



**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) KAYA POLIFENOL TERSERANG *Phytophthora palmivora* TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN *Candida albicans***

**SKRIPSI**

Oleh

**Margaretta Indra Pratiwi  
NIM 082210101069**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) KAYA POLIFENOL TERSERANG *Phytophthora palmivora* TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN *Candida albicans***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

**Margaretta Indra Pratiwi**  
**NIM 082210101069**

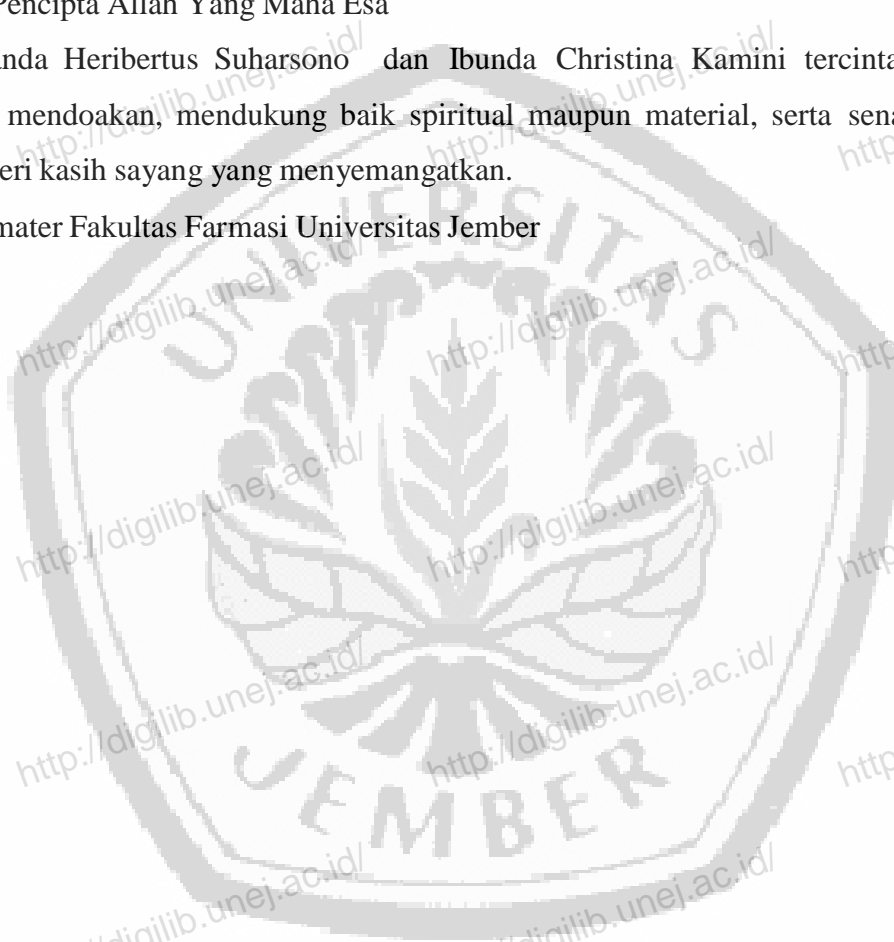
**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS JEMBER**

**2013**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Sang Pencipta Allah Yang Maha Esa
2. Ayahanda Heribertus Suharsono dan Ibunda Christina Kamini tercinta yang selalu mendoakan, mendukung baik spiritual maupun material, serta senantiasa memberi kasih sayang yang menyemangatkan.
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember



## **MOTTO**

“Bersukacitalah dalam pengharapan, sabarlah dalam kesesakan, dan bertekunlah dalam doa”

(Roma 12: 12)

“Allah turut bekerja dalam segala sesuatu untuk mendatangkan kebaikan bagi mereka yang mengasihi Dia”

(Roma 8: 28)



## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Margaretta Indra Pratiwi

NIM : 082210101069

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul *Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Kaya Polifenol Terserang Phytophthora palmivora terhadap Streptococcus mutans dan Candida albicans* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 14 Januari 2013

