya terdapat perbedaan nyata pada tiap perlakuan dapat dilihat pada tabel 5.5

Tabel 5.5 Hasil Uji *Kruskall Wallis*

Hasil Uji <i>Kruskall Wallis</i>	
sig	Uji signifikan
0,0004	Berbeda secara signifikan

Dapat dilihat pada tabel 5.5 bahwasanya ada perbedaan secara signifikan pada setiap perlakuan, maka dilanjutkan uji *pos hoc* yaitu Duncan untuk mengetahui lebih lanjut kelompok mana yang berbeda signifikan. Hasil dari duncan menunjukkan bahwa zona hambat ekstrak sonikasi 60% berbeda secara signifikan dengan ekstrak maserasi kinetik 60% dan kontrol positif. Kontrol negatif sama secara signifikan dengan ekstrak maserasi kinetik 40% dan ekstrak sonikasi 40%. Hasil dari Duncan dapat dilihat pada tabel 5.6

Tabel 5.6 Hasil Uji Duncan

Kode Sampel	N	<i>Subset for alpha = 0.05</i>			
		1	2	3	4
Ekstrak kinetika konsentrasi 40%	4	0,0000			
Kontrol negatif	4	0,0000			
Ekstrak sonikasi konsentrasi 40%	4	1,9250			
Ekstrak kinetika konsentrasi 60%	4		6,0625		
Ekstrak sonikasi konsentrasi 60%	4			8,4400	
Kontrol positif	4				13,6925
Sig.		0,115	1,000	1,000	1,000

Keterangan:

1. Perbedaan letak kolom nilai subset menunjukkan tingkat perbedaan antar varian.
2. Nilai yang terletak pada kolom subset yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara varian.

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Maserasi kinetik dan Sonikasi

Sonikasi dan maserasi kinetik merupakan metode yang memiliki perlakuan yang berbeda selama proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan pada proses sonikasi dan maserasi kinetik menggunakan etanol 70%. Hasil ekstraksi dari metode sonikasi dan maserasi kinetik pada penelitian ini menunjukkan bahwa metode sonikasi menghasilkan rendemen yang lebih besar dibandingkan metode maserasi kinetik. Hal ini dapat disebabkan oleh perlakuan pada masing-masing ekstraksi yang berbeda.

Hasil proses ekstraksi metode sonikasi menghasilkan persen rendemen yang lebih besar karena salah satu keuntungan menggunakan metode sonikasi yaitu memberikan hasil yang optimum, karena timbulnya fenomena kavitasi akibat pecahnya gelembung dalam pelarut dengan adanya gelombang ultrasonik sehingga kandungan yang ada didalamnya dapat berdifusi dengan mudah (Utami *et al.*, 2020), sedangkan metode maserasi kinetik menghasilkan persen rendemen lebih rendah karena metode ekstraksi maserasi kinetik mempunyai keterbatasan yang tidak dapat dihindari yaitu penyariannya yang kurang sempurna sehingga hasil rendemen yang didapatkan rendah (Fauzana *et al.*, 2010). Rendemen merupakan perbandingan antara hasil banyaknya metabolit yang didapatkan setelah proses ekstraksi dengan berat sampel yang digunakan.

Pelarut etanol digunakan karena etanol merupakan pelarut universal yang aman digunakan dan tidak bersifat toksik (Irawan, 2014). Penggunaan etanol 70% sebagai pelarut karena etanol 70% merupakan pelarut yang lebih polar dari etanol

96% dan lebih non polar dari etanol 50% sehingga senyawa flavonoid yang sifatnya polar akan cenderung terlarut lebih banyak dalam etanol 70% (Riwanti *et al.*, 2018).

