

**PENGARUH OPTIMASI “*GREEN SOLVENT NADES*”
EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao L.*)
TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes***

SKRIPSI



**Oleh :
Lia Rodiana Safitri
NIM 18040051**

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

**PENGARUH OPTIMASI “GREEN SOLVENT NADES”
EKSTRAK KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao L.*)
TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acnes***

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi



Oleh :
Lia Rodiana Safitri
NIM 18040051

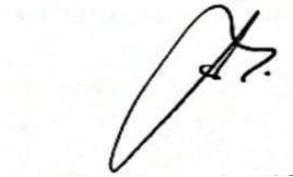
**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS dr. SOEBANDI
JEMBER
2022**

LEMBAR PERSETUJUAN

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

Jember, 7 November 2022

Pembimbing Utama



Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si
NIDN 0028077804

Pembimbing Anggota



Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN 0709129002

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul Pengaruh “*Optimasi Green Solvent Nades*” Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* telah diuji dan disahkan oleh tim penguji dan dekan Fakultas Ilmu Kesehatan pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 24 November 2022

Tempat : Program Studi Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember

Tim Penguji
Ketua

Dr. Moh Wildan, A. Per. Pen., M.Pd., MM
NIDN. 4021046801

Penguji II

Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si
NIDN. 0028077804

Penguji III

Aliyah Purwanti, M.Si
NIDN. 0709129002



Nella Mekdy Purwana, S.Kep., Ns., M.Kep.
NIDN. 0706109

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lia Rodiana Safitri

Nim : 18040051

Program Studi : Sarjana Farmasi Universitas dr. Soebandi Jember

Menyatakan bahwa Skripsi saya yang berjudul “Pengaruh Optimasi *Green Solvent Nades* Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*” adalah karya saya sendiri dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan suatu perguruan tinggi manapun. Selain itu, sumber informasi yang dikutip penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari ditemukan adanya kecurangan dalam penyusunan Skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Jember, 11 Januari 2023

Yang menyatakan



Lia Rodiana Safitri
NIM. 18040051

SKRIPSI

**PENGARUH OPTIMASI “*GREEN SOLVENT NADES*” EKSTRAK KULIT
BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BEKTERI
*Propionibacterium acnes***

Oleh:

Lia Rodiana Safitri

NIM. 18040051

Pembimbing:

Dosen Pemping Utama : Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si

Dosen Pembimbing Anggota : Aliyah Purwanti, M.Si

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya yang selalu memberikan kemudahan dan kelancaran sehingga penulis bisa menyelesaikan tugas akhir ini dengan tepat waktu.

Karya ilmiah ini saya persembahkan untuk :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Misnadi dan Ibu Ismiyati yang telah memberi segenap kasih sayang, do'a, dukungan, semangat dan support sehingga saya dapat menyelesaikan studi dan tugas akhir ini dengan tepat waktu.
2. Kakak tercinta Eka Siswanti, kakak ipar Rizky Prayogi, Adik Wanda Dia Tri Anggareini yang telah memberi motivasi, nasehat, semangat dalam mengerjakan tugas akhir ini.
3. Ibu Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si, Ibu Aliyah Purwanti, M.Si, Bapak Dr. Moh. Wildan, A.Per.Pen., MPd.,MM yang telah memberikan bimbingan, nasihat, saran dan dukungan dalam penyusunan tugas akhir ini.
4. Segenap civitas akademik kampus Universitas dr. Soebandi Jember dan seluruh mahasiswa yang telah membimbing saya dan memberikan semangat selama menempuh pendidikan di kampus.
5. Ananda Dendis Melangga Pandu Saputra yang telah bersedia memberi semangat, arahan, tempat berdiskusi dan berkeluh kesah dalam penyusunan tugas akhir ini.

6. Teman-teman, Sahabat yang telah banyak memberi masukan, arahan dan semangat hingga akhirnya dapat terselesaikan tugas akhir ini.
7. Pada diri sendiri yang mampu bertahan, kuat untuk menyemangati diri sendiri sampai detik ini.
8. Almamater tercinta Universitas dr. Soebandi Jember

MOTTO

“ Skripsi tidak akan selesai apabila kamu hanya memikirkannya, ayo take action jangan menjadi pemalas dan penakut karena ada harapan besar orang tua diatas pundakmu”

(Lia Rodiana Safitri)

“ Kecerdasaan bukan penentu kesuksesan, tapi kerja keraslah yang merupakan penentu kesuksesanmu yang sebenarnya”

“Cukuplah Allah menjadi penolong kami dan Allah adalah sebaik-baiknya Pelindung”

(QS. Al Imran: 73)

ABSTRAK

Safitri, Lia R* Ulfa, Evi U** Purwanti, Aliyah*** .2022. Pengaruh Optimasi “Green Solvent NADES” Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. Skripsi. Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi.

Latar Belakang : Jerawat adalah penyakit kulit akibat peradangan kronis dengan patogenosis kompleks. *P. acnes* merupakan bakteri gram positif yang memiliki bentuk batang dan paling banyak menyebabkan jerawat. Pentingnya mengekstraksi dengan menggunakan pelarut NADES. Senyawa aktif pada kulit buah kakao dapat diekstraksi menggunakan pelarut ramah lingkungan seperti pelarut NADES. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

Metode : Jenis penelitian yang digunakan adalah studi eksperimental laboratorium dengan metode ekstraksi *Ultrasonic Assited extraction* (UAE) menggunakan pelarut NADES asam sitrat:glukosa dari sampel kulit buah kakao. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode sumuran dengan tiga macam rasio pelarut sebesar 4:1, 5:1, 6:1 dan replikasi sebanyak 5 kali. Analisa statistik menggunakan *One Way ANOVA*.

Hasil Penelitian : Berdasarkan penelitian, didapatkan rata-rata zona hambat pada setiap rasio sampel ekstrak kulit buah kakao. Pada rasio pelarut 4:1 memperoleh rata-rata 19,606 mm, rasio pelarut 5:1 dengan rata-rata 22,246 mm sedangkan rasio pelarut 6:1 terdapat rata-rata 24,51 mm kontrol positif 20,492 mm. Sedangkan sampel yang mempunyai zona hambat paling besar yaitu rasio pelarut 6:1. Pada hasil uji skrining fitokimia ekstrak kulit buah kakao mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin.

Kesimpulan : semakin tinggi rasio pelarut ekstrak kulit buah kakao maka semakin tinggi zona hambat pada bakteri *Propionibacterium acnes*. Semua ekstrak NADES kulit buah kakao mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin.

Kata Kunci : Kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.), antibakteri, *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE), *Propionibacterium acne*

*Peneliti

**Pembimbing 1

***Pembimbing 2

ABSTRACT

Safitri, Lia R* Ulfa, Evi U** Purwanti, Aliyah*** .2022. Effect of “*Green Solvent NADES*” Optimization of Cocoa Fruit Peel Extract (*Theobroma cacao* L.) Against *Propionibacterium acnes* Bacteria. Thesis. Bachelor of Pharmacy Study Program, Faculty of Health Sciences, University of dr. Soebandi.

Background: Acne is a skin disease due to chronic inflammation with a complex pathogenesis. *P. acnes* is a gram-positive bacteria that has a rod shape and is the most common cause of acne. The importance of extracting using NADES solvent. Active compounds in cocoa pod skin can be extracted using environmentally friendly solvents such as NADES solvent. This study aimed to test the antibacterial activity of cocoa pod peel extract (*Theobroma cacao* L.) against *Propionibacterium acnes* bacteria.

Methods: The type of research used is a laboratory experimental study with the *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) method using NADES citric acid:glucose as a solvent from cocoa pod skin samples. The antibacterial activity was tested using the well method with three different ratios solvent of 4:1, 5:1, 6:1 and 5 times replication. Statistical analysis using *One Way* ANOVA.

Research Results: Based on the results obtained, the average zone of inhibition in each ratio of the cocoa sump peel extract sample was obtained. At a ratio solvent of 4:1, the average was obtained 19,606 mm the ratio solvent was 5:1 with an average 22,246 mm while the ratio solvent of 6:1 contained an average 24,51 mm positive control of 20,492 mm. While the sample that has the largest inhibition zone is a ratio solvent of 6:1. On the results of the phytochemical screening test cocoa pod extract contains alkaloid, flavonoid, tanin, and saponin.

Conclusion: the higher the ratio solvent of cocoa pod peel extract, the higher the inhibition zone for *Propionibacterium acnes* bacteria. All NADES extracts of cacao pods contain compounds alkaloid, flavonoid, tanin, saponin.

Keywords: Cocoa pod (*Theobroma cacao* L.), antibacterial, *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE), *Propionibacterium acne*

*Researcher

**Supervisor 1

***Supervisor 2

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmad dan hidayah-ya sehingga penyusun skripsi ini dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu persyaratan menyelesaikan pendidikan Program Sarjana Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas dr. Soebandi Jember dengan berjudul Pengaruh Optimasi “*GREEN SOLVENT NADES*” Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*.

Selama proses penyusunan skripsi ini penulis dibimbing dan dibantu oleh 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.Kep. 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. Ibu Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama
5. Ibu Aliyah Purwanti, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota
6. Bapak Dr. Moh. Wildan, A. Per. Pen., M.Pd.,MM selaku Ketua Penguji

Semoga amal kebaikan diterima Allah SWT. Dalam penyusunan tugas akhir ini penulis menyadari masih jauh dari kesempurnaan untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dimasa mendatang.

Jember, 2022

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI	v
SKRIPSI	vi
PERSEMBAHAN	vii
MOTTO	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 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 Institusi	7
1.4.3 Bagi Masyarakat	7
1.5 Keaslian Penelitian	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L)	10
2.1.1 Definisi Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	10

2.1.2	Morfologi Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	11
2.1.3	Klasifikasi Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	13
2.1.4	Kandungan Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	14
2.2	<i>Propionibacterium acnes</i>	15
2.2.1	Klasifikasi <i>Propionibacterium acnes</i>	15
2.2.2	Morfologi <i>Propionibacterium acnes</i>	16
2.2.3	Karakteristik <i>Propionibacterium acnes</i>	16
2.3	Ekstraksi.....	18
2.3.1	Definisi ekstraksi	18
2.3.2	Tujuan Ekstraksi	19
2.3.3	Metode Ekstraksi	20
2.4	Pelarut	23
2.4.1	<i>Natural Deep Eutectic Solvents</i> (NADES)	24
2.4.2	Asam Sitrat	25
2.4.3	Glukosa	26
2.5	Antibakteri	26
BAB 3.	KERANGKA KONSEP.....	30
3.1	Kerangka Konsep.....	30
3.2	Hipotesis	31
BAB 4.	METODE PENELITIAN.....	32
4.1	Desain Penelitian	32
4.2	Populasi dan Sampel.....	32
4.2.1	Populasi.....	32
4.2.2	Sampel	32
4.3	Variabel Penelitian.....	32
4.4	Tempat Penelitian	33
4.5	Waktu Penelitian.....	33
4.6	Definisi Operasional	33
4.7	Pengumpulan Data.....	34
4.7.1	Determinasi Tanaman	34
4.7.2	Pengolahan Serbuk Simplisia	34

4.7.3	Preparasi NADES	35
4.7.4	Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) 35	
4.7.5	Skrining Fitokimia	36
4.7.6	Persiapan Media.....	37
4.7.7	Preparasi Antimikroba	38
4.8	Teknik Analisa Data	39
BAB 5.	HASIL PENELITIAN	41
5.1	Determanasi Tanaman	41
5.2	Ekstraksi.....	41
5.3	Skrining Fitokimia	41
5.4	Uji Antibakteri	43
5.5	Analisa Data.....	45
BAB 6.	PEMBAHASAN	48
6.1	Determinasi Tanaman	48
6.2	Pengumpulan dan Pengeringan Kulit Buah Kakao.....	48
6.3	Ekstraksi Kulit Buah Kakao	49
6.4	Skrining Fitokimia	50
6.5	Uji Antibakteri	53
BAB 7.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
7.1	Kesimpulan	59
7.2	Saran	59
DAFTAR PUSTAKA		60

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian.....	7
Tabel 4. 1 Definisi Operasional	34
Tabel 5. 1 Hasil Uji Skrining Fitokimia Rasio 4:1, 5:1, 6:1	42
Tabel 5. 2 Hasil Pengujian Esktrak Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)....	44
Tabel 5. 3 Uji Normalitas.....	45
Tabel 5. 4 Uji Homogenitas	46
Tabel 5. 5 Uji one way ANOVA.....	46
Tabel 5. 6 Uji <i>post-hoc</i> Duncan	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bunga Kakao	12
Gambar 2.2 Daun (folium) kakao	12
Gambar 2.3 Buah kakao (<i>Theobroma cacao L</i>)	13
Gambar 2.4 <i>Propionibacterium acnes</i> di Bawah Mikroskop.....	15
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Uji Aktivitas Antibakteri	30
Gambar 5. 1 Hasil antibakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Determinasi Tanaman Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	67
Lampiran 2 <i>Mc Farland</i>	68
Lampiran 3 Hasil Uji Stastik.....	69
Lampiran 4 Dokumentasi	70

DAFTAR SINGKATAN

- UAE : *Ultrasonic Assited Extraction*
MAE : *Microwave Assited Extraction*
NADES : *Natural Deep Eutectic Solvents*
NA : *Nutrient Agar*
MHA : *Muller Hinton Agar*

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) termasuk tanaman tahunan yang tergolong dalam kelompok tanaman *caulofloris*, yaitu tanaman yang berbunga dan berbuah pada batang dan cabang. Tanaman ini pada garis besarnya dapat dibagi atas dua bagian, yaitu bagian vegetatif yang meliputi akar, batang, daun dan bagian generatif yang meliputi bunga dan buah (Laurenze, 2021).