Yang menyatakan,

Margaretta Indra Pratiwi

NIM 082210101069

## SKRIPSI

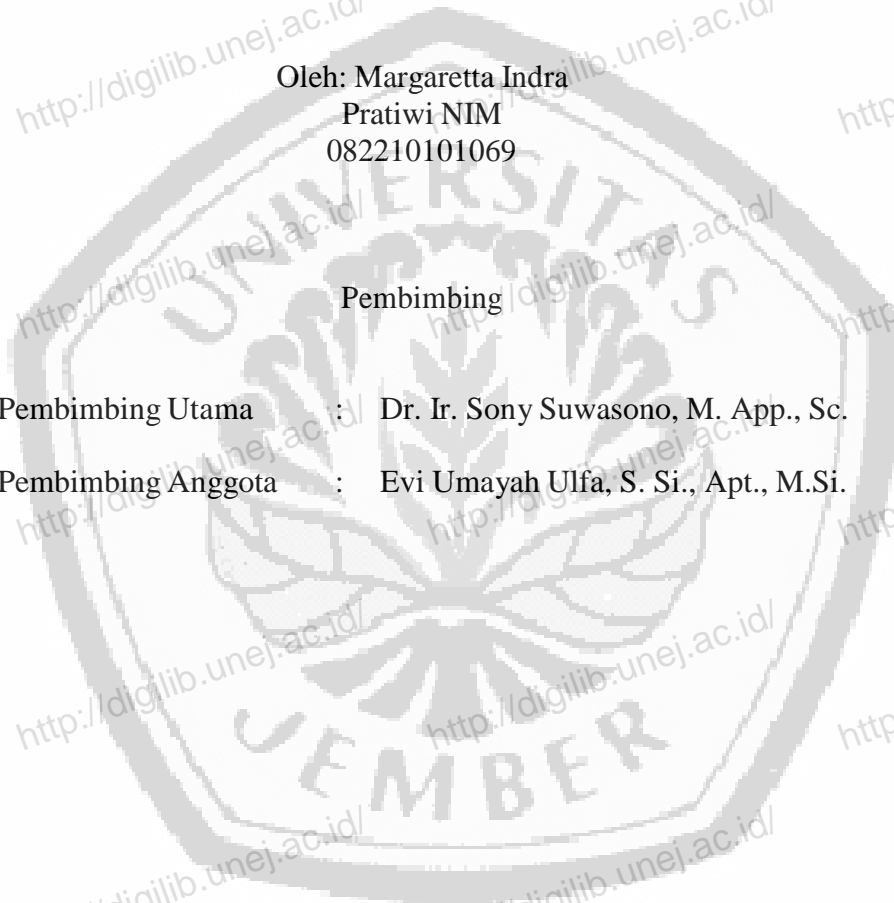
### **UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.) KAYA POLIFENOL TERSERANG *Phytophthora palmivora* TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN *Candida albicans***

Oleh: Margaretta Indra  
Pratiwi NIM  
082210101069

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App., Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : Evi Umayah Ulfa, S. Si., Apt., M.Si.



## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Kaya Polifenol Terserang *Phytophthora palmivora* terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Senin, 14 Januari 2013


Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

### Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

  
Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App., Sc.

  
Evi Umayah Ulfa, S. Si., Apt., M.Si.

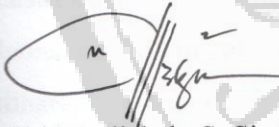
NIP 196411091989021002

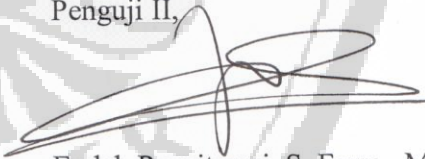
NIP 197807282005021001

### Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

  
Siti Muslichah, S. Si., M. Si., Apt.

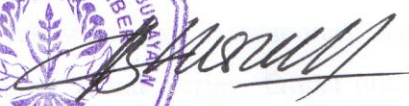
  
Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt.

NIP 197305132005012001

NIP 198107232006042002

Mengesahkan

Dean Fakultas Farmasi Universitas Jember,

  
Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.

