

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KAKAO
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP *Streptococcus mutans***

SKRIPSI



**Oleh:
Beta Putri Ananda
NIM 18040019**

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

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KAKAO
(*Theobroma cacao* L) TERHADAP *Streptococcus mutans***

SKRIPSI

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



Oleh:
Beta Putri Ananda
NIM 18040019

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

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi ini telah diperiksa oleh pembimbing dan telah disetujui untuk mengikuti seminar hasil pada Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan

Universitas dr. Soebandi

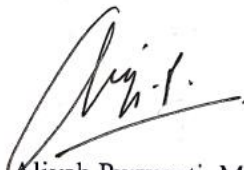
Jember, 31 Agustus 2022

Pembimbing I



Dr. apt. Nuri, M.Si
NIDI. 0012046905

Pembimbing II



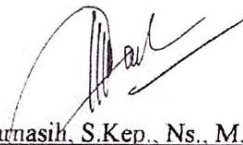
Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN. 0709129002

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul "*Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Streptococcus mutans**" telah diuji dan disahkan oleh Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

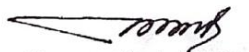
Hari : Jum'at
Tanggal : 16 September 2022
Tempat : Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi

Tim Penguji
Ketua,



I Gusti Ayu Karnasih, S.Kep., Ns., M.Kep. Sp.Mat
NIDN. 4005116802

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,



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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Beta Putri Ananda

NIM : 18040019

Program Studi : S1 Farmasi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul "*Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L) terhadap Streptococcus mutans*" benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Selain itu, sumber yang dikutip penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa adanya paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi jika dikemudian hari terdapat penyimpangan dan tidak benaran dalam pernyataan ini.

Jember, 16 September 2022
Yang membuat pernyataan,



Beta Putri Ananda
NIM : 18040019

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERHADAP *Streptococcus mutans*

Oleh:
Beta Putri Ananda
NIM 18040019

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

HALAMAN PERSEMBAHAN

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

1. Orang tua penulis, yaitu alm. Bapak Erfandi dan Ibu Nur Hasanah beserta keluarga besar yang telah memberikan suport, do'a dan kasih sayang serta perjuangannya untuk menuntun saya hingga titik ini serta memberikan semangat untuk saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dalam Pendidikan S1 Farmasi.
2. Bapak Dr. apt. Nuri, M.Si selaku dosen pembimbing I dan Ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, saran dan kesabaran dalam memberikan bimbingan dan arahnya dalam proses penyusunan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
3. Ibu I Gusti Ayu Karnasih, M.Kep., Sp. Mat selaku penguji yang telah memberikan waktu dan sarannya dalam skripsi ini
4. Seluruh pihak lembaga Universitas dr. Soebandi yang telah memberikan fasilitas selama berjalannya penelitian sampai selesai
5. Kepada teman-teman farmasi angkatan 2018 A-B yang saling memberikan dukungan dan semangat. Terutama kepada Dianty Bella Agustin, Agustin Nourma Diana, Aprilia Permata Sanny dan Maharani Fauziah yang saling memberikan masukan dan menjadi tim yang saling tolong menolong dalam keluh kesah selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini berlangsung.
6. Kepada teman-teman kos yang selalu memberi keceriaan dan kebahagiaan disaat keluh kesah yang telah dialami selama penyusunan skripsi ini.
7. Kepada pihak yang tidak saya sebutkan satu persatu, terimakasih atas semua dukungan dan doanya baik secara langsung maupun tidak langsung.

MOTTO

**“Great things are not done by impulse,
but by a series of small things brought together”**

“Hal hebat tidak dilakukan tiba-tiba,
tetapi dilakukan dengan serangkaian hal-hal kecil”

ABSTRAK

Ananda, Beta Putri*. Nuri**. Purwanti, Aliyah***. 2022. **Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kakao Terhadap *Streptococcus mutans***. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang: Indonesia merupakan negara tropis dengan keanekaragaman flora yang berperan dalam bidang kesehatan, salah satunya yaitu tanaman kakao. Potensi pada tanaman kakao yang bisa dimanfaatkan adalah kandungan pada biji kakao yaitu senyawa polifenol dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Streptococcus mutans*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) terhadap *Streptococcus mutans*.

Metode: Desain penelitian ini menggunakan *true experimental*. Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstrak biji kakao menggunakan pelarut NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) dengan metode ekstraksi UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*). Ekstrak yang dihasilkan diskriminasi fitokimia dan diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan metode difusi cakram.

Hasil penelitian : Ekstrak biji kakao mengandung senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan polifenol. Hasil uji aktivitas antibakteri ditunjukkan dari zona bening di sekeliling kertas cakram dari ekstrak biji kakao yang memiliki nilai rata-rata zona hambat sebesar 7,39 mm dan 23,89 mm untuk kontrol positif. Kedua kelompok data memiliki perbedaan yang signifikan yaitu dari nilai 2-tailed uji *Independent Sampel T-test* sebesar 0,000.

Kesimpulan : Aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* diketahui ekstrak NADES biji kakao memiliki aktivitas antibakteri kategori sedang dan pembanding *chlorhexidine* memiliki aktivitas antibakteri kategori kuat.

Kata kunci: NADES, biji kakao, antibakteri, *Streptococcus mutans*

* Peneliti

** Pembimbing 1

*** Pembimbing 2

ABSTRACT

Ananda, Beta Putri*. Nuri**. Purwanti, Aliyah***. 2022. **Antibacterial Activity Test of Cocoa Bean Extract Against *Streptococcus mutans***. Essay. Pharmacy Undergraduate Study Program, University of dr. Soebandi.

Background : Indonesia is a tropical country with flora diversity that plays a role in health sector, one of those is cocoa plant. Cocoa plant potential that can be utilized is the content of cocoa beans, namely polyphenol compounds in inhibiting the growth of pathogenic bacteria such as *Streptococcus mutans*. The purpose of this study is to determine the antibacterial activity of NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) extract cocoa beans (*Theobroma cacao L*) against *Streptococcus mutans*.

Method : This research design uses an experimental laboratory. The research began with the manufacture of cocoa bean extract using NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) with UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) extraction methods. The resulting extract was screened for phytochemicals and antibacterial activity against *Streptococcus mutans* bacteria by disc diffusion method.

Result : Cocoa bean extract is known to contain chemical compounds in the form of alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and polyphenols. The results of the antibacterial activity test were found to have an average inhibition zone value of 7.39 ± 1.39 mm for cocoa bean extract and 23.89 ± 1.41 mm for positive control. The two data groups have a significant difference from the value 2-tailed of *Independent Sample T-test* that is 0.000.

Conclusion : Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* is known that cocoa bean NADES extract has moderate antibacterial activity and chlorhexidine as a comparison has strong antibacterial activity.

Key words : NADES, cocoa bean, antibacterial, *Streptococcus mutans*

* Author
** Advisor 1
*** Advisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Studi Farmasi Program Sarjana Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Terhadap *Streptococcus mutans*”.

Selama proses penyusunan skripsi ini dapat terlaksana dengan baik berkat bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih 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 dan Penguji II
5. Ibu Aliyah Purwanti, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota dan Penguji III
6. Ibu I Gusti Ayu Karnasih, M.Kep., Sp. Mat. selaku Ketua Penguji

Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka penulis sangat mengharapkan kritik serta saran untuk perbaikan di masa depan.

Jember, 16 September 2022

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
MOTTO	vii
ABSTRAK	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Bagi Peneliti	6
1.4.2 Bagi Masyarakat	7
1.4.3 Bagi Institusi	7
1.5 Keaslian Penelitian	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	9

2.1.1 Morfologi Tanaman.....	9
2.1.2 Klasifikasi Tanaman.....	10
2.1.3 Kandungan Kimia.....	10
2.1.4 Manfaat.....	11
2.2 Ekstraksi	12
2.3 Pelarut.....	17
2.3.1 <i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> (NADES).....	18
2.3.2 <i>Choline Chloride</i> (ChCl)	20
2.3.3 Asam Laktat	20
2.4 Bakteri	21
2.4.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri	21
2.5 <i>Streptococcus mutans</i>	23
2.5.1 Klasifikasi <i>Streptococcus mutans</i>	24
2.5.2 Morfologi <i>Streptococcus mutans</i>	24
2.5.3 Penyakit yang Ditimbulkan oleh <i>Streptococcus mutans</i>	26
2.6 Antibakteri	27
2.6.1 Metode Aktivitas Antibakteri	28
BAB 3. KERANGKA KONSEP.....	31
3.1 Kerangka Konsep	31
3.2 Hipotesis Penelitian	32
BAB 4. METODE PENELITIAN.....	33
4.1 Desain Penelitian	33
4.2 Populasi dan Sampel.....	33
4.2.1 Populasi Penelitian	33
4.2.2 Sampel Penelitian	33

4.3	Variabel Penelitian	34
4.3.1	Variabel Bebas	34
4.3.2	Variabel Terikat.....	34
4.4	Tempat Penelitian	34
4.5	Waktu Penelitian	34
4.6	Definisi Operasional	35
4.7	Teknik Pengumpulan Data	36
4.7.1	Determinasi Tanaman.....	36
4.7.2	Pembuatan Serbuk Simplisia Biji Kakao	36
4.7.3	Pembuatan Ekstrak Biji Kakao.....	36
4.7.4	Skrining Fitokimia.....	37
4.7.5	Pembuatan Media	38
4.7.6	Pembiakan Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	39
4.7.7	Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	39
4.7.8	Pembuatan Kontrol Negatif dan Kontrol Positif	40
4.7.9	Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Cakram.....	40
4.8	Teknik Analisa Data	41
4.8.1	Pengumpulan Data	41
4.8.2	Analisa Data	41
BAB 5.	HASIL PENELITIAN	42
5.1	Identifikasi Tanaman Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	42
5.2	Ekstraksi Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	42
5.3	Uji Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Biji Kakao	42
5.4	Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L) ..	43
BAB 6.	PEMBAHASAN	46

6.1 Ekstraksi Biji Kakao dengan Metode UAE	46
6.2 Kandungan Senyawa Ekstrak NADES Biji Kakao	46
6.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak NADES Biji Kakao	49
BAB 7. PENUTUP	54
7.1 Kesimpulan.....	54
7.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	7
Tabel 2.1 Daftar Pembuatan NADES	19
Tabel 2.2 Klasifikasi Kategori Zona Hambat Antibakteri	27
Tabel 4.1 Definisi Operasional	35
Tabel 5.1 Hasil Uji Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Biji Kakao.....	43
Tabel 5.2 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri.	44
Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas	45
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Independent T-test</i>	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Biji Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	10
Gambar 2.2 <i>Streptococcus mutans</i> di Bawah Mikroskop	25
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Aktivitas Antibakteri Biji Kakao.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Hasil Determinasi	62
Lampiran 2 : Hasil Uji Kekeruhan <i>Mc. Farland</i>	63
Lampiran 3 : Dokumentasi Penelitian.....	64
Lampiran 4 : Perhitungan.....	67
Lampiran 5 : Output Data Uji Statistik (<i>Independent T-test</i>).....	69
Lampiran 6 : Halaman Riwayat Hidup	72

DAFTAR SINGKATAN

NADES	: <i>Natural Deep Eutectic Solvents</i>
DES	: <i>Deep Eutectic Solvents</i>
UAE	: <i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>
MAE	: <i>Microwave Assisted Extraction</i>
MHA	: <i>Mueller Hinton Agar</i>
NA	: <i>Nutrient Agar</i>
Ditjen POM	: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan
ATP	: <i>Adenosine Three Phosphate</i>
ILS	: <i>Ionic Liquids</i>
EPS	: <i>Extracellular Polysaccharide</i>
IPS	: <i>Intracellular Polysaccharide</i>
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimum
KBM	: Konsentrasi Bunuh Minimum
ChCl	: <i>Choline Chloride</i>
FeCl ₃	: Besi (III) Klorida
BaCl	: Barium Klorida
HCl	: Hidrogen Klorida
H ₂ SO ₄	: Asam Sulfat

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan seribu pulau yang mempunyai keanekaragaman ekosistem yang sangat luar biasa dan memiliki keanekaragaman hayati karena merupakan gabungan dari benua Asia dan Australia. Potensi luar biasa dari Indonesia ini membutuhkan pemberdayaan yang lebih intensif untuk melakukan penelitian di bidang tanaman obat sebagai pengobatan alternatif di bidang kesehatan. Indonesia juga merupakan negara tropis yang memiliki beraneka ragam tanaman mulai dari hasil hutan, pertanian dan perkebunan. Secara empiris, tanaman-tanaman tersebut telah terbukti memiliki khasiat untuk pengobatan, baik untuk penyakit *degenerative* maupun untuk pengobatan penyakit infeksi (Sepriyani, 2020).

Salah satu tanaman yang memiliki banyak potensi yang menguntungkan, baik untuk teknologi pangan maupun untuk dikembangkan sebagai obat tradisional adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L). *Theobroma cacao* atau yang lebih dikenal dengan tanaman kakao terdiri atas akar, batang, daun, bunga, dan buah. Buah kakao terdiri atas tiga komponen terbesar utama yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Salah satu potensi pada tanaman kakao yang bisa dimanfaatkan dalam bidang kesehatan adalah pada biji (Sepriyani, 2020).

