

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI



Oleh :

NOVIANA MANDHAKI

1613206015

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG**

2020

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S. Farm)

Program Studi S1 Farmasi

STIKes Karya Putra Bangsa Tulungagung



Oleh :

NOVIANA MANDHAKI

1613206015

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI
STIKES KARYA PUTRA BANGSA
TULUNGAGUNG**

2020

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 SECARA *IN VITRO*

Yang diajukan oleh :

NOVIANA MANDHAKI

1613206015

Telah disetujui oleh :



Pembimbing Utama,

Pembimbing pendamping,

Choirul Huda, M.Farm., Apt

NIDN. 072 603 8502

Amalia Eka Putri, M.Farm., Apt

NIP. 17.92.01.09

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 SECARA *IN VITRO*

Oleh :

NOVIANA MANDHAKI

1613206015

Telah lolos uji etik penelitian dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi Program Studi S1 Farmasi STIKes Karya Putra Bangsa

Tanggal : 24 Juli 2020

Ketua penguji : Choirul Huda, M. Farm., Apt (.....)
Anggota penguji : 1. Amalia Eka Putri, M. Farm., Apt (.....)
2. Dr. Gunawan P. W., M.Si., Apt (.....)
3. Yunita Diyah Safitri, S.Si., M.Si (.....)

Mengetahui,

Ketua STIKes Karya Putra Bangsa

dr. Denok Sri Utami, M. H

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Tulungagung, 10 Juli 2020

Penulis,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Noviana Mandhaki', with a horizontal line underneath.

Noviana Mandhaki

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan karunia-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara *In Vitro***”.

Penyusunan skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Choirul Huda, M. Farm., Apt selaku pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dalam penyelesaian penyusunan skripsi.
2. Ibu Amalia Eka Putri, M. Farm., Apt selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dalam penyelesaian penyusunan skripsi.
3. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian skripsi.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca dan berharap skripsi ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang farmasi.

Tulungagung, 10 Juli 2020

Penulis



Noviana Mandhaki

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI DAUN KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 SECARA *IN VITRO*

Noviana Mandhaki
Prodi S1 Farmasi

INTISARI

Indonesia memiliki keanekaragaman jenis flora yang dapat dimanfaatkan masyarakat dalam berbagai bidang. Kurang lebih 300 spesies telah dimanfaatkan oleh industri obat tradisional di Indonesia sebagai bahan baku obat tradisional. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah kakao (*Theobroma cacao* L.). Kakao mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri terhadap bakteri *staphylococcus aureus*. *S. Aureus* merupakan bakteri Gram positif yang ditemukan sebagai flora normal pada bagian kulit rongga hidung manusia. *S. Aureus* merupakan salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi *S. Aureus* dapat terjadi ketika sistem imun melemah. Infeksi yang dapat ditimbulkan oleh *S. Aureus* yaitu jerawat, meningitis, pneumonia dan mastitis. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas fraksi etanol, diklorometana dan n-heksan dari ekstrak daun kakao sebagai antibakteri terhadap *S. Aureus* ATCC 25923, mengetahui fraksi yang memiliki zona hambat paling luas sebagai antibakteri terhadap *S. Aureus* ATCC 25923, dan mengetahui konsentrasi optimum fraksi aktif daun kakao sebagai antibakteri terhadap *S. Aureus* ATCC 25923.

Serbuk daun kakao diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan difraksinasi menggunakan pelarut etanol, diklorometana dan n-heksan. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao menggunakan metode difusi cakram dengan seri konsentrasi 10%, 20% dan 30%. Analisis statistik menggunakan *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh variasi konsentrasi fraksi daun kakao terhadap pertumbuhan *S. Aureus* ATCC 25923.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etanol dan diklorometana mempunyai aktivitas antibakteri. Fraksi etanol merupakan fraksi teraktif dalam menghambat aktivitas bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 karena mengandung senyawa flavonoid, saponin dan tanin. Konsentrasi optimum fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 adalah konsentrasi 10% dengan rata-rata zona hambat sebesar $12,67 \text{ mm} \pm 0,577$.

Kata kunci : daun kakao, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fraksinasi, difusi.

***ANTIBACTERIAL ACTIVITY of CACAO LEAF FRACTION (*Theobroma cacao* L.)
AGAINST STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 25923 BACTERIA IN VITRO***

Noviana Mandhaki
SI Pharmacy Study Program

ABSTRACT

*Indonesia has a diversity of flora that can be utilized by people in various fields. Approximately 300 species have been utilized by the traditional medicine industry in Indonesia as a traditional medicinal raw material. One of the herbs that can be utilized as traditional medicine is cacao (*Theobroma cacao* L.). Cacao compounds contain secondary metabolites that can be utilized as an antibacterial against *Staphylococcus aureus* bacteria. *S. Aureus* is a Gram-positive bacteria found as normal flora on the skin of the human nasal cavity. *S. Aureus* is one of the bacteria that often cause human infections. *S. Aureus* infection can occur when the immune system is weakened. *S. Aureus* can be acne, meningitis, pneumonia, and mastitis. The purpose of this research is to determine the activity of ethanol fraction, dichloromeana and n-hexane of cacao leaf extract as an antibacterial against *S. Aureus* ATCC 25923, dichlorometana and n-hexane of cacao leaf extract as an antibacterial against *S. Aureus* ATCC 25923, knowing the fraction of which has the most widespread barrier zone as an antibacterial against *S. Aureus* ATCC 25923, and know the optimum concentration of the active fraction of cocoa leaf as an antibacterial against *S. Aureus* ATCC 25923.*

*Cacao leaf powder is extracted using the maceration method with 96% ethanol solvent and is fractionated using ethanol solvent, dichloromethane, and n-hexane. Test the antibacterial activity of cacao leaf fraction using a method of diffusion discs with a series of concentrations of 10%, 20%, and 30%. Statistical analysis uses the Kruskal-Wallis to determine whether there is a variation of the concentration of cacao leaf fraction of the growth of *S. Aureus* ATCC 25923.*

*The results showed that the ethanol and dichloromethane fractions had antibacterial activity. The ethanol fraction is the most active in inhibiting the activity of *S. Aureus* ATCC 25923 bacteria due to the flavonoid compounds, saponins, and tannins. The optimum concentration of the active fraction in inhibiting the growth of *S. Aureus* bacteria is a 10% concentration with an average inhibitory zone of $12.67 \text{ mm} \pm 0,577$.*

*Keywords: Cacao leaf, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fractionation, diffusion.*

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS	iv
KATA PENGANTAR	v
INTISARI	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Uraian Tanaman Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	5
2.2. Simplisia	

2.3.	Ekstraksi.....	13
2.4.	Bakteri.....	17
2.5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6.	Antibakteri	18
2.7.	Metode Pengujian Antibakteri	21
2.8.	Kerangka Penelitian	23
2.9.	Hipotesis	23
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....		24
3.1.	Bahan	24
3.2.	Alat.....	24
3.3.	Populasi penelitian	24
3.4.	Sampel penelitian.....	24
3.5.	Definisi Operasional	24
3.6.	Variabel Penelitian.....	25
3.7.	Metode Penelitian	25
3.8.	Analisis Statistika.....	31
3.9.	Kerangka Penelitian	33
3.10.	Jadwal Penelitian	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		35
4.1.	Determinasi Tanaman	35
4.2.	Pemeriksaan Karakteristik Simplisia	35

4.3.	Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak	36
4.4.	Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Daun Kakao	37
4.5.	Fraksinasi Daun Kakao	40
4.6.	Identifikasi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	40
4.7.	Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		47
5.1.	Kesimpulan	47
5.2.	Saran	47
DAFTAR PUSTAKA		48

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kategori Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri Berdasarkan Diameter Zona Hambat.....	22
Tabel 3.1	Jadwal Pelaksanaan Penelitian.....	34
Tabel 4.1	Hasil Uji Susut Pengerinan Simplisia Daun Kakao.....	35
Tabel 4.2	Hasil Uji Kadar Air Serbuk Simplisia Daun Kakao	36
Tabel 4.3	Hasil Rendemen Ekstrak Daun Kakao.....	36
Tabel 4.4	Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kakao	37
Tabel 4.5	Hasil Skrining Fitokimia Fraksi Daun Kakao.....	38
Tabel 4.6	Hasil Fraksinasi Daun Kakao	40
Tabel 4.7	Hasil Zona Hambat Kontrol Positif dan Kontrol Negatif Fraksi Daun Kakao	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun Kakao.....	5
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian	33
Gambar 4.1 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Kakao.....	37
Gambar 4.2 Hasil Skrining Fitokimia Fraksi Daun Kakao	38
Gambar 4.3 Hasil Uji Identifikasi Bakteri <i>S. Aureus</i>	41
Gambar 4.4 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao	43
Gambar 4.5 Nilai Rata-Rata Zona Hambat Fraksi Daun Kakao.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Determinasi <i>Theobroma cacao L.</i>	56
Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian	57
Lampiran 3 Perhitungan Hasil Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak	58
Lampiran 4 Perhitungan Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri	60
Lampiran 5 Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Uji	60
Lampiran 6 Analisis Statistika	61
Lampiran 7 Tingkat Kepolaran Pelarut	65

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman jenis flora yang dapat dimanfaatkan masyarakat dalam berbagai bidang. Indonesia diperkirakan memiliki sekitar 40.000 spesies tumbuhan, dari 30.000 spesies tumbuhan tersebut dimanfaatkan sebagai tanaman industri, tanaman buah-buahan, tanaman rempah-rempah dan 9.600 spesies tumbuhan berkhasiat sebagai obat. Kurang lebih 300 spesies telah dimanfaatkan oleh industri obat tradisional di Indonesia sebagai bahan baku obat tradisional (Depkes RI, 2007).

Bahan baku obat tradisional berasal dari tumbuhan obat yang telah digunakan secara turun-temurun. Tumbuhan obat telah dimanfaatkan oleh masyarakat untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Tumbuhan obat tersebut menjadi pilihan alternatif karena mudah dalam mendapatkannya di lingkungan sekitar, harganya relatif murah, dan jarang menimbulkan efek samping jika dibandingkan obat-obatan dari bahan sintesis. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah kakao (Fauzi, 2008).

Kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah salah satu komoditas perkebunan di Indonesia. Bagian paling banyak pada tanaman kakao yaitu daun kakao (Dirjen Perkebunan, 2014). Menurut Singh *et al.* (2015), hasil skrining fitokimia ekstrak daun kakao mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, saponin dan tanin serta mengandung senyawa fenolat, *theobromine*, kafein, antosianin, *leucoantosianin* dan katekol. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada kakao dapat digunakan sebagai antikanker, antioksidan, antimikroba, analgesik, anti alergi dan anti inflamasi. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman kakao dapat dipisahkan dengan cara ekstraksi (Supriyanto *et al.*, 2014).

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat aktif dari dalam sel dengan menggunakan pelarut yang melibatkan perpindahan zat terlarut ke dalam zat pelarut (Siregar *et al.*, 2012). Metode yang digunakan untuk ekstraksi senyawa flavonoid, saponin dan tanin pada daun kakao yaitu metode maserasi. Metode

maserasi dipilih karena memiliki metode pemisahan yang sederhana, cara pengerjaannya sederhana dan tidak memerlukan pemanasan sehingga senyawa aktif dari tanaman tidak mengalami kerusakan (Susanty dan Bachdim, 2016). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi ini yaitu etanol 96% karena mampu mengekstraksi senyawa seperti flavonoid, saponin dan tanin pada daun kakao, tidak beracun dan tidak berbahaya (Arifianti *et al.*, 2014 ; Wahyuni *et al.*, 2018). Etanol 96% menghasilkan persen rendemen tinggi yaitu 38,2167% karena semakin tinggi konsentrasi pelarut maka semakin besar kadar yang dapat diekstrak (Diem Do *et al.*, 2014).

Maserat yang dihasilkan dari proses ekstraksi maserasi selanjutnya dilakukan fraksinasi. Fraksinasi bertujuan untuk mendapatkan fraksi ekstrak yang lebih murni dengan aktivitas yang lebih tinggi (Harborne, 2006). Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi ini yaitu etanol sebagai pelarut polar, n-heksan sebagai pelarut non polar dan diklorometana sebagai pelarut semi polar. Fraksi yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus*) (Mutiasari, 2012).

S. Aureus merupakan bakteri Gram positif yang memiliki bentuk bulat, tersusun dalam rangkaian tidak beraturan seperti buah anggur (Purnama Dewi *et al.*, 2018). Bakteri ini ditemukan sebagai flora normal pada bagian kulit rongga hidung manusia. *S. Aureus* merupakan salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi *S. Aureus* dapat terjadi ketika sistem imun melemah. Infeksi yang dapat ditimbulkan oleh *S. Aureus* yaitu jerawat, meningitis, pneumonia dan mastitis (Afifurrahman *et al.*, 2014). Pengujian antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram atau disk. Metode cakram memiliki harga relatif murah karena tidak memerlukan alat khusus dalam pengerjaannya, cepat dan lebih mudah dilakukan (Katrin *et al.*, 2015).

Berdasarkan latar belakang diatas, peneliti tertarik melakukan “Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 secara *In Vitro*” untuk mengetahui aktivitas antibakteri

dari fraksi daun kakao terhadap pertumbuhan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi cakram.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1.** Apakah fraksi etanol, n-heksan dan diklorometana daun kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 ?
- 1.2.2.** Fraksi manakah yang memiliki zona hambat paling luas sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 ?
- 1.2.3.** Berapakah konsentrasi optimum fraksi aktif daun kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 ?

1.3. Tujuan Penelitian

- 1.3.1.** Mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi etanol, n-heksan dan diklorometana daun kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.
- 1.3.2.** Mengetahui fraksi yang memiliki zona hambat paling luas sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.
- 1.3.3.** Mengetahui konsentrasi optimum fraksi aktif daun kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Bagi Masyarakat

Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa daun kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki aktivitas antibakteri.

1.4.2. Bagi Instansi Kesehatan

Sebagai referensi untuk mengembangkan senyawa antibakteri baru dengan memanfaatkan senyawa metabolit sekunder dari tanaman.

1.4.3. Bagi Instansi Pendidikan

Memberikan informasi dan referensi untuk mahasiswa dalam melakukan penelitian berikutnya.

1.4.4 Bagi Peneliti

Menambah informasi tentang obat tradisional khususnya manfaat daun kakao sebagai antibakteri serta untuk memenuhi persyaratan kelulusan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

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



Gambar 2.1 Daun kakao (Wahyudi *et al.*, 2008)

2.1.1. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman kakao sebagai berikut : (Suwarto *et al.*, 2014)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Marga	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

2.1.2. Morfologi tanaman kakao

Tanaman kakao memiliki dua bentuk tunas vegetatif yaitu tunas yang memiliki arah pertumbuhan ke atas disebut tunas ortotrop atau tunas air (wiwilan atau chupon), sedangkan tunas yang memiliki arah pertumbuhan ke samping disebut plagiotrop (cabang kipas atau fan). Tanaman kakao memiliki tinggi 1,8 – 3,0 meter pada umur tiga tahun dan memiliki tinggi 4,50 – 7,0 meter pada umur 12 tahun (Karmawati *et al.*, 2010).

Daun kakao memiliki bentuk helai daun berupa bulat memanjang, memiliki ujung daun dan pangkal daun runcing. Daun kakao memiliki tulang daun menyirip

dengan tulang daunnya menonjol ke permukaan bawah helai daun, tepi daun rata, dan memiliki daging daun tipis. Tanaman kakao memiliki bentuk perakaran lateral dan bagian ujung akar membentuk cabang-cabang kecil (Karmawati *et al.*, 2010).