6.2 Skrining Fitokimia

Ekstrak kental kulit biji kakao dari metode sonikasi dan maserasi kinetik dilakukan uji skrining fitokimia. Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam kulit biji kakao yang sudah diekstraksi menggunakan metode sonikasi dan maserasi kinetik (Khotimah, 2016). Hasil skrining fitokimia pada setiap metode ekstraksi menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit biji kakao mengandung senyawa kimia, yaitu alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin dan saponin. Hasil penelitian yang melakukan identifikasi terhadap senyawa aktif dari kulit biji kakao Yumas (2017), menyatakan bahawa kulit biji kakao mengandung senyawa fitokimia flavonoid, alkaloid, polifenol, tanin dan saponin.

Pada peneltian ini ditemukan senyawa alkaloid pada ekstrak etanol kulit biji kakao dengan metode sonikasi dan maserasi kinetik, yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna jingga. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Santi dkk. (2013) pengujian senyawa alkaloid yang diperoleh dari analisis senyawa yaitu terbentuknya endapan berwarna jingga. Endapan berwarna jingga terbentuk karena senyawa alkaloid yang berinteraksi dengan ion tetraiodobismutat (III) yang terkandung dalam reagen *dragendroff*.

Pada penelitian ini ditemukan senyawa flavonoid pada ekstrak etanol kulit biji kakao dengan metode sonikasi dan kinetik, yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga pada hasil uji skrining fitokimia metode sonikasi dan maserasi kinetik. Menurut penelitian Fitriyanti dkk. (2020) pengujian senyawa flavonoid yang didapatkan dari analisis senyawa yaitu terjadinya perubahan warna jingga. Perubahan warna jingga karena senyawa flavonoid akan tereduksi dengan Mg dan HCl sehingga menghasilkan warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

Pada penelitian ini ditemukan senyawa polifenol pada ekstrak kulit biji kakao dengan metode sonikasi dan maserasi kinetik, yang ditunjukkan dengan perubahan warna hitam pekat pada hasil uji skrining fitokimia metode sonikasi dan maserasi kinetik. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fitriyanti dkk. (2020) pengujian senyawa polifenol yang didapatkan dari analisis senyawa yaitu terjadinya perubahan warna hitam kehijauan hingga hitam pekat.

Pada penelitian ditemukan senyawa tanin pada ekstrak kulit biji kakao dengan metode sonikasi dan maserasi kinetik, yang ditunjukkan dengan perubahan warna hijau kehitaman pada hasil uji skrining fitokimia metode sonikasi dan maserasi kinetik. Berdasarkan penelitian Sulistyarini dkk. (2019) pengujian senyawa alkaloid yang diperoleh dari analisis senyawa yaitu terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman. Perubahan warna hijau kehitaman karena penambahan FeCl_3 1% bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin.

Pada penelitian ditemukan senyawa saponin pada ekstrak kulit biji kakao

dengan metode sonikasi dan maserasi kinetik, yang ditunjukkan dengan terbentuknya busa pada hasil uji skrining fitokimia metode sonikasi dan maserasi kinetik. Berdasarkan penelitian Sulistyarini dkk. (2019) saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang mudah terdeteksi melalui kemampuannya dalam membentuk busa. Busa yang timbul disebabkan karena senyawa saponin mengandung sifat fisik yang mudah terhidrolisis dalam air sehingga menimbulkan busa ketika dikocok.

6.2 Uji Antibakteri

Penentuan aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar menggunakan sumuran. Metode ini dipilih karena pengerjaannya sederhana, namun tetap memberikan hasil yang diharapkan. Prinsip dari metode ini adalah mengukur diameter zona bening di sekitar sumuran. Semakin besar diameter zona bening, berarti semakin kuat daya antibakterinya (Jannata *et al.*, 2014).

Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit biji kakao dapat menghambat bakteri *Streptococcus mutans*. Hasil penelitian yang melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* Yumas (2017) menyatakan bahwa ekstrak kulit biji kakao berpotensi sebagai senyawa aktif antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Ekstrak kulit biji kakao bersifat bakteriostatik terhadap *Streptococcus mutans*. Hal ini ditandai dengan adanya zona bening di sekitar sumuran. Hasil uji antibakteri pada metode sonikasi memiliki daya hambat yang lebih kuat dibandingkan dengan metode maserasi kinetik. Kemampuan membunuh bakteri

uji pada ekstrak kulit biji kakao dengan metode sonikasi lebih baik karena dengan konsentrasi lebih kecil sudah membunuh bakteri uji, dibanding ekstrak kulit biji kakao dengan metode maserasi kinetik.