Bagian biji kakao 80% banyak dimanfaatkan oleh masyarakat pada produk olahan seperti coklat dan minuman coklat. Namun, akhir-akhir ini biji kakao sering difungsikan dalam bidang kesehatan. Salah satu senyawa yang bisa dihasilkan dari pengolahan biji kakao adalah polifenol. Polifenol dapat

dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam pangan atau untuk mencegah dan menghambat pertumbuhannya (Wulandari *et al.*, 2012).

Senyawa polifenol dalam biji kakao terdiri dari flavonoid, katekin, prosianidin, antosianin, dan tanin kompleks. Berdasarkan beberapa hasil penelitian didapatkan bahwa polifenol biji kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan bakteri kariogenik seperti *Streptococcus mutans*. (Diyantika *et al.*, 2017).

Streptococcus mutans adalah bakteri utama penyebab karies gigi. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri kariogenik yang mampu memetabolisme karbohidrat dan mampu membuat suasana asam di dalam mulut (Supari *et al.*, 2016). *Streptococcus mutans* mampu untuk mensistesis polisakarida ekstraseluler dari sukrosa, mengalami agregasi sel ke sel ketika bercampur dengan sukrosa atau dekstran. Bakteri ini bersifat asidogenik yaitu menghasilkan asam dan bersifat asidurik yaitu mampu hidup pada lingkungan asam (Azzahra dan Hayati, 2019). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, bakteri *Streptococcus mutans* dapat dihambat oleh salah satu senyawa kimia pada biji kakao yaitu polifenol yang berpotensi sebagai antibakteri.

Ekstraksi merupakan cara pemisahan komponen bioaktif dari larutannya dengan menggunakan pelarut tertentu. Komponen bioaktif yang terkandung dalam suatu bahan dapat diperoleh dengan metode ekstraksi (Sekarsari *et al.*, 2019). Pemilihan metode ekstraksi yang tepat sangat mempengaruhi kualitas dan kuantitas kandungan senyawa kimia yang diekstraksi dalam simplisia sehingga

dapat meningkatkan kandungan senyawa kimia yang berpotensi sebagai zat antibakteri (Mandala Sari *et al.*, 2020).

Pada saat ini, mulai banyak penelitian yang mencoba mengembangkan penggunaan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) sebagai pelarut alternatif dalam ekstraksi. NADES (*Natural Deep Eutectic Solvent*) adalah sebagai salah satu kandidat *green solvent* (pelarut hijau) yang dipilih sebagai pelarut alternatif dalam ekstraksi senyawa-senyawa bioaktif. *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) merupakan bagian dari DES yang ramah lingkungan dan dibuat dari senyawa-senyawa metabolit primer yang alami dan aman seperti asam-asam amino, monosakarida, disakarida, polisakarida, asam asetat, asam laktat, kolin klorida dan senyawa-senyawa lain dengan perbandingan mol rasio tertentu. Menurut Dewi *et al* (2021) pelarut NADES cenderung mempunyai sifat polar daripada non polar.

Pelarut eutektik alami atau NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) telah diklasifikasikan sebagai jenis cairan ketiga, berbeda dari air dan lipid yang ada di semua sel hidup (Choi *et al.*, 2011). Campuran eutektik dapat didefinisikan sebagai campuran dari dua komponen yang biasanya tidak berinteraksi pada perbandingan mol tertentu. Pelarut ekstraksi yang disintesis dari kolin klorida-asam laktat menunjukkan kapasitas dan efisiensi yang baik dalam mengekstraksi senyawa kimia tumbuhan (Ozturk, *et al.*, 2018). Terdapat hasil skrining fitokimia ekstrak kolin klorida-asam laktat memberikan hasil yang positif untuk senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin tetapi tidak mengandung senyawa steroid/titerpenoid (Anhar, 2021).

Kelebihan dari penggunaan NADES memberikan keuntungan dalam segi biaya yang lebih murah, termasuk pelarut ramah lingkungan serta aman apabila dikonsumsi (Lilyawati *et al.*, 2019). Dari perspektif lingkungan dan ekonomi, NADES juga memberikan keuntungan besar mengenai tingkat degradabilitas, keberlanjutan, biaya rendah dan persiapan yang sederhana. Dari semua sifat tersebut menunjukkan bahwa NADES sebagai pelarut ekstraksi untuk produk alami dan aplikasi potensial di bidang kesehatan seperti makanan, kosmetik dan kefarmasian (Dai *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian telah melaporkan tentang penggunaan NADES sebagai pelarut alternatif seperti ekstraksi kafein dan polifenol dari biji kopi (Ahmad *et al.*, 2020), ekstraksi kandungan asam klorogenat dan kafein dari biji kopi hijau robusta, ekstraksi getah pepaya untuk produksi Bio-insektisida dan lain-lain. Namun sejauh ini masih belum ada yang melaporkan tentang penggunaan pelarut NADES pada proses ekstraksi biji kakao.

Hasil penelitian yang sudah dilakukan oleh Pohan *et al* (2020) melaporkan bahwa pengujian efektivitas antibakteri dari ekstrak biji kakao terhadap *Streptococcus pyogenes* dilakukan proses ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol proanalisis. Pengujian efektivitas antibakteri dilakukan dengan uji difusi cakram. Dari hasil penelitian tersebut terlihat bahwa ekstrak biji kakao dapat menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan zona hambat tertinggi yaitu 12,65 mm pada konsentrasi 100%.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Hafidhah *et al* (2017) melaporkan bahwa penelitian yang sudah dilakukan yaitu pengaruh ekstrak biji kakao terhadap

pertumbuhan *Enterococcus faecalis* menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi kinetik selama 1 jam. Dari setiap perlakuan menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao dapat menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.

Berdasarkan latar belakang dan beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak biji kakao, sejauh ini banyak penelitian ekstrak biji kakao menggunakan pelarut etanol dengan metode ekstraksi panas dan dingin, sedangkan penggunaan NADES sebagai pelarut alternatif dengan metode ekstraksi non konvensional yaitu UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder dari biji kakao (*Theobroma cacao* L) masih belum pernah dilaporkan. Maka dari uraian di atas mendorong peneliti untuk tertarik melakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan ekstraksi biji kakao menggunakan pelarut NADES dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap kandungan senyawa kimia ekstrak biji kakao pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*)?
2. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap *Streptococcus mutans*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui kandungan senyawa kimia dan aktivitas antibakteri ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap *Streptococcus mutans*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*).
2. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap daya hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Dapat menambah ilmu pengetahuan, wawasan, dan pengalaman tentang metode ekstraksi yang efektif terhadap aktivitas antibakteri ekstrak biji kakao menggunakan pelarut NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Penelitian ini dapat memberikan informasi baru tentang manfaat ekstrak biji kakao serta kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol biji kakao.

1.4.3 Bagi Institusi

Dari hasil penelitian yang didapat diharapkan bisa dijadikan sebagai tambahan pengetahuan bagi mahasiswa yang ingin melakukan penelitian lebih lanjut.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Nama Penulis	Tahun Terbit	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Dame J Pohan; Angela P Kakerissa; Evy S Arodes	2020	Uji Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L) Sebagai Antibakteri Dalam Berbagai Konsentrasi Pada <i>Streptococcus Pyogenes</i>	Hasil penelitian menunjukkan ekstrak biji kakao yang diekstrak menggunakan pelarut etanol proanalisis dengan metode maserasi efektif memberikan efek antibakteri terhadap bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> mulai dari konsentrasi terkecil 20% dengan rata-rata diameter zona hambat 8.07 mm sampai konsentrasi terbesar 100% dengan rata-rata diameter zona hambat 10,98 mm.
Nur Hafidhah; Rachmi	2017	Pengaruh Ekstrak Biji Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L) Terhadap	Uji pengaruh ekstrak biji kakao (<i>Theobroma cacao</i> L) terhadap pertumbuhan koloni <i>E. faecalis</i> dengan

Fanani Hakim		Pertumbuhan <i>Enterococcus faecalis</i> Pada Berbagai Konsentrasi	menggunakan ekstraksi maserasi kinetik menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao dapat menghambat pertumbuhan <i>E. faecalis</i> berbagai konsentrasi.
Atikah; Hendrik Setia Budi; Tuti Kusuma	2017	<i>Antibacterial Effect of 70% Ethanol and Water Extract of Cacao Beans (Theobroma cacao L) on Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Hasil penelitian yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70% terdapat perbedaan nyata koloni yang ditumbuhkan pada konsentrasi 6,25% dan 3,125% antara ekstrak etanol 70% biji kakao dan ekstrak air biji kakao memiliki aktivitas antibakteri.
Kusuma, Suwasono and Yuwanti,	2013	Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber Antioksidan dan Antibakteri	Hasil penelitian yang dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 70% menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak polifenol dan semakin kecil ukuran saringan bubuk biji kakao, menghasilkan luasan diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri yang semakin besar.

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya adalah penggunaan pelarut ekstraksi yaitu NADES (*Natural Deep Eutectic Solvent*) kolin klorida dan asam laktat dengan metode ekstraksi UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) dan penggunaan bakteri yaitu menggunakan bakteri *Streptococcus mutans*, sedangkan untuk persamaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yaitu menggunakan ekstrak biji kakao sebagai antibakteri.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)

2.1.1 Morfologi Tanaman

Tanaman kakao termasuk ke dalam keluarga *Sterculiaceae* generasi *Theobroma* (*theo* berarti dewa, *borsi* berarti makanan). Tanaman kakao berupa pohon kecil yang bercabang-cabang rendah, tinggi pohon sekitar 3-8 m, berkayu dan mempunyai akar tunggang. Tanaman kakao memiliki percabangan yang bersifat dimorphous (2 tipe percabangan) yaitu cabang yang tumbuh vertikal (*orthotrop*) dan cabang horizontal (*plagiotroph*) yang tumbuh dari cabang kipas. Percabangan dan kedudukan daun tanaman kakao bersifat *dimorphous*. Daun pertama mempunyai tangkai daun (*petiol*) yang panjang, simetris dan ujungnya membengkok. Bunga dapat muncul dari batang dan cabang yang sudah cukup tua (Haryadi, 2017).

Buah kakao merupakan buah buni yang daging bijinya sangat lunak. Buah kakao yang sudah masak panjangnya sekitar 15-20 cm dan berdiameter 8-9 cm. Jumlah biji setiap buah berkisar antara 30-40 buah. Masing-masing biji memiliki lapisan berlendir atau pulp. Biji pada tanaman kakao menempel pada dinding buah yang masih muda. Setelah buah masak, lapis tipis daging buah melepaskan diri dari dinding sehingga biji tersebut mengumpul di tengah, terikat oleh plasenta. Ketika kakao dipotong melintang biji tersusun oleh dua kotiledon yang saling meliputi dan bagian pangkalnya menempel pada poros lembaga (*embryo axis*) (Marru dan Sipayung, 2015).



Gambar 2.1 Biji Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.)
Sumber : Umar, 2019

2.1.2 Klasifikasi Tanaman

Klasifikasi tanaman kakao berdasarkan ilmu taksonomi (Sudibyo, 2012) sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Super divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: Theobroma
Species	: <i>Theobroma cacao</i> L

2.1.3 Kandungan Kimia

Pada biji kakao mengandung banyak senyawa kimia seperti glukosa, fruktosa, sukrosa, tanin, lemak dan protein. Metabolit sekunder yang ada di dalam tanaman kakao adalah steroid, terpenoid, fenolik, kumarin, alkaloid dan flavonoid. Biji kakao memiliki kandungan protein 9% yang kaya akan asam amino triptofan, fenilalanin, dan tirosin. Kandungan lemak biji kakao 31% terdiri dari tujuh macam asam lemak, asam palmitat 24,8%, asam stearat 33%, asam olet 3,2%, asam

arakhidonat 0,8%, asam palmitoleat 0,3%, dan asam miristat 0,2% (Yumas, 2017).

Kandungan senyawa polifenol pada biji kakao didominasi oleh katekin dan epillogalokatekin. Biji kakao mengandung senyawa polifenol sebanyak 120-180 g/kg (dalam bubuk bebas lemak). Senyawa polifenol ini dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri untuk membunuh mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam pangan atau untuk mencegah dan menghambat pertumbuhannya (Habiburrahman *et al.*, 2016).

Theobromin di dalam biji kakao ditemukan oleh Woskresensky pada tahun 1842 dan strukturnya yang dibuat oleh Emil Fischer pada akhir abad ke 19. Biji kakao segar yang tidak difermentasi mengandung teobromin antara 14-38 kilogram dan kafein 1-8 gram untuk setiap kilogram berat kering biji kakao (Sepriyani, 2020).

2.1.4 Manfaat

Mutu biji kakao dalam perdagangan internasional sangat penting sehingga dibuat suatu standar yang dikeluarkan oleh Badan Standardisasi Nasional yang tercantum dalam persyaratan umum dan khusus pada SNI 2323:2008 tentang biji kakao (Flora, 2018).