Bunga kakao memiliki tangkai bunga yang panjang yaitu 1-1,5 cm dan berukuran kecil. Daun mahkota pada bagian pangkal berbentuk seperti kuku binatang, sedangkan bagian ujung berbentuk lembaran tipis dan berwarna putih. Tanaman kakao memiliki buah berwarna hijau ketika muda dan akan berwarna kuning ketika tua atau masak, sedangkan buah yang berwarna merah ketika muda akan berwarna jingga ketika tua atau masak. Biji kakao memiliki kotiledon berwarna putih. Biji tersebut dibungkus oleh daging buah yang memiliki rasa asam manis dan berwarna putih (Karmawati *et al.*, 2010).

2.1.3. Habitat

Hutan tropis merupakan habitat asli dari tanaman kakao. Tanaman kakao akan tumbuh tinggi dengan kondisi curah hujan tinggi, suhu konstan serta kelembapan tinggi yang relatif tetap. Tanaman kakao di Indonesia ditanam pada ketinggian 1 - 600 meter di atas permukaan air laut dengan suhu 30°C sampai 32°C. Sulawesi, Sumatera, Bali, Kalimantan dan Jawa Timur merupakan daerah penghasil kakao terbanyak di Indonesia (Wahyudi, 2008).

2.1.4. Kandungan kimia

Tumbuhan memiliki senyawa metabolit primer yang bersifat esensial untuk proses metabolisme sel tumbuhan dan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai pelindung tumbuhan dari gulma atau hama penyakit. Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan terhadap tanaman kakao, khususnya ekstrak daun kakao positif mengandung saponin, flavonoid dan tanin (Singh *et al.*, 2015). Saponin, flavonoid dan tanin memiliki sifat sebagai antibakteri, hal ini dibuktikan melalui pengujian antibakteri ekstrak daun kakao dengan konsentrasi 50%, 75% dan 100% terhadap bakteri *S. Aureus* dengan hasil zona hambat pada masing-masing konsentrasi yaitu 20 mm, 22 mm dan 23 mm. Berikut penjelasan terkait senyawa saponin, flavonoid dan tanin :

2.1.4.1. Saponin

Saponin adalah senyawa metabolit sekunder dari tanaman. Saponin merupakan glikosida yang tersusun dari gula yang berikatan dengan aglikon (sapogenin) yang terdiri dari rantai triterpenoid atau steroid. Saponin memiliki sifat cenderung polar karena ikatan glikosidanya (Simaremare, 2014). Saponin memiliki rumus kimia $C_{30}H_{46}O_5$. Struktur saponin menyebabkan saponin bersifat seperti deterjen (Calabria, 2008). Saponin memiliki berat molekul yaitu 414,6231 g/mol. Saponin memiliki titik didih yang cukup tinggi yaitu $158^{\circ}C$ dan densitas $0,5 \text{ g/cm}^3$ pada suhu $20^{\circ}C$ (Santosa *et al.*, 2018).

Saponin membentuk kristal berwarna kuning dan berbentuk amorf, memiliki bau menyengat dan memiliki rasa pahit. Saponin merupakan senyawa *non-volatile*, larut dalam air dingin maupun panas dan larut dalam alkohol. Saponin membentuk busa koloidal dalam air dan memiliki sifat tahan terhadap pemanasan yaitu tahan pada suhu $70^{\circ}C$ (Prasetyo S. *et al.*, 2011 ; Wahyuni *et al.*, 2018).

Saponin dapat digunakan sebagai antibakteri dengan cara menurunkan tegangan permukaan dinding sel dan efektif pada bakteri Gram positif (Hassan, 2008). Saponin akan berikatan dengan lipopolisakarida yang terdapat pada dinding sel bakteri, hal ini mengakibatkan peningkatan permeabilitas dinding sel bakteri sehingga membran menjadi tidak stabil dan menurunkan tegangan permukaan dari dinding sel bakteri sehingga dinding sel tersebut akan mengalami lisis. Zat antibakteri akan masuk ke dalam sel kemudian zat tersebut akan mengganggu metabolisme yang dapat menyebabkan bakteri mati (Dwicahyani *et al.*, 2018).

2.1.4.2. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder golongan polifenol yang larut dalam air. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan berwarna hijau dan berkontribusi memproduksi pigmen warna merah, oranye, biru, kuning dan ungu dari bunga, buah dan daun dari tanaman (Arifin dan Ibrahim, 2018). Flavonoid memiliki gugus hidroksil atau suatu gula sehingga flavonoid merupakan senyawa polar. Flavonoid dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida dan air. Aglikon dari flavonoid bersifat

kurang polar sehingga lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Markham, 1988). Flavonoid memiliki struktur kimia C₆-C₃-C₆ yang terdiri dari 15 atom karbon. Kerangka karbonnya terdiri dari dua gugus C₆ yang dihubungkan dengan rantai alifatik 3-karbon (Cook dan S. Samman, 1996). Senyawa flavonoid akan mengalami kerusakan jika dipanaskan pada suhu lebih dari 90°C, hal ini disebabkan karena flavonoid memiliki sistem aromatik terkonjugasi yang mudah rusak pada suhu tinggi (Wahyuni *et al*, 2018).

Flavonoid berfungsi sebagai bakteriostatik karena adanya reaksi dari suatu senyawa kimia. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat yang menyebabkan penghambatan pembentukan DNA dan RNA, merusak membran sitoplasma bakteri dan menghambat metabolisme energi (Rijayanti, 2014).

Senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma karena senyawa tersebut menyebabkan bocornya metabolit penting dan mengaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan membran ini menyebabkan nukleotida dan asam amino keluar dan mencegah bahan-bahan aktif masuk ke dalam sel sehingga menyebabkan kematian bakteri (Prajitno, 2007).

Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme terhambat dan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri sehingga menyebabkan kematian bakteri (Rijayanti, 2014).

2.1.4.3. Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa polifenol yang terdiri dari gugus hidroksi dan karboksil. Tanin memiliki rumus kimia C₇₆H₅₂O₄₆. Tanin larut dalam pelarut organik polar, namun tidak larut dalam pelarut organik non polar seperti benzena. Tanin memiliki sifat polar. Tanin berfungsi untuk melindungi tanaman dari hewan pemangsa karena tanin memiliki rasa sepat (Robinson, 1995).

Senyawa tanin memiliki sifat kimia dan fisika. Sifat kimia dari tanin yaitu tanin memiliki gugus fenol, membentuk koloid jika dilarutkan dalam air, membentuk endapan jika dicampur dengan alkaloid dan gelatin, mengendapkan protein dari larutannya, tanin dapat bereaksi dengan garam besi, tanin akan terurai

menjadi *pyrogallol*, *pyrocatechol* dan *phloroglucinol* apabila dipanaskan pada suhu 99-102°C, tanin dapat terhidrolisa oleh asam, basa dan enzim (Risnasari, 2002).

Sifat fisika dari tanin yaitu tanin berbentuk amorf, tanin berwarna putih kekuningan sampai coklat terang, tanin berbentuk serbuk, tanin berwarna gelap jika terkena cahaya langsung atau dibiarkan di udara terbuka, tanin memiliki sifat bakteristatik dan fungistatik (Risnasari, 2002).

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu tanin menyebabkan dinding sel bakteri menjadi lisis, sehingga pembentukan dinding sel bakteri menjadi terhambat dan menyebabkan sel bakteri mati. Tanin dapat menginaktifkan enzim pada bakteri dan mengganggu jalannya protein pada lapisan dalam sel (Ngajow *et al.*, 2013).

2.2. Simplisia

2.2.1. Pengertian simplisia

Simplisia merupakan bahan alamiah yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan yang dipergunakan sebagai obat (Depkes RI, 2000). Simplisia harus memenuhi persyaratan untuk menjamin keseragaman senyawa aktif dan menjamin keamanan dalam penggunaannya. Faktor yang mempengaruhi persyaratan mutu yaitu bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia, cara pengepakan dan penyimpanan simplisia. Simplisia dibedakan menjadi 3 jenis yaitu :

2.2.1.1. Simplisia nabati

Simplisia nabati merupakan simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dikeluarkan dengan cara tertentu dari selnya (Depkes RI, 2000).

2.2.1.2. Simplisia hewani

Simplisia hewani merupakan simplisia yang berupa hewan utuh, bagian dari hewan atau zat yang dihasilkan dari hewan yang belum berupa zat kimia murni (Depkes RI, 1979).

2.2.1.3. Simplisia pelikan atau mineral

Simplisia pelikan atau mineral merupakan simplisia yang berasal dari bumi, baik telah diolah maupun belum diolah dan tidak berupa zat kimia murni (Depkes RI, 1979).

2.2.2. Syarat – syarat simplisia

Simplisia memiliki beberapa persyaratan yaitu:

- 2.2.2.1. Lolos uji organoleptis yang meliputi warna dan bau simplisia tidak boleh menyimpang.
- 2.2.2.2. Kadar air simplisia kurang dari 10%.
- 2.2.2.3. Bebas dari serangga, fragmen hewan atau kotoran hewan.
- 2.2.2.4. Tidak mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya (Depkes RI, 1989).

2.2.3. Pembuatan simplisia secara umum

Pembuatan simplisia secara umum melalui berbagai tahapan yaitu :

2.2.3.1. Pengumpulan bahan baku

Bahan baku dapat diperoleh dari tanaman liar (tanaman yang tumbuh dengan sendirinya di hutan atau tempat lain) dan tanaman budidaya (tanaman yang sengaja ditanam untuk tujuan produksi bahan baku simplisia). Bagian tanaman yang digunakan, umur, waktu pemanenan dan lingkungan tempat tumbuh dari tanaman dapat mempengaruhi kadar zat aktif simplisia. Waktu pemanenan yang tepat yaitu saat bagian tanaman tersebut mengandung senyawa aktif dalam jumlah terbesar sehingga waktu pemanenan memiliki hubungan erat dengan kandungan senyawa aktif dalam tanaman yang akan di panen (Prasetyo dan Inorih, 2013).

2.2.3.2. Sortasi basah

Pemisahkan kotoran atau bahan asing dari simplisia dapat dilakukan dengan sortasi basah. Misalnya pada bahan baku simplisia yang berasal dari akar tanaman obat, terdapat bahan-bahan asing seperti tanah dan bahan pengotor lainnya yang harus dibuang. Tanah mempunyai kandungan beberapa jenis mikroba dalam jumlah yang tinggi, oleh karena itu pembersihan simplisia dari tanah dapat mengurangi jumlah mikroba awal (Prasetyo dan Inorih, 2013).

2.2.3.3. Pencucian

Penghilangan bahan pengotor lain yang melekat pada bahan simplisia dapat dilakukan dengan cara pencucian menggunakan air bersih misalnya air sumur atau air PAM (Depkes RI, 1985). Pencucian dilakukan sebanyak 3 kali karena pencucian satu kali dapat menghilangkan jumlah mikroba awal sebanyak 25%, sedangkan pencucian sebanyak tiga kali menyebabkan jumlah mikroba yang tertinggal yaitu 42% dari jumlah mikroba awal. Air yang digunakan untuk pencucian biasanya mengandung sejumlah mikroba sehingga pencucian tidak dapat membersihkan simplisia dari semua jenis mikroba. Jumlah dan jenis mikroba yang terdapat pada simplisia dipengaruhi oleh cara sortasi dan pencucian (Prasetyo dan Inorih, 2013).

2.2.3.4. Perajangan

Perajangan diperlukan untuk beberapa jenis bahan simplisia seperti bahan simplisia yang berasal dari akar, umbi dan rimpang. Perajangan dapat digunakan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan dan penggilingan simplisia. Alat perajangan yang dapat digunakan yaitu pisau atau alat perajang khusus untuk memperoleh simplisia dengan irisan tipis atau irisan dengan ukuran yang dikehendaki. Semakin tipis bahan baku yang akan digunakan dapat mempercepat waktu pengeringan karena penguapan air pada bahan baku semakin cepat, sedangkan irisan yang terlalu tipis dapat menyebabkan berkurangnya zat berkhasiat yang mempunyai sifat mudah menguap sehingga mempengaruhi komposisi (Prasetyo dan Inorih, 2013).

2.2.3.5. Pengeringan

Pengeringan bertujuan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat menyebabkan penurunan mutu dan kerusakan simplisia. Pengeringan dapat dilakukan melalui dua cara yaitu pengeringan alamiah dengan menggunakan sinar matahari secara langsung atau dengan cara diangin-anginkan, sedangkan pengeringan buatan menggunakan alat dengan sumber panas yang berasal dari listrik, kompor atau lampu. Suhu pengeringan simplisia tergantung dengan bahan simplisia dan cara pengeringannya (Prasetyo dan Inorih, 2013).

2.2.3.6. Sortasi kering

Sortasi kering bertujuan untuk memisahkan benda-benda asing yang terdapat pada simplisia kering sebelum simplisia dibungkus untuk disimpan. Sortasi kering merupakan tahap akhir dalam proses pembuatan simplisia (Prasetyo dan Inorihah, 2013).

2.2.3.7. Pengepakan dan penyimpanan

Beberapa hal yang harus diperhatikan pada penyimpanan simplisia yaitu cara pengepakan, pembungkusan, persyaratan gudang penyimpanan simplisia, cara sortasi dan pemeriksaan mutu simplisia (Prasetyo dan Inorihah, 2013).

2.2.4. Penghalusan simplisia

Tahapan pembuatan serbuk simplisia kering atau penyerbukan merupakan proses awal dalam pembentukan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat menggunakan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu (Depkes RI, 2000).

Umumnya penyarian bertambah baik jika permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan cairan penyari semakin luas. Semakin halus serbuk simplisia seharusnya semakin baik penyariannya sehingga semakin tinggi rendemen yang dihasilkan (Depkes RI, 2000).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sapri *et al.* (2014), derajat kehalusan simplisia merupakan salah satu faktor untuk mendapatkan ekstrak yang optimal. Ukuran serbuk simplisia yang digunakan yaitu ukuran 40 mesh, 60 mesh dan 80 mesh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa serbuk simplisia dengan ukuran 80 mesh menghasilkan rendemen ekstrak tertinggi, sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin kecil ukuran serbuk simplisia maka semakin besar rendemen ekstrak yang diperoleh. Penelitian kali ini menggunakan ayakan dengan ukuran 80 mesh.

2.3. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut seperti minyak atsiri, alkaloid, flavonoid sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut seperti protein, karbohidrat, serat dengan menggunakan pelarut cair. Kandungan senyawa aktif pada simplisia dapat mempermudah pemilihan pelarut

dan cara ekstraksi yang tepat (Depkes RI, 2000). Beberapa metode ekstraksi yang digunakan yaitu sebagai berikut :

2.3.1. Maserasi

Maserasi merupakan proses pengekstraksian menggunakan pelarut dengan beberapa kali penggojokan atau pengadukan pada temperatur ruangan atau suhu kamar (Depkes RI, 2000). Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari seperti air, etanol, air-etanol atau pelarut lain. Perbandingan antara bahan dan pelarut yang digunakan pada metode maserasi adalah 1 : 7,5 atau merendam 1 bagian simplisia dengan derajat kehalusan tertentu dengan 7,5 bagian pelarut (Dwi Ratna *et al.*, 2015). Cairan penyari akan menembus dinding sel dan akan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel akan menyebabkan zat aktif terlarut dalam cairan penyari (Depkes RI, 1986).