Perbedaan besarnya zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi disebabkan karena adanya perbedaan besar kecilnya kandungan zat aktif antibakteri yang terkandung di dalamnya serta kecepatan difusi bahan antibakteri ke dalam medium agar. Handayani (2016) menyatakan bahwa ekstraksi menggunakan metode sonikasi kandungan senyawa flavonoidnya lebih tinggi, oleh karena itu hasil ekstrak metode sonikasi memiliki daya hambat yang lebih besar.

Berdasarkan rata-rata diameter zona hambat menunjukkan semakin besar konsentrasi ekstrak maka, semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk.. Hal ini sesuai dengan Ngaisah (2010) yang menyatakan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin banyak jumlah zat aktif yang terkandung di dalamnya.

Terbentuknya zona hambat di sekitar sumuran karena aktivitas dari kandungan senyawa kimia dalam menghambat bakteri *Streptococcus mutans*. Kandungan senyawa kimia memiliki mekanisme kerja yang berbeda dalam menghambat bakteri *Streptococcus mutans*.

Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri dengan cara berikatan dengan DNA. Hal ini diduga karena alkaloid memiliki gugus basa yang mengandung nitrogen. Gugus basa ini akan bereaksi dengan senyawa asam yang ada pada bakteri seperti DNA yang merupakan penyusun utama inti sel. Dengan

terganggunya DNA maka sintesis protein dan asam nukleat dalam sel akan terganggu. Hal ini mengakibatkan metabolisme sel terganggu sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mengalami kematian (Rosidah *et al.* 2014).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel serta menghambat metabolisme energi. Flavonoid merupakan senyawa yang terdiri dari banyak fenol. Senyawa fenol yang terdapat dalam flavonoid dapat mendenaturasi protein sehingga merusak struktur protein. Oleh karena itu, membran sel serta sitoplasma bakteri yang tersusun dari protein dapat dirusak oleh flavonoid (Sapara *et al.*, 2014).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesi sel mikroba, menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin pada membran sel bakteri akan bereaksi dengan protein untuk membentuk ikatan hidrogen sehingga protein akan didenaturasi, selain itu tanin juga dapat bereaksi dengan fosfolipid sehingga tanin akan merusak sel membran dan menyebabkan kebocoran metabolit penting yang menonaktifkan sistem enzim bakteri (Rosidah *et al.* 2014).

Saponin juga merupakan senyawa aktif yang bersifat antibakteri dalam ekstrak etanol kulit biji kakao. Saponin memiliki sifat seperti sabun. Saponin adalah senyawa aktif yang menimbulkan busa apabila dikocok dalam air. Saponin bekerja dengan meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga membran menjadi tidak stabil dan mengakibatkan hemolisis sel (Rosidah *et al.* 2014).

Mekanisme kerja polifenol sebagai antibakteri berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel bakteri meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah. Polifenol dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein, menginaktifkan enzim dan menyebabkan kebocoran sel (Rosidah *et al.* 2014).

Penelitian ini memiliki kekurangan yang perlu terus diperbaiki dalam penelitian-penelitian selanjutnya. Penelitian ini tidak melakukan penentuan kadar senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol kulit biji kakao sehingga tidak diketahui secara spesifik pengaruh metode ekstraksi sonikasi dan maserasi kinetik kulit biji kakao terhadap kandungan senyawa kimia yang diujikan. Penelitian ini hanya mengujikan pada bakteri gram positif saja yaitu *Streptococcus mutans*.

BAB 7. PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa:

1. Metode ekstraksi sonikasi dan maserasi kinetik mempengaruhi persen rendemen ekstrak yang dihasilkan.
2. Metode ekstraksi sonikasi dan maserasi kinetik tidak mempengaruhi kandungan senyawa kimia.
3. Metode sonikasi dan maserasi kinetik mempengaruhi aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans*.