Potensi dalam pemanfaatan produk olahan biji kakao serta pengaruhnya terhadap kesehatan telah dilakukan oleh masyarakat di Amerika Tengah dan Eropa sejak tahun 1600-1700an. Pada tahun 1850-1900an perkembangan produk olahan biji kakao yang mempunyai manfaat kesehatan diterima secara luas. Dalam kurun waktu 30-40 tahun, setelah banyak diteliti dan ditemukan adanya beberapa

zat yang bermanfaat pada produk olahan biji kakao masyarakat meyakini bahwa biji kakao mempunyai peran penting dalam menjaga kesehatan. Salah satu zat yang bermanfaat pada olahan biji kakao tersebut adalah flavonoid yang termasuk dalam sub-kelompok senyawa polifenol (Sepriyani, 2020).

Dalam beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa biji kakao yang diolah menjadi produk olahan biji kakao seperti minuman coklat merupakan sumber kaya antioksidan dalam bentuk senyawa katekin, epikatekin, procianidin dan polifenol. Selain sebagai antioksidan, produk olahan biji kakao juga dapat dimanfaatkan untuk kesehatan lainnya seperti menurunkan tekanan darah dan memperkuat aliran darah, anti kanker, mengurangi penyakit diabetes, menjaga sistem kekebalan tubuh, memperbaiki kinerja kemampuan kognitif dan antimikroba untuk mencegah terjadinya karies (Sudibyo, 2012).

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi atau penyairan merupakan proses pemisahan senyawa kimia dari simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai, metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat fisik dan sifat kimia kandungan senyawa yang akan diekstraksi (Marjoni, 2016). Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan ekstraksi sebagai berikut:

a. Jumlah Simplisia yang Diekstrak

Jumlah simplisia yang akan diekstrak sangat erat kaitannya dengan jumlah pelarut yang akan digunakan, maka jumlah pelarut yang akan digunakan juga semakin banyak (Marjoni, 2016).

b. Derajat Kehalusan Simplisia

Semakin halus simplisia maka luas kontak permukaan dengan pelarut juga akan semakin besar sehingga proses ekstraksi akan dapat berjalan lebih optimal (Marjoni, 2016).

c. Jenis Pelarut dalam Ekstraksi

Pemilihan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sangat dipengaruhi oleh kepolaran dari pelarut itu sendiri. Senyawa dengan kepolaran yang sama akan lebih mudah larut dalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama pula (*like dissolves like*) (Marjoni, 2016).

d. Waktu Ekstraksi

Waktu yang digunakan selama proses ekstraksi sangat menentukan kondisi kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam bahan dengan konsentrasi senyawa pada pelarut (Yulianingtyas, 2015).

e. Kondisi Proses Ekstraksi

Beberapa proses ekstraksi memerlukan keadaan kondisi tertentu. Misalnya, proses ekstraksi skala industri dilakukan secara kontiniu, sedangkan pada skala laboratorium ekstraksi dapat dilakukan baik dengan pengadukan ataupun tanpa pengadukan (Marjoni, 2016).

f. Metode Ekstraksi

Pemilihan metode ekstraksi sangat tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu (Stephenson, 2018).

Menurut Ditjen POM (2000) terdapat beberapa jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut:

a. Ekstraksi Dingin

Ekstraksi dengan cara dingin dapat dilakukan dengan beberapa metode sebagai berikut:

1. Maserasi

Maserasi merupakan proses penyarian simplisia dengan cara perendaman menggunakan pelarut dengan sesekali pengadukan pada temperatur ruangan. Maserasi yang dilakukan pengadukan secara terus menerus disebut maserasi kinetik sedangkan yang dilakukan penambahan ulang pelarut setelah dilakukan penyaringan terhadap maserat pertama dan seterusnya disebut remaserasi. Terdapat beberapa modifikasi metode ekstraksi maserasi yaitu remaserasi, maserasi dengan mesin pengaduk, maserasi melingkar, maserasi melingkar bertingkat, ekstraksi turbo dan *Ultrasound assisted solvent extraction*.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses perkolasi terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak). Pelarut pada perkolasi dialirkan secara vertikal dari atas ke bawah melalui serbuk simplisia dan akan melarutkan zat aktif dalam sel simplisia yang dilalui sampai keadaan jenuh.

b. Ekstraksi Panas

Ekstraksi secara panas dapat dilakukan dengan beberapa metode berikut:

1. Sokhletasi

Sokhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2. Infusa

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit).

3. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama 3 sampai 5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

4. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40 - 50°C.

5. Dekok

Proses penyariannya hampir sama dengan infusa, hanya berbeda pada lamanya waktu pemanasan yaitu 30 menit dihitung setelah suhu mencapai 90°C.

c. Ekstraksi Non-Konvensional

Selain metode ekstraksi panas dan dingin, terdapat ekstraksi Non-Konvensional sebagai berikut:

1. *Ultrasonic Assisted Extraction (UAE)*

Ultrasonik merupakan metode ekstraksi non termal yang dapat meningkatkan laju transfer massa dan memecahkan dinding sel dengan *microcavity* sehingga mempersingkat waktu proses ekstraksi dan mengoptimalkan penggunaan pelarut. Peningkatan kecepatan kontak antara ekstrak dan solven mengakibatkan peningkatan penetrasi cairan menuju dinding sel dan melepas komponen sel. Kelebihan lain dari metode UAE yaitu dapat mengeluarkan ekstrak dari matriks tanpa merusak struktur ekstrak. Penggunaan pada temperatur rendah dapat mengurangi panas dan mencegah penguapan senyawa yang memiliki titik didih rendah (Handaratri dan Yuniati, 2019).

Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) juga disebut ekstraksi ultrasonik atau sonikasi dengan menggunakan energi gelombang ultrasonik dalam ekstraksi. Ultrasonografi dalam pelarut yang menghasilkan kavitasi dapat mempercepat pelarutan dan difusi zat terlarut serta perpindahan panas sehingga meningkatkan efisiensi ekstraksi. Keuntungan lain dari UAE termasuk konsumsi pelarut dan energi yang rendah, serta pengurangan suhu dan waktu ekstraksi. UAE digunakan untuk ekstraksi senyawa termolabil dan tidak stabil. UAE biasanya juga digunakan dalam ekstraksi berbagai jenis produk alami (Lilyawati *et al.*, 2019).

Pada penelitian Sjahid *et al* (2020) melaporkan bahwa metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) merupakan metode ekstraksi dengan memberikan getaran ultrasonik > 20 kHz pada permukaan simplisia. Simplisia akan mengalami kondisi fragmentasi dan erosi yang terjadi karena pecahnya partikel simplisia menjadi ukuran yang lebih kecil sehingga luas permukaan partikel yang

diekstraksi menjadi lebih besar. Hal ini mengakibatkan adanya peningkatan transfer massa dari simplisia ke pelarut dan pada akhirnya akan meningkatkan laju ekstraksi dan jumlah rendemen.

2. *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Microwave Assited Extraction (MAE) merupakan gelombang mikro menghasilkan panas dengan berinteraksi dengan senyawa polar seperti air dan beberapa komponen organik dalam matriks tumbuhan mengikuti konduksi ionik dan mekanisme rotasi dipol. Metode ini menggunakan energi dari radiasi *microwave* untuk memanaskan pelarut dengan cepat dan efisien. Teknologi ekstraksinya menggunakan aplikasi termal berdasarkan efisiensi produksi panas (pemanasan selektif). Aplikasinya terdiri dari ekstraksi senyawa bernilai tinggi dari sumber alami, nutraseutikal, bahan pangan fungsional dan bahan aktif dari biomassa. Pada prosesnya terjadi absorpsi gelombang *microwave* oleh bagian tanaman yang menyebabkan pembengkakan dan pelepasan komponen-komponennya pada fase likuid. Faktor yang perlu diperhatikan dalam menggunakan MAE yaitu pemilihan jenis pelarut, pengaruh kontak luas area sampel dan efek temperatur terhadap senyawa yang diekstrak (Handaratri dan Yuniati, 2019).

2.3 Pelarut

Dalam pemilihan jenis pelarut beberapa hal harus dipertimbangkan diantaranya adalah selektivitas, kemampuan pelarut dalam mengekstrak, toksisitas serta kemampuan pelarut dalam penguapan dan harga pelarut (Harborne, 1987).

Pada umumnya pelarut merupakan zat yang berada pada larutan dalam jumlah besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut. Pelarut yang akan digunakan pada proses ekstraksi harus merupakan pelarut terbaik sebagai zat aktif yang terdapat pada sampel atau simplisia, sehingga zat aktif dapat dipisahkan dari simplisia dan senyawa lainnya (Marjoni, 2016).

2.3.1 *Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)*

Deep Eutectic Solvents (DES) merupakan pelarut baru seperti *Ionic liquids* (ILS). NADES melampaui fenomena fisikokimia semata yang didasarkan pada fungsi biologis hipotetis NADES di alam. Dalam hal aplikasi, NADES mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan ILS seperti tidak beracun, mudah terbakar, korosif lebih rendah dan bahaya terhadap lingkungan. Karakteristik dari NADES ini merupakan aspek penting dalam kimia dan memungkinkan menjadi alternatif untuk menghindari masalah penggunaan pelarut organik (Diego *et al.*, 2020).

NADES dibentuk dengan mencampur dua atau lebih komponen tetapi bahannya berasal dari sumber alami yaitu termasuk gula, gula alkohol, polialkohol, asam amino, asam organik dan basa organik. Kombinasi dua atau lebih pelarut dengan penambahan air dalam rasio molar tertentu dapat menghasilkan cairan eutektik. NADES memiliki sifat fisikokimia yang sangat berguna sebagai pelarut, seperti titik leleh yang sangat rendah dan viskositas yang dapat disesuaikan (Diego *et al.*, 2020).

Berdasarkan senyawa-senyawa penyusunnya, *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) dapat dikelompokkan sebagai berikut:

- a. Cairan ionik, terdiri dari asam-asam organik (asam sitrat, asam maleat, asam laktat) dan senyawa basa diantaranya yaitu *choline chloride*, *betaine chloride* dan *betaine*
- b. NADES netral, tidak terdapat konstituen ionik, seperti campuran *polyalcohols* (gliserol, glisin dan 1-2 propandiol)
- c. NADES bersifat asam, terdiri dari senyawa netral, seperti glukosa, fruktosa, sukrosa, maltosa, trehalose dan senyawa asam
- d. NADES bersifat basa, terdiri dari senyawa netral dan senyawa basa
- e. NADES bersifat amfoter, yaitu kombinasi dari asam amino (α -Proline, β -Alamine) dan gula *polyalcohol*, atau senyawa-senyawa asam

Berikut daftar kombinasi bahan dan rasio molar dalam pembuatan NADES

(Dai *et al.*, 2013), yaitu :

Tabel 2.1 Daftar Pembuatan NADES

No.	Komponen 1	Komponen 2	Rasio mol
1.	Kolin klorida	Asam laktat	1:1
2.	Kolin klorida	Asam malonat	1:1
3.	Kolin klorida	Asam maleat	1:1; 1:2
4.	Kolin klorida	Asam sitrat	1:1; 2:1
5.	Kolin klorida	Asam akonitrik	1:1
6.	Kolin klorida	Gliserol	1:1; 3:2
7.	Kolin klorida	Glikol	1:1
8.	Kolin klorida	D-sorbitol	3:1; 5:2
9.	Kolin klorida	Maltosa	4:1
10.	Kolin klorida	Sukrosa	4:1; 1:1

2.3.2 Choline Chloride (ChCl)

Choline Chloride (ChCl) dengan nama IUPAC *2-hydroxy-N,N,N-trimethylethanaminium chloride* atau *(2-hydroxyethyl) trimethylethanaminium chloride* merupakan salah satu garam amonium yang paling luas digunakan sebagai pembentukan NADES karena murah, dapat terurai secara hayati dan tidak beracun. Berdasarkan *Council Directive 70/524/EEC*, ChCl disetujui untuk digunakan sebagai aditif nutrisi di semua spesies (Radosevic *et al.*, 2015).

DES yang berbasis ChCl mempunyai banyak keuntungan seperti harga murah, mudah disimpan, mudah disiapkan karena DES diperoleh hanya dengan pencampuran dua komponen, mengatasi semua masalah pemurnian dan pembuangan limbah yang umumnya dihadapi dengan ILs, serta DES yang berasal dari ChCl merupakan biodegradable, biokompatible dan tidak beracun (Zhang *et al.*, 2012).

2.3.3 Asam Laktat

Pada DES berbasis ChCl, pemilihan Hydrogen Bonding Donor (HBD) merupakan titik kritis dalam pembentukan DES dengan titik beku rendah. Asam laktat digunakan sebagai Hydrogen Bonding Donor (HBD) karena sintesis NADES harus didasarkan pada bahan-bahan nabati yang murah, berlimpah dan dapat didaur ulang dan juga dalam hal ini upaya dilakukan untuk menggunakan zat yang kompatibel dengan makanan, farmasi dan formulasi kosmetik termasuk salah satunya yaitu asam laktat (Bakirtzi *et al.*, 2016).

2.4 Bakteri

Dalam buku *Essential Microbiology*, bakteri merupakan mikrobia prokariotik uniselular yang tidak memiliki membran inti sel dan berukuran mikroskopik. Umumnya bakteri berbentuk 1 sel tunggal atau uniseluler, tidak mempunyai klorofil, berkembang biak dengan membelah sel atau biner. Tempat hidup bakteri tersebar di udara, di dalam tanah di dalam air, pada tanaman, tubuh manusia maupun hewan. Berdasarkan sifatnya bakteri dikenal sebagai bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Yusmaniar *et al.*, 2017).