Maserasi digunakan untuk ekstraksi simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, stirak dan lain-lain. Keuntungan ekstraksi maserasi yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan. Maserasi dapat dilakukan modifikasi yaitu dengan remaserasi. Cairan penyari pada proses remaserasi dibagi menjadi dua kemudian seluruh serbuk simplisia dimaserasi menggunakan cairan penyari pertama. Filtrat hasil maserasi pertama dimaserasi kembali dengan cairan penyari kedua (Depkes RI, 1986).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fauzana (2010), hasil rendemen dari metode remaserasi menghasilkan jumlah rendemen yaitu sekitar 15,60% sampai 16,70% sedangkan metode maserasi menghasilkan rendemen sekitar 12,20% sampai 12,60%. Hal ini disebabkan karena residu pelarut pada ekstraksi remaserasi merupakan pelarut baru sehingga pelarut belum mengalami kejenuhan dan memiliki kemampuan mengekstrak lebih tinggi.

2.3.2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses pengekstraksian menggunakan pelarut yang selalu baru pada temperatur ruangan (Depkes RI, 2000). Prinsip perkolasi yaitu

pelarut yang telah jenuh yang terdapat dalam perkolator akan digantikan oleh pelarut yang baru (Depkes RI, 1986). Serbuk sampel pada metode perkolasi diletakkan dalam sebuah wadah perkolator kemudian pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan pelarut akan menetes perlahan pada bagian bawah. Keuntungan metode perkolasi yaitu penyarian menggunakan pelarut yang selalu baru, sedangkan kerugian dari metode perkolasi yaitu pelarut akan mengalami kesulitan dalam menjangkau seluruh area sampel yang tidak homogen, membutuhkan waktu cukup lama dan membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak (Mukhriani, 2014).

2.3.3. Refluks

Refluks merupakan ekstraksi menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000). Sampel yang diekstraksi menggunakan metode refluks dimasukkan ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut yang terdapat di dalam labu dipanaskan hingga mencapai titik didihnya kemudian akan terbentuk uap terkondensasi yang akan kembali ke dalam labu (Mukhriani, 2014).

2.3.4. Soxhlet

Soxhlet merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi yang kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI, 2000). Sampel yang diekstraksi menggunakan metode soxhlet dibungkus menggunakan kertas saring kemudian ditempatkan dalam klonsong di atas labu dan di bawah kondensor. Keuntungan metode soxhlet yaitu proses ekstraksi yang kontinu, tidak membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak dan tidak membutuhkan waktu yang cukup lama, sedangkan kerugian dari metode soxhlet yaitu senyawa yang memiliki sifat termolabil dapat terdegradasi (Mukhriani, 2014).

2.3.5. Fraksinasi

Proses fraksinasi bertujuan untuk mendapatkan fraksi ekstrak yang lebih murni dengan aktivitas yang lebih tinggi. Fraksinasi terdiri dari ekstraksi padat-cair dan cair-cair. Proses yang terjadi pada fraksinasi padat-cair yaitu terjadi

keseimbangan diantara fase padat dan fase cair atau pelarut sedangkan fraksinasi cair-cair terjadi pemisahan yang didasarkan pada perbedaan kelarutan komponen dua pelarut yang tidak saling bercampur (Harborne, 2006).

Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya. Prinsip fraksinasi yaitu *like dissolve like* atau senyawa pada tanaman akan larut dalam pelarut yang memiliki kepolaran yang sama, apabila kepolarannya berbeda akan terpisah (Harbone, 1987).

Fraksinasi pada suatu ekstrak menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur. Pelarut n-heksan dan diklorometana digunakan untuk menarik lemak dan senyawa non polar, sedangkan etanol digunakan untuk menarik senyawa polar. Senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar (Yasjudani, 2017).

Menurut Andhini (2017) fraksi polar merupakan fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri jika dibandingkan dengan fraksi non polar dan fraksi semi polar. Fraksi polar memiliki daya hambat paling besar terhadap bakteri karena fraksi polar mampu menarik senyawa yang paling aktif sebagai antibakteri jika dibandingkan dengan fraksi yang lain. Fraksi polar mampu menarik senyawa aktif berupa saponin dan flavonoid yang memiliki sifat sebagai antibakteri. Hal ini terjadi karena adanya kandungan senyawa kimia yang bersifat polar di dalam fraksi polar yang lebih optimum untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

2.3.6. Pelarut

Pelarut merupakan zat yang digunakan sebagai media untuk melarutkan zat lain. Pemilihan pelarut umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu selektif atau dapat melarutkan semua zat berkhasiat yang dikehendaki, pelarut memiliki titik didih yang cukup rendah, pelarut bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lain, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar (Depkes RI, 1986). Beberapa pelarut yang digunakan untuk ekstraksi yaitu sebagai berikut:

2.3.6.1. Air

Air (H₂O) dipertimbangkan sebagai pelarut karena murah, mudah diperoleh, tidak mudah menguap, dan tidak beracun. Kerugian penggunaan pelarut air yaitu

tidak dapat melarutkan semua zat berkhasiat yang dikehendaki, ekstrak dapat ditumbuhi kapang sehingga cepat rusak dan waktu pengeringan ekstrak memerlukan jangka waktu lama. Air dapat melarutkan garam alkaloid, glikosida, tanin, gom, pati, protein, dan asam organik (Depkes RI, 1986).

Air (H₂O) merupakan senyawa yang tidak berwarna, tidak berbau dan tidak memiliki rasa. Air memiliki titik didih 100°C, viskositas 1,005 cP, berat molekul 18 g/mol, dan konstanta dielektrik sebesar 80,37 pada suhu 20°C (Chandra, 2015).

2.3.6.2. Etanol

Etanol (C₂H₅OH) memiliki nama lain yaitu etil alkohol. Etanol dapat melarutkan alkaloid, minyak atsiri, glikosida, antrakinon, flavonoid, tanin, saponin, steroid, dan kurkumin. Etanol dipertimbangkan sebagai penyari karena lebih selektif, kapang dan bakteri sulit tumbuh dalam etanol dengan konsentrasi lebih dari 20%, tidak beracun, dan netral (Depkes RI, 1986).

Etanol memiliki massa jenis 0,789 g/cm³, berat molekul 46,04g/mol, viskositas pada 20°C yaitu 1,200 cP, titik didih 78,4°C, momen dipol sebesar 1,69 D (gas), dan tidak berwarna (Chandra, 2015). Menurut Arifianti *et al.* (2014), etanol 96 % merupakan pelarut yang mampu mengekstraksi senyawa seperti flavonoid, saponin dan tanin. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Roslizawaty *et al.* (2013), pengujian aktivitas antibakteri menggunakan kontrol negatif yaitu etanol 96% menunjukkan hasil bahwa etanol 96% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga zona hambat yang dihasilkan ekstrak bukan berasal dari pelarut etanol 96%.

2.3.6.3. N-Heksan

N-Heksan (C₆H₁₄) merupakan pelarut non polar yang memiliki sifat mudah menguap. Pelarut ini memiliki titik lebur -95°C (Susanti *et al.*, 2012). N-Heksan berbentuk cairan jernih, memiliki bau seperti eter, memiliki berat molekul 86,18 gr/mol dan memiliki titik didih 68,73°C (Depkes RI, 1995). N-Heksan larut dalam pelarut non polar atau sedikit polar seperti dietil eter atau benzena, tetapi tidak larut dalam pelarut polar seperti air (Brieger, 1969).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Puspita Sari (2016), pengujian aktivitas antibakteri menggunakan kontrol negatif yaitu heksan menunjukkan hasil

bahwa heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Eschericia coli* dan *S. Aureus*, sehingga zona hambat yang dihasilkan ekstrak bukan berasal dari pelarut heksan.

2.3.6.4. Diklorometana

Diklorometana atau metilena klorida merupakan senyawa organik dengan rumus kimia CH_2Cl_2 . Diklorometana merupakan senyawa tidak berwarna dan memiliki aroma (Nafis, 2005). Diklorometana larut dalam pelarut organik lainnya, namun tidak larut sempurna dengan air. Diklorometana digunakan sebagai bahan dasar pembuatan sediaan farmasi dan sebagai pelarut (Lee, 2005).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sri Agustini *et al.* (2017), pengujian aktivitas antibakteri menggunakan kontrol negatif yaitu diklorometana menunjukkan hasil bahwa diklorometana tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. Aureus* dan *Eschericia coli* sehingga zona hambat yang dihasilkan fraksi diklorometana bukan berasal dari pelarut diklorometana.

2.4. Bakteri

2.4.1. Definisi Bakteri

Nama bakteri berasal dari kata “bakterion” yang berarti tongkat atau batang. Bakteri merupakan mikroorganisme bersel satu, berkembangbiak dengan pembelahan diri dan berukuran kecil sehingga hanya tampak dengan menggunakan mikroskop (Dwidjoseputro, 1978). Bakteri merupakan sel prokariotik yang khas, uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasma. Bakteri dapat dibedakan berdasarkan ukuran, susunan, dan responnya terhadap antibiotik. Bentuk sel bakteri meliputi kokus (bulat), basil (batang) dan spirilium (spiral). Bentuk sel menunjukkan karakteristik dari spesies bakteri, tetapi dapat bervariasi tergantung kondisi pertumbuhannya. Ukuran bakteri berkisar antara 0,5 sampai 5 μm (Pelczar *et al.*, 1998).

2.5. *Staphylococcus aureus*

2.5.1. Klasifikasi

Domain : Bacteria

Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: <i>Staphylococcaceae</i>
Marga	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Soedarto, 2015)

2.5.2. Morfologi

Bakteri *S. Aureus* merupakan bakteri berbentuk kokus dengan ukuran diameternya sekitar 1µm yang pada pewarnaan bersifat Gram positif. Bakteri *S. Aureus* berbentuk seperti kelompok anggur jika diamati dibawah mikroskop. *S. Aureus* tidak aktif bergerak, tidak membentuk spora, bersifat katalase positif, tahan terhadap pemanasan sampai suhu 50°C, tahan terhadap kadar garam tinggi dan tahan kekeringan. Koloni *Staphylococci* memiliki ukuran besar dengan diameter 6-8 mm dan berwarna bening. Strain dari koloni bakteri ini memiliki pigmen berwarna jingga. *S. Aureus* hidup pada manusia yang terdapat di aksila dan lubang hidung anterior (Soedarto, 2015).

2.6. Antibakteri

Antimikroba merupakan senyawa kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Berdasarkan jenis mikroorganisme yang dimatikan atau dihambat pertumbuhannya, antimikroba dibagi menjadi antibakteri, antivirus, antifungi dan antiprotozoa. Antibakteri merupakan zat yang dapat membunuh bakteri atau menghambat pertumbuhan dan reproduksi bakteri (Volk *et al.*, 1990).

2.6.1. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja zat antibakteri yaitu sebagai berikut :

2.6.1.1. Menghambat metabolisme sel

Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidup, namun bakteri patogen tidak mendapatkan asam folat dari luar tubuh sehingga bakteri mensintesis asam folat tersebut. Zat antibakteri akan mengganggu proses

pembentukan asam folat sehingga menghasilkan asam folat yang nonfungsional dan metabolisme sel bakteri akan terganggu (Setiabudy, 2007).

2.6.1.2. Menghambat sintesis dinding sel

Dinding sel bakteri berfungsi untuk melindungi membran protoplasma yang terdapat dalam sel. Senyawa antibakteri dapat merusak dan mencegah proses sintesis dinding sel sehingga menyebabkan terbentuknya sel yang peka terhadap tekanan osmotik (Waluyo, 2004).

2.6.1.3. Menghambat sintesis protein

Suatu sel mikroba dapat hidup apabila molekul-molekul dalam sel dalam keadaan alamiahnya. Denaturasi protein dan asam nukleat dapat merusak sel dan tidak dapat diperbaiki kembali. Koagulasi ireversibel komponen sel dapat disebabkan oleh suhu tinggi dan konsentrasi dari beberapa zat kimia (Pelczar, 1988).

2.6.1.4. Menghambat sintesis asam nukleat

Sintesis DNA mempengaruhi pertumbuhan sel sedangkan RNA berfungsi untuk transkripsi dan penentuan informasi sintesis protein dan enzim. Gangguan yang terjadi pada DNA dan RNA dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel sehingga hal ini mempengaruhi metabolisme asam nukleat (Yasjudani, 2017).

2.6.1.5. Menghambat fungsi membran sel

Antibakteri dapat mempengaruhi permeabilitas dan menyebabkan senyawa intraseluler mikroorganisme tersebut keluar. Membran sel memiliki sifat permeabilitas selektif dan berfungsi sebagai pengontrol keluar masuknya substransi dari dalam dan luar sel. Beberapa antibiotik dapat bersatu dengan membran sehingga dapat mengganggu proses biokimia sel (Yasjudani, 2017).

2.6.2. Kloramfenikol

Kloramfenikol merupakan suatu golongan antibiotika dengan spektrum kerja yang luas. Antibiotik ini berkhasiat sebagai bakteriostatik terhadap hampir semua bakteri Gram positif dan sejumlah bakteri Gram negatif (Tjay dan Rahardja, 2015). Mekanisme kerja kloramfenikol sebagai antibakteri yaitu mengubah proses denaturasi protein dan asam nukleat pada bakteri sehingga dapat merusak sel bakteri (Ganiswara, 2012). Kloramfenikol juga dapat menghambat

enzim peptidil transferase yang berperan sebagai katalisator untuk ikatan-ikatan peptida ketika sintesis protein pada bakteri (Brooks *et al.*, 2005)

Kloramfenikol merupakan antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena kloramfenikol memiliki mekanisme kerja yang sama dengan senyawa yang terkandung dalam daun kakao yaitu senyawa flavonoid. Mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai antibakteri yaitu menghambat sintesis asam nukleat yang menyebabkan penghambatan pembentukan DNA dan RNA serta merusak membran sel bakteri (Rijayanti, 2014).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dwi Ratna *et al.* (2015), hasil uji sensitifitas menunjukkan *S. Aureus* bersifat resisten terhadap ampisilin, eritromisin dan tetrasiklin dengan zona hambat masing-masing sebesar 12, 13 dan 9 mm, sedangkan pada kloramfenikol bersifat sensitif dengan zona hambatnya 22 mm.

Karakteristik Kloramfenikol menurut Farmakope Indonesia edisi IV halaman 189 adalah sebagai berikut :

Nama Umum	: Kloramfenikol
Nama Lain	: Chloramphenicolum
Nama Kimia	: <i>D- treo- (-)-2,2-Dikloro-N-[β-hidroksi-α-(hidroksimetil)-p-nitrofenetil]asetamida</i>
Rumus Kimia	: C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅
BM	: 323,13
Suhu Lebur	: 149°C – 153°C
Pemerian	: Hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang, putih hingga putih kelabu atau putih kekuningan, larutan praktis netral terhadap lakmus P, stabil dalam larutan netral atau larutan sedikit asam.
Kelarutan	: Sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol, dalam propilen glikol, dalam aseton dan dalam etil asetat.
Persyaratan	: Pada sediaan kapsul kloramfenikol mengandung kloramfenikol, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari jumlah yang tertera pada etiket

2.7. Metode Pengujian Antibakteri

2.7.1. Metode difusi

Penentuan aktivitas antibakteri pada metode difusi didasarkan pada kemampuan difusi dari zat antimikroba dalam lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan berupa ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk di sekeliling zat antimikroba pada waktu tertentu masa inkubasi (Yasjudani, 2017). Metode difusi dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu :

2.7.1.1 Metode *disk diffusion*

Metode ini digunakan untuk menentukan kepekaan kuman terhadap berbagai macam obat-obatan. Cara ini menggunakan suatu cakram kertas saring (*paper disc*) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan di atas lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi umumnya selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri. Kelebihan metode cakram disk yaitu mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus dan relatif murah (Yasjudani, 2017).