7.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, peneliti selanjutnya disarankan untuk:

1. Melakukan uji secara kuantitatif terhadap kandungan senyawa kimia ekstrak etanol kulit biji kakao dengan metode sonikasi dan maserasi kinetik untuk mengetahui perbedaan yang lebih spesifik terhadap pengaruh metode ekstraksi.
2. Melakukan pengujian efek antibakteri ekstrak etanol kulit biji kakao terhadap bakteri gram negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Aas, J. A. *et al.* (2008) 'Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults', *Journal of clinical microbiology*, 46(4), pp. 1407–1417.
- Adiguna, P. and Santoso, O. (2017) 'Pengaruh Ekstrak Daun Serai (*Cymbopogon Citratus*) Pada Berbagai Konsentrasi Terhadap Viabilitas Bakteri *Streptococcus Mutans*', *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 6(4), pp. 1543–1550.
- Ajdić, D. *et al.* (2002) 'Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), pp. 14434–14439.
- Aminah, U. and Nur, F. (2018) 'Biosorpsi Logam Berat Timbal (Pb) oleh Bakteri', *Teknosains: Media Informasi Sains Dan Teknologi*, 12(1).
- Andini, A. R. (2017) 'Identitas dan Kebijakan Luar Negeri: Komitmen Jepang Terhadap Penanganan Illegal Logging di Indonesia dalam Kerangka Asia Forest Partnership Tahun 2002 - 2012', *Journal of International Relations*, 3(1), pp. 98–105.
- Andries, J. R., Gunawan, P. N. and Supit, A. (2014) 'uji efek anti bakteri ekstrak bunga cengkeh terhadap bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro', *e-GiGi*, 2(2).
- Apriliani S (2020) 'UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum* Linn) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Streptococcus mutans* PADA INFEKSI ODONTOGENIK SECARA IN VITRO', *Gigi, Fakultas Kedokteran Utara, Universitas Sumatera*, pp. 1–54.
- Aryani N.L.P.N.A., Ni Luh Yulianti, G. A. (2018) 'Karakteristik Biji Kakao Hasil Fermentasi Kapasitas Kecil dengan Jenis Wadah dan Lama Fermentasi yang Berbeda', *Jurnal Beta (Biosistem dan Teknik Pertanian)*, 6(1), pp. 17–24.
- Banas, J. A. (2004) 'Virulence properties of *Streptococcus mutans*', *Front Biosci*,

9(10), pp. 1267–1277.

- Boleng, D. T. (2015) *Bakteriologi Konsep-Konsep Dasar*. Malang: UMM Press.
- Chu, F. C. S. *et al.* (2006) ‘Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings’, *Journal of Endodontics*, 32(1), pp. 17–23.
- 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), p. 1. doi: 10.24843/jrma.2021.v09.i01.p01.
- Downer, M. C., Drugan, C. S. and Blinkhorn, A. S. (2006) ‘Salaried services in the delivery of dental care in Western industrialised countries: implications for the National Health Service in England’, *International dental journal*, 56(1), pp. 7–16.
- F, S. (2014) ‘Modul 1 Struktur Sel Mikroorganisme’, *Universitas Terbuka Repository*, pp. 1–7.
- Fardiaz, S. (1989) ‘Mikrobiologi Pangan, PAU Pangan dan Gizi’, *Institut Pertanian Bogor, Bogor*.
- Farhanandi, B. W. and Indah, N. K. (2022) ‘Karakteristik Morfologi dan Anatomi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) yang Tumbuh pada Ketinggian Berbeda Morphological and Anatomical Characteristics of Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) That Grow at Different Heights’, 11, pp. 310–325.
- Fatmawati, D. W. A. and Widowati, E. (2011) ‘ANTIBACTERIAL EFFECT OF GLASS IONOMER AND ZINC OXIDE CHKM CEMENT AS ROOT CANAL FILLER TOWARD STREPTOCOCCUS VIRIDANS: EFEK ANTIBAKTERI SEMEN IONOMER KACA DAN ZINK OKSID CHKM SEBAGAI BAHAN PENGISI SALURAN AKAR TERHADAP STREPTOCOCCUS VIRIDANS’, *Dentika: Dental Journal*, 16(2), pp. 134–138.
- Felicia, M. *et al.* (2016) ‘Perancangan Media Komunikasi Visual Produk Cokelat