2.4.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

Bakteri membutuhkan beberapa hal untuk dapat bermetabolisme, melakukan pembelahan sel dan tumbuh secara optimal pada lingkungan yang menyediakan kebutuhan-kebutuhannya. Secara kimiawi bakteri terbentuk oleh unsur-unsur polisakarida, protein, lipid, asam nukleat dan peptidoglikan (Putri *et al.*, 2017). Adapun beberapa hal yang harus dipenuhi agar mencapai pertumbuhan yang baik, yaitu:

1. Oksigen

Berdasarkan kebutuhan oksigen, bakteri dapat diklasifikasikan menjadi 4 kelompok (Putri *et al.*, 2017) sebagai berikut:

- a. Obligat aerob. Dapat tumbuh ketika terdapat oksigen
- b. Obligat anaerob. Dapat tumbuh jika tidak terdapat oksigen
- c. Fakultatif anaerob. Dapat tumbuh jika adanya oksigen menggunakan oksigen untuk membentuk energi, jika tidak tersedia cukup oksigen menggunakan jalur fermentasi

d. *Microaerophilic*. Dapat tumbuh dalam lingkungan dengan sedikit oksigen

2. Tingkat Keasaman pH

Menurut Putri *et al.*, (2017) pH akan optimal pada pertumbuhan bakteri yang berkisar antara pH 7,2 – 7,4. Suhu optimal dibutuhkan untuk kerja enzim bakteri yang efektif meskipun bakteri dapat tumbuh pada rentang suhu yang sangat lebar. Kebutuhan pH dapat diklasifikasikan yaitu mikroorganisme asidofil (pH 1-5,5), neutrofil (pH 5,5-8,0), alkalofil (pH 8,5-11,5) dan alkalofil ekstrim (pH > 10).

3. Suhu

Pada umumnya suhu bakteri dapat tumbuh optimal berdasarkan suhu tubuh manusia. Tetapi, terdapat beberapa bakteri yang dapat tumbuh pada suhu ekstrim misalnya pada suhu yang panas atau dingin (Yusmaniar *et al.*, 2017).

Berdasarkan kemampuan tumbuh pada suhu lingkungan, bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

- a. Bakteri mesofil yaitu bakteri yang tumbuh pada suhu 20-45°C
- b. Bakteri termofil yaitu bakteri yang tumbuh pada suhu optimal 55-80°C
- c. Bakteri psikofil yaitu bakteri yang tumbuh pada suhu dibawah 20°C

4. Nutrisi

Hidrogen, karbon, ion-ion anorganik seperti nitrogen, sulfur, fosfat, magnesium, kalium dan nutrien organik seperti asam amino, karbohidrat, purin, pirimidin, dan media pertumbuhan merupakan kebutuhan nutrisi bakteri. Media termasuk campuran nutrien atau zat makanan yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhan (Yusmaniar *et al.*, 2017).

2.5 *Streptococcus mutans*

Streptococcus adalah bakteri yang pertama kali ditemukan oleh Billroth (1874), yang berasal dari suatu eksudat purulen dari sebuah lesi erisipelas. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang paling dominan dan menjadi salah satu bakteri yang menginsiasi terjadinya karies gigi dengan memproduksi asam organik yang tinggi. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif dengan dinding sel tebal yang tersusun dari peptidoglikan (murein) dan asam teikotik yang berfungsi mencegah lisis osmotik protoplasma sel. Dinding selnya juga berfungsi memberikan kekakuan dan bentuk selnya memiliki kapsul yang tersusun oleh polisakarida. Polisakarida ini memiliki subunit struktural yaitu glukosa dekstran. (Sepriyani, 2020).

Menurut (Febriany, 2013) *Streptococcus mutans* dikenal mampu untuk mensintesis polisakarida ekstraseluler dari sukrosa yang mengalami agregasi sel ke sel ketika bercampur dengan sukrosa atau dekstran. Bakteri ini bersifat asidogenik yaitu menghasilkan asam dan bersifat asidurik yang mampu hidup pada lingkungan asam. Lapisan permukaan sel *Streptococcus mutans* terdiri dari 4 komponen yaitu peptidoglikan, antigen polisakarida, glikoprotein dan gliserol dari asam teikotik dan lipoteikotik, dan juga mengandung fimbria. Molekul pada sitoplasma dinding sel peptidoglikan berfungsi melindungi bakteri dari tekanan osmotik internal yang tinggi, tetapi ruang antar polimer di dalam dinding membantu pemecahan polisakarida maupun protein oleh enzim proteolitik. Struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana, yaitu berlapis tunggal dengan kandungan lipid rendah yaitu 1-4%.

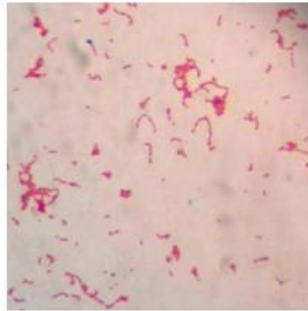
2.5.1 Klasifikasi *Streptococcus mutans*

Menurut Zelnicek (2014) klasifikasi ilmiah *Streptococcus mutans* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Streptococcaceae
Spesies	: <i>Streptococcus mutans</i>

2.5.2 Morfologi *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif yang bersifat nonmotil (tidak bergerak), anaerob fakultatif dan berbentuk kokus yang sendirian, berbentuk bulat atau bulat telur serta tersusun seperti rantai. Bakteri *Streptococcus mutans* tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18°C-40°C. *Streptococcus mutans* dapat tumbuh dalam perbenihan padat sebagai koloni diskoid dengan diameter 1-2 mm dan tumbuh baik pada pH 7,4-7,6. Secara umum, bakteri ini tergolong dalam alfa atau gamma-hemolitik dan dapat tumbuh dalam media yang padat dan membentuk koloni kecil berwarna putih. Spesies *Streptococcus mutans* yang menjadi pemicu terjadinya karies gigi adalah bakteri dominan *Streptococcus mutans* (Rosdiana, 2016).



Gambar 2.2 *Streptococcus mutans* di Bawah Mikroskop
dengan Pembesaran 1000x
Sumber : Rosdiana (2016)

Streptococcus mutans merupakan bakteri kokus berbentuk gram positif yang biasanya ditemukan pada rongga mulut manusia dan merupakan penyumbang utama kerusakan gigi (Thodar, 2012). Menurut Zelnicek (2014) melaporkan *Streptococcus mutans* mampu memecah gula untuk dijadikan energi dan menghasilkan lingkungan asam yang dapat menghambat proses mineralisasi struktur gigi, sehingga lapisan gigi menjadi hancur. Beberapa karakteristik *Streptococcus mutans* yang dapat meningkatkan sifat kariogeniknya adalah sebagai berikut:

a. Transpor Gula

Tinggi dan rendahnya afinitas sistem transpor sangat berpengaruh dalam pengambilan substrat walau dibawah kondisi ekstrem. Contohnya yaitu pH rendah.

b. Jalannya proses glikolisis yang efisien dapat memproduksi nilai pH rendah dalam plak gigi dengan cepat.

c. Asiduritas (Ketahanan Pada Suasana Asam)

Sel memiliki komponen biokimia spesifik yang mampu bertahan atau tetap hidup, bermetabolisme dan tumbuh pada nilai pH yang rendah.

d. Produksi Polisakarida Ekstraseluler (*Extracellular Polysaccharide/EPS*)

EPS memperbesar matrik plak, menggabungkan pelengkap sel dan dapat menempatkan produk fermentasi yang bersifat asam.

e. Produksi Polisakarida Intraseluler (*Intracellular Polysaccharide/IPS*)

2.5.3 Penyakit yang Ditimbulkan oleh *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan mikroorganisme endogen rongga mulut, faring dan usus yang paling banyak ditemukan pada awal pembentukan plak. Pada tahun 1924 Clark menyatakan bahwa bakteri *Streptococcus mutans* merupakan bakteri utama penyebab karies. Karies gigi disebabkan oleh aktivitas mikroba pada suatu karbohidrat yang mengalami fermentasi dan ditandai oleh adanya demineralisasi pada jaringan keras gigi, diikuti dengan kerusakan bahan organik. Dari hal tersebut menyebabkan terjadinya invasi bakteri dan kerusakan pada jaringan pulpa dan penyebaran infeksi ke jaringan periapikal (Yumas, 2017).

Beberapa faktor penyebab karies gigi yaitu perlekatan terhadap permukaan enamel, produksi asam metabolit, kapasitas untuk membangun cadangan glikogen dan kemampuan untuk mensintesis polisakarida ekstraseluler yang terdapat dalam karies gigi. Keberadaan *Streptococcus mutans* biasanya dalam akvitas gigi yang diikuti oleh karies setelah 6-24 bulan. Enzim *glukosiltransferase* merupakan salah satu faktor virulensi utama pada perlekatan *Streptococcus mutans* yang dapat mensintesis glukosa dari sukrosa dan sebagai perantara yang mempengaruhi perlekatan sukrosa *Streptococcus mutans* pada permukaan gigi (Supari *et al.*, 2016).

2.6 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme dan dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan mikroorganisme. Antibakteri termasuk antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Suatu zat dikatakan mempunyai aktivitas antibakteri apabila dalam konsentrasi rendah mampu memberikan daya hambat terhadap bakteri (Pratiwi, 2019).

Adapun klasifikasi kategori zona hambat antibakteri menurut David dan Stout dalam Andayani *et al.*, (2016) dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2.2 Klasifikasi Kategori Zona Hambat Antibakteri

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

Berikut beberapa golongan senyawa aktif sebagai antibakteri, antara lain:

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa organik yang biasanya ditemukan di alam dan memiliki atom nitrogen dalam strukturnya. Senyawa ini mudah larut dalam alkohol, sedikit larut dalam air. Golongan senyawa ini memiliki aktivitas farmakologis pada manusia dan hewan. Pada tumbuhan alkaloid dapat ditemukan dibagian biji, daun, ranting dan kulit batang (Julianto, 2019).

2. Flavonoid

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenolik terbesar di alam. Banyaknya senyawa flavonoid yang berasal dari tingkat hidroksilasi, alkoksidasi dan glikosilasi dari berbagai struktur. Flavonoid memiliki kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon yang membentuk susunan C6-C3-C6. (Julianto, 2019).

3. Tanin

Tanin adalah senyawa fenolik yang memberikan rasa pahit, dapat bereaksi dengan protein dan mengumpulkan senyawa organik lainnya. Tanin diketahui memiliki beberapa khasiat yaitu sebagai astrigen, antidiare, dan antioksidan. Menurut Diniati *et al* (2019) tanin digunakan sebagai antibakteri karena mempunyai sifat antiseptik yang dapat digunakan sebagai komponen antimikroba.

4. Saponin

Saponin merupakan glikosida yang banyak diproduksi oleh tumbuhan, hewan laut tingkat rendah dan beberapa bakteri. Dari segi kesehatan, saponin mempunyai sifat antioksidan, antiinflamasi, antijamur, penyembuhan luka dan antibakteri (Pratiwi, 2019).

5. Fenol

Fenol merupakan metabolit sekunder yang tersusun dari turunan hidroksi dari satu atau lebih cincin benzana. Senyawa fenol dalam medis mempunyai berbagai aktivitas termasuk sifat antibakteri dan antijamur (Pratiwi, 2019).

2.6.1 Metode Aktivitas Antibakteri

Penentuan kepekaan bakteri terhadap antibakteri dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yaitu difusi dan dilusi. Metode standar sangat

penting untuk untuk mengendalikan semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri standar dan obat pembanding yang sudah diketahui.

Berikut jenis metode yang dapat dipergunakan untuk mengukur potensi antibiotik lain dalam sampel atau kepekaan mikrobial, yaitu:

a. Metode Difusi

1. Difusi Cakram

Metode difusi cakram adalah metode sebagai penentuan aktivitas agen antibakteri menggunakan kertas cakram dengan diameter $6 \pm \text{mm}$ mengandung senyawa uji yang diletakkan pada permukaan agar yang telah ditanami bakteri uji. Senyawa uji akan berdifusi membentuk zona hambat (Jayanti, 2018). Metode ini dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik dan kimia Hasil dari pengamatan metode ini diperoleh ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri.

2. Metode Sumuran

Metode sumuran adalah metode yang dilakukan dengan membuat lubang tegak lurus pada agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Jumlah dan letak lubang disesuaikan, kemudian lubang diisi dengan sampel yang akan diuji. Setelah proses inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambat disekeliling lubang (Nurhayati *et al.*, 2020).