Habitat asli tanaman kakao adalah hutan tropis dengan naungan pohon-pohon yang tinggi, curah hujan tinggi, suhu sepanjang tahun relatif sama, serta kelembaban tinggi yang relatif tetap. Dalam habitat seperti itu, tanaman kakao akan tumbuh tinggi tetapi bunga dan buahnya sedikit. Jika dibudidayakan di kebun, tinggi tanaman umur tiga tahun mencapai 1,8 – 3,0 meter dan pada umur 12 tahun dapat mencapai 4,50 – 7,0 meter (Syakir, 2010).

Buah kakao terdiri atas tiga komponen terbesar yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Biji merupakan salah satu bagian dari buah kakao yang paling banyak dimanfaatkan. Biji kakao baik untuk kesehatan maupun makanan. Penelitian Mulyatni, dkk (2012) menyatakan bahwa saat panen, umumnya petani memanen biji kakao untuk diolah menjadi coklat, dan menghasilkan limbah kulit buah kakao yang cukup banyak. Kulit buah kakao belum banyak dimanfaatkan. Kulit buah kakao ini biasanya dibuang di area perkebunan sebagai sampah atau limbah yang dapat menyebabkan bau busuk yang menyengat dan menimbulkan penyakit pada tanaman kakao yang sehat. Pemanfaatan kulit buah kakao saat ini hanya sebatas dijadikan pupuk kompos serta bahan pakan ternak saja (Jusmiati *et al.*,

2015). Minimnya pemanfaatan kulit buah kakao akan menimbulkan masalah ketika produksi kakao terus meningkat karena limbah kulit buah kakao juga akan semakin meningkat, maka dibutuhkan inovasi baru yang dapat memaksimalkan pengolahan kulit buah kakao.

Wahyudi dan Pujianto (2015) menyatakan bahwa pada kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) mengandung senyawa fitokimia berupa katekin jenis flavonoid, teobromin, tanin, dan saponin yang efektif digunakan sebagai penghambat pertumbuhan mikroba. Senyawa polifenol pada kulit buah kakao telah diteliti banyak mengandung berbagai komponen bioaktif yang sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia karena memiliki sifat antimikroba terhadap bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* (Wardiana, 2015).

P. acnes dan *S. epidermidis* merupakan bakteri yang berperan dalam pembentukan jerawat yang merupakan anggota flora kulit dan selaput lendir manusia. Bakteri ini ikut serta dalam fotogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase, yang dapat memecah asam lemak bebas dari lipid kulit (Sari *et al.*, 2010). Inflamasi yang terjadi dapat memicu terbentuknya jerawat (Adha dan Ibrahim, 2021). Jerawat merupakan penyakit yang sering terjadi pada permukaan kulit wajah, leher, dada dan punggung. Jerawat muncul pada saat kelenjar minyak kulit terlalu aktif, sehingga pori-pori kulit akan tersumbat oleh timbunan lemak yang berlebihan (Saraswati, 2015). Pada kulit normal, *P. acnes* tidak bersifat patogen. Bakteri ini akan bersifat patogen dan invasif ketika terjadi perubahan kondisi pada kulit (Adha dan Ibrahim, 2015). Tingginya suhu di negara beriklim tropis

menyebabkan sering terjadinya perubahan kondisi pada kulit berupa peningkatan kadar lemak. Produksi kadar lemak meningkat, maka jumlah *P. acnes* semakin banyak. Hal tersebut dikarenakan *P. acnes* berperan dalam proses degradasi asam lemak (Adha dan Ibrahim, 2021). Sejauh ini pengobatan jerawat ringan dan sedang dilakukan dengan memberikan kombinasi retinoidtopical, benzoil peroksida dan obat antibiotika. Retinoid topical erupakan turunan vitamin A yang efektif untuk mengatasi deskuamasi pada lesi komedo dengan cara mengurangi obstruksi folikel sehingga mengurangi resiko ruptur dan lesi inflamasi. Benzoil peroksida dapat mengurangi terbentuk asam lemak bebas, meningkatkan deskuamasi folikuler dan mengurangi terbentuknya plak folikel. Antibiotik, seperti doksisisiklin, eritromisin dan klindamisin berfungsi menghambat perkembangan mikroba dan mengurangi asam lemak bebas. Penggunaan antibiotika secara terus-menerus dapat menyebabkan timbulnya *P. acnes* resisten. Antibiotik topikal juga dapat ditoleransi dengan baik, tetapi sebaiknya tidak digunakan secara monoterapi yang sering menyebabkan resistensi (Sibero, 2019).

Jerawat dengan koloni *P. acnes* yang resisten terhadap antibiotik memiliki respons terapi yang lebih buruk bila dibandingkan jerawat dengan *P. acnes* yang masih sensitif. Kondisi ini menyebabkan perlunya eksplorasi sumber senyawa bioaktif pada bahan alam (Hindritiani *et al.*,2017). Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat berhubungan dengan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan (Lorenzo *et al.*,2015). Metabolit sekunder tersebut mengandung senyawa antibakteri. Sehingga dapat dimanfaatkan sehingga sumber antimikroba baru (Lestari *et al.*, 2021).

Ekstraksi merupakan salah satu penyarian atau pengambilan senyawa bioaktif dari simplisia menggunakan pelarut tertentu. Pada senyawa bioaktif yang terkandung dalam suatu bahan dapat diperoleh dengan cara ekstraksi (Sekarsari *et al.*, 2019). Pada 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 (Verawati *et al.*, 2020).

Oleh karena itu, sangat penting untuk dilakukan pengembangan metode ekstraksi dalam rangka pemanfaatan kulit buah kakao.

Pengembangan metode ekstraksi diharapkan secara selektif dapat menarik senyawa-senyawa metabolit sekunder target secara optimal. Salah satu metode yang dikembangkan adalah pengembangan metode ekstraksi berbasis *green chemistry* dengan penggunaan pelarut hijau *Natural Deep Eutectic Solvent* (NADES). Dilihat dari segi sifat fisikokimianya, NADES memiliki beberapa keuntungan yang tidak dimiliki oleh pelarut organik konvensional diantaranya memiliki sifat stabil pada suhu tinggi, tidak mudah menguap, tidak toksik, ramah lingkungan (Gomez dan Espino, 2018), dan *food grade* (Ahmad *et al.*, 2018). Beberapa penelitian telah melaporkan tentang penggunaan NADES sebagai pelarut alternatif seperti ekstraksi kafein dan polifenol dari biji kopi (Ahmad *et al.*, 2018). Namun sejauh ini masih belum ada yang melaporkan tentang penggunaan pelarut NADES pada proses ekstraksi kulit buah kakao.

Pada penelitian ini, penggunaan NADES sebagai pelarut hijau yang dikombinasikan dengan metode ekstraksi non konvensional berbantu dengan

Ultrasound Assisted Extraction (UAE), diharapkan dapat diperoleh kondisi ekstraksi yang efisien, mudah, cepat, dan ramah lingkungan. Pada metode UAE, memiliki beberapa keuntungan dimana proses ekstraksi konsumsi pelarut pelarut dan energi yang rendah, serta pengurangan suhu dan waktu ekstraksi (Ahmad *et al.*, 2018).

Berdasarkan latar belakang di atas dan beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap ekstrak kulit buah kakao, sejauh ini banyak penelitian yang melakukan ekstrak kulit buah kakao dengan menggunakan pelarut etanol 96% 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 itu peneliti tertarik untuk melakukan pengujian antibakteri dengan ekstrak kulit buah kakao dengan menggunakan pelarut NADES dengan metode UAE (*Ultrasonic Assisted Extraction*) terhadap kandungan senyawa kimia ekstrak kulit buah kakao terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh rasio pelarut asam sitrat:glukosa dalam proses ekstraksi kulit buah kakao dengan metode UAE terhadap kandungan senyawa kimia ekstrak kulit buah kakao?

2. Bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao dengan menggunakan pelarut asam sitrat:glukosa dengan metode UAE terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh rasio pelarut asam sitrat:glukosa dalam proses ekstrak kulit buah kakao terhadap bakteri *P. acnes*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh rasio pelarut asam sitrat:glukosa dalam proses ekstraksi kulit buah kakao dengan metode UAE terhadap kandungan senyawa kimia.
2. Untuk mengetahui pengaruh rasio pelarut asam sitrat:glukosa dalam proses ekstraksi kulit buah kakao dengan metode UAE terhadap aktivitas antibakteri khususnya terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Menambah pengetahuan dan wawasan tentang ekstrak kulit buah kakao menggunakan pelarut asam sitrat:glukosa dengan metode UAE dalam pertumbuhan bakteri *P. acnes*.

1.4.2 Bagi Institusi

Manfaat penelitian ini bagi institusi pendidikan adalah dapat memberikan informasi tentang Pengaruh Optimasi *Green Solvent Nades* Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dari hasil penelitian diharapkan agar dapat dijadikan sebagai salah satu informasi serta dapat jadi bahan acuan penelitian selanjutnya.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat adalah menjadi bukti bahwa kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat mengobati jerawat setelah dilakukan uji lebih lanjut melalui uji-uji praklinis maupun klinis.

1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1.1 Keaslian Penelitian

Nama Penulis	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Agustin Sri Mulyatni (2012)	Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap <i>Escherichia coli</i> , <i>bacillus subtilis</i> , dan <i>Stahpylococcu aureus</i>	Ekstraksi kulit buah kakao dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Analisis aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode cakram kertas. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan factor tunggal konsenterasi ekstrak, yaitu 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, dan 64% (g/mL), masing-masing dengan tiga kali ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao berpotensi sebagai antibakteri <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , dan <i>E. coli</i> , dengan KHM berturut-turut adalah 8% (g/mL), 16% (g/mL), dan 32% (g/mL).
Selvira Dwi	Aktivitas Antibakteri	Ekstrak kulit buah kakao diekstraksi

Adha dan Muslimin Ibrahim (2021)	Ekstrak Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) terhadap Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	dengan menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Metode sumuran digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri. Dengan diperoleh hasil terbentuknya zona hambat dengan diameter paling besar dihasilkan oleh konsentersasi 100% dengan rata-rata sebesar $3,25 \pm 0,33$ cm dan diameter zona hambat paling kecil dihasilkan oleh konsentersasi 25% dengan rata-rata sebesar $1,38 \pm 0,41$ cm.
Helda Dwiya Lestari dan Mahanani Tri Asri (2021)	Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) Terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ekstrak kulit buah kakao diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dengan menggunakan metode sumuran. Rerata clear zone yang dihasilkan konsentersasi 25% dan 50% menunjukkan ada perbedaan nyata setiap perlakuan, sedangkan konsentersasi 75% dan 100% tidak menunjukkan perbedaan nyata. Konsentersasi terbaik yang didapatkan adalah 75% dan 100% dengan masing-masing reratazone hambat, yaitu $2,85 \pm 0,42$ cm dan $3,13 \pm 0,43$ cm.
(Mashuni <i>et al.</i> , 2019)	Pemanfaatan Kulit Buah Kakao sebagai Antibakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan zat antibakteri dari asap cair dengan metode pirolisis KBK. Metode penelitian ini meliputi preparasi dengan pengeringan bahan baku KBK Selma 5-7 hari kemudian dilakukan pada suhu 385-500°C dengan kecepatan alir pemanasan 6°C/menit. crude asap cair yang diperoleh difiltrasi dan didestilasi fraksinasi untuk menghasilkan asap cair yang lebih jernih. Uji antibakteri asap cair KBK dilakukan menggunakan metode dilusi dengan variasi konsentersasi asap cair yaitu 5, 7, 10, dan 15%. TPC asap cair KBK sebesar 1,035g/L. asap cair

		menunjukkan adanya senyawa: asam asetat, metil glikosal, piridin, 4-metil-piridin, 4-[2(metilamino) etil]-fenol. Hasil analisis konsentersasi hambat minimum (KHM) asap cair KBK terhadap bakteri <i>Esherichia Coli</i> dan <i>Sthapylococcus aureus</i> didapatkan pada konsentersasi 15%.
Nur Fatdliyah Eka Yulianti, Peni Indrayudha, Rima Munawaroh (2013)	Aktivitas AntibakteriI dan Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Terhadap <i>Streptococcus mutanssss</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>	Kulit buah kakao dimaserasi dengan aseton sehingga didapat ekstrak aseton kulit buah kakao. Fraksi diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao mempunyai aktivitas antibakteri terhadap <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Bacillus subtilis</i> pada konsentersasi 3,0-5,0 mg/disk. Konsentersasi minimum 3,0mg/disk memberikan zona hambat 10,00±0,58mm terhadap <i>Bacillus subtilis</i> serta 9,58±0,38mm terhadap <i>streptococcus mutans</i> .

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L)

2.1.1 Definisi Kakao (*Theobroma cacao* L)

Tanaman kakao adalah tanaman yang ditanam secara garis besar tanaman kakao dibedakan menjadi tiga jenis yaitu *Forastero*, *Criollo* dan *Triinitario* yang merupakan hasil persilangan antara *Forastero* dan *Criollo*. Varietas kakao hibrida adalah varietas *Trinitario* yang memiliki kapasitas produksi lebih tinggi dibandingkan varietas *Criollo* dan *Forastero* (Surti, 2012). Varietas kakao yang digunakan adalah varietas F1 campuran. Hibrida F1 merupakan bagian dari upaya Puslitbang Kopi dan Kakao untuk mendapatkan varietas kakao berkualitas tinggi yang unggul dan tahan terhadap penyakit busuk buah kakao yang disebabkan oleh infeksi *Phytophthora palmi*, diperlukan tetua donor yang memiliki sifat tahan dan tetua resipien yang berdaya hasil tinggi (Siregar *et al.*, 2011).