2.7.1.2 *Ditch-plate technique*

Suatu lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat sebidang parit yang berisi zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai dengan mikroba uji. Hasil pengamatan berupa ada atau tidaknya zona hambat yang akan terbentuk disekitar parit (Yasjudani, 2017).

2.7.1.3 *Cup-plate technique*

Lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang diisi dengan zat antimikroba uji. Setiap lubang diisi dengan zat uji, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang (Yasjudani, 2017).

Tabel 2.1 Kategori respon hambatan pertumbuhan bakteri berdasarkan diameter zona hambat (Susanto *et al.*, 2012)

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan
≥ 21 mm	Sangat Kuat
11 – 20 mm	Kuat
6 – 10 mm	Sedang
< 5 mm	Lemah

2.7.2. Metode dilusi

Metode dilusi dilakukan dengan mencampurkan zat antimikroba dan media agar, kemudian diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan berupa tumbuh atau tidaknya mikroba di dalam media (Yasjudani, 2017). Metode dilusi terdiri dari dua cara yaitu:

2.7.2.1 Metode dilusi cair / *broth dilution test (serial diution)*

Pengujian dengan menggunakan sederet tabung reaksi yang diisi dengan inokulum kuman dan larutan antibakteri dalam berbagai konsentrasi. Zat untuk pengujian aktivitas antibakteri diencerkan sesuai serial dalam media cair, kemudian diinokulasikan dengan kuman dan diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai dengan mikroba uji (Yasjudani, 2017).

2.7.2.2 Metode dilusi padat (*solid dilution test*)

Zat antibakteri diencerkan dalam media agar. Zat antibakteri dituangkan ke dalam cawan petri sampai media agar membeku kemudian diinokulasikan kuman dan diinkubasi. Konsentrasi terendah larutan zat antibakteri yang masih memberikan hambatan terhadap pertumbuhan kuman ditetapkan sebagai konsentrasi hambat minimum (Yasjudani, 2017).

2.8. Kerangka Penelitian

Daun kakao dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat tradisional, hal ini didasarkan pada uji fitokimia yang telah dilakukan terhadap tanaman kakao, khususnya ekstrak daun kakao positif mengandung saponin, flavonoid dan tanin. Saponin, flavonoid dan tanin memiliki sifat sebagai antibakteri, hal ini dibuktikan melalui pengujian antibakteri ekstrak daun kakao dengan konsentrasi 50%, 75% dan 100% terhadap bakteri *S. Aureus* menghasilkan zona hambat pada masing-masing konsentrasi yaitu 20 mm, 22 mm dan 23 mm (Singh *et al.*, 2015).

Senyawa saponin, flavonoid dan tanin yang terkandung dalam daun kakao pada penelitian ini dipisahkan dengan cara ekstraksi menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96%. Maserat yang dihasilkan dari proses maserasi selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut etanol sebagai pelarut polar, diklorometana sebagai pelarut semi polar dan n-heksan sebagai pelarut non polar. Fraksi yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi cakram. Konsentrasi fraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 10%, 20% dan 30%.

2.9. Hipotesis

- 2.9.1. Fraksi etanol dan diklorometana dari daun kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.Aureus* ATCC 25923.
- 2.9.2. Fraksi yang memiliki zona hambat paling luas sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 adalah fraksi polar (etanol).
- 2.9.3. Seri konsentrasi fraksi yang digunakan untuk penelitian uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 yaitu 10%, 20% dan 30%. Konsentrasi optimum fraksi aktif yaitu fraksi etanol untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 adalah konsentrasi 10%.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kakao sebanyak 5 kg, etanol 96% sebanyak 7.500 ml, bakteri *S. Aureus* ATCC 25923, antibiotik Kloramfenikol, media *Nutrient Agar* sebanyak 2,6 g, media *Nutrient broth* sebanyak 0,08 g, n-heksana sebanyak 75 ml, diklorometana sebanyak 75 ml, *aquadestilata*, HCl, Mg, FeCl₃.

3.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu botol maserasi, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, alumunium foil, corong pisah, cawan penguap, kaca arloji, pipet, *blender*, spatula, gelas ukur, autoklaf, cawan petri, jarum ose, pinset, mikropipet, lampu spiritus, kapas, *hot plate*, oven, lemari pendingin, *laminar air flow* (LAF), inkubator, cakram kosong steril, jangka sorong, dan alat-alat gelas standar laboratorium.

3.3. Populasi penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah daun kakao yang terdapat di Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur.

3.4. Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kakao sebanyak 5 kg diperoleh dari Desa Samir, Kecamatan Ngunut, Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1. Daun kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan daun dari tumbuhan kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diambil dari Desa Samir, Kecamatan Ngunut, Kabupaten Tulungagung, Jawa Timur.

3.5.2. Bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 merupakan bakteri Gram positif yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UESBE.

3.6. Variabel Penelitian

3.6.1. Variabel bebas

Variabel bebas adalah variabel yang dapat menjadi penyebab atau yang mempengaruhi perubahannya atau munculnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2013). Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dari fraksi daun kakao.

3.6.2. Variabel terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang menjadi akibat atau yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas (Sugiyono, 2013). Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah daya hambat fraksi daun kakao terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.

3.6.3. Variabel kontrol

Variabel kontrol atau terkendali merupakan variabel yang dibuat konstan atau dikendalikan sehingga hubungan variabel terikat terhadap variabel bebas tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti (Sugiyono, 2013). Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 dan metode maserasi .

3.7. Metode Penelitian

3.7.1. Determinasi tanaman

Sampel tanaman daun kakao dilakukan determinasi di UPT Materia Medica Kota Batu, Malang, Jawa Timur. Tujuan determinasi tersebut untuk mengetahui identitas tanaman berdasarkan klasifikasi ilmiah (Insanu *et al.*, 2011).

3.7.2. Pembuatan simplisia

Mengambil daun kakao (*Theobroma cacao* L.) segar dengan cara memetik daunnya sebanyak 5 kg. Daun kakao yang telah diambil dilakukan sortasi basah yang bertujuan untuk membersihkan daun kakao dari bahan pengotor. Pencucian daun kakao menggunakan air mengalir dari sumur untuk menghilangkan pengotor

yang menempel pada daun kakao. Daun yang telah dicuci dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan dengan temperatur ruangan. Simplisia daun kakao kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan simplisia dari kotoran atau bahan asing lainnya. Simplisia yang telah kering kemudian dilakukan penghalusan menggunakan *blender* sampai simplisia daun kakao menjadi serbuk halus. Serbuk halus daun kakao dilakukan pengayakan dengan ayakan no.mesh 80. Pengayakan bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi karena semakin halus serbuk simplisia maka permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan cairan penyari semakin luas (Depkes RI, 2000).

3.7.3. Pemeriksaan karakteristik simplisia

3.7.3.1. Uji susut pengeringan simplisia

Susut pengeringan adalah pengurangan berat bahan setelah dikeringkan dengan cara yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2008).

$$\% \text{ Susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot daun basah} - \text{Bobot daun kering}}{\text{Bobot daun basah}} \times 100 \%$$

Penetapan susut pengeringan pada simplisia bertujuan untuk mengetahui batas maksimal atau rentang besarnya pengurangan berat bahan pada proses pengeringan serta tidak terdapat syarat atau rentang nilai yang ditetapkan (Depkes RI, 2000).

3.7.3.2. Uji kadar air serbuk simplisia

Menimbang serbuk simplisia daun kakao sebanyak 10 g dalam wadah yang telah ditara, kemudian mengeringkan selama 5 jam pada suhu 105°C. Proses selanjutnya yaitu menimbang serbuk simplisia hasil pengeringan dan menghitung kadar air. Perhitungan uji kadar air yaitu sebagai berikut : (Depkes RI, 2000)

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

Kandungan air serbuk simplisia yang memenuhi persyaratan yaitu kurang dari 10% karena reaksi enzimatis tidak dapat berlangsung apabila kadar air dalam serbuk simplisia kurang dari 10% sehingga mencegah terjadinya penurunan mutu serbuk simplisia (BPOM RI, 2014).

3.7.4. Pembuatan ekstrak daun kakao

Menimbang serbuk simplisia daun kakao sebanyak 500 g. Perbandingan antara bahan dengan pelarut yang digunakan dalam maserasi yaitu 1: 7,5 (Dwi Ratna *et al.*, 2015). Proses selanjutnya yaitu memasukkan serbuk simplisia daun kakao ke dalam bejana maserasi, lalu menambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3.750 ml atau hingga terendam, dan dilakukan pengadukan hingga homogen. Selanjutnya menutup bejana dan menyimpan serbuk dalam bejana maserasi dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari secara langsung selama 5 hari. Selama perendaman, setiap hari dilakukan pengadukan selama 15 menit. Setelah dilakukan perendaman selama 5 hari, kemudian menyaring ekstrak untuk mendapatkan maserat. Hasil ampas dari proses maserasi kemudian dilakukan remaserasi dengan menggunakan jumlah pelarut yang sama yaitu 3.750 ml. Proses selanjutnya yaitu memekatkan maserat hasil remaserasi dengan oven pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak daun kakao (Depkes RI, 2000). Pemekatan menggunakan suhu 50°C karena suhu tersebut dapat mencegah terjadinya kerusakan senyawa metabolit sekunder seperti saponin, flavonoid dan tanin (Wahyuni *et al.*, 2018).

3.7.5. Pemeriksaan karakteristik ekstrak

3.7.5.1. Organoleptik

Pengamatan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun kakao (Depkes RI, 2000).

3.7.5.2. Rendemen ekstrak

Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Rendemen ekstrak daun kakao dihitung dengan membandingkan bobot awal simplisia dengan bobot akhir yang dihasilkan (Depkes RI, 2000).

% Rendemen = $\frac{\text{Bobot ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal serbuk simplisia}} \times 100 \%$

Bobot awal serbuk simplisia

Hasil penghitungan rendemen ditunjukkan dengan satuan persen (%), semakin tinggi nilai rendemen maka nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Kualitas ekstrak yang dihasilkan berbanding terbalik dengan jumlah

rendemen yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin rendah mutu yang didapatkan (Wijaya *et al.*, 2018).

3.7.6. Skrining fitokimia

3.7.6.1. Identifikasi flavonoid

Mencampurkan ekstrak daun kakao sebanyak kurang lebih 0,5 g dengan 3 ml etanol kemudian memanaskan dan menghomogenkan campuran. Proses selanjutnya yaitu menyaring campuran yang telah homogen dan menambahkan Mg sebanyak 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat pada filtrat yang telah diperoleh. Adanya flavonoid dalam sampel ditandai dengan warna merah, orange, dan hijau pada lapisan etanol (Harborne, 2006). Perubahan warna yang terjadi pada identifikasi flavonoid tersebut disebabkan karena flavonoid akan tereduksi dengan Mg dan HCl (Latifah, 2015).

3.7.6.2. Identifikasi saponin

Menimbang ekstrak daun kakao sebanyak 0,5 g kemudian menambahkan 10 ml *aquadestilata* panas, dilakukan pendinginan dan kemudian mencampurkan larutan tersebut selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit (Depkes RI, 1989). Busa yang terbentuk menunjukkan adanya kandungan glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk busa dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Latifah, 2015).

3.7.6.3. Identifikasi tanin

Menambahkan ekstrak daun kakao sebanyak 2 g dengan etanol sampai ekstrak tersebut terendam, kemudian memindahkan larutan tersebut sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi dan menambahkan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Harborne, 2006). Pembentukan warna hitam kebiruan atau hijau disebabkan karena logam Fe dan tanin membentuk senyawa kompleks. Senyawa kompleks tersebut terbentuk karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom non logam (Latifah, 2015).

3.7.7. Fraksinasi

Ekstrak etanol daun kakao dilakukan fraksinasi dengan cara menimbang sejumlah ekstrak sebanyak 5 g, kemudian melarutkan ekstrak menggunakan 75 ml etanol. Langkah selanjutnya yaitu memasukkan larutan sampel ke dalam corong pisah dan menambahkan pelarut n-heksan sebagai pelarut non polar sebanyak 25 ml, kemudian dilakukan penggojogan hingga tampak terjadi pemisahan. Hasil fraksinasi diperoleh fraksi n-heksan dan fraksi etanol, kemudian memisahkan fraksi n-heksan yang telah diperoleh. Fraksi etanol dilakukan fraksinasi kembali dengan menambahkan diklorometana sebanyak 25 ml. Fraksi diklorometana dan fraksi etanol tersebut kemudian dipisahkan. Hasil fraksinasi diperoleh fraksi diklorometana. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Fraksi yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan oven dengan suhu 50°C sampai didapatkan fraksi daun kakao (Yulianti *et al.*, 2013). Pemekatan menggunakan suhu 50°C karena suhu tersebut dapat mencegah terjadinya kerusakan senyawa metabolit sekunder seperti saponin, tanin dan flavonoid (Wahyuni *et al.*, 2018).

3.7.8. Uji daya hambat bakteri fraksi ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao* L.)

3.7.8.1. Sterilisasi

Alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian ini disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci bersih, kemudian alat dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas perkamen (Muhamad, 2014). Sterilisasi media dan larutan uji dilakukan dengan menggunakan wadah yang sesuai dengan menutup mulut wadah menggunakan kapas dan membungkus wadah menggunakan aluminium foil (Pratiwi, 2008).

3.7.8.2. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

Medium NA digunakan untuk membiakkan bakteri uji. Menimbang serbuk NA sebanyak 0,3 g kemudian melarutkan dalam *aquadestilata* sebanyak 15 ml dan memanaskan sampai mendidih sehingga serbuk NA terlarut. Selanjutnya media NA disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media

agar siap dituangkan pada plate atau cawan petri. (Muhamad, 2014). Cawan petri berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan petri berdiameter 9 cm dapat menampung media sebanyak 10 ml (Widodo dan Kusharyati, 2013).

3.7.8.3. Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB)

Media NB digunakan untuk pembuatan suspensi bakteri uji. Menimbang serbuk NB sebanyak 0,08 g kemudian melarutkan dalam 10 ml *aquadestilata*, dan memanaskan sampai mendidih sehingga serbuk NB terlarut. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam tabung reaksi kemudian didinginkan (Muhamad, 2014).

3.7.8.4. Pembuatan larutan uji

Seri konsentrasi fraksi daun kakao diencerkan menggunakan masing-masing pelarut dalam fraksinasi yaitu etanol, n-heksan dan diklorometana. Konsentrasi fraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10%, 20% dan 30%. Konsentrasi 10% dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 10 g dilarutkan dalam 100 ml pelarut, konsentrasi 20% dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 20 g dilarutkan dalam 100 ml pelarut, dan konsentrasi 30% dibuat dengan menimbang fraksi sebanyak 30 g dilarutkan dalam 100 ml pelarut.

3.7.8.5. Pembuatan kontrol positif dan kontrol negatif

A. Kontrol positif yang digunakan yaitu kloramfenikol

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu kloramfenikol 1%. Kloramfenikol termasuk dalam kategori sensitif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. Aureus* karena memiliki zona hambat sebesar 22 mm (Dwi Ratna *et al.*, 2015).

B. Kontrol negatif yang digunakan adalah etanol, diklorometana dan n-heksan

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol, diklorometana dan n-heksan.

3.7.8.6. Pembuatan suspensi bakteri

Mensuspensikan satu ose biakan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 ke dalam tabung berisi 5 ml media NB kemudian menginkubasi suspensi tersebut selama 24

jam pada suhu 37°C. Selanjutnya mengencerkan suspensi bakteri tersebut menggunakan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan 0,5 Mc. Farland (biakan cair yang mempunyai populasi 1×10^7 CFU/ml sampai 1×10^8 CFU/ml) (Jawetz dan Adelberg, 2005).