Vicco Kopkar Sekar Jember Abstrak Pendahuluan Rumusan Masalah Batas Lingkup Perancangan Tujuan Perancangan Metode Pengumpulan Data Metode Analisis Data', pp. 1–10.

Fifendy, M. (2017) 'Mikrobiologi Edisi Pertama', *Depok: Kencana*, 240.

Fitriyanti, F., Abdurrazaq, A. and Nazarudin, M. (2020) 'UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI ESKTRAK ETIL ASETAT BAWANG DAYAK (*Eleutherine palmifolia* Merr) TERHADAP *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DENGAN METODE SUMURAN', *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 5(2), p. 174. doi: 10.51352/jim.v5i2.278.

Forssten, S. D., Björklund, M. and Ouwehand, A. C. (2010) 'Streptococcus mutans, caries and simulation models', *Nutrients*, 2(3), pp. 290–298. doi: 10.3390/nu2030290.

Ginting, S. A. (2020) 'Efektivitas Ekstrak Buah Merah (*Pandanusconioideus* Lam) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* Secara In Vitro'. Available at: <http://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/27072>.

Hasanuddin, H. (2017) 'COCCUS BACTERIA IN FERMENTED DURIAN SPECIFIC FOOD OF BENGKULU', *Jurnal Agroindustri*, 7(1), pp. 37–43.

Helmiyati, A. and Nurrahman, N. (2010) 'Pengaruh Konsentrasi Tawas Terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Positif Dan Negatif', *Jurnal Pangan dan Gizi*, 1(1), p. 116514. doi: 10.26714/jpg.1.1.2010.

Hidayatiandri, N. and Mahardika, R. G. (2021) 'Potensi *Stenochlaena palustris* Burm . Sebagai Agen Antiinflamasi Berdasarkan Metode Ekstraksi PEF (Pulsed Electric Field): Sebuah Kajian Naratif', 4(2), pp. 66–74.

Irawan, H. (2014) ' Pengaruh Konsentrasi Pelarut Etanol Terhadap Profil Kromatogram dan Kandungan Senyawa Kimia Dalam Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L) Dan Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L.)' Article, pp. 40-45.

Kandala, N. J., Al-Karaawi, I. Ah. and Mehdi, D. A. S. (2011) 'Determination the optimal DNA extraction method from *Streptococcus mutans* biofilm formation that isolated from patients with caries active'.

- Jannata, R.H., Gunadi, A and Ermawati, T. (2014) 'Daya Antibakteri Ekstrak Kulit Apel Manalagi (*Malus syvestris* mill.) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*', Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember (UNEJ).
- 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.
- Leman, M. A. and Waworuntu, O. A. (2016) 'Uji Efek Antibakteri Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L) Terhadap Bakteri *Streptococcus Mutans*', *Pharmakon*, 5(1), pp. 20–25. doi: 10.35799/pha.5.2016.11219.
- Lukito, A. (2004) *Paduan Lengkap Budidaya Kakao*. Jakarta: AgroMedia pustaka.
- Mahardhika, R. and Laif, J. (2015) 'Pustaka unpad beberapa bahan alam'.
- Maksum, R. (2009) *Mikrobiologi*. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Maulida Hayati, Herry Herman and Andri Rezano (2014) 'PERAN IMUNOGLOBULIN A (SIgA) DALAM MENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM STREPTOKOKUS MUTANS PADA PERMUKAAN GIGI', *Dentika: Dental Journal*, 18(2), pp. 199–203. doi: 10.32734/dentika.v18i2.2031.
- Nurjanah, S., Isbiyantoro, I. and Fadillah, H. (2018) 'Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) Sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguinis*', *JFL: Jurnal Farmasi Lampung*, 7(1).
- Padmasari, P. D., Astuti, K. W. and Warditiani, N. K. (2013) 'Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.)', *Journal*, 366, pp. 1–7.
- Prawoto, A. Winarsih, S. (2010) *Budi daya kakao*. Jakarta: AgroMedia pustaka.
- Rahman, F. A., Haniastuti, T. and Utami, T. W. (2017) 'Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668', *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 3(1), pp. 1–7.