Tanaman kakao dari biji yang berhenti tumbuh dan membentuk *jorkette* setelah mencapai ketinggian 0,9 – 1,5 m. Jorket adalah tempat percabangan dari pola percabangan ortotropik hingga miring dan hanya khas pada tanaman kakao. Pembentukan jorket didahului dengan berhentinya pertumbuhan pucuk orthotropic, karena segmen-segmen ini tidak memanjang. Di ujung pucuk, stipula (sejenis sisik pada kuncup bunga) dan ketiak serta kuncup daun tidak berkembang. Dari ujung titik dok akan tumbuh 3-6 pucuk, miring ke samping, membentuk sudut 0-60° dengan horizontal. Cabang-cabang ini disebut cabang primer (cabang miring). Tunas primer kemudian berkembang menjadi tunas

samping (kipas) yang memungkinkan tanaman membentuk tajuk yang rapat (Puslitbang Perkebunan, 2010).

Selain itu, kulit buah kakao yang direndam dalam tanah dapat berfungsi sebagai penambah nutrisi. Namun pada umumnya buah kakao yang dihasilkan dari pemanenan biji kakao dari buah yang masak hanya akan membusuk di sekitar area tanam kakao. Hal ini dapat menyebabkan munculnya hama pada saat proses pembusukan tanaman kakao, yang dapat mengganggu kelangsungan hidup tanaman kakao itu sendiri (Sari *et al.*, 2012).

Beberapa penelitian pun telah dilakukan untuk memanfaatkan kulit buah kakao yang telah menjadi limbah tersebut seperti aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. Potensi dan pemanfaatan kulit buah kakao sebagai pakan alternatif ternak ruminansia. Namun peluang pemanfaatannya belum bisa memaksimalkan potensi limbah kulit buah kakao untuk dikelola. Peneliti lainnya melaporkan bahwa kulit buah kakao mengandung senyawa aktif lainnya yang dapat dikembangkan seperti senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin.

2.1.2 Morfologi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L)

Bunga kakao terdapat berwarna putih, ungu atau kemerahan. Warna bunga ini khas untuk setiap kultivar. Tangkai bunga kecil tetapi panjang (1-1,5 cm). Daun mahkota panjangnya 6-8 mm, terdiri atas dua bagian. Bagian pangkal berbentuk seperti kuku binatang (claw) dan biasanya terdapat dua garis merah. Bagian ujungnya berupa lembaran tipis, fleksibel, dan berwarna putih (Winda Sary, 2020).



Gambar 2.1 Bunga Kakao (Rahardjo, 2011)

Daun kakao juga bersifat dimorfisme. Pada tunas ortotrop, tangkai daunnya panjang, yaitu 7,5-10 cm sehingga pada tunas plagiotrop panjang tangkai daunnya hanya sekitar 2,5 cm. Tangkai daun bentuknya silinder dan bersisik halus, bergantung pada tipenya. Salah satu sifat khusus daun kakao yaitu adanya dua persendian (articulation) yang terletak di 7 pangkal dan ujung tangkai daun. Dengan persendian ini dilaporkan daun mampu membuat gerakan untuk menyesuaikan dengan arah datangnya sinar matahari (Lamaga, 2018).



Gambar 2.2 Daun (folium) kakao (Elna Karmawati, 2010)

Warna buah kakao sangat beragam, tetapi biasanya hanya ada dua macam warna. Buah yang ketika muda berwarna hijau atau hijau agak putih jika sudah masak akan berwarna kuning. Sementara itu, buah yang ketika muda berwarna merah, setelah masak berwarna jingga. Kulit buah memiliki 10 alur dalam dan

dangkal yang letaknya berselang-seling. Pada tipe criollo dan trinitario alur kelihatan jelas, kulit buahnya tebal tetapi lunak dan permukaannya kasar. Sebaliknya, pada tipe forastero, permukaan kulit halus; tipis, tetapi liat. Buah akan masak setelah berumur enam bulan. Biji tersusun dalam lima baris mengelilingi poros buah. Jumlahnya beragam, yaitu 20 – 50 butir per buah (Sagara, 2022).



Gambar 2.3 Buah kakao (*Theobroma cacao L*) (Rhamadan, 2019)

2.1.3 Klasifikasi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L*)



Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L*) (Rhamadan, 2019)

Klasifikasi tanaman kakao adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Subkingdom : Tracheobionta
- Superdivision : Spermatophyta
- Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida
Subclass : Dilleniidae
Order : Malvales
Family : Sterculiaceae
Genus : *Theobroma* L
Species : *Theobroma cacao* L

(Sumber: USDA,2018)

2.1.4 Kandungan Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L)

Biji kakao mengandung lemak, air, glukosa, pati, pectin, serat, selulosa, pentose, gum,tannin, asam organic (asetat dan oksalat), theobromin dan kafein. Kulit buah kakao mengandung flavonoid, tanin theobromine, pectin,dan lignin (Azizah, *et al.*, 2012).

Menurut hasil penelitian Irawati, (2013) kulit buah kakao mengandung fenolik seperti tannin, pirogalol, epikatekin-3-galat, kuersetin dan resorsinol. Kulit buah kakao juga memiliki kandungan senyawa kimia alkaloid, flavonoid, tannin, dan saponin (Azizah *et al.*, 2014).

a. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik yang memiliki atom nitrogen dan mempunyai sifat basa sehingga dapat menyebabkan koagulasi protein pada sel bakteri, sehingga dapat menyebabkan penghambatan dalam pertumbuhan bakteri (Mulyatni *et al.*, 2016).

b. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang akan membentuk ikatan kompleks dengan protein sehingga dapat merusak membran sel sehingga dapat menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler (Lamaga, 2018).

c. Tanin

Senyawa tanin merupakan senyawa polifenol yang dapat mengikat protein pada dinding sel bakteri sehingga dapat menghambat pembentukan dinding sel dan dapat mengganggu permeabilitas pada membran sel (Kayaputri, 2014).

d. Saponin

Senyawa saponin merupakan senyawa yang berikatan dengan membran sel sehingga dapat mengubah struktur dan fungsi pada membran yang dapat menyebabkan denaturasi protein akibatnya terjadi lisis (Suparjo, 2010).

2.2 *Propionibacterium acnes*

2.2.1 Klasifikasi *Propionibacterium acnes*



Gambar 2.4 *Propionibacterium acnes* di Bawah Mikroskop dengan Pembesaran 100x (Abate,2013)

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Actinobacteria*

Class : *Actinomycetales*
Oreder : *Propionibacteriae*
Family : *Propionibacteriaceae*
Genus : *Propionibacterium*
Species : *Propionibacterium acnes* (Narulita.windy, 2017).

2.2.2 Morfologi *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes adalah bakteri gram positif yang memiliki bantuk sel batang, panjang berkisar antara 1-1,5 μm , nonmotil, tidak membentuk spora dan dapat tumbuh di udara dan memerlukan oksigen mulai dari aerob atau anaerob fakultatif sampai ke anaerob. Sehingga, bakteri ini mampu melakukan fermentasi glukosa yang menghasilkan asam propionat dan asetat dalam jumlah banyak (Harjadi, 2014).

Propionibacteri acnes ikut serta patogenis jerawat dengan menghasilkan lipase dan mencegah asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam lemak ini dapat menimbulkan radang jaringan dan ikut menyebabkan jerawat. *Propionibacterium acnes* terkadang menyebabkan infeksi katub jantung prostetik dan pintas cairan serebrospinal (Dr. Vladimir, 1967).

2.2.3 Karakteristik *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes* memiliki karakteristik yang berkoloni kecil yang berwarna putih, permukaan halus dan konsistensi yang padat pada media *Blood Agar Plate* (BAP). Saat pewarnaan gram terlihat bakteri *Propionibacterium acnes* ini menunjukkan ciri-cirinya yaitu berbentuk batang yang tak beraturan dan terlihat pada perwarnaan gram menunjukkan bakteri tersebut

berwarna ungu yang menandakan bakteri ini termasuk golongan gram positif. Sifat bakteri ditentukan melalui uji biokimia, uji biokimia bakteri digunakan untuk mengetahui sifat-sifat bakteri terhadap berbagai macam zat. Hasil uji biokimia dari bakteri *Propionibacterium acnes* menunjukkan bakteri ini positif pada uji TSIA, uji Indol, uji simon dan uji katalase (Harjadi, 2014).

Uji TSIA adalah media differensial yang digunakan untuk menentukan fermentasi karbohidrat. Uji TSIA juga dapat mendeteksi adanya gas hasil dari metabolisme karbohidat. Bakteri *Propionibacterium acnes* menunjukkan positif fermentasi karbohidrat yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi kuning. Uji indol bertujuan untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri menghasilkan indol dengan menggunakan enzim *tryptophanase*. Bakteri *Propionibacterium acnes* memiliki enzim *tryptophanase* menghidrolisis tryptophan menjadi indol, piruvat dan ammonia. Uji simon sitrat ini bertujuan untuk mendeteksi kemampuan suatu organisme untuk memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber carbon dan energi. Bakteri *Propionibacterium acnes* memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon ditunjukkan dengan hasil positif pada uji simon sitrat. Uji katalasem digunakan untuk mengetahui kemampuan mikroorganisme untuk mengurangi hidrogen peroksida dengan menghasilkan enzim katalase. Hasil positif apabila terdapat gelembung udara, bakteri *Propionibacterium acnes* menunjukkan hasil yang positif pada uji katalase (Lestari, Sari, and Robiyanto, 2015).

2.3 Ekstraksi

2.3.1. Definisi ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa kimia dari simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai, metode ekstraksi yang digunakan tergantung pada jenis, sifat dan kimia kandungan senyawa yang akan diekstrak (Hanani, 2015). Proses ekstraksi pada dasarnya adalah proses perpindahan massa dari komponen zat padat yang terdapat pada simplisia ke dalam pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk ke dalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses ini terus berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif antara di dalam sel dengan konsentrasi diluar sel (Marjoni, 2016).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan cara yang sesuai dengan sifat dan tujuan ekstraksi itu sendiri. Sampel yang diekstraksi dapat berbentuk sampel segar ataupun sampel yang telah di keringkan. Sampel yang umum digunakan adalah sampel segar karena penetrasi pelarutan akan berlangsung lebih cepat. Selain itu, penggunaan sampel yang segar dapat mengurangi kemungkinan terbentuknya polimer resin atau artefak lain yang dapat terbentuk selama proses pengeringan. Penggunaan sampel kering juga memiliki kelebihan tersendiri yaitu dapat mengurangi kadar air yang terdapat di dalam sampel, sehingga dapat mencegah kemungkinan rusaknya senyawa akibat aktivitas anti mikroba (Marjoni, 2016).

2.3.2. Tujuan Ekstraksi

Tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik semua zat dan komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Menurut Marjoni (2016) dalam menentukan tujuan dari suatu proses ekstraksi, perlu diperhatikan beberapa kondisi dan pertimbangan berikut ini :

1. Senyawa kimia yang telah memiliki identitas

Senyawa kimia yang telah memiliki identitas, maka proses ekstraksi dapat dilakukan dengan cara mengikuti prosedur yang telah dipublikasikan atau dapat juga dilakukan sedikit modifikasi untuk mengembangkan proses ekstraksi.

2. Mengandung kelompok senyawa kimia tertentu

Dalam hal ini, proses ekstraksi bertujuan untuk menentukan kelompok senyawa kimia metabolit sekunder tertentu dalam simplisia seperti alkaloid, flavonoid, dan lain-lain. Metode umum yang dapat digunakan adalah studi pustaka dan untuk kepastian hasil yang kromatografi yang sesuai untuk kelompok senyawa yang tertentu.

3. Penemuan senyawa baru

Untuk isolasi senyawa kimia baru yang belum diketahui sifatnya dan belum pernah ditentukan sebelumnya dengan metode apapun maka, metode ekstraksi dapat dipilih secara random atau dapat juga dipilih berdasarkan penggunaan tradisional untuk mengetahui adanya senyawa kimia yang memiliki aktivitas biologi khusus.

2.3.3. 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) menyatakan ada beberapa metode ekstraksi konvensional yang sering digunakan dalam berbagai penelitian antara lain, yaitu:

a. Cara Dingin

1. Maserasi

Maserasi merupakan proses penyarian simplisia dengan cara perendaman menggunakan pelarut dengan sesekali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. 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.

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses penyarian simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyarian sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bertahan.

b. Cara Panas

1. Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
2. Soxhlet merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya di lakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
3. Digesti merupakan proses maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar) yaitu secara umum di lakukan pada temperatur 40-50°C.
4. Infus merupakan 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).
5. Dekoktasi merupakan proses infus pada waktu yang lebih lama ≥ 30 menit dan temperatur sampai titik didih air.

c. Ekstraksi Non-Konvensional

Selain metode ekstraksi panas dan dingin, terdapat ekstraksi non-konvensional sebagai berikut:

1. *Ultrasonic Assited Extraction* (UAE)

Ultrasonik merupakan metode ekstraksi non termal yang dapat meningkatkan laju transfer massa dan memecahkan dinding sel dengan *microfity* 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 rendah (Hendaratri dan Yuniati, 2019).

Ultrasonic Assited 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 Assited Extraction*) merupakan metode ekstraksi dengan memberikan getaran ultrasonik > 20kHz 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 Assited 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 dan radiasi *microwave* untuk memanaskan pelarut dengan cepat dan efisien. Teknologi ekstraksinya menggunakan aplikasi termal berdasarkan efisiensi produksi panas (pemanas selektif). Aplikasinya terdiri dari ekstraksi senyawa bernilai tinggi dari sumber alami, nutrasetikal, 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).