3.7.8.7. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao dengan seri konsentrasi

Uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao menggunakan metode difusi cakram kertas. Menyiapkan media yang telah diinokulasi dengan bakteri uji, kemudian menyiapkan dan mensterilkan kertas cakram dengan diameter 6 mm. Langkah selanjutnya yaitu menambahkan fraksi etanol, n-heksan dan diklorometana daun kakao dengan berbagai konsentrasi yaitu konsentrasi 10%, 20% dan 30% pada masing-masing cakram sejumlah 20 mikroliter. Kertas cakram steril yang telah ditetesi dengan fraksi daun kakao kemudian ditempatkan pada permukaan media dengan pinset steril dengan cara menekan ke bawah untuk memastikan kontak antara kertas cakram dengan permukaan media. Kontrol positif disiapkan dengan meneteskan kertas cakram dengan larutan kloramfenikol sebanyak 20 mikroliter. Kontrol negatif disiapkan dengan meneteskan kertas cakram dengan masing-masing pelarut fraksi sebanyak 20 mikroliter. Langkah selanjutnya yaitu menginkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian mengukur diameter zona hambatnya terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 (Kusumowati *et al.*, 2014).

3.7.8.8. Pengukuran zona hambat

Pengukuran zona hambat menggunakan mistar berskala atau jangka sorong. Pengukuran dilakukan pada zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram secara horizontal dan vertikal, kemudian diperoleh berupa diameter (mm). Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil yang akurat (Mulyatni, 2012).

3.8. Analisis Statistika

Data hasil penelitian aktivitas antibakteri fraksi daun kakao terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 dianalisis menggunakan program SPSS 16 untuk

mengetahui aktivitas antibakteri fraksi daun kakao terhadap *S. Aureus* ATCC 25923. Pengolahan data dapat dilakukan sebagai berikut :

3.8.1. Uji normalitas data

Uji normalitas adalah uji untuk mengukur apakah data mempunyai distribusi normal, sehingga dapat digunakan dalam statistik parametrik. Penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk* sebagai uji normalitas data.

Perumusan hipotesis :

H_0 : data berdistribusi normal

H_1 : data berdistribusi tidak normal

Pengambilan keputusan :

- 1) Jika $p > 0,05$; maka H_0 diterima
- 2) Jika $p \leq 0,05$; maka H_1 diterima

3.8.2. Uji homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk menguji kesamaan (homogenitas) beberapa sampel, yakni seragam tidaknya variasi sampel – sampel yang diambil dari populasi yang sama (Ghazali, 2011). Pengujian homogenitas dilakukan dengan menggunakan *levene statistic*.

Perumusan hipotesis :

H_0 : data yang didapat memiliki variansi yang sama atau homogen

H_1 : data yang didapat memiliki variansi yang tidak sama atau tidak homogen

Pengambilan keputusan :

- 1) Jika $p > 0,05$; maka H_0 diterima
- 2) Jika $p \leq 0,05$; maka H_1 diterima

3.8.3. Uji *Kruskal - Wallis*

Uji *Kruskal - Wallis* dalam penelitian ini digunakan untuk membuktikan bahwa perlakuan fraksi daun kakao dengan variasi konsentrasi berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.

Perumusan hipotesis :

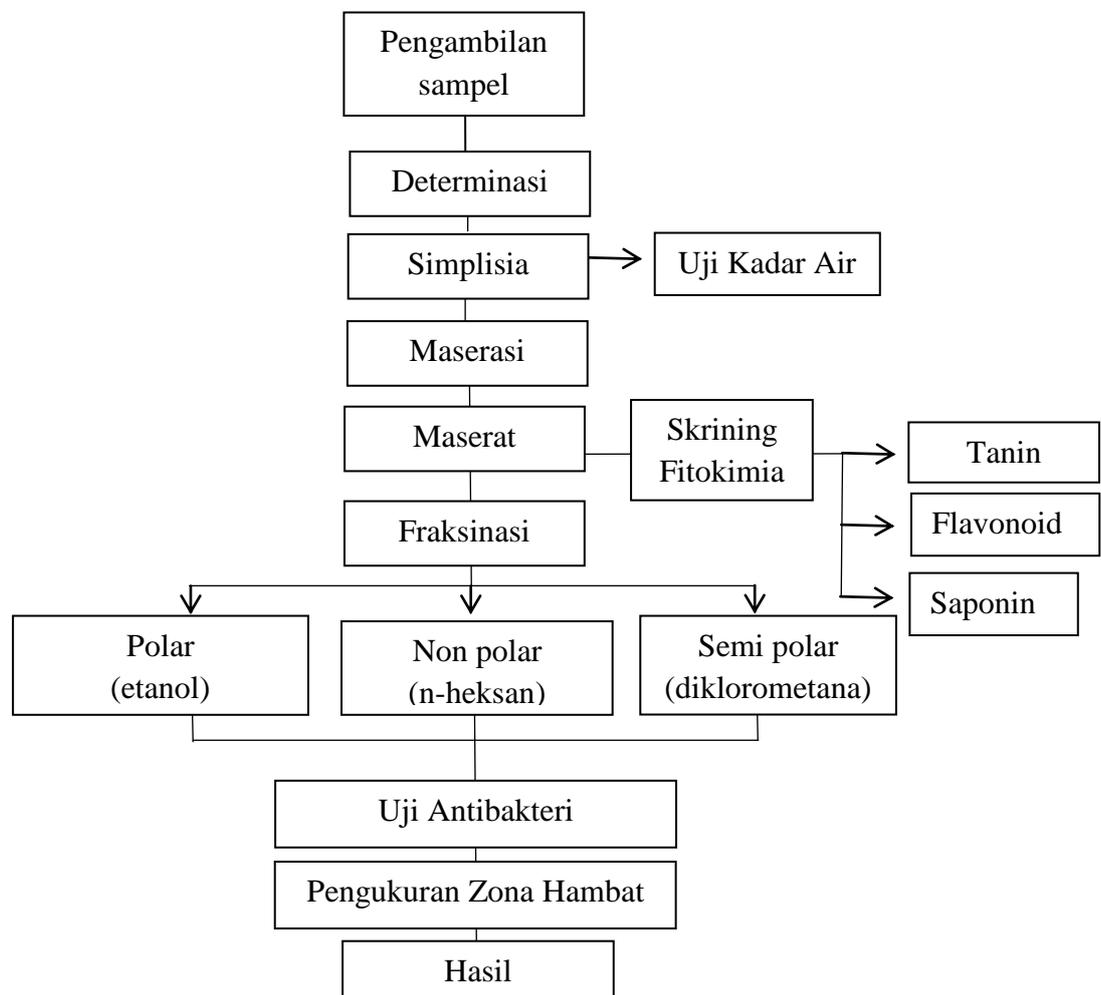
H_0 : Tidak ada pengaruh variasi konsentrasi fraksi daun kakao terhadap pertumbuhan *S. Aureus* ATCC 25923

H_1 : Ada pengaruh variasi konsentrasi fraksi daun kakao terhadap pertumbuhan *S. Aureus* ATCC 25923

Pengambilan keputusan :

- 1) Jika $p > 0,05$; maka H_0 diterima
- 2) Jika $p \leq 0,05$; maka H_1 diterima

3.9. Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

3.10. Jadwal Penelitian

JADWAL KEGIATAN		Tahun 2019			Tahun 2020							TEMPAT
		Bulan ke-			Bulan ke-							
		10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
1.	Pengajuan judul	√										
2.	Studi pustaka	√										
3.	Persiapan penelitian				√							
	a. Determinasi tanaman				√							UPT Materia Medica
	b. Pembuatan serbuk simplisia				√							Laboratorium Botani KPB
	c. Maserasi					√						Laboratorium Botani KPB
4.	Penelitian laboratorium						√					
	a. Pembuatan ekstrak kental dan fraksinasi						√					Laboratorium Botani KPB
	b. Identifikasi kandungan ekstrak						√					Laboratorium Botani KPB
	c. Pengujian fraksi terhadap <i>S. Aureus</i>						√	√				Laboratorium Botani KPB
5.	Pengumpulan dan analisis data								√			Laboratorium Botani
6.	Penyusunan laporan								√	√		Laboratorium Botani KPB
7.	Pengumpulan laporan										√	Prodi S1 Farmasi

Tabel 3.1 Jadwal pelaksanaan penelitian

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui identitas suatu tanaman berdasarkan klasifikasi ilmiahnya (Insanu *et al.*, 2011). Tanaman yang digunakan yaitu tanaman kakao yang telah diidentifikasi di UPT Materia Medica Kota Batu, Malang, Jawa Timur. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) memiliki kunci determinasi sebagai berikut 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120b-128b-129b-135b-136b-139b-140b-142b-143a-144b-145b-1b-3b-4b-5b-6b. Hasil determinasi tanaman kakao dapat dilihat pada lampiran 1.

4.2. Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

4.2.1. Uji susut pengeringan simplisia

Hasil dari uji susut pengeringan simplisia daun kakao dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji susut pengeringan simplisia daun kakao

Sampel	Bobot daun basah	Bobot daun kering	% Hasil
Daun kakao	5,00 kg	2,10 kg	58 %

Rumus % susut pengeringan (Depkes RI, 2008) :

$$\% \text{ susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot daun basah} - \text{Bobot daun kering}}{\text{Bobot daun basah}} \times 100 \%$$

Uji susut pengeringan pada simplisia digunakan untuk mengetahui rentang besarnya pengurangan berat simplisia pada proses pengeringan (Depkes RI, 2000). Hasil uji susut pengeringan simplisia daun kakao sebesar 58% sehingga dapat dikatakan bahwa pada proses pengeringan tersebut, simplisia daun kakao mengalami pengurangan berat bahan yang besar. Hal ini disebabkan karena suhu pada proses pengeringan simplisia dapat mempengaruhi proses transpirasi kandungan air yang terdapat pada daun kakao (Luliana *et al.*, 2016).

4.2.2. Uji kadar air serbuk simplisia

Hasil dari uji kadar air serbuk simplisia daun kakao dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji kadar air serbuk simplisia daun kakao

Sampel	Bobot awal	Bobot akhir	% Hasil
Daun kakao	10,00 gram	9,25 gram	7,5 %

Rumus % kadar air (Depkes RI, 2000) :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

Bobot awal

Uji kadar air bertujuan untuk mengetahui presentase kadar air yang terdapat pada serbuk simplisia (Depkes RI, 2000). Hasil uji kadar air serbuk daun kakao yaitu 7,5%. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air serbuk daun kakao tidak melampaui batas maksimal yaitu 10% (BPOM RI, 2004). Kadar air yang melebihi 10% dapat menyebabkan serbuk simplisia mudah ditumbuhi kapang dan mengalami reaksi enzimatik yang dapat merusak serbuk simplisia. Reaksi enzimatik tersebut terjadi karena didalam sel terdapat enzim tertentu yang masih dapat menguraikan senyawa aktif sesaat setelah sel mati dan reaksi tersebut dipengaruhi oleh kadar air pada serbuk simplisia (Depkes RI, 1985).

4.3. Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak

4.3.1. Organoleptik

Organoleptis ekstrak daun kakao pada penelitian ini yaitu ekstrak berwarna coklat pekat, berbentuk kental dan memiliki bau khas daun kakao.

4.3.2. Rendemen ekstrak

Presentase rendemen bertujuan untuk membandingkan bobot awal serbuk simplisia daun kakao dengan bobot ekstrak yang dihasilkan sehingga kualitas ekstrak dapat diketahui. Hasil dari rendemen ekstrak daun kakao dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil rendemen ekstrak daun kakao

Sampel	Bobot simplisia	Bobot ekstrak	Hasil
Daun kakao	500 gram	34 gram	6,8 %

Rumus % rendemen (Depkes RI, 2000) :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Bobot awal serbuk simplisia

Berdasarkan Tabel 4.3 nilai rendemen ekstrak daun kakao memiliki nilai rendemen yang rendah yaitu 6,8 %. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wijaya *et al.*(2018) semakin tinggi nilai rendemen maka nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak, namun kualitas ekstrak yang dihasilkan berbanding terbalik dengan jumlah rendemen yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin rendah mutu yang didapatkan. Berdasarkan Tabel 4.3 dapat disimpulkan bahwa nilai rendemen ekstrak daun kakao memiliki kualitas ekstrak baik.

4.4. Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Daun Kakao

Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak dan fraksi daun kakao dilakukan secara kualitatif dengan metode skrining fitokimia. Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam daun kakao dengan cara penambahan suatu reagen tertentu sehingga akan dihasilkan suatu perubahan warna pada sampel. Senyawa yang diidentifikasi pada ekstrak dan fraksi daun kakao yaitu flavonoid, saponin dan tanin. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun kakao dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan hasil skrining fitokimia fraksi daun kakao dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.4 Hasil skrining fitokimia ekstrak daun kakao

Kandungan senyawa kimia	Pereaksi	Perubahan warna	Hasil
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl pekat	Orange	+
Saponin	Ekstrak + <i>aquadestilata</i>	Busa stabil	+
Tanin	FeCl 1%	Hitam kebiruan	+

Keterangan : (+) terdapat senyawa dan (-) tidak terdapat senyawa



(a)



(b)



(c)

Gambar 4.1 Hasil skrining fitokimia (a) flavonoid, (b) saponin, (c) tanin

Tabel 4.5 Hasil skrining fitokimia fraksi daun kakao

Kandungan senyawa kimia	Perubahan warna			Hasil		
	Etanol	Dikloro- metana	N- Heksan	Etanol	Dikloro- metana	N- Heksan
Flavonoid	Orange	Orange	Bening	+	+	-
Saponin	Busa stabil	Busa tidak stabil	Tidak terdapat busa	+	-	-
Tanin	Hitam kebiruan	Hitam kebiruan	Bening	+	+	-

Keterangan : (+) terdapat senyawa dan (-) tidak terdapat senyawa

Kandungan senyawa kimia	Fraksi etanol	Fraksi diklorometana	Fraksi n-heksan
Flavonoid			
Saponin			
Tanin			

Gambar 4.2 Hasil skrining fitokimia fraksi daun kakao

Identifikasi flavonoid bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak dan fraksi daun kakao. Ekstrak dan fraksi yang mengandung senyawa flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna

menjadi merah, orange, dan hijau pada lapisan etanol (Harborne, 2006). Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena flavonoid akan tereduksi dengan Mg dan HCl (Latifah, 2015).

Identifikasi saponin bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa saponin dalam ekstrak dan fraksi daun kakao. Hasil identifikasi saponin positif apabila terbentuk busa stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Busa yang terbentuk disebabkan adanya senyawa glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Latifah, 2015).

Identifikasi tanin bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa tanin dalam ekstrak dan fraksi daun kakao. Hasil identifikasi tanin positif apabila terbentuk warna hitam kebiruan atau hijau (Harborne, 2006). Pembentukan warna hitam kebiruan atau hijau disebabkan karena terbentuknya senyawa kompleks antara logam Fe dan tanin. Senyawa kompleks tersebut terbentuk karena terdapat ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom non logam (Latifah, 2015).