- RIONO, Y. (2020) 'PERTUMBUHAN BIBIT KAKAO (*Theobroma cacao* L) DENGAN BERBAGAI PEMBERIAN DOSIS SERBUK GERGAJI PADA VARIETAS (BUNDO-F1) DI TANAH GAMBUT', *Selodang Mayang: Jurnal Ilmiah Badan Perencanaan Pembangunan Daerah Kabupaten Indragiri Hilir*, 6(3), pp. 163–171. doi: 10.47521/selodangmayang.v6i3.175.
- Rosidah, A. N., Lestari, E. P and Astuti, V. (2014) 'Daya Antibakteri Ekstrak Daun Kendali (*Hippobroma longiflora* [L] G.Don) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*', Fakultas Kedokteran gigi Universitas Jember.
- Sani, R.N., Fithri, C.N., Ria, D.A., and Jaya, M.M. (2014) ' Analisis Rendemen dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii*, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(2):121-126.
- Senduk, T. W., Montolalu, L. A. D. Y. and Dotulong, V. (2020) 'The rendement of boiled water extract of mature leaves of mangrove *Sonneratia alba*', *Jurnal Perikanan Dan Kelautan Tropis*, 11(1), p. 9. doi: 10.35800/jpkt.11.1.2020.28659.
- Sepriyani, R. (2020) 'Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Antimikroba Terhadap *Streptococcus mutans*', *Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara Medan*, pp. 13–16. Available at: <https://repositori.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/28665/160600096.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Sidhu, G. K. *et al.* (2015) 'Evaluation of *Lactobacillus* and *Streptococcus mutans* by Addition of Probiotics in the form of Curd in the Diet', *Journal of international oral health: JIOH*, 7(7), p. 85.
- Siregar, I. and Syarief, T. H. (2013) *Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Coklat*. Jakarta: Penebar Swadaya Grup.
- Siregar, T. H. S., Riyadi, S. and Nuraeni, L. (2010) *Budi Daya Cokelat*. Jakarta: Penebar Swadaya Grup.
- Suci, A. R. (2017) 'The Effect of Maseration on Polyphenol Characteristics of Cacao Shell and Cacao Husk', *Sn Biosper*, (2010), pp. 53–60.