NIP 196902011994031002

## RINGKASAN

*Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Kaya Polifenol Terserang Phytophthora palmivora terhadap Streptococcus mutans dan Candida albicans*; Margaretta Indra Pratiwi, 082210101069; 2013; 65 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Produksi kakao di Indonesia melimpah dengan jumlah produksi 809.583 ton per tahun sehingga menempati produsen kakao kedua terbesar dunia pada tahun 2009. Perkebunan kakao Indonesia tidak lepas dari kendala akibat serangan hama dan penyakit. Penyakit tanaman kakao yang memberikan kerugian mencapai 40% yaitu penyakit akibat serangan *Phytophthora palmivora*. Biji kakao dari kakao terserang *P. palmivora* tidak memiliki cita rasa normal sehingga tidak boleh dicampur dengan biji kakao normal yang menyebabkan penurunan harga jual. Pemanfaatan biji kakao terserang *P. palmivora* dapat dilakukan dengan memanfaatkan kandungan senyawa yang masih ada didalamnya, yaitu polifenol, sebagai senyawa antimikroba. Pengambilan senyawa polifenol dilakukan dengan proses ekstraksi dimana hasil ekstraksi polifenol dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut pengekstrak dan kandungan lemak dalam biji kakao. Ekstrak kaya polifenol dari biji kakao terserang *P. palmivora* diharapkan mampu diaplikasikan untuk melawan patogenitas *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi dan perlakuan “defatting” PB (Petroleum Benzene) terhadap efek antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* dan untuk mengetahui KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* serta KHM terhadap *C. albicans*.

Pembuatan ekstrak kaya polifenol dari biji kakao terserang *P. palmivora*, dilakukan dengan maserasi kemudian di evaporasi dan dikeringkan dengan oven vakum sehingga didapatkan ekstrak kering. Empat macam ekstrak yang digunakan yaitu ekstrak etanol 70% “non-defatting” PB, ekstrak etanol 70% “defatting” PB, ekstrak air panas “non-defatting” PB, dan ekstrak air panas “defatting” PB.



Uji aktivitas antimikroba menggunakan metode sumuran. Sumur atau lubang berdiameter 7 mm dibuat pada campuran media dan suspensi mikroba dalam cawan petri yang telah memadat, kemudian dalam lubang dimasukkan DMSO 2% sebagai kontrol negatif dan ekstrak dengan beragam konsentrasi antara lain 30%, 35%, 40%, dan 45%. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk *S. mutans* dan suhu 30°C selama 24 jam untuk *C. albicans*. Pengujian dilakukan sebanyak 5 replikasi. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar sumuran yang dinyatakan dalam DDH (Diameter Daya Hambat).

Uji penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* dilakukan dengan metode dilusi agar-hitung koloni. Media dicampur dengan ekstrak dengan konsentrasi uji tertentu kemudian dituang dalam cawan petri berisi suspensi *S. mutans* dan dibiarkan padat, diinkubasi 37°C selama 24 jam. Uji penentuan KHM *C. albicans* dengan menggoreskan mikroba di atas campuran ekstrak dan media agar yang telah memadat lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam untuk *C. albicans*. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh untuk *S. mutans*. dan mengamati ada tidaknya pertumbuhan hasil goresan untuk *C. albicans*. Identifikasi polifenol dan flavonoid menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dengan fase gerak butanol:as.asetan:air (4:1:2,2).

Rendemen ekstrak ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, ekstrak etanol 70% *defatting* PB, ekstrak air panas *non-defatting* PB, dan ekstrak air panas *defatting* PB secara berturut-turut yaitu 5,12; 4,05; 9,52; dan 4,5 % (b/b). Urutan ekstrak dengan aktivitas antimikroba paling tinggi ke rendah yaitu ekstrak etanol 70% *defatting* PB, ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, ekstrak air panas *defatting* PB, dan ekstrak air panas *non-defatting* PB.

Nilai IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans*, KHM terhadap *S. mutans*, dan KHM terhadap *C. albicans* ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB yaitu 0,23%, 0,8%, dan 1,6% (b/v); ekstrak etanol 70% *defatting* PB yaitu 0,21%, 0,8%, dan 1,6% (b/v); ekstrak air panas *non-defatting* PB yaitu 0,97%, 3%, dan 4% (b/v); dan ekstrak air panas *defatting* PB yaitu 0,77%, 3%, dan 4% (b/v).