Berdasarkan Tabel 4.4 hasil skrining fitokimia pada ekstrak daun kakao menunjukkan bahwa ekstrak daun kakao positif mengandung senyawa flavonoid, saponin dan tanin, hal ini sesuai dengan sifat senyawa aktif yang terdapat pada daun kakao yaitu lebih banyak mengandung senyawa polar sehingga senyawa aktif pada daun kakao relatif larut dalam larutan penyari. Berdasarkan Tabel 4.5 hasil skrining fitokimia pada fraksi daun kakao menunjukkan bahwa pada fraksi etanol mengandung senyawa flavonoid, saponin dan tanin karena senyawa-senyawa tersebut bersifat polar sehingga relatif larut dalam pelarut polar, pada fraksi diklorometana mengandung senyawa flavonoid dan tanin karena aglikon dari flavonoid bersifat kurang polar sehingga dapat larut dalam pelarut semi polar, sedangkan pada fraksi n-heksan tidak mengandung senyawa saponin, flavonoid dan tanin karena senyawa tersebut memiliki sifat polar dan semi polar sehingga tidak larut dalam pelarut non polar.

4.5. Fraksinasi Daun Kakao

Ekstrak daun kakao selanjutnya dilakukan fraksinasi untuk memisahkan senyawa yang terdapat pada daun kakao berdasarkan polaritasnya (Harborne, 2006). Pelarut yang digunakan yaitu etanol sebagai pelarut polar, diklorometana sebagai pelarut semi polar dan n-heksan sebagai pelarut non polar. Hasil fraksinasi daun kakao dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil fraksinasi daun kakao

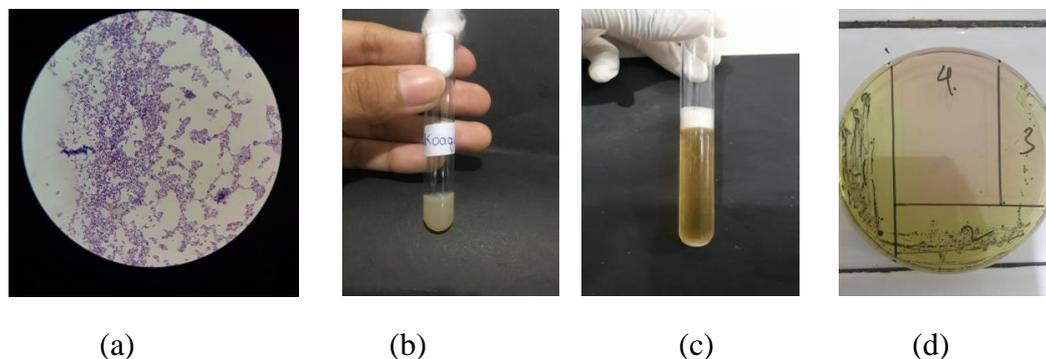
Sampel	Bobot Ekstrak	Bobot Fraksi	Rendemen
Fraksi Etanol	25 gram	3,13 gram	12,52 %
Fraksi Diklorometana	25 gram	2,31 gram	9,24 %
Fraksi N- Heksan	25 gram	1,30 gram	5,2 %

Berdasarkan Tabel 4.6 rendemen yang diperoleh dari masing-masing fraksi berbeda karena adanya perbedaan kemampuan pelarut dalam proses penyarian. Nilai rendemen fraksi berbanding terbalik dengan kualitas fraksi yaitu semakin tinggi nilai rendemen maka nilai fraksi yang dihasilkan semakin banyak, namun kualitas fraksi yang dihasilkan memiliki mutu rendah (Wijaya *et al.*, 2018). Nilai rendemen tertinggi terdapat pada fraksi etanol sebesar 12,52 % karena daun kakao lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar yaitu flavonoid dalam bentuk glikonnya, saponin dan tanin sehingga senyawa aktif pada daun kakao relatif larut dalam pelarut polar, diikuti dengan nilai rendemen fraksi diklorometana sebesar 9,24 % dan yang terakhir yaitu fraksi n-heksan memiliki nilai rendemen sebesar 5,2 %. Nilai rendemen fraksi diklorometana dan fraksi n-heksan lebih rendah jika dibandingkan dengan fraksi etanol karena senyawa aktif yang bersifat semi polar dan non polar terdapat dalam jumlah yang lebih kecil pada daun kakao.

4.6. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Identifikasi bakteri bertujuan untuk mengetahui identitas bakteri uji. Bakteri uji pada penelitian ini yaitu *S. Aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi UESBE. Identifikasi bakteri yang dilakukan pada Laboratorium Mikrobiologi UESBE terdiri dari uji pewarnaan Gram, uji koagulase, uji katalase

dan uji cawan gores. Gambar hasil uji identifikasi bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil uji identifikasi bakteri *S. Aureus* (a) uji pewarnaan Gram, (b) uji koagulase, (c) uji katalase, (d) uji cawan gores.

Uji pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi suatu sel bakteri dan mengetahui kemurnian dari sel bakteri. Berdasarkan Gambar 4.3 (a), morfologi dari sel bakteri yaitu berwarna ungu, berbentuk bulat dan berkelompok seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop. Warna ungu dari pewarnaan Gram menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif. Warna ungu tersebut disebabkan karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel terluar yang terdiri dari peptidoglikan tebal tanpa lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida sehingga bakteri mampu mempertahankan warna pertama yaitu kristal violet atau cat Gram A (Ijong, 2015). Perbedaan warna bakteri pada pewarnaan Gram disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan tipis yang dibungkus oleh lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida sehingga ketika diwarnai dengan kristal violet lalu dibilas dengan alkohol, lipid akan terlarut sehingga bakteri Gram negatif akan menyerap pewarnaan kedua yaitu warna merah (Khrisna, 2013).

Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri menghasilkan enzim koagulase. Enzim koagulase merupakan protein yang dihasilkan oleh *S. Aureus* yang mengakibatkan penggumpalan plasma (Khrisna, 2013). Uji ini digunakan untuk membedakan bakteri *S. Aureus* dengan bakteri *Staphylococcus epidermis* karena bakteri *Staphylococcus epidermis* tidak terbentuk gumpalan – gumpalan putih. Hasil positif dari uji koagulase yaitu jika

gumpalan plasma pada tabung uji tidak terlepas atau tetap melekat ketika tabung dibalik atau dimiringkan (Suryaku, 2017). Berdasarkan Gambar 4.3 (b), hasil identifikasi menunjukkan positif terbentuk gumpalan plasma yang melekat pada tabung uji, sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri uji tersebut yaitu bakteri *S. Aureus*.

Uji katalase bertujuan untuk membedakan antara kelompok bakteri *staphylococcus* dan *streptococcus* karena kedua bakteri tersebut memiliki bentuk sama yaitu berbentuk kokus, dimana kelompok *staphylococcus* bersifat katalase positif (Lay, 1994). Hasil positif dari uji katalase yaitu adanya gelembung udara karena H_2O_2 bersifat toksik terhadap sel bakteri sehingga bakteri akan menghasilkan enzim katalase. Enzim katalase pada bakteri mampu mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi H_2O dan O_2 (Suryaku, 2017). Berdasarkan gambar 4.3 (c), hasil identifikasi menunjukkan katalase positif karena terbentuk gelembung udara sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri uji tersebut yaitu kelompok bakteri *Staphylococcus*.

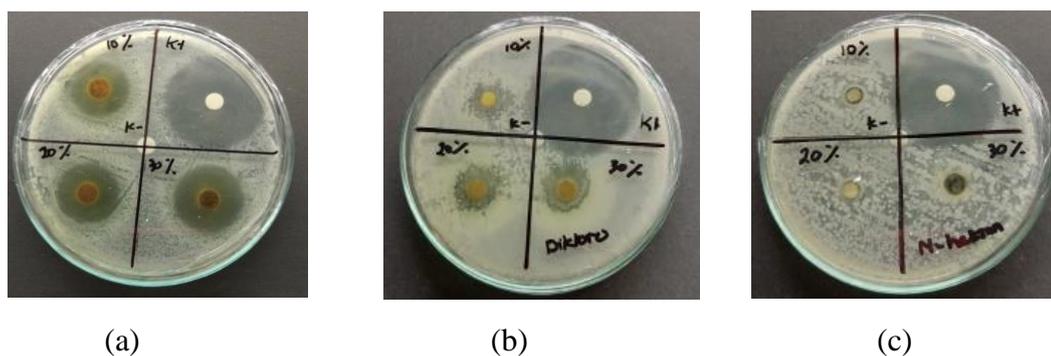
Uji cawan gores bertujuan untuk mengetahui koloni dari bakteri *S. Aureus*. Hasil identifikasi koloni *S. Aureus* ditunjukkan dengan koloni berwarna hitam karena *S. Aureus* mampu mereduksi tellurit menjadi metalik tellurit. Media disekitar koloni berwarna kuning, hal ini disebabkan adanya fermentasi manitol yang ditunjukkan dengan perubahan warna indikator phenol red dari warna merah menjadi warna kuning (Jawetz *et al.*, 2012). Berdasarkan Gambar 4.3 (d), hasil identifikasi menunjukkan hasil positif karena terdapat warna koloni hitam dan warna media disekitar koloni berwarna kuning sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri uji tersebut yaitu bakteri *S. Aureus*.

4.7. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao

Fraksi yang didapatkan dari ekstrak daun kakao yaitu fraksi etanol, diklorometana dan n-heksan yang kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 menggunakan metode difusi cakram. Metode cakram memiliki harga relatif murah karena tidak memerlukan alat khusus dalam pengerjaannya, cepat dan lebih mudah dilakukan (Katrin *et al.*,

2015). Seri konsentrasi yang digunakan untuk masing – masing fraksi daun kakao pada pengujian ini yaitu 10%, 20% dan 30%. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan fraksi daun kakao yaitu pelarut dari masing-masing fraksi. Penelitian ini menggunakan kontrol negatif berupa etanol, diklorometana dan n-heksan.

Kontrol positif yang digunakan yaitu kloramfenikol karena kloramfenikol memiliki mekanisme yang sama dengan senyawa yang terkandung dalam daun kakao yaitu senyawa flavonoid dan berkhasiat sebagai bakteriostatik terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Tjay dan Rahardja, 2015). Kloramfenikol mampu mengubah proses denaturasi protein dan asam nukleat pada bakteri sehingga antibiotik ini dapat merusak sel bakteri (Ganiswara, 2012). Hasil zona hambat uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi (a) etanol, (b) diklorometana dan (c) n-heksan

Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa fraksi etanol dan diklorometana memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. Aureus* ATCC 25923, hal ini ditandai dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram pada konsentrasi 10%, 20% dan 30%, sedangkan pada fraksi n-heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri karena tidak terdapat zona bening di sekitar kertas cakram.

Aktivitas antibakteri berdasarkan diameter zona hambat dapat digolongkan dalam 4 kategori yaitu kategori lemah (< 5 mm), kategori sedang (6-10 mm), kategori kuat (11-20 mm) dan kategori sangat kuat (≥ 21 mm) (Susanto *et al.*, 2012). Zona hambat kontrol positif (kloramfenikol 1%) dan kontrol negatif pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil zona hambat kontrol positif dan kontrol negatif fraksi daun kakao

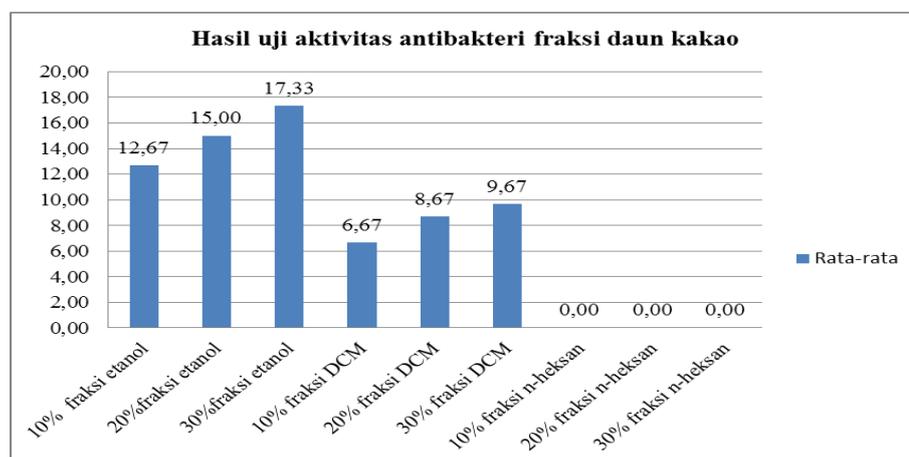
Sampel	Diameter hambat (mm)			Rata-rata \pm SD
	Replikasi			
	1	2	3	
K+ fraksi etanol	27,00	28,00	27,00	27,33 \pm 0,577
Etanol	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,000
K+ fraksi diklorometana	31,00	30,00	31,00	30,67 \pm 0,577
Diklorometana	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,000
K+ fraksi n-heksan	30,00	31,00	30,00	30,33 \pm 0,577
N- Heksan	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,000

Berdasarkan Tabel 4.7 hasil zona hambat pada kontrol negatif pada penelitian ini memiliki rata-rata $0,00 \pm 0,000$. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif berupa etanol, diklorometana dan n-heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga tidak mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri pada fraksi daun kakao. Hasil zona hambat kontrol positif pada fraksi etanol, diklorometana dan n-heksan memiliki nilai rata-rata $27,33 \pm 0,577$, $30,67 \pm 0,577$ dan $30,33 \pm 0,577$. Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif memiliki aktivitas antibakteri kategori sangat kuat. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Dwi Ratna *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa kloramfenikol bersifat sensitif terhadap *S. Aureus*.

Nilai rata-rata zona hambat fraksi etanol pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% yaitu sebesar $12,67 \pm 0,577$, $15,00 \pm 1,000$, dan $17,33 \pm 0,577$. Nilai rata-rata zona hambat fraksi diklorometana pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% yaitu sebesar $6,67 \pm 0,577$, $8,67 \pm 0,577$, dan $9,67 \pm 0,577$. Nilai rata-rata zona hambat fraksi n-heksan pada konsentrasi 10%, 20% dan 30% yaitu sebesar $0,00 \pm 0,000$. Nilai rata-rata zona hambat fraksi daun kakao dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Berdasarkan Gambar 4.5 dapat diketahui bahwa fraksi etanol merupakan fraksi teraktif karena memiliki zona hambat paling besar terhadap *S. Aureus* ATCC 25923 jika dibandingkan dengan fraksi diklorometana dan fraksi n-heksan. Hal ini disebabkan karena fraksi etanol mampu menarik senyawa flavonoid, saponin dan tanin pada daun kakao. Mekanisme senyawa flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran sitoplasma karena senyawa tersebut dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan mengaktifkan sistem enzim

bakteri. Kerusakan membran ini menyebabkan nukleotida dan asam amino keluar dan mencegah bahan-bahan aktif masuk ke dalam sel sehingga menyebabkan kematian bakteri (Prajitno, 2007).



Gambar 4.5 Nilai rata-rata zona hambat fraksi daun kakao

Saponin dapat digunakan sebagai antibakteri dengan cara menurunkan tegangan permukaan dinding sel pada bakteri (Hassan, 2008). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu tanin menyebabkan dinding sel bakteri menjadi lisis, sehingga pembentukan dinding sel bakteri menjadi terhambat dan menyebabkan sel bakteri mati. (Ngajow *et al.*, 2013).

Fraksi diklorometana memiliki zona hambat lebih rendah jika dibandingkan dengan fraksi etanol dan lebih tinggi jika dibandingkan dengan fraksi n-heksan. Hal ini disebabkan karena fraksi diklorometana mampu menarik senyawa flavonoid dan tanin sehingga memiliki zona hambat yang lebih besar daripada fraksi n-heksan. Berdasarkan Gambar 4.5 dapat diketahui bahwa konsentrasi optimum fraksi teraktif yaitu fraksi etanol dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 adalah konsentrasi 10% karena pada konsentrasi 10% atau konsentrasi paling rendah pada penelitian ini, fraksi etanol mampu menghambat pertumbuhan *S. Aureus* dengan menghasilkan diameter zona hambat kategori kuat.