2.4 Pelarut

Dalam pemilihan jenis pelarut ada beberapa hal yang harus dipertimbangkan diantaranya adalah selektivitas, kemampuan pelarut dalam mengekstrak, toksisitas serta kemampuan pelarut dalam penguapan dan harga pelarut.

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).

2.4.1 *Natural Deep Eutectic Solvents (NADES)*

Deep Eutectic Solvents (DES) adalah pelarut baru seperti *Ionic liquids* (ILs), dengan karakteristik yang diinginkan seperti biaya rendah, kelarutan tinggi, potensi luas dan kompatibel dengan lingkungan. Disebut sebagai *Deep Eutectic Solvents* (DES) karena ketika dua komponen pembentuknya dicampur bersama dalam rasio yang tepat, maka titik eutektik akan terjadi. Pelarut DES termasuk ILs dengan mencampurkan garam amonium kuaterner tersubstitusi dan donor ikatan hidrogen, keduanya memiliki titik leleh yang tinggi, untuk membentuk campuran eutektik dengan titik peleburan yang jauh lebih rendah (Leron dkk., 2012). DES yang paling umum didasarkan pada kolin klorida (ChCl), asam karboksilat, dan donor ikatan hidrogen lainnya, seperti urea, asam sitrat, asam suksinat, dan gliserol (Craveiro dkk., 2016).

Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) merupakan pelarut alternatif yang ramah lingkungan. Potensi penggunaan pelarut NADES dapat diaplikasikan dalam proses ekstraksi (misalnya perasa makanan, pewangi, pewarna, obat-obatan, kosmetik, dan bahan kimia pertanian), kimia organik sintesis, dan reaksi enzimatis. NADES menyajikan sifat yang baik untuk digunakan sebagai pelarut ekstraksi alternatif, seperti cair pada suhu kamar dan terkadang bahkan di bawah 0°C, memiliki viskositas yang dapat diatur dengan mudah, dan berkelanjutan serta aman (Choi dkk., 2011; Paiva dkk., 2014).

Dari perspektif lingkungan dan ekonomi, NADES juga menawarkan banyak keuntungan yang mencolok termasuk kemampuan terurai secara hayati, keberlanjutan, biaya rendah dan persiapan yang sederhana. Semua sifat ini membuatnya menarik untuk aplikasi di bidang yang berhubungan dengan kesehatan seperti farmasi, makanan, dan kosmetik. Penggunaan pelarut NADES telah digunakan untuk melarutkan DNA, sebagai media reaksi enzim, biotransformasi dan ekstraksi fenolat (Dai dkk., 2015).

2.4.2 Asam Sitrat

Asam sitrat merupakan asam organik lemah yang ditemukan di daun dan buah tumbuhan. Asam sitrat terdapat pada berbagai jenis buah dan sayuran, namun ditemukan pada konsentrasi tinggi hingga dapat mencapai bobot 8% kering. Sifat asam sitrat yang tidak beracun, dapat mengikat logam-logam berat, (besi maupun bukan besi) dan dapat menimbulkan rasa yang menarik. Rumus kimia Asam sitrat adalah $C_6H_8O_7$. Struktur asam ini tercermin pada nama IUPACnya, asam 2-hidroksi-1,2,3-propanatrikarboksilat. Keasamaan Asam Sitrat didapat dari tiga gugus karboksil $COOH$ yang dapat melepas proton dalam larutan. Jika hal ini terjadi yang dihasilkan adalah ion sitrat (Murningsih, 2019).

Penambahan asam sitrat dapat mengkondisikan pH asam pada larutan sehingga dapat menghasilkan ekstrak pigmen yang lebih banyak (Riffkowaty et al., 2018). Asam laktat, asam asetat, asam sitrat, asam suksinat, asam malat, asetaldehid, diasetil dan asetoin merupakan senyawa-senyawa yang dapat menaikkan dan menstabilkan aktivitas antioksidan (Murningsih, 2019).

2.4.3 Glukosa

Glukosa ($C_6H_{12}O_6$), suatu gula monosakarida yang merupakan hasil akhir dari proses metabolisme karbohidrat didalam tubuh. Glukosa adalah salah satu karbohidrat yang digunakan sebagai sumber tenaga. Gula sederhana seperti glukosa (yang diproduksi dari sukrosa dengan enzim atau hidrolisis asam) menyimpan energi yang akan digunakan oleh sel. Dalam bentuk glukosa, maka karbohidrat diabsorpsi melalui dinding usus dan dikonversi didalam hati (Faridah, 2014).

Glukosa ini gunanya untuk dibakar agar mendapatkan kalori atau energi. Sebagian glukosa yang ada dalam darah adalah hasil penyerapan dari usus dan sebagian lagi dari hasil pemecahan simpanan energi dalam jaringan. Glukosa yang ada dalam usus bisa berasal dari glukosa yang kita makan atau bisa juga hasil pemecahan zat tepung yang kita makan dari nasi, ubi, jagung, kentang, roti atau dari yang lain. Kadar glukosa yang tinggi sangat berbahaya bisa menyebabkan berbagai masalah serius seperti tekanan darah tinggi, penyakit jantung, gangguan ginjal dan kebutaan. Jika tidak diobati dengan benar, kadar glukosa dapat dapat menyebabkan kematian. Hiperglikemi dapat dikontrol melalui tatalaksana pola makan, olah raga dan pengobatan.

2.5 Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba yang dapat menghambat pertumbuhan atau dapat dapat membasmi jenis mikroba lain. Pada uji ini, yang akan diukur adalah respon pertumbuhan populasi mikroorganisme

terhadap agen antibakteri. Salah satu manfaat dari uji antibakteri adalah diperolehnya satu system pengobatan yang efektif dan efisien. Beberapa cara pengujian antibakteri adalah sebagai berikut:

a. Metode Difusi

Pada metode ini, penentuan aktivitas didasarkan pada kemampuan difusi dari zat antibakteri dalam lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada atau tidaknya padazona hambat yang akan terbentuk disekeliling zat antibakteri pada waktu tertentu pada masa inkubasi (Eko, 2013). Pada metode ini dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu:

1. Cara Cakram (*Disc*)

Cara ini merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentuka kepekaan baktei terhadap berbagai macam obat-obatan. Pada cara ini, digunakan suatu cakram kertas saring yang berfungsi sebagai tempat untuk menampung zat antibakteri. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari atibakteri. Pada umumnya, hasil yang didapat bias diamati setalah inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Metode cakram ini mcemiliki kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya adalah mudah dilakukan, tidak memerlukan peralan khusus dan relative murah. Kelemehannya adalah ukuran zona bening yang terbentuk tergantung oleh kondisi inkubasi (Eko, 2013).

2. Cara Parit (*ditch*)

Suatu lempeng agar telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat sebidang parit. Parit tersebut berisi zat antibakteri, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk mikroba uji. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada tidaknya zona hambat yang terbentuk disekitar parit (Eko, 2013).

3. Cara Sumuran (*hole/cup*)

Pada lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang selanjutnya diisi dengan antibakteri uji. kemudian setiap lubang diisi dengan zat uji, dilakukannya pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambat disekeliling lubang (Eko, 2013).

b. Metode Dilusi

Pada metode ini dilakukan dengan mencampurkan zat antibakteri dan media agar, yang kemudian diinokulasikan dengan antimikroba uji. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa tumbuh atau tidaknya mikroba didalam media. Aktivitas zat antibakteri ditentukan dengan melihat konsentersasi hambat minimum (KHM) yang merupakan konsentersasi terkecil dari zat antimikroba uji yang masih memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan pada mikroba uji (Eko, 2013). Metode ini terdiri dari dua cara yaitu:

1. Pengenceran serial dalam tabung

Pengujian dilakukan dengan menggunakan sederatan tabung reaksi yang diisi dengan inokulum kuman dan larutan antibakteri dalam berbagai konsentersasi. Zat yang akan diuji aktivitas bakterinya diencerkan sesuai serial dalam media cair, kemudian diinokulasikan dengan kuman dan diinkubasi pada waktu dan suhu

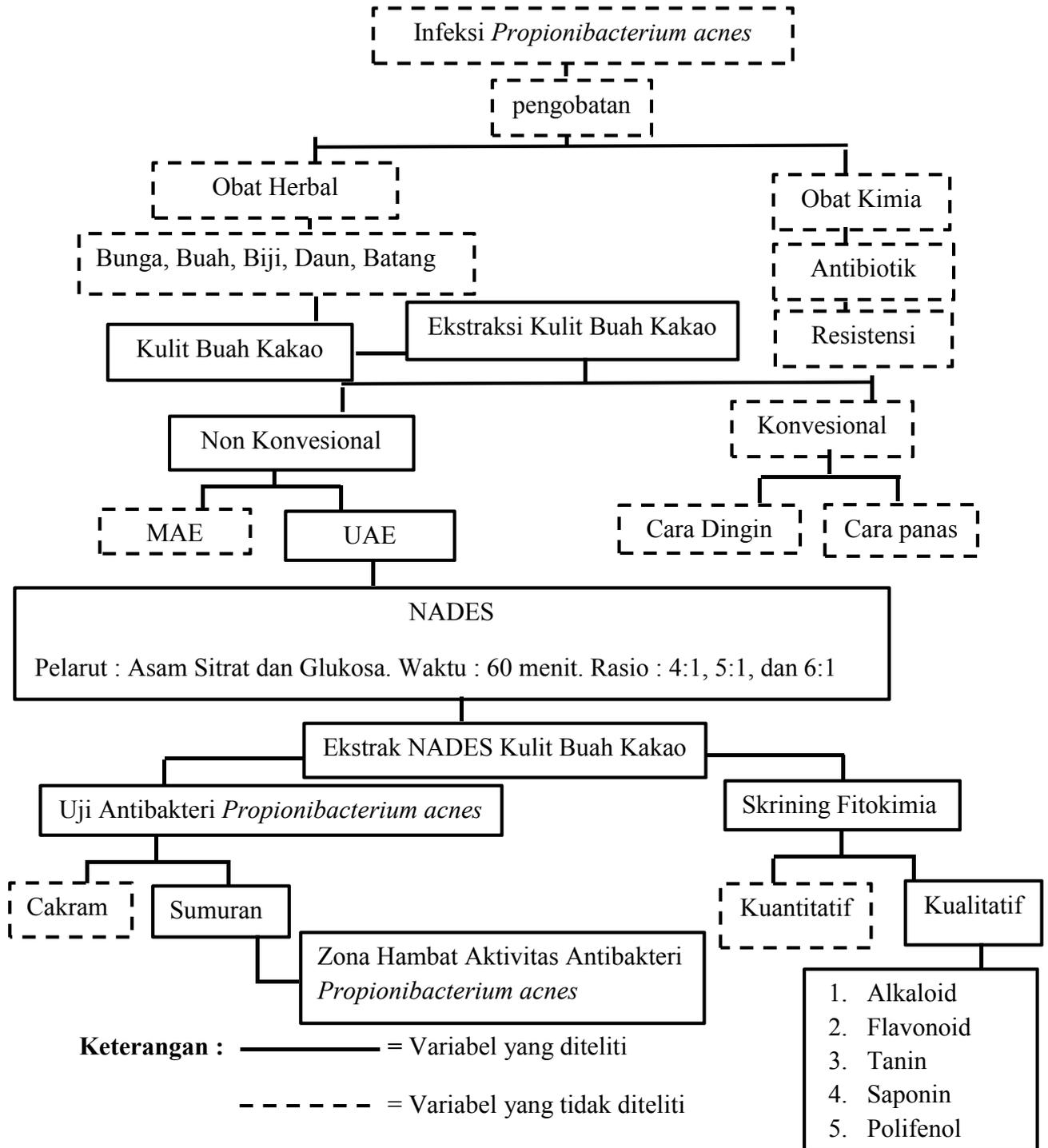
yang sesuai dengan mikroba uji. Aktivitas zat ditentukan sebagai kadar hambat minimal (KHM) (Eko, 2013).

2. Penipisan lempeng agar

Zat antibakteri diencerkan dalam media agar dan kemudian dituangkn ke dalam cawan petri. Setelah agar membeku, diinokulskan bakteri kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Konsenterasi terendah dari larutan zat antibakteri yang masih memberikan hambatan terhadap pertumbuhan kuman ditetapkan sebagai konsenterasi hambat minimal (KHM) (Eko, 2013).

BAB 3. KERANGKA KONSEP

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Uji Aktivitas Antibakteri

3.2 Hipotesis

Hipotesis merupakan suatu rumusan yang bertujuan untuk membuat gambaran atau ramalan tentang peristiwa yang terjadi apabila suatu gejala yang akan muncul, jadi pada hipotesis ini merupakan jawaban sementara dari rumusan masalah atau pernyataan penelitian (Notoatmodjo, 2012). Untuk membuktikan kebenaran suatu hipotesis yaitu dengan cara melakukan atau penelitian yang dapat dilakukan oleh peneliti. Pada penelitian ini dapat disimpulkan dengan hipotesis sebagai berikut:

H₀ : Rasio pelarut asam sitrat:glukosa tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

H_a : Rasio pelarut asam sitrat:glukosa mempengaruhi aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes*.

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 sumuran. Desain penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas dari ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan menggunakan metode difusi sumuran terhadap *Propionibacterium acnes*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi adalah sekumpulan obyek penelitian yang memiliki karakteristik yang sama. Populasi merupakan semua individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi dalam penelitian ini adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diambil di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Kabupaten Jember-Jawa Timur.