3. Cara Parit (*ditch*)

Metode ini dilakukan dengan menempatkan zat antibakteri pada alur yang dibuat dengan memotong media agar dalam cawan petri pada bagian yang

mengandung agen bakteri. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil pengamatan yang diberikan pada metode ini yaitu dengan melihat ada tidaknya zona hambat yang akan terbentuk di sekitar parit (Pratiwi, 2019).

b. Metode Dilusi

1. Metode Dilusi Cair

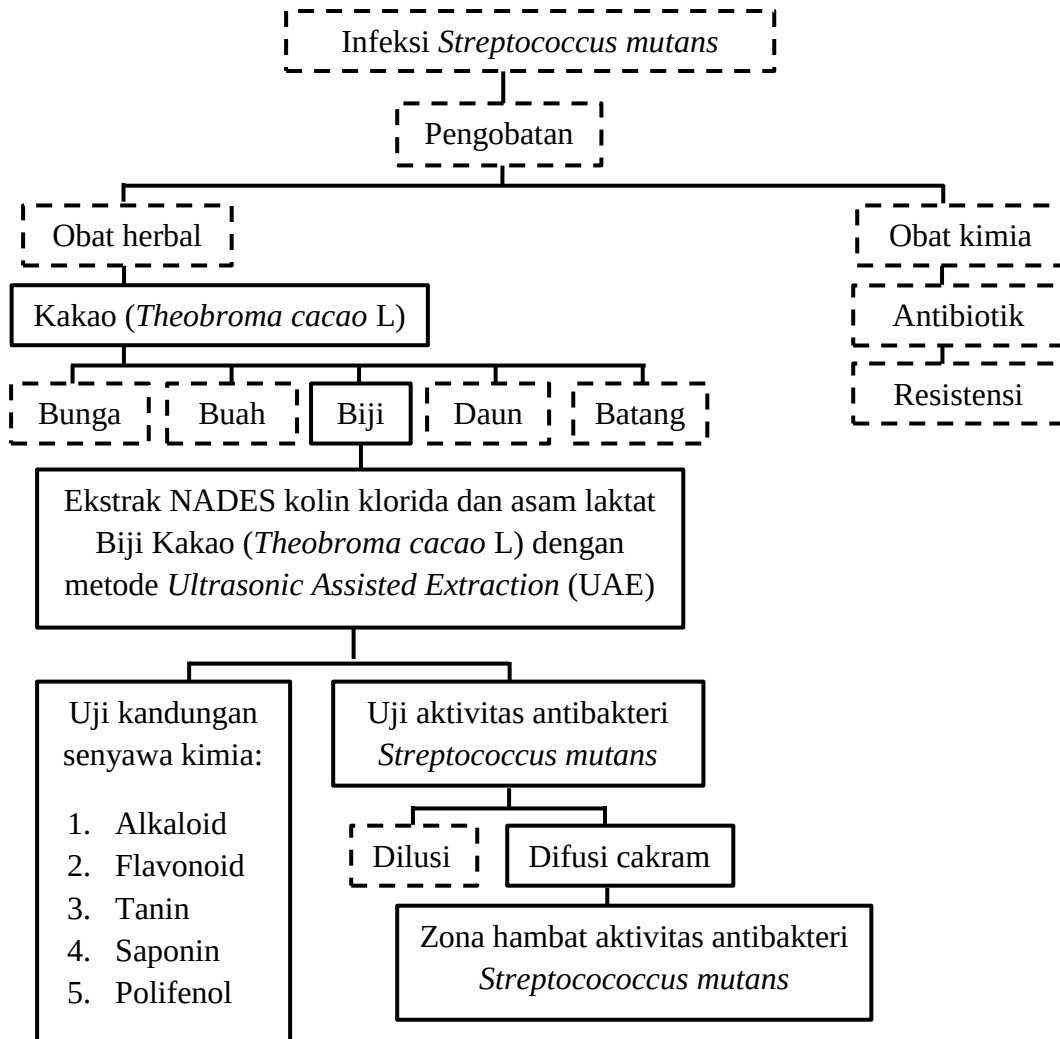
Metode uji pengenceran cair (pengenceran serial) yaitu mengukur KHM (konsentrasi minimum atau kadar bunuh minimum, KBM). Metode yang digunakan terdiri dari pembuatan serangkaian pengenceran agen bakteri dalam media cair yang ditambahkan keorganisme uji. Kemudian, KHM ditumbuhkan dalam media cair tanpa penambahan mikroorganisme uji atau agen antibakteri dan diinkubasi selama 18-24 jam. Medium cair yang terlihat jelas setelah diinkubasi disebut KBM (Mauliyanti, 2017).

2. Metode Dilusi Padat

Metode dilusi padat adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimum dari zat antibakteri. Kelebihannya adalah dapat menguji beberapa bakteri uji dengan satu konsentrasi agen antibakteri (Pratiwi, 2019).

BAB 3. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan : ————— = Variabel yang diteliti
 - - - - - = Variabel yang tidak diteliti

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Uji Aktivitas Antibakteri Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Terhadap *Streptococcus mutans*

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis atau hipotesa merupakan suatu pernyataan yang sifatnya sementara, atau kesimpulan sementara, atau dugaan yang bersifat logis tentang suatu populasi. Dalam ilmu statistik, hipotesis merupakan pernyataan parameter populasi. Dengan demikian hipotesis sangat dibutuhkan dalam penelitian kuantitatif. Hipotesis dalam penelitian ini yaitu

H_0 : Tidak ada aktivitas antibakteri ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap *Streptococcus mutans*.

H_a : Ada aktivitas antibakteri ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap *Streptococcus mutans*.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan proses ekstraksi dengan pelarut NADES menggunakan metode UAE. Pada proses uji antibakteri menggunakan metode difusi cakram. Desain penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) dengan menggunakan metode difusi cakram terhadap *Streptococcus mutans*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi merupakan 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, 2015). Populasi dalam penelitian ini menggunakan biji kakao (*Theobroma cacao* L) yang didapatkan dari Puslit Koka (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia) Kabupaten Jember, Provinsi Jawa Timur, Indonesia.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel merupakan suatu sub kelompok dari populasi yang dipilih untuk digunakan dalam penelitian (Amirullah, 2015). Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) dengan menggunakan pelarut NADES *Cholin chloride* (ChCl) dan asam laktat.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah suatu atribut atau sifat nilai dari orang, objek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiono, 2019:69).

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas (*variabel independent*) merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel *dependen*/terikat (Sugiono, 2016). Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) biji kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diekstraksi dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*).

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat (*variabel dependent*) merupakan variabel yang dipengaruhi atau menjadi akibat karena adanya variabel bebas (Sugiono, 2016). Variabel terikat pada penelitian ini adalah kandungan senyawa kimia ekstrak dan aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans*.

4.4 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas dr. Soebandi Jember.

4.5 Waktu Penelitian

Waktu penelitian yang dilaksanakan oleh peneliti dalam rentang waktu bulan Juli - Agustus 2022.

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah suatu atribut atau sifat atau nilai dari objek atau kegiatan yang memiliki variasi tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti untuk mempelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiono, 2016). Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Data
1.	Kandungan senyawa kimia	Hasil dari uji kandungan senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, dan polifenol	Tabung reaksi dan pipet tetes	Penambahan pereaksi reagen sesuai senyawa yang akan diuji	Terbentuknya warna atau endapan pada setiap uji kandungan senyawa kimia ekstrak biji kakao	Nominal
2.	Aktivitas antibakteri <i>Streptococcus mutans</i>	Zona hambat yang diukur dari daerah sekeliling kertas cakram yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri	Jangka sorong	Mengukur diameter zona hambat pada area yang jernih di sekitar kertas cakram	Diameter zona hambat (mm)	Rasio

4.7 Teknik Pengumpulan Data

4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi biji kakao dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk memastikan kebenaran identitas dengan jelas bahwa biji kakao yang akan diuji merupakan spesies (*Theobroma cacao* L).

4.7.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Biji Kakao

Buah kakao dipanen pada saat berumur ± 1 tahun dengan warna coklat kekuningan. Biji buah kakao dibersihkan dari pulpa biji. Setelah bersih teknik pengeringan menggunakan oven ± 4 sampai 5 hari dalam suhu $40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$. Biji kakao yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan mesin dan menghasilkan serbuk simplisia (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, 2022).

4.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Kakao

a. Preparasi NADES

Komponen NADES sebagai pelarut ditimbang bahan kolin klorida sebanyak 139,62 gram, asam laktat sebanyak 1 mL dan akuades sebanyak 324 mL dengan masing-masing konsentrasi rasio mol 1:1:18. Ketiga bahan dilebur pada suhu 80°C ke dalam erlenmeyer, lalu dilakukan pengadukan dengan menggunakan *hotplate stirrer* pada suhu 80°C pada kecepatan 350 rpm selama ± 1 jam. Selanjutnya dilakukan pemanasan sampai diperoleh larutan yang stabil yang ditandai dengan campuran tetap bening, tidak mengendap, mengkristal atau berubah warna (Dai *et al.*, 2013).

b. Proses Ekstraksi NADES Biji Kakao dengan Metode UAE

Dalam proses ekstraksi dengan metode UAE yang dilakukan mengacu pada penelitian Mansinhos pada tahun 2021. Sebanyak 100 gram serbuk biji kakao ditimbang menggunakan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 500 mL pelarut NADES kolin klorida : asam laktat : akuades, kemudian diekstraksi menggunakan waktu 15 menit dengan menggunakan *ultrasonic bath* dalam frekuensi 37 kHz. Setelah proses ekstraksi, dilakukan proses penyaringan atau yang disebut dengan filtrasi untuk memisahkan filtrat dan ampas. Penyaringan dilakukan dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring lalu dicatat volume hasil ekstraksi dan filtratnya disimpan pada suhu ruang sampai digunakan.

4.7.4 Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 5 mL HCL 2N, kemudian dibagi ke dalam 3 tabung. Pada tabung 1 ditambah pereaksi *Mayer*, tabung 2 ditambah pereaksi *Dragendorff*, tabung 3 ditambah pereaksi *Wagner*. Hasil dinyatakan positif apabila pada tabung 1 terbentuk endapan putih, pada tabung 2 terbentuk endapan kuning kejinggaan, dan pada tabung 3 terdapat endapan merah kecoklatan (Hafiz *et al.*, 2020).

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji kakao ditambahkan 5 mL air, dididihkan kurang lebih 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 2 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok hingga homogen. Hasil

dinyatakan positif apabila terbentuk warna kuning sampai jingga (Hafiz *et al.*, 2020).

3. Uji Tanin

Sebanyak 2 mL ekstrak biji kakao dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 2 mL FeCl_3 . Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk hitam kehijauan (Herman *et al.*, 2020).

4. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji kakao ditambahkan 5 mL air panas dikocok kuat selama kurang lebih 10 detik. Terbentuk busa stabil selama kurang lebih 10 menit busa tersebut tidak hilang. Dinyatakan positif apabila terdapat busa yang stabil (Hafiz *et al.*, 2020).

5. Uji Polifenol

Sebanyak 1 mL ekstrak direaksikan dengan larutan FeCl_3 , jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol (Adhayanti *et al.*, 2018).

4.7.5 Pembuatan Media

Sebelum melakukan proses pembuatan media dan pengujian aktivitas antibakteri alat-alat gelas yang memiliki presisi dan media pertumbuhan bakteri dalam pengujian disterilkan terlebih dahulu di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan untuk media, kawat ose dan pinset menggunakan api bunsen (Laoli, 2018).

a. Pembuatan Media Agar Miring *Nutrient Agar* (NA)

Nutrient Agar (NA) sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 50 mL akuades menggunakan erlenmeyer. Kemudian di homogenkan dengan *stirrer* di atas penangas air sampai mendidih. *Nutrient Agar* dituangkan masing-masing pada 3 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Nurhamidin *et al.*, 2021).

b. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Sebanyak 6,8 gram *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dalam 200 mL akuades menggunakan erlenmeyer. Kemudian dihomogenkan dengan *stirrer* di atas penangas air sampai mendidih. Media yang sudah homogen disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Gunawan *et al.*, 2019).

4.7.6 Pembiakan Bakteri *Streptococcus mutans*

Diambil bakteri uji dengan kawat ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Nurhamidin *et al.*, 2021).

4.7.7 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Mengambil bakteri uji yang telah diinokulasi menggunakan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan *Mc. Farland*. Pembuatan standar kekeruhan 0,5 *Mc. Farland* dibuat dari campuran H₂SO₄ 1%

sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh (Nurhamidin *et al.*, 2021).

4.7.8 Pembuatan Kontrol Negatif dan Kontrol Positif

Pada penelitian ini kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut NADES dengan kombinasi bahan kolin klorida sebanyak 139,62 gram, asam laktat sebanyak 1 mL dan akuades sebanyak 324 mL. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu *chlorhexidine* 0,2% (Rondhianto *et al.*, 2016).

4.7.9 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Cakram

Metode uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) pada cawan petri dan kertas cakram (*paper disc*) berdiameter 6 mm. Sebelum bakteri ditanam pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA), bagian depan cawan petri dibagi menjadi tiga bagian yang terdiri dari ekstrak NADES biji kakao konsentrasi 100%, kontrol positif dan kontrol negatif.

Suspensi bakteri uji dari media larutan NaCl 0,9% dipipet sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam cawan petri media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kemudian disebar secara perlahan menggunakan batang L untuk menyebarkan biakan bakteri secara merata. Lalu 3 buah kertas cakram dicelupkan pada ekstrak NADES biji kakao, kontrol positif dan kontrol negatif. Dilakukan 8 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. Setelah itu, kertas cakram diletakkan pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dengan bantuan pinset steril dengan sedikit penekanan agar kertas cakram melekat dengan baik. Kemudian diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1×24 jam (Nurhamidin *et al.*, 2021).