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao dengan beberapa seri konsentrasi tersebut selanjutnya dilakukan analisis statistik menggunakan SPSS 16 dengan metode *Kruskal - Wallis*. Uji *Kruskal - Wallis* dalam penelitian ini

digunakan untuk membuktikan bahwa perlakuan fraksi daun kakao dengan variasi konsentrasi berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *S. Aureus* ATCC 25923. Hasil dari uji *Kruskal - Wallis* didapatkan $p = 0,000$, nilai tersebut kurang dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh variasi konsentrasi fraksi daun kakao terhadap pertumbuhan *S. Aureus* ATCC 25923.

Analisis post hoc dari uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao menggunakan uji Mann-Whitney bertujuan untuk mengetahui zona hambat yang dihasilkan oleh fraksi daun kakao dari berbagai konsentrasi sudah setara (tidak memiliki perbedaan) atau belum setara (memiliki perbedaan) dengan antibiotik pembanding yaitu kloramfenikol. Hasil menunjukkan bahwa nilai $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa semua aktivitas antibakteri fraksi daun kakao yang diujikan belum setara dengan aktivitas antibakteri kloramfenikol 1%. Hal tersebut terjadi karena konsentrasi fraksi untuk uji aktivitas antibakteri kurang tinggi sehingga hasil tersebut belum setara dengan kloramfenikol 1%.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

- 5.1.1. Fraksi etanol dan fraksi diklorometana daun kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.
- 5.1.2. Fraksi etanol merupakan fraksi teraktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 karena fraksi etanol mengandung senyawa flavonoid, saponin dan tanin.
- 5.1.3. Konsentrasi optimum fraksi etanol daun kakao sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 adalah 10%.

5.2. Saran

- 5.2.1. Perlu dilakukan penelitian mengenai kandungan senyawa lain yang terdapat pada fraksi daun kakao sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923.
- 5.2.2. Perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri fraksi daun kakao terhadap bakteri *S. Aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi.
- 5.2.3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan bentuk sediaan obat untuk mengetahui efektifitas daun kakao sebagai bahan baku obat tradisional.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifurrahman., Samadin, K. Husni., Aziz, Syahril. 2014. Pola Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik Vancomycin di RSUP Dr. Mohammad Hosein Palembang. *MKS*, Th. 46, No. 4, p : 266-270
- Andhini, Nisa Fitri. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksan, Etil Asetat dan Air dari Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. *Skripsi*. Surakarta : Universitas Setia Budi
- Arifin, Bustanul., dan Ibrahim, Sanusi. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. Vol. 6, No. 1, p : 21-29
- Arifianti, Lusiana., Oktarina, Rice Disi., Kusumawati, Idha. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi terhadap Kadar Sinensetin dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E- Journal Planta Husada*. Vol.2, No.1. P : 1-4
- BPOM RI. 2014. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Non Klinik secara In Vitro*. Jakarta : BPOM RI
- Brieger, Gottfried. *A Laboratory Manual for Modern Organic Chemistry*. New York : Oakland University
- Brooks, Geo F., Butel, Janet S., Morse, Stephen A. 20015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Salemba Medika
- Calabria, L. M. 2008. The Isolation and Characterization of Triterpene Saponins from Silphium and the Chemosystematic and Biological Significance of Saponins in the Asteraceae. ProQuest.
- Chandra, Andy. 2015. Studi Awal Ekstraksi Batch Daun *Stevia Rebaudiana* Dengan Variabel Jenis Pelarut dan Temperatur Ekstraksi. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.
- Cook, N.C. dan S,Samman. 1996. Review Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effect, And Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem* (70), p : 66-76
- Depkes RI. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi Ketiga*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Hal. XXX
- Depkes RI. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Hal : 4-24

- Depkes RI. 1986. *Sediaan Galenika*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Hal : 2-8
- Depkes RI. 1989. *Materia Medika Indonesia (Jilid V)*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi Keempat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat* . Jakarta : Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, hal. 1-3
- Depkes RI. 2007. *Lampiran Keputusan Menteri Kesehatan Nomor : 381/Menkes/SK/III/2007 Mengenai Kebijakan Obat Tradisional Nasional Departemen Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Depkes RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*, Edisi I. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Diem Do, Quy., Elisa Angkawijaya, Artik., Tran – Nguyen, Phuong Lan., Huong Huynh, Lie., Soetardjo, Felycia Edi., Ismadji, Suryadi., Ju, Yi-Hsu. 2014. Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophilia Aritmica*. *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol. 22, No. 3. p : 296 - 302
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia-Kakao*. Jakarta : Direktorat Jenderal Indonesia
- Dwicahyani, Tiara., Sumardianto., Rianingsih, Laras. 2018. Uji Bioaktivitas Ekstrak Teripang Keling (*Holothuria atra*) sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J. Peng. & Biotek*. Vol. 7, No. 1, p : 15-24
- Dwidjoseputro. 1982. *Dasar – Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : Djambatan
- Dwi Ratna, Yuliana Rizqi., Ardani, Utari Sita., Fathiana, Zakiah., Rahmatullah, Annie., Trisharyanti D.K., Ika. 2016. Daya Antibakteri Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Sensitif dan Multiresisten. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol. 14, No. 1, p : 103-110
- Fauzana, Dianita Laila. 2010. Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan Reperkolasi Terhadap Rendemen Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Skripsi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor

- Fauzi, Ahmad Doni. 2008. *Panduan Lengkap Manfaat Tanaman Obat*. Jakarta : Edsa Mahkota
- Ganiswara, Sulistia G. 2012. *Farmakologi dan Terapi Edisi IV*. Jakarta : Bagian Farmakologi FKUI
- Ghazali, I., 2011. *Aplikasi Analisis Multivariate Dengan Program SPSS19*. Semarang: BP Universitas Diponegoro.
- Hadioetomo, R.S. 1990. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta : Gramedia, Hal. 103-104
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung : ITB
- Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi ke-2. Bandung : ITB
- Hassan, S.M. 2008. Antimicrobial Activities of Saponin-Rich Guar Meal Extract Poultry Science. *Disertasi*. Texas : A & M University, p : 33-34
- Ijong FG. 2015. *Mikrobiologi Perikanan dan Kelauatan*. Jakarta : Rineka Cipta
- Insanu, M. Ruslan, K., Wijaya, S. 2011. Isolasi Flavonoid dari Daun Durian (*Durio zibethinus Murr., Bombacaceae*). *Acta Pharmaceutical Indonesia*. Vol. 34, p : 6-10
- Jawetz, E. Melnick, J.L dan Adelberg, EA. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : EGC, Hal. 79
- Jawetz, E. Melnick, J.L dan Adelberg, EA. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : EGC, Hal. 229-230
- Katrin, Dina., Idiwati, Nora., Sitorus, Berlian. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Malek (*Litsea graciae vidal*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *JKK*. Vol. 4, No. 1, p : 7-12
- Karmawati, Elna., Mahmud, Zainal., Syakir, M., Munarso, Joni., Ardana, I Ketut., dan Rubiyo. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kakao*. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Hal 11-18
- Krishna, Amalia Dewi. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicilin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*. ISSN : 01260421. p : 138-150

- Kusumowati, Ika Trisharyanti Dian., dkk. 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Senggani (*Melastoma affine D. Don*). *Biomedika*. Vol. 6, No. 2.
- Latifah. 2015. Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Rimpang Kencur *Kaempferia galanga L.* dengan Metode DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*). *Skripsi*. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta : PT. Raja Grafindo Persada
- Lee, J., Jung, H., Kwak, D., Chung, P. 2005. Adsorption of Dichloromethane from Water onto a Hydrophobic Polymer Resin XAD-1600. *Water Research*. Vol. 39. p : 617-629.
- Lestari, Yulianti., Ardiningsih, Puji., Nurlina. 2016. Aktivitas Antibakteri Gram Positif dan Negatif dari Ekstrak dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans Wurmb.*) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat. *JKK*. Vol. 5, No. 4. P : 1-8.
- Luliana, Sri., Purwanti, Nera Umilia Purwanti., Manihuruk, Kris Natalia. 2016. Pengaruh Cara Pengeringan Simplisia Daun Senggani (*Melastoma malabathricum L.*) terhadap Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). *Pharm Sci Res*. Vol.3, No. 3. P : 120-129
- Mahendra, W. 2010. Pendugaan Ragam, Heritabilitas, dan Kemajuan Seleksi Kacang Panjang (*Vigna sinensis L.*) Populasi F2 Keturunan Persilangan Testa Hitam x Bernas Super. *Skripsi*. Lampung : Universitas Lampung
- Marcelinda, Agriyani., Ridhay, Ahmad., Prismawiryanti. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Limbah Kulit Ari Biji Kopi (*Coffea sp*) Berdasarkan Tingkat Kepolaran Pelarut. *Online Jurnal of Natural Science*. Vol. 5, No. 1, p. 21-30.
- Markham KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung : Penerbit ITB. Hal 58-60.
- Muhamad, Zakiya Kamila. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Daun Sintok (*Cinnamomum suntoc Blume.*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* serta Analisa Komponen Senyawa Fraksi Aktif dengan Kromatografi Gas-Spektrometri Massa. *Skripsi*. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemusahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. Vol. 8, No. 2, p : 361-367

- Mulyatni, Agustin Sri., dkk. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *Menara Perkebunan*. Vol. 80, No.2
- Mutiasari, IR. 2012. Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Aktif. *Journal*. Jakarta : FMIPA-UI
- Nafis, Mohamad Husein. 2016. Degradasi Diklorometana dalam Air dengan Metode *Advance Oxidatin Treatment* (AOT). *Skripsi*. Surabaya : Universitas Airlangga, hal : 1- 47
- Ngajow, Mercy., Abidjulu, Jemmy., S. Kamu, Vanda. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. Vol. 2, No.2, p : 128-132
- Nuria, M.C., A. Faizatun., dan Sumatri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu- Ilmu Pertanian*. Vol. 5, No. 2, p : 26-37
- Pelczar, Michael J., dan E.C.S, Chan. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : UI Press
- Pelczar, Michael J., dan E.C.S, Chan. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : UI Press, Hal. 49 - 51
- Prajitno, A. 2007. Uji Sensitifitas Flavonoid Rumput Laut (*Euclidean Cottoni*) Sebagai Bioaktif Alami Terhadap Bakteri *Vibrio Harveyi*. *Jurnal Protein*. Vol. 15, No. 2, p : 66-71
- Prasetyo S., Susiana, Prima K., A., Yosephine, Felicia. *Pengaruh Rasio Biji Teh/Pelarut Air dan Teperatur pada Ekstraksi Saponin Biji Teh Secara Batch*. Bandung : Universitas Katolik Parahyangan Bandung, p : 12-14
- Prasetyo., dan Inorah, Entang. 2013. *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Bahan Simplisia)*. Bengkulu : Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta : Erlangga
- Pratiwi, Refrina Setya. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kayu Nangka (*Artocarpus heterophylla Lmk.*) Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. *Pharmacy*. Vol. 08, No.03

- Purnama Dewi, Desak Gede Dian., Mastra, Nyoman., Jirna, I Nyoman. 2018. Perbedaan Zona Hambat Pertumbuhan *Staphylococys aureus* pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Biduri secara *In Vitro*. *Meditory*. Vol. 6, No. 1, p : 39-45
- Puspita Sari, M. Anindya. 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Heksana Daun Bangle (*Zingiber cassumunar*Roxb.) terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcu aureus*. *Skripsi*. Yogyakarta : Universitas Atma Jaya Yogyakarta
- Rijayanti, Rika Pratiwi. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*. *Naskah Publikasi*, Hal. 1-17
- Risnasari, I. 2002. Tanin. Digital Library Universitas Sumatera Utara. <http://library.usu.ac.id/download/fp/Hutan-Iwan6.pdf>, diakses : 28 oktober 2019
- Rusdi. 1988. *Tumbuhan Sebagai Sumber Obat*. Universitas Andalas : Pusat Penelitian Universtas Andalas
- Robinson, T. 1995. *The Organic Constituent of Higher Plants*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi VI. Bandung : Penerbit ITB, Hal. 71-712
- Roslizawaty., Ramadani, Nita Yulida., Fakhurrazi., Herrialfian. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medika Veterinaria*. Vol. 7, No. 2, p : 91-94
- Santosa, Herry., Sari, Widya., Handayani, Noer Abyor. 2018. Ekstraksi Saponin dari Daun Waru Berbantu Ultrasonik Suatu Usaha untuk Mendapatkan Senyawa Penghambat Berkembangnya Sel Kanker. *Inovasi Teknik Kimia*. Vol. 3, No.2, p : 12-16
- Sapri, Fitriani, A., Narulita, R., 2014. Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia terhadap Rendemen Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* l.) dengan Metode Maserasi. *Akademi Farmasi Samarinda. Prosiding Seminar Nasional Kimia 2014 HKI-Kaltim ISBN: 978-602-19421-0-9*
- Sarker, Satyajit D., Latif, Zahid., Gray, Alexander I. 2006. *Natural Products Isolation*. Totowa : Humana Press. Page :36
- Setiabudy, R. 2007. *Framakologi dan Terapi*. Jakarta : Gaya Baru
- Simaremare, Eva Susanty. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy*. Vol. 11, No. 01, p: 98-107

- Singh, Nidhi., Datta, Shreyan., Dey, Abhirup., Chowdhury, Akash Roy., Abraham, Jayanthi. 2015. Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Theobroma Cacao extracts. *Der Pharmacia Lettre*. Vol. 7, No. 7, p : 287-294
- Siregar, A. F., S. Agus., P. Delianis. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermis* dan *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Research*. Vol. 1, No. 2, p : 152-160
- Soedarto. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya : Sagung Seto, Hal. 194-195
- Sri Agustini, Ni Wayan., Kusmiati., Handayani, D. 2017. Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Senyawa Kimia Asam Lemak dari Mikroalga *Lyngbya sp.* *Biopropal Industri*. Vol. 8, No. 2, p : 99 - 107
- Sugiyono. 2013. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung : Alfabeta, Hal : 60-64
- Sujarweni, V. Wiratna., Endrayanto, P. 2012. *Statistika untuk Penelitian*. Yogyakarta : Graha Ilmu
- Suryaku, Nora Ilham. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksan, Etil Asetat, dan Air Dari Ekstrak Etanolik Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Skripsi*. Surakarta : Universitas Setia Budi
- Susanty., Bachdim, Fairus. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays L.*). *Konversi*. Vol. 5, No. 2, p : 87-93
- Susanto, Sudrajat, dan R. Ruga. 2012. Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (*Shorea leprosula Miq*) sebagai sumber senyawa antibakteri. *Mulawarman Scientifie*. Vol.11, No. 12, hal. 181–190.
- Suwarto., Octavianty, Yuke., dan Hermawati, Silvia. 2014. *Top 15 Tanaman Perkebunan*. Jakarta : Penebar Swadaya
- Tiwari, Prashant., Kumar, Bimlesh., Kaur, Mandeep., Kaur, Gurpreet., Kaur, Harleen. 2011. Phytochemical Screening and Extraction : a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. Vol. 1, No. 1, p : 98-106
- Tjay, Tan Hoan., dan Rahardja, Kirana. 2015. *Obat-Obat Penting*. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo
- Volk dan Wheller. 1984. *Mikrobiologi Dasar*, Diterjemahkan Oleh Soenarto Adisoemarto. Jakarta : Erlangga, hal 137-138

- Wahyudi, T., Panggabean T. R., Pujiyanto. 2008. *Panduan Lengkap Kakao*. Jakarta : Penerbit Penebar Swadaya, Hal. 12-14, 44-46
- Wahyuni, Sri., Vifta, Rissa Laila., dan Erwiyani, Agitya Resti. 2018. Kajian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Inovasi Teknik Kimia*. Vol. 3, No. 1, p : 25-30
- Waluyo, Lud. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang : UMM Press
- Widodo, Lestanto Unggul., Kusharyati, Dyah Fitri. 2013. *Praktikum Mikrobiologi*. Jakarta : Universitas terbuka
- Yasjudani. 2017. Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi Ekstrak Daun Mahoni (*Swietenia mahagoni* L.) Terhadap Beberapa Mikroba Patogen. *Skripsi*. Makassar : UIN Alaudin Makassar
- Yulianti, Nur Fatdliyah Eka. 2013. Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis*. *Naskah Publikasi*. Surakarta : Universitas Muhammadiyah Surakarta

Lampiran 1 Hasil Determinasi *Theobroma cacao L.*



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No 87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 162A/ 102.7/ 2020
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Coklat/ Kakao**

Memenuhi permohonan saudara

Nama : NOVIANA MANDHAKI
NIM : 1613206015
Fakultas : PROGRAM STUDI S1 FARMASI STIKES KARYA PUTRA BANGSA TULUNGAGUNG

1. Perihal determinasi tanaman coklat

Kingdom : Plantae
Sub Kingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Sub divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Malvales
Suku : Sterculiaceae
Marga : Theobroma
Jenis : *Theobroma cacao L.*
Nama Umum : Coklat, kakao.
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120b-128b-129b-135b-136b-139b-140b-142b-143a-144b-145b-1b-3b-4b-5b-6b.