4.2.2 Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini merupakan segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang dapat ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga dapat memperoleh

informasi tentang hal tersebut, sehingga dapat disimpulkan. Pada variabel ini peneliti menggunakan variabel independent dan variabel dependet, sehingga dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Variabel *independent/variabel* bebas merupakan variabel yang berperan untuk memberi pengaruh kepada variabel lain. Variabel *independent* pada penelitian ini yaitu rasio pelarut asam sitrat:glukosa.
2. Variabel *dependent/variabel* terikat yaitu variabel yang dijadikan sebagai faktor yang dapat mempengaruhi oleh sebuah atau sejumlah variabel lain. Pada variabel *dependent* dari penelitian ini yaitu kandungan senyawa kimia dan aktivitas antibakteri *Propionibacterium acnes*.

4.4 Tempat Penelitian

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

4.5 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September-Oktober 2022.

4.6 Definisi Operasional

Definisi Operasional merupakan uraian tentang batasan variabel yang diteliti, atau tentang apa yang telah diukur oleh variabel yang bersangkutan (Notoatmodjo, 2012). 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	Uji kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, tannin. Polifenol dan saponin	Tabung reaksi dan pipet tetes	Penambahan pereaksi reagen sesuai senyawa yang akan diuji	Terbentuknya warna atau endapan pada uji kandungan senyawa kimia pada ekstrak kulit buah kakao	Nominal
2.	Aktivitas antibakteri terhadap bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	Zona hambat yang berada di sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan <i>Propionibacterium acnes</i>	Jangka sorong	Mengukur diameter zona hambat pada area yang jernih di sekitar sumuran	Terdapat terbentuknya diameter pada zona hambat di sekitar sumuran	Rasio

4.7 Pengumpulan Data

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

4.7.1 Determinasi Tanaman

Determinasi kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L) dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk memastikan bahwa kulit buah kakao yang akan diuji merupakan spesies (*Theobroma cacao* L).

4.7.2 Pengolahan Serbuk Simplisia

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dipisahkan lalu dicuci bersih dengan air mengalir sampai bersih dan ditiriskan. Dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama kurang lebih 5 hari. Kulit buah kakao dianggap kering

apabila sudah rapuh (diremas menjadi hancur). Kemudian simplisia kulit buah kakao yang telah kering diblender, dan disimpan dalam wadah plastik yang tertutup rapat (Depkes RI., 1995).

4.7.3 Preparasi NADES

Komponen NADES sebagai pelarut hijau ditimbang dengan perbandingan asam sitrat dan glukosa yaitu dengan masing-masing konsentrasi rasio 4:1, 5:1, dan 6:1 g/g dapat dilihat pada lampiran 5. Kedua bahan dilebur pada suhu 70-80°C ke dalam erlenmeyer, lalu dilakukan pengadukan dengan menggunakan *hotplate stirrer* pada kecepatan 500rpm selama \pm 60 menit. Setelah melebur ditambahkan *aquadest* 50%. Kemudian disaring hingga diperoleh larutan yang homogen. Larutan NADES tersebut disimpan pada wadah botol yang tertutup rapat hingga digunakan (Wang, *et al.*, 2018).

4.7.4 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Pada penelitian ini, pembuatan ekstrak menggunakan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), ditimbang masing-masing 10 gram serbuk simplisia kulit buah kakao kemudian dimasukkan ke dalam 3 erlenmeyer dan masing-masing ditambahkan 100 mL NADES. NADES yang digunakan adalah asam sitrat dan glukosa dengan rasio 4:1, 5:1, dan 6:1. Selanjutnya dimasukkan ke dalam *ultrasonic bath* dengan frekuensi 53 kHz selama 20 menit. Setelah diekstraksi proses penyaringan dilakukan dengan disaring menggunakan kertas *whatman* No. 1. Disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas dan dicatat volume hasil ekstraksi.

4.7.5 Skrining Fitokimia

1. Uji Alkaloid

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 5mL HCl 2N, kemudian dibagi kedalam 3 tabung. Pada tabung 1 ditambah pereaksi *Mayer*, tabung 2 ditambahkan pereaksi *Dragendroff*, tabung 3 ditambahkan 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

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5gram, ditambahkan 5mL air, dididihkan kurang lebih 5menit lalu disaring. Filtrate sebanyak 2mL ditambahkan 0,05mg serbuk Mg dan 1mL HCl pekat, kemudian dikocok sehingga homogen. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk warna kuning sampai jingga (Hafiz *et al.*, 2020).

3. Uji Tanin

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5gram, ditambahkan 5 mL air panas kemudian dididihkan selama 5 menit kemudian filtratnya ditambahkan FeCl₃ 3-4 tetes, jika berwarna hijau biru (hijau-hitam) berarti positif adanya tanin katekol sedangkan jika berwarna biru hitam berarti positif adanya tanin pirogalol. (Hafiz *et al.*, 2020).

4. Uji Saponin

Ditimbang ekstrak sebanyak 0,5gram, ditambahkan 5mL air panas dikocok kuat selama kurang lebih 10 detik. Apabila terbentuk busa stabil selama kurang

lebih 10 menit dan setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N, busa tersebut tidak hilang. Dinyatakan positif apabila terdapat busa yang stabil (Hafiz *et al.*, 2020).

5. Uji Folifenol

Sebanyak 0,5gram ekstrak ditambahkan 3-4 tetes FeCl₃, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawa polifenol (Adhayanti *et al.*, 2018).

4.7.6 Persiapan Media

1. *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 0,2 gram dilarutkan ke dalam 20 mL akuades menggunakan erlenmeyer. Media tersebut dilarutkan dengan cara dipanaskan di *hot plate* dengan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna. sebanyak 3 mL dituangkan masing-masing pada tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama ± 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Nurhamidi *et al.*, 2021).

2. Pembuatan *Media Muller Hinton Agar* (MHA)

Muller Hinton Agar ditimbang sebanyak 10 gram dilarutkan ke dalam 300 mL *aquades* menggunakan erlenmeyer lalu dipanaskan dan dihomogenkan dengan menggunakan alat pemanas dan *magnetic stirrer*. Media yang sudah homogen disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media MHA dituang ke dalam cawan petri sebanyak 25mL (Gunawan *et al.*, 2019).

4.7.7 Preparasi Antimikroba

1. Pembuatan Kultur Bakteri

Regenerasi bakteri dilakukan pada media NA dengan cara menginokulasikan 1-2 kawat ose bakteri ke permukaan media NA miring, kemudian diinkubasi 24 jam di inkubator. Kemudian, kultur bakteri disimpan dalam kulkas penyimpanan dengan suhu 4°C agar bakteri tidak segera mati.

2. Pengujian Kekeruhan Bakteri

Sebelum melakukan uji antibakteri dilakukan pengujian kekeruhan pada suspensi koloni uji yang distandarisasi dengan standar *Mc Farland* 0,5. Cara pembuatan standar *Mc Farland* 0,5 adalah dengan cara BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 ml H₂SO₄ 1%. Kemudian diuji densitas standar *Mc Farland* 0,5 dengan mengukur absorbansinya menggunakan alat spektrofotometer absorbansinya diukur pada panjang gelombang 625 nm rentang 0,08-0,13 (Dalynn, 2014).

3. Pembuatan Kontrol Positif dan Negatif

Pada penelitian ini, kontrol negatif menggunakan pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan klindamisin 0,01% (Sundu *et al.*, 2018).

4. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

Metode sumuran merupakan 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 dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambat disekeliling lubang (Nurhayati *et al.*, 2020).

Mencampur 1 ose suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* ke dalam tabung reaksi yang telah berisi larutan asam sitrat:glukosa sesuai konsentrasi 0,5 Mc Farland. Bakteri tersebut dioleskan ke dalam MHA, sehingga membuat lubang di media MHA yang telah diinokulasikan bakteri menggunakan batang L ke dalam cawan petri. Kemudian ekstrak kulit buah kakao dimasukkan ke dalam lubang di media MHA. Bakteri diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong (Eko, 2013).

4.8 Teknik Analisa Data

Data hasil penelitian efek ekstrak kulit buah kakao pada *Propionibacterium acnes* dianalisis dengan menggunakan program SPSS untuk melihat apakah ada perbedaan efektifitas yang bermakna dari masing-masing sumuran uji yang mengandung kontrol negatif, berbagai konsentersasi ekstrak kulit buah kakao dan kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Data pada penelitian ini berupa variabel numerik lebih dari dari 2 kelompok tidak berpasangan sehingga menggunakan uji *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Apabila data tidak terdistribusi normal dan atau data pengujian homogenitas variasi tidak terdistribusi homogen.

Anova merupakan singkatan dari "*analysis of varian*". *Analysis of Varian* adalah salah satu uji komparatif yang digunakan untuk menguji perbedaan mean (rata-rata) data lebih dari dua kelompok.

BAB 5. HASIL PENELITIAN

5.1 Determanasi Tanaman

Determinasi tanaman kulit buah kakao dilakukan di UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.). Hasil determinasi tanaman kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat dilihat pada lampiran 1.

5.2 Ekstraksi

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada metode ekstraksi UAE dari 10 gram simplisia kulit buah kakao dengan menggunakan pelarut asam sitrat:glukosa dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1 100 mL, rasio pelarut asam sitrat:glukosa 5:1 100 mL, rasio pelarut asam sitrat:glukosa 6:1 100 mL didapatkan ekstrak cair sebanyak 30 mL untuk masing-masing rasio pelarut.

5.3 Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia ekstrak NADES kulit buah kakao menunjukkan seluruh ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan tidak mengandung senyawa polifenol (Tabel 5.1).

Tabel 5. 1 Hasil Uji Skrining Fitokimia Rasio asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil Menurut Literatur	Pengamatan	Hasil		
				Rasio 4:1	Rasio 5:1	Rasio 6:1
Alkaloid	<i>Mayer</i>	Tidak adanya alkaloid tidak terbentuknya endapan putih (Fitriyani <i>et al.</i> , 2020).	Tidak terbentuknya endapan putih	-	-	-
	<i>Dragendrof</i>	Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih kejinggaan (Fitriyani <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk endapan putih kejinggaan	+	+	+
	<i>Wagner</i>	Adanya alkaloid terbentuk endapan merah (Fitriyani <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk endapan merah	+	+	+
Flavonoid	Mg+HCl pekat	Jika berubah warna menjadi kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid	Terbentuk warna kuning hingga jingga	+	+	+
Tanin	FeCl ₃	Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Fitriyani <i>et</i>	Terbentuk hitam kehijauan	+	+	+

Saponin	Air+HCl 2N	<i>al.</i> , 2020). Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1 cm (Fitriyani <i>et al.</i> , 2020).	Terbentuk busa stabil	+	+	+
Polifenol	FeCl ₃	Tidak adanya senyawa polifenol dengan tidak terjadinya perubahan warna hitam kehijauan (Fitriyani <i>et al.</i> , 2020).	Tidak terbentuk hitam kehijauan	-	-	-

Keterangan : (+) mengandung senyawa kimia
(-) tidak mengandung senyawa kimia

5.4 Uji Antibakteri

Uji kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 mendapatkan hasil absorbansi 0,127 dan untuk absorbansi bakteri mendapatkan hasil absorbansi 0,119. Hal ini dapat dilihat pada lampiran 2. Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao dapat menghambat bakteri *Propionibacterium acnes*. Hasil uji antibakteri ekstrak kulit buah kakao dapat dilihat pada gambar 5.1.



Gambar 5. 1 Hasil antibakteri *Propionibacterium acnes*

Hasil uji antibakteri ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE menunjukkan semua rasio mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* (Gambar 5.1). Rata-rata zona hambat ekstrak NADES dengan perbandingan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1 sebesar $19,606 \pm 1,68$ mm, sedangkan dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 5:1 memiliki nilai rata-rata $22,246 \pm 1,31$ mm, dan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 6:1 memiliki nilai rata-rata $24,51 \pm 1,45$ mm. Hasil uji antibakteri berupa hasil pengukuran zona hambat untuk masing-masing rasio dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5. 2 Hasil Pengujian Esktrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*

Rasio pelarut	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 4	Replikasi 5	Rata-rata \pm SD (mm)
Rasio 4:1	19,72	17,41	18,73	20,25	21,92	$19,606 \pm 1,68^b$
Rasio 5:1	22,41	21,85	20,85	21,75	24,37	$22,246 \pm 1,31^a$
Rasio 6:1	23,58	24,01	23,13	25,06	26,77	$24,51 \pm 1,45^a$
Kontrol Positif	20,87	22,13	19,42	18,93	21,11	$20,492 \pm 1,303$
Kontrol Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	$0,00 \pm 0,00$

Keterangan: Notasi ab merupakan hasil dari uji Duncan dengan taraf kepercayaan 5% notasi berbeda menunjukkan perbedaan nyata. Kategori respon hambatan pada zona bening yang didapat pada ketiga rasio.

5.5 Analisa Data

5.5.1 Hasil Uji Normalitas Data

Didapatkan hasil semua data memiliki $p\text{-value (sig.)} > 0,05$ sehingga distribusi data aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao normal, sehingga data dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas data untuk memenuhi persyaratan sebelum dilakukan uji *One-Way* ANOVA.

Tabel 5. 3 Uji Normalitas

Shapiro-Wilk				
	<i>Statistic</i>	<i>Df</i>	<i>Sig</i>	<i>Kesimpulan</i>
Rasio 4:1	0,995	5	0,995	Normal
Rasio 5:1	0,906	5	0,446	Normal
Rasio 6:1	0,915	5	0,495	Normal
Kontrol Positif	0,945	5	0,703	Normal
Kontrol Negatif		5		

5.5.2 Uji Homogenitas Data

Hasil pengujian homogenitas diperoleh nilai $p\text{-value (sig.)} > 0,05$ yaitu 0,270. Maka dapat disimpulkan bahwa data aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao secara statistik homogen atau data memiliki varians yang sama. Karena semua persyaratan telah terpenuhi, yaitu data berdistribusi normal dan homogen, memiliki varians yang sama pada setiap perlakuan, maka selanjutnya dapat dilakukan uji *One-Way* ANOVA.