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala hikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul *Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Kaya Polifenol Terserang Phytophthora palmivora terhadap Streptococcus mutans dan Candida albicans*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dukungan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Bapak Dr. Ir. Sony Suwasono, M, App., Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan dukungan dan semangat penuh untuk penyelesaian skripsi ini;
3. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., Apt., M.Si, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak memberikan bimbingan dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan skripsi ini ;
4. Ibu Siti Muslichah, S. Si., M. Si., Apt. dan Endah Puspitasari, S. Farm., M. Sc., Apt. selaku dosen penguji yang banyak memberikan saran dan kritik yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Ayah dan Ibuku tercinta yang telah banyak berkorban dan memberikan dukungan, semangat, doa, dan kasih sayang tak henti-hentinya selama ini yang menjadi semangat utamaku menyelesaikan skripsi ini. serta bude Sisil, mas Yohan, dan mbak Elis yang juga selalu menyemangatiku untuk segera menyelesaikan skripsi;
6. Sahabatku Evi yang sangat berperan selama studiku di Fakultas Farmasi ini serta teman-teman dekatku April, Eka, Tyta, dan Emy yang selalu memberikan

- bantuan, semangat tak henti, dan doa dalam penyelesaian skripsi ini dan membuat studiku di Farmasi menjadi lebih berwarna;
7. Mas Andre yang selalu memberikan semangat dan hiburan yang selalu mampu menyegarkan kepenatan ketika mengalami ketidaklancaran dalam proses penelitian;
  8. Teman-teman penelitianku mbak Fitri, Evi, Ateng, Candra, dan Ja'far yang berjuang bersama selama penelitian skripsi ini;
  9. Keluarga UK3 yang selalu mendoakan dan memberikan semangat dalam penyelesaian skripsi ini;
  10. Teman-teman Fakultas Farmasi 2008 yang telah membantu selama kuliah sampai penyelesaian skripsi ini;
  11. Seluruh staff dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknologi Pertanian dan Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi atas bantuan, kerja sama, dan saran selama pengerjaan penelitian ini;
  12. Teman-teman KKT Desa Arjasa: Dian, Dewi, Diwa, Rizal, dan Yoyok yang saling menyemangati dalam menyelesaikan skripsi.

Penulis menerima saran dan kritik yang membangun dari semua pihak karena penulis menyadari skripsi ini tidaklah sempurna. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Jember, Januari 2013