2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi 5-10 m. Batang: Berkayu, bulat, percabangan monopodial, coklat kotor. Daun: Tunggal, bertangkai, bulat telur, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 10-48 cm, lebar 4-20 cm, hijau. Bunga: Tunggal, di ketiak daun, berkelamin dua, kelopak putih panjang 6-8 mm, mahkota panjang 8-9 mm, benang sari bentuk periuk, stamodia ungu tua, ujung putih, bakal buah beruang lima, merah. Buah: Buni, bulat telur, berusuk, kulit buah tebal, panjang 12-22 cm, merah. Biji: Bulat telur, dibalut selaput putih, tebal, coklat. Akar: Tunggang, bercabang, bulat, kecoklatan.

3. Bagian yang digunakan : Daun.

4. Penggunaan : Penelitian

5. Daftar Pustaka

- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 12 Februari 2020

Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu
Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,



[Signature]
Erlia Rahmawati, S.Farm., Apt.
NIP. 19900430 201403 2 002

Lampiran 2 Dokumentasi penelitian

1. Pembuatan ekstrak dan fraksi daun kakao



Pengambilan daun kakao



Serbuk daun kakao



Maserasi daun kakao



Remaserasi daun kakao



Penyaringan maserat



Ekstrak kental daun kakao



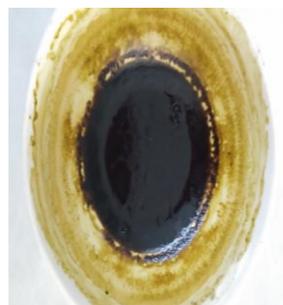
Fraksinasi ekstrak daun kakao dengan pelarut etanol dan n-heksan



Fraksinasi ekstrak daun kakao dengan pelarut etanol dan DCM



Fraksi diklorometana daun kakao

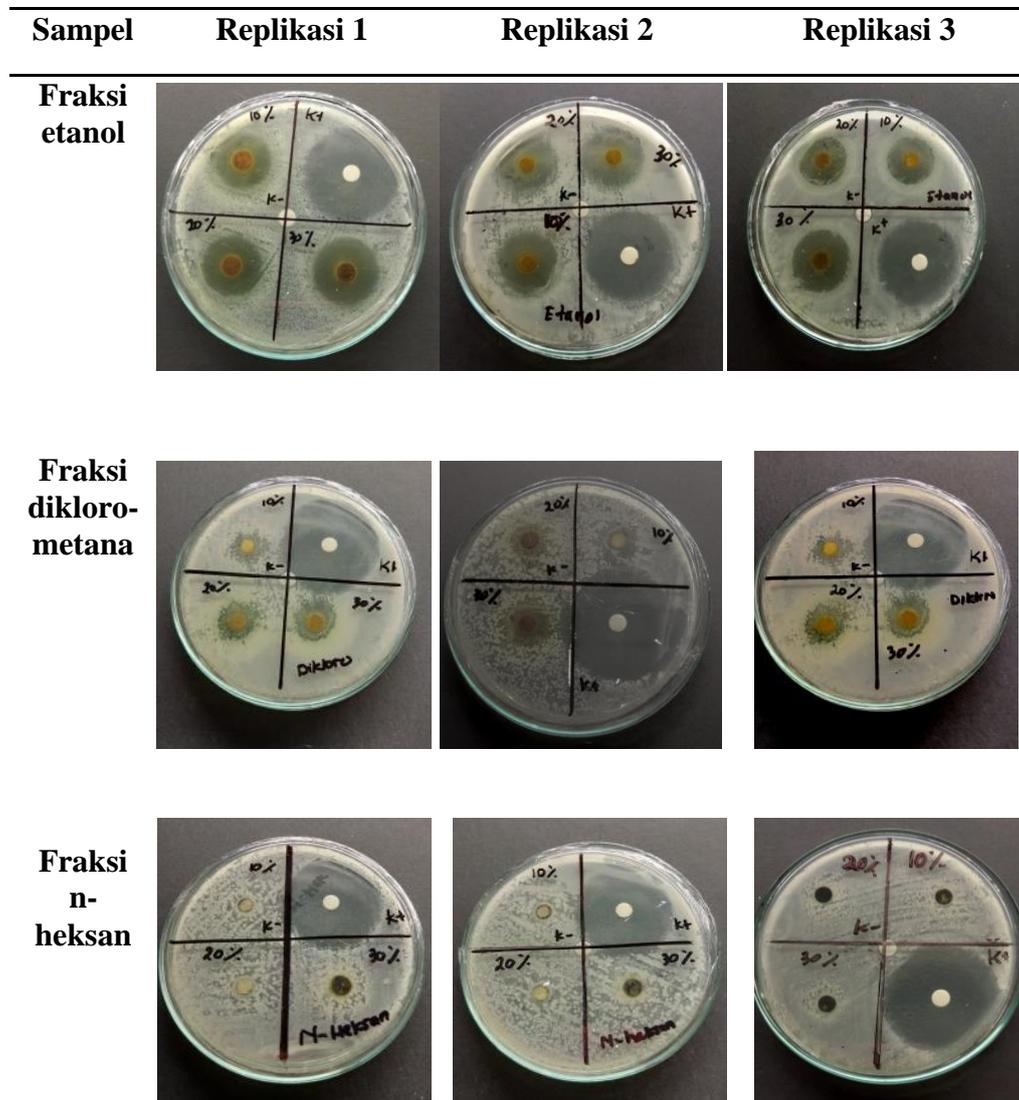


Fraksi etanol daun kakao



Fraksi n-heksan daun kakao

2. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao

**Lampiran 3** Perhitungan Hasil Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak

1. Uji susut pengeringan simplisia

Sampel	Bobot daun basah	Bobot daun kering	% Hasil
Daun kakao	5,00 kg	2,10 kg	58 %

$$\% \text{ susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot daun basah} - \text{Bobot daun kering}}{\text{Bobot daun basah}} \times 100 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ susut pengeringan} &= \frac{5,00 \text{ kg} - 2,10 \text{ kg}}{5,00 \text{ kg}} \times 100 \% \\ &= 58\% \end{aligned}$$

2. Uji kadar air serbuk simplisia

Sampel	Bobot awal	Bobot akhir	% Hasil
Daun kakao	10,00 gram	9,25 gram	7,5%

Rumus :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

Bobot awal

$$\% \text{ kadar air} = \frac{10,00 \text{ gram} - 9,25 \text{ gram}}{10,00 \text{ gram}} \times 100\%$$

10,00 gram

$$= 7,5 \%$$

3. Rendemen ekstrak

Sampel	Bobot simplisia	Bobot ekstrak	Hasil
Daun kakao	500 gram	34 gram	6,8 %

Rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Bobot awal serbuk simplisia

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{34 \text{ gram}}{500 \text{ gram}} \times 100\%$$

500 gram

$$= 6,8 \%$$

4. Rendemen fraksi

Sampel	Bobot Ekstrak	Bobot Fraksi	Rendemen
Fraksi Etanol	25 gram	3,13 gram	12,52 %
Fraksi Diklorometana	25 gram	2,31 gram	9,24 %
Fraksi N- Heksan	25 gram	1,30 gram	5,2 %

Rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal ekstrak}} \times 100\%$$

Bobot awal ekstrak

$$\% \text{ Rendemen fraksi etanol} = \frac{3,13 \text{ gram}}{25 \text{ gram}} \times 100\%$$

25 gram

$$= 12,52 \%$$

$$\% \text{ Rendemen fraksi diklorometana} = \frac{2,31 \text{ gram}}{25 \text{ gram}} \times 100\%$$

25 gram

$$= 9,24 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen fraksi n-heksan} &= \frac{1,30 \text{ gram}}{25 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 5,2 \% \end{aligned}$$

Lampiran 4 Perhitungan pembuatan media pertumbuhan bakteri

1. Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB)

$$\begin{aligned} \text{gram} &= \frac{\text{Mr}}{1000} \times \text{volume} \\ &= \frac{8}{1000} \times 10 \text{ ml} \\ &= 0,08 \text{ gram} \end{aligned}$$

2. Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA)

$$\begin{aligned} \text{gram} &= \frac{\text{Mr}}{1000} \times \text{volume} \\ &= \frac{20}{1000} \times 15 \text{ ml} \\ &= 0,3 \text{ gram} \end{aligned}$$

Lampiran 5 Pembuatan seri konsentrasi larutan uji

1. Konsentrasi 30%

$$30 \text{ gram} \cap 100 \text{ ml} = x \text{ gram} \cap 1 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} X \text{ gram} &= \frac{30 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} \\ &= 0,3 \text{ gram} \end{aligned}$$

2. Konsentrasi 20%

$$20 \text{ gram} \cap 100 \text{ ml} = x \text{ gram} \cap 1 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned} X \text{ gram} &= \frac{20 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} \\ &= 0,2 \text{ gram} \end{aligned}$$

3. Konsentrasi 10%

$$10 \text{ gram} \cap 100 \text{ ml} = x \text{ gram} \cap 1 \text{ ml}$$

$$X \text{ gram} = \frac{10 \text{ gram}}{100 \text{ ml}}$$

$$= 0,1 \text{ gram}$$

Lampiran 6 Analisis Statistika

1. Tabel input data uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao

10:	kelompok	zonahambat	translog_zona	var	var
1	1	27	1.43		
2	1	28	1.45		
3	1	27	1.43		
4	2	12	1.08		
5	2	13	1.11		
6	2	13	1.11		
7	3	14	1.15		
8	3	16	1.20		
9	3	15	1.18		
10	4	17	1.23		
11	4	17	1.23		
12	4	18	1.26		
13	5	0	.		
14	5	0	.		
15	5	0	.		
16	6	31	1.49		
17	6	30	1.48		
18	6	31	1.49		
19	7	7	0.85		

10:	kelompok	zonahambat	translog_zona	var	var
19	7	7	0.85		
20	7	6	0.78		
21	7	7	0.85		
22	8	8	0.90		
23	8	9	0.95		
24	8	9	0.95		
25	9	10	1.00		
26	9	9	0.95		
27	9	10	1.00		
28	10	0	.		
29	10	0	.		
30	10	0	.		
31	11	30	1.48		
32	11	31	1.49		
33	11	30	1.48		
34	12	0	.		
35	12	0	.		
36	12	0	.		
37	13	0	.		

10:	kelompok	zonahambat	translog_zona	var	var
36	12	0	.		
37	13	0	.		
38	13	0	.		
39	13	0	.		
40	14	0	.		
41	14	0	.		
42	14	0	.		
43	15	0	.		
44	15	0	.		
45	15	0	.		

2. Uji normalitas data

Tests of Normality ^{b,c,d,e,f,g}						
kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
zonahambat K+ fraksi etanol	.385	3	.	.750	3	.000
10% fraksi etanol	.385	3	.	.750	3	.000
20% fraksi etanol	.175	3	.	1.000	3	1.000
30% fraksi etanol	.385	3	.	.750	3	.000
K+ fraksi DCM	.385	3	.	.750	3	.000
10% fraksi DCM	.385	3	.	.750	3	.000
20% fraksi DCM	.385	3	.	.750	3	.000
30% fraksi DCM	.385	3	.	.750	3	.000
K+ fraksi n-heksan	.385	3	.	.750	3	.000

3. Uji homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

translog_zona

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.676	8	18	.039

4. Uji *Kruskal-Wallis*

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
zonahambat	45	10.56	11.194	0	31
kelompok	45	8.00	4.369	1	15

Kruskal-Wallis Test**Ranks**

kelompok	N	Mean Rank
Zonahambat K+ fraksi etanol	3	38.00
10% fraksi etanol	3	29.00
20% fraksi etanol	3	32.00
30% fraksi etanol	3	35.00
etanol 96%	3	9.50
K+ fraksi DCM	3	43.00
10% fraksi DCM	3	20.00
20% fraksi DCM	3	23.33
30% fraksi DCM	3	25.67
DCM	3	9.50
K+ fraksi n-heksan	3	42.00
10% fraksi n-heksan	3	9.50
20% fraksi n-heksan	3	9.50
30% fraksi n-heksan	3	9.50
n-heksan	3	9.50
Total	45	

Test Statistics^{a,b}

	zonahambat
Chi-Square	43.834
Df	14
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
kelompok

5. Hasil analisis post hoc uji aktivitas antibakteri fraksi daun kakao menggunakan uji Mann-Whitney

Perlakuan	Analisis Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Kakao				
	Fraksi Etanol			Kloramfenikol	Etanol
	10%	20%	30%		
10%		0,046*	0,043*	0,043*	0,034*
20%			0,046*	0,046*	0,037*
30%				0,043*	0,034*
Kloramfenikol					
Etanol					
	Fraksi diklorometana				
	10%	20%	30%	Kloramfenikol	Diklorometana
10%		0,043*	0,043*	0,043*	0,034*
20%			0,099*	0,043*	0,034*
30%				0,043*	0,034*
Kloramfenikol					
Diklorometana					
	Fraksi n-heksan				
	10%	20%	30%	Kloramfenikol	N-heksan
10%		1,000	1,000	0,034*	1,000
20%			1,000	0,034*	1,000
30%				0,034*	1,000
Kloramfenikol					
N-heksan					

Keterangan : *p < 0,05

Lampiran 7 Tingkat kepolaran pelarut

Pelarut	Indeks kepolaran	Titik didih (°C)	Viskositas (cPoise)	Kelarutan dalam air (%w/w)
n-heksan	0,0	69	0,33	0,001
Diklorometana	3,1	41	0,44	1,6
n-butanol	3,9	118	2,98	7,81
Iso-propanol	3,9	82	2,30	100
n-propanol	4,0	92	2,27	100
Kloroform	4,1	61	0,57	0,815
Etil asetat	4,4	77	0,45	8,7
Aseton	5,1	56	0,32	100
Metanol	5,1	65	0,60	100
Etanol	5,2	78	1,20	100
Air	9,0	100	1,00	100

Sumber : Sarker, Latif dan Gray (2006)