Tabel 5. 4 Uji Homogenitas

		<i>Test of Homogeneity of Variances</i>				Kesimpulan
		<i>Levene Statistic</i>	df1	df2	Sig.	
Hasil Uji	<i>Based on Mean</i>	2,493	4	20	0,076	Homogen
	<i>Based on Median</i>	1,431	4	20	0,260	Homogen
	<i>Based on Median and with adjusted df</i>	1,431	4	15,534	0,270	Homogen
	<i>Based on trimmed mean</i>	2,438	4	20	0,081	Homogen

5.5.3 Uji *One-Way* ANOVA

Didapatkan nilai *p-value* (sig.) pada pengujian *One-Way* ANOVA <0,05 yaitu 0,000. Sehingga diperoleh kesimpulan maka H_0 ditolak yang artinya terdapat sekurang-kurangnya satu sampel kulit buah kakao yang memiliki daya hambat yang berbeda terhadap perkembangan bakteri penyebab jerawat. Tahap selanjutnya adalah perlu dilakukan analisis lanjutan untuk mengetahui sampel kulit buah kakao dengan pelarut manakah yang memberikan pengaruh paling signifikan.

Tabel 5. 5 Uji *one way* ANOVA

	<i>Sum of Squares</i>	Df	<i>Mean Square</i>	F	Sig.
<i>Between Groups</i>	1956,092	4	489,023	292,056	0,000
<i>Within Groups</i>	33,488	20	1,674		
Total	1989,581	24			

5.5.4 Uji *Post-Hoc* Duncan

Hasil dari uji duncan yang telah dilakukan sesuai tabel dibawah ini bahwa pada rasio 6:1 memiliki zona hambat yang paling tinggi dibandingkan dengan lainnya.

Tabel 5. 6 Uji *post-hoc* Duncan

Rasio pelarut	Kontrol negatif	Kontrol positif	Rasio 4:1	5:1	6:1
Kontrol negatif	5	0,0000*			
Kontrol positif	5		20,4920		
Rasio 4:1	5		19,4920		
Rasio 5:1	5			22,2460*	
Rasio 6:1	5				24,5100*
Signifikan		1,000	0,292	1,000	1,000

Keterangan: *Pada kontrol negatif berbeda secara signifikan dengan rasio 4:1,5:1,6:1. Pada rasio 5:1 berbeda secara signifikan dengan rasio 4:1 dan sehingga rasio 6:1 berbeda secara signifikan dengan rasio 4:1 dan 5:1.

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman merupakan tahap awal yang dilakukan sebelum menuju tahap lebih lanjut pada proses penelitian. Determinasi tanaman adalah proses dalam menentukan nama atau jenis tanaman secara spesifik yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran identitas tanaman yang diinginkan, sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti (Kartika, 2015). Determinasi tanaman penelitian ini dicantumkan pada lampiran 1.

6.2 Pengumpulan dan Pengeringan Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao yang digunakan dalam penelitian ini berwarna hijau kehitaman, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua. Diambil dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao yang berada di Kabupaten Jember-Jawa Timur untuk dijadikan sampel penelitian.

Pengeringan adalah proses mengeluarkan atau menghilangkan sebagian air dari suatu bahan pangan dengan cara menguapkan sebagian besar kandungan airnya (Sarofatin dan Wahyono, 2018). Kulit buah kakao yang digunakan disortasi terlebih dahulu untuk memastikan kulit buah yang digunakan baik dari segi fisik, warna dan ukuran. Kemudian kulit buah kakao yang telah disortasi dicuci bersih menggunakan air yang mengalir. Proses selanjutnya adalah pengeringan kulit buah kakao dengan cara diangin-anginkan. Pada proses

pengeringan yang terpenting adalah menjaga agar tidak terkena cahaya matahari langsung karena akan terjadi perubahan pada sifat kulit buah kakao.

6.3 Ekstraksi Kulit Buah Kakao

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Ultrasonic Assited Extraction* (UAE), merupakan salah satu metode ekstraksi berbantu ultrasonik. UAE memiliki beberapa keunggulan diantaranya lebih sederhana, penanganannya yang mudah, biaya rendah, dan menggunakan pelarut organik yang lebih sedikit (Hildayanti, 2020).

Hasil proses ekstraksi metode UAE mendapatkan hasil ekstrak cair sebanyak 30 mL untuk masing-masing rasio pelarut. Asam sitrat:glukosa merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa non polar, tidak toksik, dan asam sitrat dan glukosa merupakan pelarut yang baik untuk ekstraksi senyawa antibakteri karena asam sitrat:glukosa lebih mudah untuk menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler bahan pada tumbuhan.

Pada penelitian ini menggunakan pelarut asam sitrat:glukosa karena dapat mempermudah pemisahan senyawa. Pelarut asam sitrat:glukosa mampu melarutkan senyawa yang bersifat non polar yang diantaranya skrining fitokimia. Asam sitrat:glukosa sebagai pelarut yang memiliki kelebihan diantaranya tidak beracun, netral, memerlukan panas yang lebih sedikit untuk proses pemekatan (Nirwana *et al.*, 2015)

6.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan uji kandungan senyawa kimia secara kualitatif yang dilakukan untuk mengetahui kandungan yang terdapat dalam kulit buah kakao yang sudah diekstraksi, menggunakan metode UAE menggunakan pelarut NADES. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak NADES kulit buah kakao dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1 positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin dan tidak mengandung senyawa polifenol.

Pada penelitian ini ditemukan senyawa alkaloid pada ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1, yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih ketika ekstrak direaksikan dengan reagen *mayer*, tetapi pada penelitian ini pada reagen *mayer* tidak terdapat endapan warna putih pada pereaksi *mayer*. Terbentuknya endapan kuning kejinggaan dengan reagen *dragendrof* dan terbentuk endapan merah kecoklatan dengan reagen *wagner*. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Ikalinus *et al.*, (2015) dimana terbentuknya endapan pada uji *mayer* dan *dragendrof* dalam ekstrak NADES kulit buah kakao terdapat alkaloid dan pada uji *mayer* tidak terbentuk endapan sehingga tidak terdapat alkaloid dalam ekstrak NADES kulit buah kakao. Dapat disimpulkan bahwa uji *mayer* dan *dragendrof* positif senyawa alkaloid dan uji *mayer* negatif senyawa alkaloid. 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 tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks

kalium-alkaloid yang mengendap. Menurut Jannah (2021) pengujian alkaloid dengan menggunakan pereaksi *dragendorf* yang diperoleh terbentuk endapan warna 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 warna merah kecoklatan. Endapan ini karena ion logam K^+ akan membentuk kompleks kalium-alkaloid mengendap.

Pada penelitian ini ditemukan senyawa flavonoid pada ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1, karena terdapat perubahan warna jingga pada hasil uji skrining fitokimia dengan metode UAE. Menurut penelitian Fitriyanti dkk (2020) pada pengujian senyawa flavonoid yang didapatkan dari analisa senyawa yaitu terjadinya perubahan warna jingga. Perubahan warna jingga karena senyawa flavonoid akan tereduksi dengan Mg dan HCl sehingga menghasilkan warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

Pada penelitian ditemukan senyawa tanin pada ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1, karena terdapat perubahan warna hijau kehitaman pada hasil uji skrining fitokimia dengan metode UAE. Berdasarkan penelitian Sulistyarni dkk (2019) pengujian senyawa alkaloid yang diperoleh dari analisa senyawa yaitu terbentuknya warna biru tua atau kehitaman. Perubahan warna hijau kehitaman karena penambahan

FeCl_3 1% bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin.

Pada penelitian ditemukan senyawa saponin pada ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1, karena positif mengandung saponin yang ditunjukkan dengan adanya buih setelah penambahan air panas dan dikocok kuat hingga terbentuk busa yang bertahan selama kurang lebih 10 menit. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jannah (2021) melaporkan bahwa adanya busa yang menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lain.

Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya senyawa polifenol pada ekstrak NADES kulit buah kakao dengan metode UAE rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1, karena tidak terdapat perubahan warna hitam pekat pada hasil uji skrining fitokimia dengan metode UAE. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fitriyanti dkk (2020) pengujian senyawa polifenol yang didapatkan dari analisa senyawa yaitu tidak terjadinya perubahan warna hitam kehijauan.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Nugroho *at al.*, (2019) dalam ekstrak kulit buah kakao dengan pelarut etanol memiliki kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin. Namun dalam penelitian tersebut menyebutkan bahwa ekstrak etanol kulit buah kakao tidak memiliki kandungan senyawa polifenol. Hal ini, serupa dengan hasil penelitian ini menjelaskan bahwa ke empat senyawa kimia memiliki aktivitas antibakteri. Pada penelitian ini,

menjelaskan bahwa ekstrak NADES kulit buah kakao dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa memiliki kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin. Namun dalam penelitian ini ekstrak NADES kulit buah kakao dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa tidak memiliki kandungan senyawa polifenol. Pada hasil penelitian ini menjelaskan bahwa ekstrak NADES kulit buah kakao dengan kandungan senyawa kimia memiliki aktivitas antibakteri.

6.5 Uji Antibakteri

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao adalah metode difusi sumuran. Metode difusi sumuran dipilih karena memiliki kelebihan yaitu lebih mudah mengukur zona hambat yang terbentuk karena bakteri beraktivitas tidak hanya di permukaan atas *muller hinton agar* tetapi juga sampai bawah. Pembuatan sumuran memiliki beberapa kesulitan seperti terdapatnya sisa-sisa agar pada suatu media yang digunakan untuk membuat sumuran, selain itu juga besar kemungkinan media agar retak atau pecah di sekitaran lokasi sumuran sehingga dapat mengganggu proses peresapan antibiotik ke dalam media yang akan memengaruhi terbentuknya diameter zona bening saat melakukan uji sensitivitas (Balaori *et al.*, 2016).

Metode ini dilakukan untuk mengetahui besarnya diameter zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran untuk mengetahui besarnya diameter zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran yang telah diberi ekstrak kulit buah kakao setelah diinkubasi 24 jam.

Media yang digunakan yaitu *Muller Hinton Agar* (MHA). *Muller Hinton Agar* (MHA) dipilih karena medium yang baik sebagai tempat tumbuhnya beberapa bakteri gram positif dan gram negatif yang dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi bagi pertumbuhan bakteri, semua bakteri dapat tumbuh karena media ini bukan media selektif dan differensial, mengandung *starch* (tepung padi) yang berfungsi untuk menyerap racun yang dikeluarkan bakteri, sehingga tidak mengganggu antibiotik, rendah sulfonamide, trimethoprin dan tetracycline inhibitors, mendukung pertumbuhan bakteri non-fastidious yang patogen (Atmojo, 2016).

Pada tabel 5.2 menunjukkan diameter zona hambat *Propionibacterium acnes* perbedaan yang bermakna terhadap kontrol positif dan berbagai rasio pelarut ekstraksi kulit buah kakao, yaitu 4:1, 5:1 dan 6:1 kontrol negatif yang digunakan adalah asam sitrat:glukosa yang menunjukkan tidak adanya zona hambat. Pelarut asam sitrat:glukosa merupakan pelarut organik dan tidak bersifat toksik (Assidqi *et al*, 2012). Menandakan bahwa asam sitrat:glukosa tidak memiliki aktivitas antibakteri, sehingga dapat dipastikan aktivitas antibakteri yang dihasilkan tidak dipengaruhi secara langsung oleh asam sitrat:glukosa (Amalia *et al.*, 2016). Asam sitrat:glukosa juga merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa non polar.

Kontrol positif menunjukkan perbedaan dengan kontrol negatif dan berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah kakao, karena menghasilkan aktivitas antibakteri dengan zona hambat bening paling besar terhadap uji, yaitu 26,77 mm. Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif adalah klindamisin yang memiliki

sepktum luas. Mekanisme kerja dari klindamisin adalah dengan menghambat biosintesis dari mukopeptida dinding sel bakteri saat bakteri bermultiplikasi (Kaur *et al.*, 2011).

Dari hasil pengukuran diameter zona hambat diperoleh rata-rata zona hambat untuk rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, tergolong kategori kuat dengan rata-rata $19,606 \pm 1,68$ mm dan rasio 5:1, 6:1 tergolong kategori sangat kuat dengan rata-rata zona hambat $22,246 \pm 1,31$ mm dan $24,51 \pm 1,45$ mm, sedangkan untuk rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1, 6:1 kontrol positif kategori kuat dengan rata-rata zona hambat $20,492 \pm 1,30$ mm. Pada tabel 5.1 membuktikan bahwa semakin tinggi rasio pelarut asam sitrat:glukosa ekstrak kulit buah kakao maka semakin baik untuk menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Pohan dkk. (2020) tentang efektivitas ekstrak etanol kulit buah kakao sebagai antibakteri pada bakteri *Streptococcus pyogenes*. Menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah kakao memiliki efektivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dan memiliki zona hambat sebesar 12,65mm. Pada penelitian ini, dapat dijelaskan bahwa pada ekstrak NADES kulit buah kakao dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1,5:1,6:1 menunjukkan bahwa ekstrak NADES kulit buah kakao memiliki efektifitas pada bakteri *Propionibacterium acnes* dan memiliki diameter zona hambat yang berbeda sehingga dapat melampui pada zona hambat pada kontrol positif.