- Sulistyarini, I., Sari, D. A., and Wicaksono, T.A. (2019) 'SKRINING FITOKIMIA METABOLIT SEKUNDER BATANG BUAH NAGA', Sekolah tinggi Ilmu Farmasi "Yayasan Pharmasi Semarang"
- Suharman, T. H. P. (2020) 'Bahan ajar mata kuliah mikrobiologi umum'.
- Susanti, L., Isbiyantoro, I. and Simanjuntak, S. (1970) 'ANALISIS BIOAUTOGRAFI DAN KARAKTERISASI DENGAN FTIR PADA FRAKSI DAUN LABU SIAM (*Sechium edule* (jacq).SW) TERHADAP *Porphyromonas gingivalis* DAN *Streptococcus mutans*', *JFL : Jurnal Farmasi Lampung*, (June 2019), pp. 55–66. doi: 10.37090/jfl.v8i1.87.
- Susanto, F. X. (2010) 'Tanaman Kakao Budidaya Pengolahan Hasil', *Kanisius, Jokjakarta*.
- Suyono, S. and Carnovia, C. (2018) 'Sistem Pendukung Keputusan Menentukan Penyakit Pada Tanaman Kakao Menggunakan Metode TOPSIS', *Explore: Jurnal Sistem informasi dan telematika (Telekomunikasi, Multimedia dan Informatika)*, 9(1).
- Tjahjadi, P. (2007) *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Toar, A. I., Posangi, J. and Wowor, V. (2013) 'Daya Hambat Obat Kumur Cetylpyridinium Chloride Dan Obat Kumur Daun Sirih Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans*', *Jurnal Biomedik (Jbm)*, 5(1), pp. 163–168. doi: 10.35790/jbm.5.1.2013.2639.
- Utami, R. R. *et al.* (2017) 'Aktivitas Antioksidan Kulit Biji Kakao dari Hasil Penyangraian Biji Kakao Kering pada Derajat Ringan, Sedang dan Berat', *Agritech*, 37(1), p. 89. doi: 10.22146/agritech.10454.
- Utami, N.F., Nurdayanty, S.M., Susanto., Suhendar, U. 2020. Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides*). Program Studi Kimia, FMIPA Universitas Pakuan Bogor. Artikel Riset, DOI : 10.33751/jf.v10i1.2069
- Yumas, M. (2017) 'Pemanfaatan Limbah Kulit Ari Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Sebagai Sumber Antibakteri *Streptococcus mutans*.' , *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, 12(2), pp. 7–20.
- Yusuf, H., Sahputra, R. and Irfansyah, R. (2019) 'Pengaruh Media Tanam dan

Pemberian Pupuk Organik Cair terhadap Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao* L.)', *Bionatural: Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi*, 5(1).

Zaenab *et al.* (2004) 'UJI ANTIBAKTERI SIWAK (*Salvadora persica* Linn.) TERHADAP *Streptococcus mutans* (ATC31987) DAN *Bacteroides melaninogenicus*', *Makara Kesehatan*, 8(2), pp. 37–40.

Zelnicek, T. (2014) *Streptococcus mutans- Tooth Decay*. Italy: Microbiology in Arezzo. Univ. Of Oklahoma.

Zhang, P. *et al.* (2002) 'Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection', *Infection and immunity*, 70(12), pp. 6779–6787.

Lampiran 1: Hasil Determinasi

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 068/PL17.8/PG/2022

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 1002/FIKES.UDS/U/IV/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Dianty Bella Agustin
NIM : 18040027
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 18 April 2022
Ka. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu

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

Lampiran 2: Hasil *Mc Farland***Photometry Test Report**

File Name: Bella S mutans.bas	Test Time:
Software Version: UV V1.92.0	
Operator: Lab Kimia Farmasi	Company:

Test Record List.

No.	WL(nm)	Abs	Trans(%T)	Test Time	Sample Name
1	625,0	0,107	78,2	05/08/2022 14:56:00	blanko MC Farland
2	625,0	0,104	78,7	05/08/2022 15:05:31	Susp S mutans

Lampiran 3: Hasil Uji Statistik

Uji Normality

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekstrak kinetika konsentrasi 40%		4			4	
Ekstrak kinetika konsentrasi 60%	0,184	4		0,975	4	0,872
Ekstrak sonikasi konsentrasi 40%	0,236	4		0,965	4	0,810
Ekstrak sonikasi konsentrasi 60%	0,245	4		0,959	4	0,773
kontrol positif	0,285	4		0,922	4	0,549
kontrol negatif		4			4	

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogeneity

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil Uji	Based on Mean	3,308	5	18	0,027
	Based on Median	2,248	5	18	0,094
	Based on Median and with adjusted df	2,248	5	4,980	0,198
	Based on trimmed mean	3,061	5	18	0,036

Uji Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

	Hasil Uji
Kruskal-Wallis H	0,194
df	5
Asymp. Sig.	0,004

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: kode sampel

Uji Pos Hoc

Hasil Uji

Duncan^{a,b}

Kode Sampel	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Ekstrak kinetika konsentrasi 40%	4	0,0000			
Kontrol negatif	4	0,0000			
Ekstrak sonikasi konsentrasi 40%	4	1,9250			
Ekstrak kinetika konsentrasi 60%	4		6,0625		
Ekstrak sonikasi konsentrasi 60%	4			8,4400	
Kontrol positif	4				13,6925
Sig.		0,115	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.769.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

b. Alpha = 0,05.