4.8 Teknik Analisa Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Pengukuran aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara mengukur diameter zona hambat yaitu zona bening pada daerah sekeliling kertas cakram (*paper disc*) terhadap *Streptococcus mutans* dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm.

4.8.2 Analisa Data

Data yang telah diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan SPSS yaitu uji *Independent T-Test* untuk mengetahui daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* terhadap ekstrak biji kakao, sedangkan untuk kandungan senyawa kimia dianalisis menggunakan analisis deskriptif.

BAB 5. HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi Tanaman Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Determinasi biji kakao dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kakao (*Theobroma cacao* L.) seperti yang terlampir pada surat identifikasi pada lampiran 1.

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

Dalam pembuatan pelarut NADES dari komponen bahan *choline chloride* : asam laktat : akuades dengan rasio mol 1:1:18 diperoleh hasil larutan yang stabil yang ditandai dengan campuran tetap bening, tidak mengendap, mengkristal dan tidak berubah warna. Setelah dilakukan proses ekstraksi, pada hasil akhir volume yang didapat diperoleh sebanyak 300 mL ekstrak NADES biji kakao.

5.3 Uji Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Biji Kakao

Hasil uji kandungan senyawa kimia menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan polifenol. Dari hasil uji kandungan senyawa kimia dapat dilihat dari adanya endapan atau perubahan warna dari masing-masing pereaksi. Hasil uji kandungan senyawa kimia ekstrak biji kakao dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Biji Kakao

Uji Senyawa	Pereaksi	Teoritis	Hasil Ekstrak	Kesimpulan
Alkaloid	Ekstrak + HCl 2N + 2 tetes pereaksi <i>mayer</i>	Apabila terbentuk endapan putih (Hafiz <i>et al.</i> , 2020)	Terbentuk endapan putih	(+)
	Ekstrak + HCl 2N + 2 tetes pereaksi <i>dragendorff</i>	Apabila terbentuk endapan kuning kejinggaan (Hafiz <i>et al.</i> , 2020)	Terbentuk endapan kuning kejinggaan	(+)
	Ekstrak + HCl 2N + 2 tetes pereaksi <i>wagner</i>	Apabila terbentuk endapan merah kecoklatan (Hafiz <i>et al.</i> , 2020)	Terbentuk endapan merah kecoklatan	(+)
Flavonoid	Ekstrak + Air + serbuk Mg + HCl pekat	Apabila terbentuk warna kuning sampai jingga. (Hafiz <i>et al.</i> , 2020)	Terbentuk warna jingga	(+)
Tanin	Ekstrak + FeCl ₃	Apabila terbentuk warna hitam kehijauan. (Hafiz <i>et al.</i> , 2020)	Terbentuk hitam kehijauan	(+)
Saponin	Ekstrak + air panas	Apabila terbentuk busa yang stabil. (Hafiz <i>et al.</i> , 2020)	Terbentuk busa yang stabil	(+)
Polifenol	Ekstrak + FeCl ₃	Apabila terbentuk warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan (Adhayanti <i>et al.</i> , 2018)	Terbentuk hitam kehijauan	(+)

Keterangan: (+) mengandung senyawa kimia pada ekstrak biji kakao

5.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L)

Pengujian standar kekeruhan *Mc. Farland* 0,5 dengan panjang gelombang 625 nm mendapatkan hasil absorbansi 0,109 dan untuk suspensi bakteri mendapatkan hasil absorbansi 0,104. Hasil uji kekeruhan dapat dilihat pada lampiran 2.

Uji aktivitas antibakteri biji kakao terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* dilakukan pada perlakuan ekstrak biji kakao, kontrol positif *chlorhexidine* 0,2% dan kontrol negatif pelarut NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*). Bakteri yang digunakan adalah *Streptococcus mutans*. Hasil data aktivitas antibakteri ekstrak biji kakao dapat dilihat pada tabel 5.2 dan lampiran 3.

Tabel 5.2 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) Biji Kakao Terhadap *Streptococcus mutans*.

Bahan Uji	Replikasi	Zona Hambat (mm)	Rata-rata Zona Hambat $\bar{x} \pm SD$
Kontrol Negatif	1	0	0 mm $\pm$ 0 mm
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
	6	0	
Kontrol Positif	1	24,09	23,89 mm $\pm$ 1,41 mm
	2	24,28	
	3	23,93	
	4	22,33	
	5	22,53	
	6	26,23	
Ekstrak NADES biji kakao	1	7,15	7,39 mm $\pm$ 1,39 mm
	2	6,29	
	3	5,37	
	4	8,65	
	5	8,94	
	6	7,98	

Dari hasil data rata-rata zona hambat di atas dapat dikategorikan yaitu ekstrak NADES biji kakao memiliki kategori sedang, sedangkan untuk kontrol positif memiliki kategori sangat kuat. Hasil pengukuran tersebut dilanjutkan dengan uji statistik menggunakan SPSS yaitu *Independent T-test*. Pada uji

normalitas terdistribusi normal dan uji homogenitas terdistribusi homogen. Hasil dapat dilihat pada tabel 5.3 dan dapat dilihat pada lampiran .

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Variabel	Uji Normalitas (Shapiro Wilk)	Kesimpulan	Asumsi	Uji Homogenitas	Kesimpulan	Asumsi
Kontrol Negatif	-	-	-	-	-	-
Kontrol Positif	0,451	Normal	Memenuhi	0,753	Homogen	Memenuhi
Ekstrak Biji Kakao	0,729	Normal	Memenuhi			

Pada uji normalitas dan homogenitas telah memenuhi, maka dilakukan uji *Independent Sampel T-test* untuk mengetahui perbedaan secara signifikan antara kontrol positif dan ekstrak biji kakao yang ditunjukkan dengan ($p < 0,05$). Hasil dapat dilihat pada tabel 5.4.

Tabel 5.4 Hasil Uji *Independent T-test*

Hasil Uji <i>Independent T-test</i>	
Sig. (2-tailed)	Uji Signifikan
0,000	Berbeda secara signifikan

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Biji Kakao dengan Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE)

Tanaman biji kakao memiliki senyawa aktif polifenol yang dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri untuk membunuh, mencegah dan menghambat pertumbuhan bakteri. *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) merupakan metode non-konvensional yang bekerja dengan memberikan getaran ultrasonik >20 kHz pada permukaan simplisia. Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi UAE menggunakan pelarut NADES (*Natural Deep Eutectic Solvents*) dalam kombinasi 3 bahan yaitu *Choline Chloride* (ChCl), asam laktat dan akuades dengan perbandingan rasio mol (1:1:18).

Pada hasil ekstraksi dengan metode UAE didapat filtrat yang diperoleh yaitu sebanyak 300 mL, hal ini dikarenakan salah satu keuntungan dari menggunakan pelarut NADES yang memberikan kestabilan larutan yang baik sehingga pada proses ekstraksi dapat memisahkan zat aktif dari simplisia dan senyawa lain (Hardianti dan Tonica, 2018). Penggunaan metode UAE digunakan karena metode ini memberikan peningkatan transfer massa dari simplisia ke pelarut dan pada akhirnya akan meningkatkan laju ekstraksi (Sjahid *et al.*, 2020).

6.2 Kandungan Senyawa Ekstrak NADES Biji Kakao

Ekstrak biji kakao yang telah diperoleh diuji kandungan senyawa kimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak biji kakao. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao dengan metode UAE positif

mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan polifenol. Pada ekstrak biji kakao senyawa yang paling berperan dalam aktivitas antibakteri yaitu pada senyawa polifenol.

Pada penelitian ini, analisis senyawa ekstrak NADES biji kakao ditemukan senyawa polifenol yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna hitam kehijauan yang direaksikan dengan FeCl_3 . Berdasarkan penelitian Padamani dkk. (2020) pada uji senyawa polifenol menunjukkan perubahan warna hitam kehijauan karena reaksi antara gugus fungsi hidroksil fenol dengan pereaksi FeCl_3 yang berperan sebagai katalis serta dapat juga diartikan bahwa warna yang terbentuk diakibatkan dari komposisi larutan FeCl_3 yang bereaksi dengan senyawa fenolik. Adapun senyawa polifenol pada kakao lebih banyak didominasi oleh gugus flavonoid yang terdiri dari grup *proanthocyanidin* sebanyak $\pm 58\%$.

Pada penelitian ini, analisis senyawa ekstrak NADES biji kakao menggunakan metode UAE ditemukan senyawa flavonoid yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna jingga. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fajrin dan Susila (2019) dinyatakan mengandung senyawa flavonoid yaitu terjadi perubahan warna jingga. Perubahan ini karena adanya penambahan serbuk Mg dan HCl yang mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah atau jingga (Fajrin dan Susila, 2019).

Pada hasil penelitian ini juga ditemukan senyawa alkaloid pada ekstrak NADES biji kakao dengan metode UAE yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih menggunakan pereaksi *mayer*, terbentuknya endapan kuning

kejinggaan dengan pereaksi *dragendorf* dan terbentuk endapan merah kecoklatan dengan pereaksi *wagner*. Menurut Fajrin dan Susila (2019) pengujian senyawa alkaloid dari pereaksi *mayer* yang diperoleh terbentuk endapan putih. Endapan putih terbentuk karena nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Menurut Jannah (2021) pengujian alkaloid dengan menggunakan pereaksi *dragendorf* yang diperoleh terbentuk endapan kuning. Endapan kuning terbentuk karena terjadi penggantian ligan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat menghasilkan kompleks kalium-alkaloid mengendap yang terkandung dalam reagen *dragendorf*. Menurut Fajrin dan Susila (2019) pada hasil uji alkaloid dengan pereaksi *wagner* yaitu terbentuk endapan merah kecoklatan. Endapan ini karena ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid mengendap.

Pada penelitian ini ditemukan senyawa tanin pada ekstrak NADES biji kakao menggunakan metode UAE yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kehijauan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ergina (2014) penambahan $FeCl_3$ digunakan karena untuk menentukan adanya kandungan gugus fenol yang ditunjukkan dengan warna hitam kehijauan setelah ditetaskan $FeCl_3$. Hal ini disebabkan tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} .

Pada analisis senyawa ekstrak NADES biji kakao menggunakan metode UAE positif mengandung saponin yang ditunjukkan dengan adanya buih setelah penambahan air panas lalu dikocok kuat hingga terbentuk busa yang bertahan

selama 10 menit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jannah (2021) melaporkan bahwa adanya busa menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa yang lain.

6.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak NADES Biji Kakao Terhadap *Streptococcus mutans*

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan media yang digunakan adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Dasar pemilihan metode difusi cakram adalah karena cepat, mudah dan sederhana dalam pengerjaannya. Prinsip dari metode ini adalah zat uji dengan konsentrasi 100% pada kertas cakram dapat berdifusi dengan baik pada permukaan media padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji (Widyawati, 2018).

Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu MHA (*Mueller Hinton Agar*) merupakan media pertumbuhan dan sebagai sumber nutrisi bagi pertumbuhan bakteri aerob dan anaerob untuk makanan dan materi klinis. Media ini menyediakan nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri *Streptococcus mutans* yang merupakan bakteri anaerob untuk metabolisme sel bakteri yaitu karbohidrat kompleks yang berasal dari amilum. Amilum dapat dihidrolisis sempurna menggunakan asam menghasilkan glukosa, sehingga lingkungan pada media ini sesuai dengan kondisi rongga mulut dimana tersedianya glukosa dari amilum yang dapat dimanfaatkan oleh *Streptococcus mutans* dalam proses metabolismenya (Rosdiana, 2016).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak NADES biji kakao dengan menggunakan metode UAE dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* yang dapat dilihat dari zona hambat yaitu zona bening di area sekeliling kertas cakram pada permukaan media agar. Hal ini dibuktikan pada perolehan data rata-rata zona hambat ekstrak NADES biji kakao konsentrasi 100% dan *chlorhexidine* 0,2% sebagai kontrol positif, sedangkan pelarut NADES sebagai kontrol negatif tidak terlihat adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Rata-rata zona hambat pada penelitian ini yaitu ekstrak NADES biji kakao sebesar 7,39 mm dengan standar deviasi sebesar 1,39 mm, *chlorhexidine* 0,2% sebesar 23,89 mm dengan standar deviasi sebesar 1,41 dan NADES tidak memiliki rata-rata zona hambat.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Pohan dkk. (2020) tentang efektivitas ekstrak biji kakao sebagai antibakteri pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dalam berbagai konsentrasi. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak biji kakao efektivitas sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* dari konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Diameter zona hambat terendah terdapat pada konsentrasi 20% dengan diameter sebesar 7,50 mm pada pengulangan 1 dan 2 dan diameter zona hambat tertinggi terdapat pada konsentrasi ekstrak 100% sebesar 12,65 mm pada pengulangan ke 5 namun tidak melampaui zona hambat kontrol positif. Berdasarkan uji statistik One-Way ANOVA, didapatkan perbedaan yang signifikan dari hasil peningkatan persentase kadar ekstrak kakao yang dapat menghambat pertumbuhan *S. pyogenes* ($p < 0.005$) yaitu sebesar 0,000.