Berdasarkan hasil dari zona bening yang terbentuk dari penelitian ini dan penelitian sebelumnya yaitu menunjukkan bahwa rasio pelarut NADES merupakan pelarut yang paling baik karena semakin tinggi rasio pelarut NADES

maka semakin besar zona hambat yang terbentuk. Menurut Yuslina dkk. (2019) menyatakan bahwa semakin tinggi rasio pelarut NADES maka semakin meningkat daya antibakterinya, karena rasio pelarut NADES semakin tinggi dapat memungkinkan penyebaran zat-zat dalam menghambat bakteri semakin aktif.

Senyawa metabolit sekunder ekstrak kulit buah kakao seperti flavonoid dan tanin juga memiliki sifat antibakteri. Flavonoid diketahui memiliki sifat antibakteri dimana mekanisme kerjanya adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Darmawati *et al.*, 2015). Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Ngajow *et al.*, 2013).

Kandungan senyawa alkaloid 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).

Saponin juga merupakan senyawa aktif yang bersifat antibakteri dalam ekstrak kulit buah kakao. Saponin memiliki sifat seperti sabun. Saponin adalah senyawa aktif yang menimbulkan busa apabila dikocok dalam air. Saponin

bekerja dengan meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga membran menjadi tidak stabil dengan mengakibatkan hemolisis sel (Rosidah *et al.*, 2014).

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

Diameter zona bening yang telah diperoleh selanjutnya di uji normalitas dan homogenitas dengan uji parametrik *one way* ANOVA dengan bantuan software program komputer SPSS. Uji statistik dengan SPSS dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan zona hambat masing-masing rasio ekstrak kulit buah kakao, hasilnya signifikan atau tidak.

Berdasarkan tabel 5.3 hasil uji normalitas diperoleh data nilai signifikan kontrol positif $p= 0,703$, ekstrak kulit buah kakao rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1 $p= 0,995$ ekstrak kulit buah kakao rasio pelarut asam sitrat:glukosa 5:1 $p= 0,446$ ekstrak kulit buah kakao rasio pelarut asam sitrat:glukosa 6:1 $p= 0,495$. Nilai signifikan dari masing-masing sampel $p> 0,05$. Jadi dapat disimpulkan bahwa varian data tersebut terdistribusi normal.

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas didapatkan hasil nilai signifikan Levene statistik $p = 0,270$. Jadi nilai signifikan $p > 0,05$ dapat disimpulkan bahwa varian data tersebut homogen. Data di uji homogenitas dapat dilihat pada tabel 5.4

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas memperlihatkan bahwa data terdistribusi normal dan uji homogenitas yang ditunjukkan nilai signifikan $p > 0,05$. Data tersebut dapat dilanjutkan ke uji *one way* ANOVA.

Selanjutnya dilakukan uji *post hoc* yaitu uji *duncan* sebagai uji lanjutan untuk mengetahui rasio mana yang berbeda signifikan. Berdasarkan tabel 5.6 dapat dikatakan bahwa aktivitas antibakteri rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1 dan 6:1 memiliki nilai perbedaan yang signifikan dilihat dari nilai signifikan $p > 0,05$. Hasil analisa statistik menggunakan spss ekstrak kulit buah kakao rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1, 5:1 dan 6:1 sudah memiliki aktivitas antibakteri, tetapi lebih tinggi dengan kontrol positif klindamisin. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan daya hambat yang dimiliki oleh kontrol positif. Dari penentuan 4:1 dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa tersebut memberikan aktivitas antibakteri yang sama secara signifikan dengan kontrol positif dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 5:1 dan 6:1 memberikan aktivitas antibakteri yang berbeda secara signifikan.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak NADES kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1,5:1,6:1 memiliki kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin.
- b. Ekstrak NADES kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan rasio pelarut asam sitrat:glukosa 4:1,5:1,6:1 mampu menghambat pertumbuhan *Propionibacterium acnes*.

7.2 Saran

- a. Perlu dilakukan pengujian antibakteri menggunakan bagian lain dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.)
- b. Perlu dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan metode lain.
- c. Perlu dilakukan uji kuantitatif kandungan senyawa kimia.
- d. Perlu dilakukan uji optimasi ekstraksi dengan menggunakan metode lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Adha, S. D., & Ibrahim, M. (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*.
- 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:10.3282/mf.v14i.84.
- Ahmad I, Pertiwi AS, Kembaren YH, Rahman A, Mun'in A. *Application of natural deep eutectic solvent-based ultrasonic assisted extraction of total polyphenolic and caffeine content from Coffe Beans (Coffea Beans L.) for instant food products. Journal of Applied Pharmaceutical Sciences.* 2018;8(8):138–43.
- Ahmad I, Yanuar A, Mulia K, Mun'im A. *Ionic liquid-based microwaveassisted extraction: Fast and green extraction method of secondary metabolites on medicinal plant. Pharmacognosy Reviews.* 2018;12(23):20–6.
- Ahmad, I., & Prabowo, W. C. (2020). Optimasi metode ekstraksi berbantu mikrowave dengan pelarut hijau (asam sitrat-glukosa) terhadap kadar polifenol total dari daun Kadamba (*Mitragyna speciosa* Korth. Havil) menggunakan *response surface methodology*. Majalah Farmasi dan Farmakologi, 24(1), 11-16.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I., & Azhari, N. H. (2018). *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique. *Industrial Crops and Products*, 122, 533-544.
- Ariani, N., & Riski, A. (2018). Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Buah Pisang Kepok Mentah (*Musa paradisiaca* forma *typica*) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Secara In Vitro. *Jurnal Pharmascience*, 5(1).
- Ayudianti, P., & Indramaya, D. M. (2014). Studi Retrospektif: Faktor *Pencetus Akne Vulgaris*. Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, 26(1), 1-7.

- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan kadar flavonoid metode AICI₃ pada ekstrak metanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*). *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), 33-37.
- Camel, V. (2000). *Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.
- Choi, Y.H., Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollman, F., Arends, G., dkk. (2011). *Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology. Plant Physiology*. 156 (4): 1701-1705.
- Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M.T., Dionísio, M., dkk. (2016). *Properties and Thermal Behavior of Natural Deep Eutectic Solvents. Journal of Molecular Liquid*. 215: 534-540.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2015). *Tailoring Properties of Natural Deep Eutectic Solvents with Water to Facilitate Their Applications. Food Chemistry*. 187: 1-27.
- Dermawan, A. M., & PDL, K. (2015). Efektivitas krim anti jerawat ekstrak metanol daun pacar air (*Impatiens balsamina L.*). *Traditional Medicine Journal*, 20(3), 127-33.
- Dewi, F. K. (2010). Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia, Linnaeus*) terhadap bakteri pembusuk daging segar.
- Eko Prayoga. (2013). Perbandingan efek ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle L.*) dengan metode difusi disk dan sumuran terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
- Faridah, T. N. (2014). Perbedaan Hasil Pemeriksaan Kadar Glukosa Darah Menggunakan Serum Tanpa Sentrifuge dengan Serum Yang disentrifuge dilaboratorium Kesehatan Daerah Kota Surabaya (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surabaya).

- Fitriana, Y. A. N., Fatimah, V. A. N., & Fitri, A. S. (2020). Aktivitas anti bakteri daun sirih: uji ekstrak KHM (Kadar Hambat Mini Putri, D. A., Sumpono, S., & Ginting, S. M. (2014). Pengaruh Metode Ekstraksi Dan Konsentrasi Terhadap Aktivitas Jahe Merah (*Zingiber officinale var rubrum*) Sebagai Antibakteri *Escherichia coli*.
- Gunawan, H. C. *et al.* (2019) ‘Uji Antibakteri Air Perasan Daging Buah Nanas (*Ananas Comosus* (L) Merr) terhadap Bakteri *Stapylococcus Aureus*’, Jurnal Kedokteran dan Kesehatan, 15(2), p. 170. Doi: 10.24853/jkk.15.2.170-177
- Gomez FJ V, Espino M. A *greener approach to prepare natural deep eutectic solvents. Analytical Chemistry.* 2018;3:6122–5.
- Hafiz Ramadhan, Muhammad Arsyad and Putri Indah Sayakti (2020),, skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% biji kalangkala (*Litsea angulate* Bl.) terhadap bakteri penyebab jerawat *Propionibacterium acnes*”, *Borneo Journal of Pharmascientech*, 4(1), pp. 60-70. Doi: 10.51817/bjp.v4i1.283.
- Hafsari, A. R., Cahyanto, T., Sujarwo, T., & Lestari, R. I. (2015). Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun beluntas (*pluchea indica* (L.) less.) terhadap *propionibacterium acnes* penyebab jerawat. *Jurnal Istek*, 9(1).
- Handarati, 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
- Hindritiani, R., Soedarwoto, A., Ruchiatan, K., Suwarsa, O., Budiarti, M. U., Husadani, D., & Pranata, A. Y. (2017). Resistensi Antibiotik *Propionibacterium acnes* dari Berbagai Lesi Kulit Akne Vulgaris di Rumah Sakit Dr. Hasan Sadikin Bandung. *Media Dermato-Venereologica Indonesiana*, 38, 15-19.
- Irawati, E. S. (2013). Aktivitas Antibakteri Dan Bioutografi Fraksi Etanol-Air- Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap

- Streptococcus mutans* DAN *Escherichia coli* (Doctoral dissertation, Universitas Mehammadiyah Surakarta).
- Jusmiati, Rusli, R., & Rijai, L. (2015). Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Kakao Masak Dan Kulit Buah Kakao Muda. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 1(1), 34–39.
- Lamaga, M. L. (2018). Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi* dan *Candida albicans* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Semarang).
- Laurenze, R. (2021). Pengaruh Konsentrasi Paclobutrazol terhadap Pertumbuhan Reproduksi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao L.*) (Doctoral dissertation, Universitas Hasanuddin).
- Leron, R.B., Soriano, A.N., Li, M.H. 2012. *Densities and Refractive Indices of The Deep Eutectic Solvents (Choline Chloride + Ethylene Glycol or Glycerol) and Their Aqueous Mixtures at the Temperature Ranging From 298,15 to 333,15 K. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 43: 551- 557.
- Lestari, H. D., & Asri, M. T. (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Staphylococcus epidermidis*.
- Lilyawati, S. A., Fitriani, N. And Prasetya, F. (2019) “*Proceeding of Mulawarman Phrmaceuticals Conferences*”, *Proceeding of Mulawarman Phrmaceuticals Conference, (April 2021), pp. 135-138. Available at: <http://prosiding.farmasi.unmul.ac.id/index.php/mpc/article/view/416/399>*.
- Marjoni, Riza. (2016). *Dasar-dasar Fitokimia*. Jakarta: CV. Trans Info Media.
- Mišan A, Nađpal J, Stupar A, Pojić M, Mandić A, Verpoorte R, Choi YH. *The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019; 1–29. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717>

- Mulyatni, A. S., Budiani, A., & Taniwiryono, D. (2012). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *Menara Perkebunan*, 80(2), 77–84.
- Mulyatni, A. S., Budiani, A., & Taniwiryono, D. (2016). Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *Menara Perkebunan*, 80(2).
- Murningsih, K. (2019). Pengaruh Penambahan Kulit Buah Naga Merah dan Asam Sitrat Terhadap Aktivitas Antioksidan, Stabilitas Suspensi dan Tingkat Kesukaan Sari Buah Naga Merah (*Doctoral dissertation*, Universitas Mercu Buana Yogyakarta).
- Narulita, W. (2018). Uji efektifitas ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* secara In Vitro (Sebagai Alternatif Bahan Pengayaan Pada Sub Konsep *Archaeobacteria* dan *Eubacteria* SMA Kelas X Semester Ganjil) (*Doctoral dissertation*, UIN Raden Intan Lampung).
- Nurhamidi, A. P. R., Fatimawali, F. And Antasionasti, I. (2021) ‘Uji aktivitas antibakteri ekstrak N-heksana biji buah langsung (*Lansium domesticum* Corr) terhadap bakteri *Staphylococcus Aureus* dan *Klebsiella Pneumoniae*’, *Pharmakon*, 10(1), p. 748.. doi: 10.35799/pha.10.2021.32772.
- Purwaningdyah, R. A. K., & Jusuf, N. K. (2013). Profil penderita akne vulgaris pada siswa-siswi di SMA Shafiyatul Amaliyyah medan [Skripsi]. *Medan*: Universitas Sumatera Utara.
- Rifkowitz, E. E., Wardanu, A. P., & Hastuti, N. D. (2018). Aktivitas antioksidan sirup buah karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*) dengan variasi penambahan asam sitrat. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 10(1), 16-20.

- Sagara, Y. (2020). Implementasi algoritma backpropagation untuk sistem identifikasi kematangan buah kakao (*Doctoral dissertation, University of Technology Yogyakarta*).
- Saraswati, F. N. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Limbah Kulit Pisang Kepok Kuning (*Musa balbisiana*) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat (*Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, dan Propionibacterium acne*). Skripsi, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Sari, I. P., Wibowo, M. A., & Arreneuz, S. (2015). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang Butoh Keling (*Holothuria Leucospilota*) dari Pulau Lemukutan Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(4).
- Sekarsari, S., Widarta, I. W. R., & 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), 267-277. Doi:10.24843/itepa.2019.v08.i03.p05.
- Sibero, H. T., Putra, I. W. A., & Anggraini, D. I. (2019). Tatalaksana terkini *acne vulgaris*. *Jurnal Kedokteran Universitas Lampung*, 3(2), 313-320.
- Siregar, T. H., Riyadi, S., & Nuraeni, L. *Panduan Praktis Budidaya KAKAO*. Penebar Swadaya Grup.
- Sjahid, L. R., Aqshari, A. and Sediarmo, 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.v11i.348.
- Syakir, M. (2010). Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. *Budidaya dan Pasca Panen Karet*. Bogor.