Lampiran 4: Dokumentasi

a. Metode maserasi kinetik



K1



K2



K3



K4





b. Skrining fitokimia maserasi kinetik

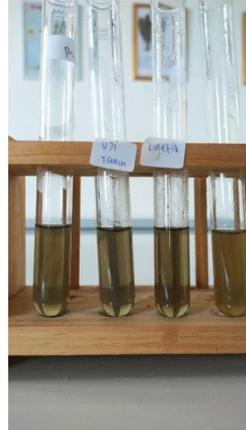
Alkaloid



Flavonoid



Tanin

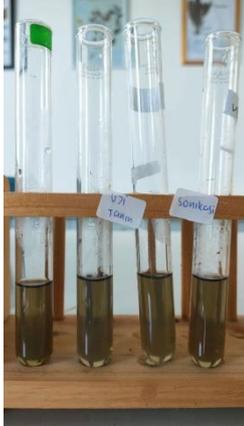


c. Metode sonikasi



d. Skrining fitokimia sonikasi

Tanin



Flavonoid



Polifenol

e. Peremajaan bakteri *Streptococcus mutans*



f. Pembuatan DMSO 10%



g. Pembuatan MC Farland



h. Uji antibakteri





Lampiran 5: Perhitungan

1. Perhitungan hasil ekstraksi

a. Maserasi kinetik

$$\begin{aligned} 1) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{5,14 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 10,8\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{5,28 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 10,6\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{5,31 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 10,6\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 4) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{4,95 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 9,9\% \end{aligned}$$

b. Sonikasi

$$\begin{aligned} 1) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{5,45 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 10,9\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{5,35 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 10,8\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3) \text{ \% Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{5,39 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 10,7\% \end{aligned}$$

$$4) \text{ \% Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

$$= \frac{5,94 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% = 11,9\%$$

2. Perhitungan MC Farland

BaCl₂ 1% : 0,05 ml

H₂SO₄ 1% : 9,95 ml

3. Perhitungan DMSO 10%

DMSO 10% dalam 100% sebanyak 100 ml

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 10\% \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{1000}{100}$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

Untuk pembuatan larutan DMSO 10% dengan mengambil 10 ml DMSO 100%

Dilartukan dalam akuadest pada labu ukur 100 ml.

4. Perhitungan konsentrasi ekstrak

$$\begin{aligned} \text{a. Konsentrasi 40\%} &= \frac{40}{100} \times 10 \text{ ml} \\ &= 4 \text{ gram ad 10 ml DMSO 10\%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Konsentrasi 60\%} &= \frac{60}{100} \times 10 \text{ ml} \\ &= 6 \text{ gram ad 10 ml DMSO 10\%} \end{aligned}$$

5. Perhitungan media

a. Media *Nutrient agar* : 20 gram ~ 1000 ml akuadest
 X gram ~ 50 ml akuadest
 1 gram dalam 50 ml akuadest

b. Media *Muller Hilton Agar* : 34 gram ~ 1000 ml akuadest

X gram ~ 250 ml akuadest

8,5 gram dalam 250 ml akuadest

6. Pengulangan sampel uji dihitung menggunakan rumus Federer:

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

Keterangan:

N : Jumlah pengulangan t : Jumlah perlakuan

Pada penelitian ini digunakan 2 konsentrasi ekstrak dengan metode maserasi kinetik dan sonikasi, serta 2 perlakuan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif maka didapatkan pengulangan:

$$(n-1) \times (t-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (6-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (5) \geq 15$$

$$(5n-5) \geq 15$$

$$(5n) \geq 20$$

$$n \geq 4$$

dari hasil perhitungan di atas, maka pengulangan yang dilakukan sebanyak 4 kali.