Berdasarkan hasil zona bening yang terbentuk dari penelitian ini dan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa konsentrasi 100% merupakan konsentrasi yang paling baik karena semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan penelitian Yuslina dkk. (2019) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin meningkat daya antibakterinya, karena dengan konsentrasi tinggi memungkinkan penyebaran zat-zat dalam menghambat bakteri semakin aktif.

Menurut David dan Stout tahun 1971 dalam penelitian Andayani *et al.*, (2016) mengelompokkan daya hambat berdasarkan zona bening yang terbentuk menjadi 4 kelompok yaitu bila zona hambat >20 mm dikategorikan sangat kuat, 10-20 mm dikategorikan kuat, 5-10 mm dikategorikan sedang dan jika <5 mm dikategorikan lemah. Berdasarkan pernyataan tersebut, maka pada penelitian ini senyawa antibakteri ekstrak NADES biji kakao 100% termasuk ke dalam kategori zona hambat sedang (5-10 mm) yaitu dengan rata-rata 7,39 mm, sedangkan pada kontrol positif termasuk kategori sangat kuat (>20 mm) yaitu sebesar 23,89.

Antibiotik yang digunakan dalam penelitian ini sebagai kontrol positif yaitu *chlorhexidine* 0,2%. Spriyani (2020) menyatakan obat kumur *chlorhexidine* 0,2% memiliki efektivitas antimikroba dan memiliki kemampuan untuk diabsorpsi dan berikatan dengan jaringan lunak maupun keras sehingga dapat bertahan dirongga mulut lebih lama, serta antibiotik ini telah diketahui memiliki kemampuan bakterisid dan bakteriostatik terhadap bakteri rongga mulut, termasuk *Streptococcus mutans*.

Berdasarkan hasil uji *Independent Sampel T-test* diperoleh nilai $p=0,000$ dimana ketentuan nilai signifikansi yaitu ($p<0,05$), maka terdapat perbedaan yang signifikan diameter zona hambat antara ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L) dengan kontrol positif *chlorhexidine* 0,2% dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Dari hasil penelitian dapat dinyatakan bahwa ekstrak biji kakao memiliki daya antibakteri sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

Timbulnya zona hambat pada ekstrak biji kakao disebabkan adanya kemampuan besar kecilnya kandungan biji kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Hal ini disebabkan karena adanya kandungan polifenol yang mampu merusak dinding sel bakteri yang mengandung peptidoglikan. Sifat antibakteri lainnya juga disebabkan karena terdapat beberapa kandungan senyawa yang bersifat antibakteri seperti alkaloid, flavonoid dan tanin (Hafidhah *et al.*, 2017).

Kandungan senyawa alkaloid yang merupakan senyawa organik dengan atom nitrogen dan bersifat basa (alkali) yang dapat menyebabkan koagulasi protein yang mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Pohan *et al.*, 2020).

Kandungan flavonoid merupakan senyawa polifenol yang bekerja dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri. Aktivitas antibakteri dari flavonoid juga melalui hambatan fungsi DNA gyrase bakteri sehingga kemampuan replikasi dan translasi bakteri dihambat (Pohan *et al.*, 2020).

Mekanisme kerja tanin menyebabkan hilangnya sifat permeabilitas membran sel sehingga enzim tidak terseleksi. Apabila enzim keluar dari dalam sel maka akan terjadi hambatan metabolisme sel sehingga mengakibatkan terhambatnya pembentukan ATP (*Adenosine Three Phosphate*) yang diperlukan dalam perkembangbiakan dan pertumbuhan sel. Tanin menginaktivasi adhesi sel mikroba yang terdapat pada sel dan enzim yang terikat pada membran sel dan polipeptida dinding sel sehingga menyebabkan kerusakan pada dinding sel (Sepriyani, 2020).

Berdasarkan uraian di atas, hasil penelitian yang telah didapat membuktikan bahwa ekstrak biji kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan terhadap beberapa bakteri lain berdasarkan penelitian sebelumnya. Hal ini terbukti dengan adanya zona hambat (zona bening) di sekitar kertas cakram. Semakin besar konsentrasi ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao* L.) maka daya hambat ekstrak biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* semakin baik. Pada hasil juga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan terhadap kontrol positif yaitu *chlorhexidine* 0,2%.

BAB 7. PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa

1. Ekstrak NADES biji kakao memiliki kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan fenol.
2. Ekstrak NADES biji kakao mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji kadar secara kuantitatif terhadap kandungan senyawa kimia ekstrak NADES biji kakao dengan metode UAE untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang lebih spesifik terhadap kandungan ekstrak NADES biji kakao.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ekstrak NADES biji kakao terhadap *Streptococcus mutans* dengan varian konsentrasi, metode ekstraksi dan metode uji aktivitas antibakteri lainnya.
3. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak NADES biji kakao terhadap bakteri gram negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhayanti, I., Abdullah, T. and Romantika, R. (2018) 'UJI KANDUNGAN TOTAL POLIFENOL DAN FLAVONOID EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT PISANG RAJA (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*)', *Media Farmasi*, 14(1), p. 39. doi: 10.32382/mf.v14i1.84.
- Ahmad, I. *et al.* (2020) 'Pengayaan Polifenol Total dari Daun Kadamba Menggunakan Metode Ekstraksi Berbantu Mikrowave Berbasis Pelarut Hijau', *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)*, 6(2), pp. 338–346. doi: 10.22487/j24428744.2020.v6.i2.15035.
- Amirullah. (2015). *Populasi dan Sampel*, Malang: Bayumedia publishing Malang
- Andayani, R., Mubarak, Z., and Rinanda, R. D. (2016). Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap *Enterococcus faecalis* Secara In Vitro *Jurnal Syiah Kuala Dent Sor.* 1(2) : 201-210.
- Andriani, M., Gde Mayun Permana, I. D. and Rai Widarta, I. W. (2019) 'PENGARUH SUHU DAN WAKTU EKSTRAKSI DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa Bilimbi* L.) TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION (UAE) METHOD', *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 8(3), pp. 330–340.
- Atikah, A. R., Budi, H. S. and Kusumaningsih, T. (2017) 'Antibacterial effects of 70% ethanol and water extract of cacao beans (*Theobroma cacao* L.) on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*', *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 49(2), p. 104. doi: 10.20473/j.djmk.v49.i2.p104-109.
- Azzahra, F. and Hayati, M. (2019) 'UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* (L). Urb) TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus mutans*', *B-Dent, Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*, 5(1), pp. 9–19. doi: 10.33854/jbd.v5i1.133.
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K. and Makris, D. P. (2016) 'Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek

- medicinal plants', *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), pp. 120–127. doi: 10.1016/j.jarmap.2016.03.003.
- Choi, Y. H. *et al.* (2011) 'Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?', *Plant Physiology*, 156(4), pp. 1701–1705. doi: 10.1104/pp.111.178426.
- Dai, Y. *et al.* (2016) 'Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents', *Journal of Chromatography A*, 1434, pp. 50–56. doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.037.
- Dewi, Y. P., Zahrina, I. and Yelmida (2021) 'Karakteristik Nades (Natural Deep Eutectic Solvents)', *Jom FTEKNIK*, 8, pp. 1–5.
- Diego J, Ramon, Guillena Gabriela. (2020). *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties and Application*. Jerman: Wiley.
- Ditjen POM. (2020). *Parameter Standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Cetakan pertama. Jakarta. Direktorat Obat Asli Indonesia, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Halaman 10-17.
- Diniati., Siti Nuryanti., dan I. S. (2019) 'Pendidikan Kimia/FKIP – Universitas Tadulako, Palu – Indonesia 94118', *J. Akademika Kim.* 7, 7(November), pp. 168–172.
- Diyantika, D., Mufida, D. C. and Misnawi (2017) 'Perubahan Morfologi *Staphylococcus aureus* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) secara In Vitro The', *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 3(1), pp. 25–33.
- Ergina. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol. Palu: Pendidikan Kimia Universitas Tadulako. Jurnal Akademika Kimia. Vol. 3. No. 3. Hal: 165-172.
- Fajrin, F. I. and Susila, I. (2019) 'Uji fitokimia ekstrak kulit petai menggunakan metode maserasi.', *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Dan Sains.*, 6(3), pp. 455–462.

- Febriany, D. (2013) 'Efek Hambat Berbagai Macam Obat Kumur Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*', *Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta*, p. 8.
- Flora, J. (2018) 'ANALISIS SEBARAN TIPE DA ORMA MUTU FISIK KAKAO PADA RENTAN SIS OF CACA AO TYPES DISTRIBUTION AND PHYSICAL QUALITY PLANCE AT THREE ELEVATION Retno o Utami Hatm ngkajian Tek knologi Pe men Teknolo ghi Industr ri Pertanian n , Fakultas Teknologi Perta', 5, pp. 11–20.
- Gunawan, H. C. *et al.* (2019) 'Uji Antibakteri Air Perasan Daging Buah Nanas (*Ananas Comosus* (L) Merr) terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*', *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 15(2), p. 170. doi: 10.24853/jkk.15.2.170-177.
- Habiburrahman B, Hasyim M, Rahim B. Formulasi dan uji stabilitas fisik ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) pada sediaan pasta gigi sebagai antibakteri terhadap *streptococcus mutans*. *Jurnal Pharma and Med Sci* 2016; 1(2) : 5-10.
- Hafidhah, N. *et al.* (2017) 'Pengaruh Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* Pada Berbagai Konsentrasi ', 2(Mei), pp. 92–96.
- Hafiz Ramadhan, Muhammad Arsyad and Putri Indah Sayakti (2020) 'SKRINING FITOKIMIA DAN Uji AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL 70% BIJI KALANGKALA (*Litsea angulata* Bl.) TERHADAP BAKTERI PENYEBAB JERAWAT *Propionibacterium acnes*', *Borneo Journal of Pharmascientech*, 4(1), pp. 60–70. doi: 10.51817/bjp.v4i1.283.
- Handaratri, A. and Yuniati, Y. (2019) 'Kajian Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei dengan Metode Sonikasi dan Microwave', *Reka Buana : Jurnal Ilmiah Teknik Sipil dan Teknik Kimia*, 4(1), p. 63. doi: 10.33366/rekabuana.v4i1.1162.
- Harborne J.B. 1987. Metode Fitokimia. Edisi ke-2. Padmawinata K, Soediro I,

- penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Hardianti, M. F. and Tonica, W. W. (2018) 'Kurkuminoid Natural Deep Eutetic Solvent Secara Spektrofotometri Uv-Vis Dalam Stability Test of Kurkuminoids in Natural Deep Eutetic Solvent (Nades) By Spektrofotometri Uv-Vis'.
- Haryadi, Supriyanto. *Teknologi cokelat*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, 2017 : 1-10.
- Herman *et al.* (2020) 'Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao L.*)', *JEDCHEM (Journal Education and Chemistry*, 2(2), pp. 57–61.
- Jannah, M. A (2021) *UJI FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SALAM (Syzygium polyanthum) HASIL SONIKASI DENGAN VARIASI PELARUT*. Fakultas Sains Dan Teknologi.
- Jayanti, E. D. (2018) *Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi daun benalu mangga gadung (Dendrophthoe pentandra (L.) Miq, Digital Repository Universitas Jember*.
- Julianto, T. S. 2019. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).
- Kusuma, Y. T. C., Suwasono, S. and Yuwanti, S. (2013) 'Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antibakteri', *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(2), pp. 33–37.
- Laoli, N. S. (2018), *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Bandotan (Ageratum conizoides L.) Terhadap Bakteri Bacillus substilis dan Proteus vulgaris*. Tugas Akhir. Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara Medan4, pp. 67-73.
- Lilyawati, S. A., Fitriani, N. and Prasetya, F. (2019) 'Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences', *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, (April 2021), pp. 135–138. Available at: <http://prosiding.farmasi.unmul.ac.id/index.php/mpc/article/view/416/399>.
- Mandala Sari, T., 'Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas

Antioksidan dan Kadar Fenolat Total dalam Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) The Effect of Different Extraction Methods on the Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Moringa (Morin', *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 17(01), pp. 90–97. Available at: <http://www.jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/PHARMACY/article/view/6013>.

Marjoni, Riza. 2016. Dasar-Dasar Fitokimia. Jakarta: CV. Trans Info Media

Marru B, Sipayung HH. Kakao. Yogyakarta: Graha Ilmu, 2015 : 1-4.

Mauliyanti, R. (2017) 'Uji Aktivitas Gel Ekstrak Etanol Daun Cempedak (*Arthocarpus champeden*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat', *Universitas Islam Negeri Alauddin*, pp. 21–22.

Nurhamidin, A. P. R., Fatimawali, F. and Antasionasti, I. (2021) 'UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK N-HEKSAN BIJI BUAH LANGSAT (*Lansium domesticum* Corr) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus Aureus* DAN *Klebsiella Pneumoniae*', *Pharmacon*, 10(1), p. 748. doi: 10.35799/pha.10.2021.32772.

Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N. and Hidayatulloh, A. (2020) 'Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram', *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), p. 41. doi: 10.24198/jthp.v1i2.27537.

Ozturk, B., Parkinson, C. and Gonzalez-Miquel, M. (2018) 'Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents', *Separation and Purification Technology*, 206, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.seppur.2018.05.052.