- Verawati, V., Sari, T. M., & Savera, H. (2020). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kadar Fenolat Total dalam Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.). *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 17(1), 90-97.
- Wardiana, E. (2015). Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap kandungan polifenol pada biji dan produk berbasis kakao. *Indonesian Industrial and Beverage Crops Research Institute Jurnal Nasional*, 1(1), 31-33.
- Winda Sary, W. S. (2020). Komponen Pohon pada Kebun Kakao di Desa Parenring Kecamatan Lilirilau Kabupaten Soppeng (*Doctoral dissertation*, Universitas Hasanuddin).
- Yin-Leng K, Suyin G. *Natural deep eutectic solvent (NADES) as a greener alternative for the extraction of hydrophilic (polar) and lipophilic (nonpolar) phytonutrients. Key Engineering and Materials*. 2019;797:20–8.
- Zhang, S., Wang, W. and Chen, T. (2018) ‘Preparation and Characterization of PMMA Particles Incorporating a Chemical Sunscreen Agent for Improvement of UV Protection Ability’, *Australian Journal of Chemistry*, 71(2–3), pp. 177–180.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Determinasi Tanaman Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

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>

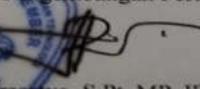
SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN
No: 026/PL.17.8/PG/2022

Menindaklanjuti surat dari Dekan Universitas dr. Soebandi Program Studi Sarjana Farmasi No: 306/FIKES.UDS/U/1/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Lia Rodiana Safitri
NIM : 18040051
Jur/Fak/PT : Prodi Sarjana Farmasi/ Universitas dr. Soebandi

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 03 Februari 2022
Ka. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu

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

Lampiran 2 *Mc Farland*

Photometry Test Report						
File Name:Photometry 2				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	0.127	74.6	26/09/2022 12:03:42	Mc Farland	
2	625.0	0.119	76.1	26/09/2022 12:13:19	P acnes	

Lampiran 3 Hasil Uji Stastik

1. Uji Normalitas

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Rasio 4:1	0,995	5	0,995
Rasio 5:1	0,906	5	0,446
Rasio 6:1	0,915	5	0,495
Kontrol Positif	0,945	5	0,703
Kontrol Negatif		5	

2. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil Uji	Based on Mean	2,493	4	20	0,076
	Based on Median	1,431	4	20	0,260
	Based on Median and with adjusted df	1,431	4	15,534	0,270
	Based on trimmed mean	2,438	4	20	0,081

3. Uji one way ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1956,092	4	489,023	292,056	0,000
Within Groups	33,488	20	1,674		
Total	1989,581	24			

4. Uji post-hoc Duncan

Kode Uji	N	Subset			
		1	2	3	4
Kontrol Negatif	5	0,0000			
Rasio 4:1	5		19,6060		
Kontrol Positif	5		20,4920		
Rasio 5:1	5			22,2460	
Rasio 6:1	5				24,5100
Sig.		1,000	0,292	1,000	1,000

Lampiran 4 Dokumentasi

a. Pembuatan Pelarut NADES Asam sitrat:Glukosa

1. Rasio 4:1



2. Rasio 5:1



3. Rasio 6:1



b. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

1. Rasio 4:1



2. Rasio 5:1

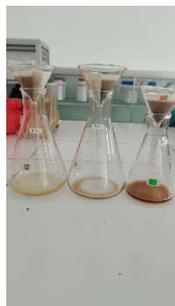


3. Rasio 6:1



4. Metode UAE tidak ada dokumen dikarenakan dilakukan di Laboratorium Cdast UNEJ

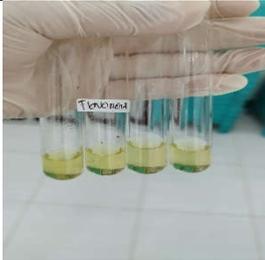
5. Penyaringan



c. Hasil Uji Skrining Fitokimia

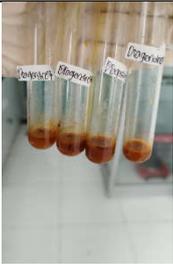
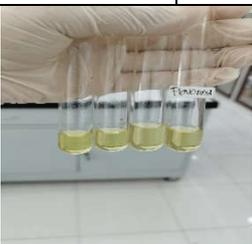
1. Rasio 4:1

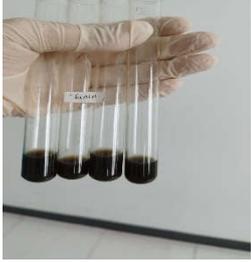
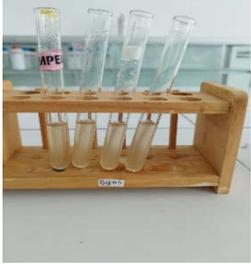
Alkoloid	Mayer	
----------	-------	---

	Dragendrof	
	Wagner	
Flavonoid		
Tanin		
Saponin		

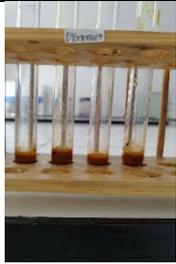
Polifenol	
-----------	--

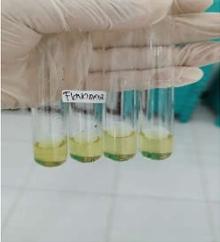
2. Rasio 5:1

Alkoloid	Mayer	
	Dragendrof	
	Wagner	
Flavonoid		

Tanin		
Saponin		
Polifenol		

3. Rasio 6:1

Alkoloid	Mayer	
	Dragendrof	

	Wagner	
Flavonoid		
Tanin		
Saponin		
Polifenol		

d. Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes*



e. Pembuatan Kontrol Positif



f. Pembuatan Mc Farland



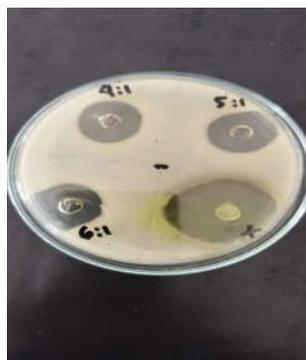
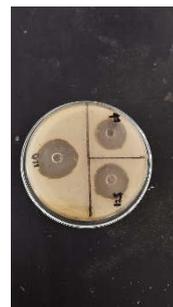
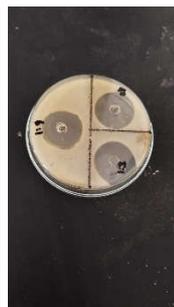
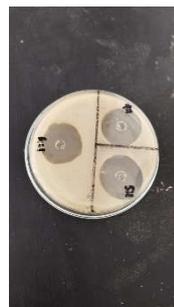
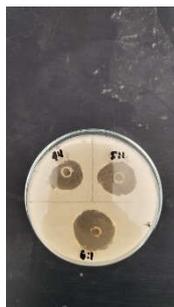
g. Pembuatan Nacl



h. Uji Antibakteri



i. Hasil Uji Antibakteri



j. Perhitungan diameter zona hambat

Hasil dari replikasi jangka sorong dikurangi dengan metode sumuran
6,40mm

1. Replikasi 1

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 4:1

$26,12\text{mm} - 6,40\text{mm} = 19,72\text{mm}$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 5:1

$28,81\text{mm} - 6,40\text{mm} = 22,41\text{mm}$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 6:1

$29,98\text{mm} - 6,40\text{mm} = 23,56\text{mm}$

Kontrol positif = $27,27\text{mm} - 6,40\text{mm} = 20,87\text{mm}$

Kontrol negatif = 0

2. Replikasi 2

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 4:1

$23,81\text{mm} - 6,40\text{mm} = 17,41\text{mm}$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 5:1

$28,25\text{mm} - 6,40\text{mm} = 21,85\text{mm}$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 6:1

$30,41\text{mm} - 6,40\text{mm} = 24,01\text{mm}$

Kontrol positif = $28,53\text{mm} - 6,40\text{mm} = 22,13\text{mm}$

Kontrol negatif = 0

3. Replikasi 3

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 4:1

$25,13\text{mm} - 6,40\text{mm} = 18,73\text{mm}$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 5:1

$27,67\text{mm} - 6,40\text{mm} = 20,83\text{mm}$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 6:1

$29,53\text{mm} - 6,40\text{mm} = 23,13\text{mm}$

Kontrol positif = $25,82\text{mm} - 6,40\text{mm} = 19,42\text{mm}$

Kontrol negatif = 0

4. Replikasi 4

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 4:1

$$26,65\text{mm} - 6,40\text{mm} = 20,25\text{mm}$$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 5:1

$$28,15\text{mm} - 6,40\text{mm} = 21,75\text{mm}$$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 6:1

$$31,46\text{mm} - 6,40\text{mm} = 25,06\text{mm}$$

$$\text{Kontrol positif} = 25,33\text{mm} - 6,40\text{mm} = 18,93\text{mm}$$

$$\text{Kontrol negatif} = 0$$

5. Replikasi 5

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 4:1

$$28,32\text{mm} - 6,40\text{mm} = 21,92\text{mm}$$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 5:1

$$30,77\text{mm} - 6,40\text{mm} = 24,37\text{mm}$$

Rasio pelarut asam sitrat:glukosa = 6:1

$$33,17\text{mm} - 6,40\text{mm} = 26,77\text{mm}$$

$$\text{Kontrol positif} = 27,51\text{mm} - 6,40\text{mm} = 21,11\text{mm}$$

$$\text{Kontrol negatif} = 0$$

Lampiran 5. Perhitungan

a. Perhitungan Preparasi NADES

1. Asam:Glukosa (g/g) ~ dibuat sebanyak 150mL. Dengan ketentuan *Aquadest* 50%

Rasio 4:1

Asam sitrat:Glukosa:Aquadest (4:1:2,5)

$$\text{Asam sitrat} : \frac{4}{7,5} \times 150 \text{ mL} = 80 \text{ gram}$$

$$\text{Glukosa} : \frac{1}{7,5} \times 150 \text{ mL} = 20 \text{ gram}$$

$$\text{Aquadest} : \frac{2,5}{7,5} \times 150 \text{ mL} = 50 \text{ gram}$$

2. Asam:Glukosa (g/g) ~ dibuat sebanyak 180 mL. Dengan ketentuan *Aquadest* 50%

Rasio 5:1

Asam sitrat:Glukosa:Aquadest (5:1:3)

$$\text{Asam sitrat} : \frac{5}{9} \times 180 \text{ mL} = 100 \text{ gram}$$

$$\text{Glukosa} : \frac{1}{9} \times 180 \text{ mL} = 20 \text{ gram}$$

$$\text{Aquadest} : \frac{3}{9} \times 180 \text{ mL} = 60 \text{ gram}$$

3. Asam:Glukosa (g/g) ~ dibuat sebanyak 210 mL. Dengan ketentuan *Aquadest* 50%

Rasio 6:1

Asam sitrat:Glukosa:Aquadest (6:1:3,5)

$$\text{Asam sitrat} : \frac{6}{10,5} \times 120 \text{ mL} = 120 \text{ gram}$$

$$\text{Glukosa} : \frac{1}{10,5} \times 120 \text{ mL} = 20 \text{ gram}$$

$$\text{Aquadest} : \frac{3,5}{10,5} \times 120 \text{ mL} = 70 \text{ gram}$$

Caranya:

Masing-masing rasio timbang asam sitrat dan glukosa, kedua bahan (asam sitrat dan glukosa) dilebur diatas *hot plate stirrer* pada suhu 80°

dengan kecepatan 350rpm, kemudian ditambahkan *aquadest*, dilakukan pemanasan sampai larutan stabil.

b. Perhitungan *Mc Farland*

BaCl₂ 1% : 0,05 mL

H₂SO₄ 1% : 9,95 mL

BaCl₂ 1% : 1 gram ~ 100mL

X = gram dalam 100 mL *aquadest*

H₂SO₄ 1% : 1 mL dalam 100 mL

X mL ~ 100 mL

X = 1 mL dalam 100 mL *aquadest*

Caranya:

Ambil BaCl₂ sebanyak 0,05 mL dengan menggunakan pipet ukur masukkan ke tabung reaksi, kemudian ambil H₂SO₄ sebanyak 9,95 mL dengan pipet ukur masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian *vortex* hingga homogen, lalu uji densitas standar *Mc Farland* dan ukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm dengan rentang 0,08-0,13.

c. Perhitungan kontrol positif

Klindamisin 300mg : 1 capsule ~ 100 mL *aquadest*

Kadar klindamisin 3mg/mL

1 mL ~ 100 mL = 300 µg

Caranya: ambil klindamisin timbang 0,1 gram masukkan ke dalam labu ukur tambahkan *aquadest* sebanyak 100 mL.

d. Perhitungan media

1. *Nutrient Agar* (NA)

1 L = 20 gram

1000 mL = x gram

10 mL = 0,2 gram

Carany: ambil *Nutrient Agar* kemudian timbang sebanyak 0,2 gram masukkan ke dalam erlenmeyer tambahkan *aquadest* 200 mL.

2. *Muller Hinton Agar* (MHA)

34 gram = 1000 mL

X = 300 mL

$$: \frac{34 \times 300}{1000} = 10,2 \text{ gram}$$

Caranya:

Ambil *Muller Hinton Agar* timbang sebanyak 10,2 gram masukkan ke dalam erlenmeyer tambahkan *aquadest* sebanyak 300 mL .

e. Pembuatan Suspensi Bakteri *Propionibacterium acnes*

NaCl 0,9% = 0,9 gram ~ 100 mL

X gram ~ 100 mL

X = 0,9 gram ~ 100 mL *aquadest*