Padamani, E., Ngginak, J. and Lema, A. T. (2020) 'ANALISIS KANDUNGAN POLIFENOL PADA EKSTRAK TUNAS BAMBU BETUNG (*Dendrocalamus asper*)', *Bioma: Jurnal Biologi dan Pembelajaran Biologi*, 5(1), pp. 52–65. doi: 10.32528/bioma.v5i1.3688.

Pohan, D. J. *et al.* (2020) 'Effectiveness Test of Cocoa Seed (*Theobroma Cacao* L.) Extract as an Antibacterial li Various Concentrations on *Streptococcus pyogenes*', XXXVI(1), pp. 8–13.

- Pratiwi, M. (2019). Aktivitas Antibakteri Fraksi Buah Jambu Wer (*Prunus pesica* L. *batsch*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*.
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (2022). Proses Pembuatan Simplisia Biji Kakao (*Theobroma cacao* L).
- Putri, M. H., Sukini, dan Yodong, (eds) 2017. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Kesehatan. Mikrobiologi, p. 634.
- Radošević, K. *et al.* (2015) ‘Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, pp. 46–53. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
- Rosdiana, Nova (2016) ‘GAMBARAN DAYA HAMBAT MINYAK KELAPA MURNI DAN MINYAK KAYU PUTIH DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN *Streptococcus mutans*’, *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*, 1(1), pp. 43–50.
- Sekarsari, S., Widarta, I. W. R. and Jambe, A. A. G. N. A. (2019) ‘PENGARUH SUHU DAN WAKTU EKSTRAKSI DENGAN GELOMBANG ULTRASONIK TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.)’, *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(3), p. 267. doi: 10.24843/itepa.2019.v08.i03.p05.
- Sepriyani, R. (2020) ‘Efektivitas Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L .) Sebagai Antimikroba Terhadap *Streptococcus mutans*’, pp. 13–16.
- Sjahid, L. R., Aqshari, A. and Sediarto, S. (2020) ‘Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Hasil Ultrasonic Assisted Extraction Daun Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis)’, *Jurnal Riset Kimia*, 11(1), pp. 16–23. doi: 10.25077/jrk.v11i1.348.
- Stephenson, A. V. (2018) ‘Jurnal 16’, *Atlantic Economic Journal*, 46(4), pp. 405–417. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11293-018-9601-y>.
- Sudibyo, A. (2012) ‘Produksi coklat.pdf’, *Jurnal Riset, Industri*, pp. 23–40.
- Supari, I. H., Leman, M. A. and Zuliari, K. (2016) ‘Efektivitas antibakteri ekstrak biji bengkuang (*Pachyrrhizus erosus*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* secara in vitro’, *Pharmakon*, 5(3), pp. 33–39.

- Thodar, K (2012). The Cell Envelope: Capsules, Cell Walls And Cell Membranes.
- Widyawati. 2018. EFEKTIFITAS EKSTRAK ETIL ASETAT TUMBUHAN MYRMECODIA PENDANS TERHADAP BAKTERI STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175. Jurnal Vol 5, No.2, 135-143
- Wulandari P, Suswati E, Misnawi, R. A. (2012) 'ANTIBACTERIAL EFFECT OF ETHANOL EXTRACT COCOA BEANS (Theobroma cacao) ON GROWTH IN VITRO BY Shigella dysenteriae * Fakultas Kedokteran Universitas Jember ** Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember ***
- 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.
- Yuslina, G Laila H. C., Daeli P.J., Sarwendah, Chiuman L. (2019) Uji Antibakteri Air Perasan Daging Buah Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. Jurnal Kedokteran dan Kesehatan.
- Yusmaniar, Wardiyah., Khairun Nida, (eds) 2017. Mikrobiologi dan Parasitologi, p.634
- Zelnicek, Tailor (2014). Streptococcus mutans- Tooth Decay. Microbiology in Arezzo. Univ. Of Oklahoma. Italy.
- Zhang, Q. *et al.* (2012) 'Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications', *Chemical Society Reviews*, 41(21), pp. 7108–7146. doi: 10.1039/c2cs35178a.

LAMPIRAN

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: 102/PL17.8/PG/2022

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi S1 Farmasi No: 1548/FIKES.UDS/U/VI/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Beta Putri Ananda
NIM : 18040019
Jur/Fak/PT : Prodi S1 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, 20 Juni 2022
K. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu

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

Lampiran 2 : Hasil Uji Kekeruhan *Mc. Farland*

Photometry Test Report

File Name:Photometry 1	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	0,109	77,7	16/08/2022 11:32:47	Blanko Mc Farland
2	625,0	0,104	78,7	16/08/2022 11:38:55	Streptococus mutans

Lampiran 3 : Dokumentasi Penelitian

a. Preparasi Pelarut NADES (*Natural Deep Eutectic Solvent*)



Penimbangan bahan



Peleburan 3 bahan



Larutan belum stabil



Larutan stabil

b. Proses Ekstraksi



Penimbangan serbuk



Campuran serbuk + NADES



Penyaringan ekstrak



Filtrat hasil penyaringan

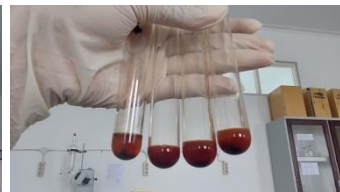
c. Uji Kandungan Senyawa Kimia



Alkaloid pereaksi *mayer*



Alkaloid pereaksi *dragendorf*



Alkaloid pereaksi *wagner*



Flavonoid



Tanin



Saponin



Polifenol

d. Inokulasi Bakteri *Streptococcus mutans*



e. Pembuatan MC farland

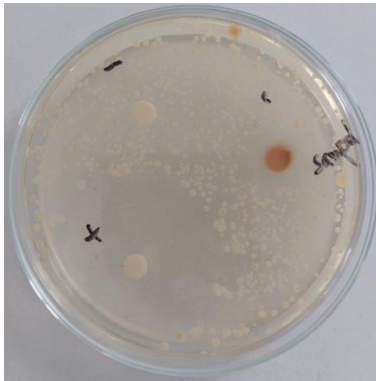


f. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji dalam larutan NaCl 0,9%



g. Uji Aktivitas Antibakteri





Lampiran 4 : Perhitungan

a. Preparasi Pelarut NADES

- 1 mol $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{Mol} \times \text{mr} = \text{massa}$

$$1 \text{ mol} \times 139,62 \text{ g/mol} = \text{massa}$$

$$139,62 \text{ gram} = \text{massa}$$

- 1 mol asam laktat $\rightarrow \text{Mol} \times \text{mr} = \text{massa}$

$$1 \text{ mol} \times 90,08 \text{ g/mol} = \text{massa}$$

$$90,08 \text{ gram} = \text{massa}$$

Asam laktat dalam bentuk larutan

$$\text{Massa jenis} = \frac{m}{V}$$

$$90,08 \text{ g/mol} = \frac{90,08 \text{ g}}{V}$$

$$V = 1 \text{ mL asam laktat}$$

- 18 mol akuades

Diketahui : berat jenis air : 1

$$\text{mr air} : 1 \text{ mol air} = 18 \text{ gram}$$

$$\text{Jika 18 mol akuades} = 18 \text{ mol} \times 18 \text{ gram}$$

$$= 324 \text{ gram}$$

- Dikonversi dalam bentuk larutan

$$\text{Massa jenis} = m / V$$

$$1 \text{ g/mL} = 324 \text{ g} / V$$

$$V = 324 \text{ g} \times 1 \text{ g/mL}$$

$$V = 324 \text{ mL}$$

b. Pengulangan Uji Aktivitas Antibakteri

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

$$(n-1) \times (3-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (2) \geq 15$$

$$(2n - 2) \geq 15$$

$$(2n) \geq 17$$

$$N \geq 8,5$$

Jadi, untuk uji aktivitas antibakteri dilakukan dalam 8 kali pengulangan

c. Perhitungan Mc farland

$$\text{BaCl}_2 \text{ 1\%} : 0,05 \text{ mL} \rightarrow 50 \mu\text{L}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 1\%} : 9,95 \text{ mL} \rightarrow 900 \mu\text{L}, 50 \mu\text{L dan } 9 \text{ mL}$$

d. Perhitungan Pembuatan Media

1. Media *Nutrient Agar* (NA) : 20 gram ~ 1000 mL akuades

$$x \text{ gram} \sim 50 \text{ mL akuades}$$

$$1 \text{ gram dalam } 50 \text{ mL akuades}$$

2. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) : 34 gram ~ 1000 mL akuades

$$x \text{ gram} \sim 100 \text{ mL akuades}$$

$$6,8 \text{ gram dalam } 200 \text{ mL akuades}$$

Lampiran 5 Output Data Uji Statistik (*Independent T-test*)

```
EXAMINE VARIABLES=Diameter BY Kelompok
/PLOT BOXPLOT STEMLEAF NPLOT
/COMPARE VARIABLES
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

Case Processing Summary

Kelompok		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Diameter	Kontrol positif	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
	Sampel	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%

Descriptives

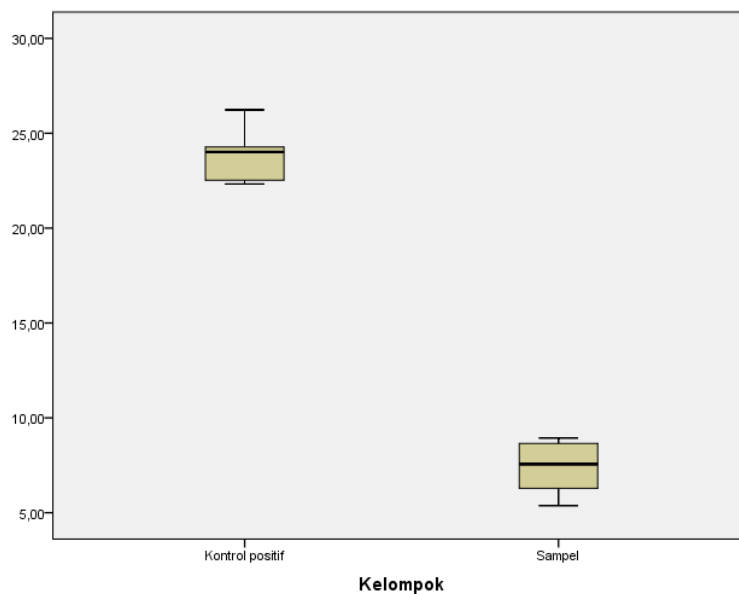
Kelompok			Statistic	Std. Error
Diameter	Kontrol positif	Mean	23,8983	,57597
		95% Confidence Interval for Mean	22,4178	
		Lower Bound	25,3789	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	23,8559	
		Median	24,0100	
		Variance	1,990	
		Std. Deviation	1,41082	
		Minimum	22,33	
		Maximum	26,23	
		Range	3,90	
		Interquartile Range	2,29	
		Skewness	,675	,845
		Kurtosis	,665	1,741
	Sampel	Mean	7,3967	,56821
		95% Confidence Interval for Mean	5,9360	
		Lower Bound	8,8573	
		Upper Bound		
		5% Trimmed Mean	7,4235	
		Median	7,5650	
		Variance	1,937	
		Std. Deviation	1,39183	
		Minimum	5,37	
		Maximum	8,94	
		Range	3,57	
		Interquartile Range	2,66	
		Skewness	-,429	,845
		Kurtosis	-1,282	1,741

Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diameter	Kontrol positif	,227	6	,200 [*]	,912	6	,451
	Sampel	,162	6	,200 [*]	,949	6	,729

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

a. Lilliefors Significance Correction



```

ONEWAY Diameter BY Kelompok
/STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS.

```

Descriptives

Diameter

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol positif	6	23,8983	1,41082	,57597	22,4178	25,3789	22,33	26,23
Sampel	6	7,3967	1,39183	,56821	5,9360	8,8573	5,37	8,94
Total	12	15,6475	8,72068	2,51744	10,1066	21,1884	5,37	26,23

Test of Homogeneity of Variances

Diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,104	1	10	,753

T-Test**Group Statistics**

Kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Diameter	Kontrol positif	6	23,8983	1,41082	,57597
	Sampel	6	7,3967	1,39183	,56821

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Diameter	Equal variances assumed	,104	,753	20,396	10	,000	16,50167	,80907	14,69894	18,30440
	Equal variances not assumed			20,396	9,998	,000	16,50167	,80907	14,69889	18,30444

Lampiran 6 : Halaman Riwayat Hidup**DATA PRIBADI**

Nama Lengkap	Program Studi
Beta Putri Ananda	Farmasi
Tempat, Tanggal Lahir	Alamat
Situbondo, 02 Juni 1999	Kendit-Situbondo
Jenis Kelamin	Email
Perempuan	<u>anandabetaaja@gmail.com</u>
Agama	
Islam	
Instansi	
Universitas dr. Soebandi	

RIWAYAT PENDIDIKAN**FORMAL**

1. Tahun 2005-2006 : TK Muslimat NU
2. Tahun 2007-2012 : SDN 2 Kendit
3. Tahun 2013-2015 : SMP Nurul Jadid
4. Tahun 2016-2018 : SMA Nurul Jadid
5. Tahun 2018-sekarang : Universitas dr. Soebandi Jember