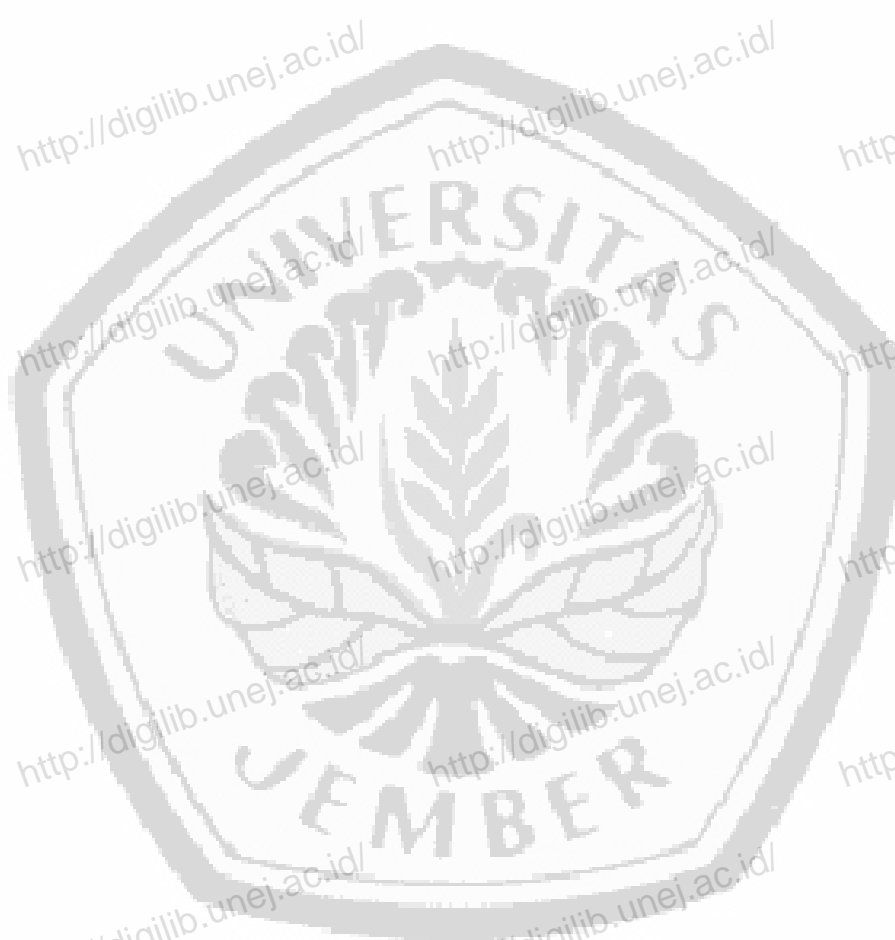
Penulis

## DAFTAR ISI

	<i>Halaman</i>
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Tinjauan Buah Kakao.....	5
2.2 Tinjauan Kandungan Senyawa dalam Kakao.....	7
2.3 Tinjauan <i>Phytophthora palmivora</i> .....	10
2.4 Tinjauan Polifenol.....	11
2.5 Tinjauan Pembebasan Lemak Kakao.....	12
2.6 Tinjauan Ekstraksi.....	13

2.6.1	Metode Penetapan Keseimbangan Konsentrasi .....	14
2.6.2	Metode Ekstraksi Maserasi .....	16
2.7	Tinjauan <i>Streptococcus mutans</i> .....	17
2.8	Tinjauan <i>Candida albicans</i> .....	18
2.9	Tinjauan Antimikroba .....	20
2.10	Tinjauan Metode Antimikroba .....	21
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>		<b>25</b>
3.1	Jenis Penelitian .....	25
3.2	Rancangan Penelitian .....	25
3.3	Sampel .....	28
3.4	Pengulangan .....	29
3.5	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional .....	29
3.6	Alat dan Bahan Penelitian .....	31
3.7	Tempat dan Waktu Penelitian .....	32
3.8	Prosedur Penelitian .....	32
3.9	Tahap Pengujian .....	37
3.10	Tahap Pengamatan .....	39
3.11	Analisis Data .....	40
3.12	Skema Kerja Penelitian .....	41
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>		<b>41</b>
4.1	Hasil Rendemen Ekstrak Biji Kakao Kaya Polifenol Terserang <i>Phytophthora palmivora</i> .....	41
4.2	Uji Aktivitas Antimikroba .....	42
4.3	Uji Penentuan IC <sub>50</sub> dan KHM terhadap <i>S. mutans</i> dan Penentuan KHM untuk <i>C. albicans</i> .....	49
4.4	Skrining Polifenol dan Flayonoid .....	56
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>		<b>58</b>
5.1	Kesimpulan .....	58
5.2	Saran .....	58

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>60</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>66</b>



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kakao sebelum fermentasi .....	7
Tabel 4.1 Data DDH ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang <i>P. palmivora</i> terhadap <i>S. mutans</i> .....	43
Tabel 4.2 Data DDH ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang <i>P. palmivora</i> terhadap <i>C. albicans</i> .....	44
Tabel 4.3 Hasil uji Anova satu arah aktivitas antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang <i>P. palmivora</i> terhadap <i>S. mutans</i> dan <i>C. albicans</i> .....	46
Tabel 4.4 Data jumlah koloni dan % penghambatan terhadap pertumbuhan <i>S. mutans</i> .....	50
Tabel 4.5 Nilai KHM dan $IC_{50}$ <i>S. mutans</i> .....	53
Tabel 4.6 Hasil pengujian KHM terhadap <i>C. albicans</i> .....	55

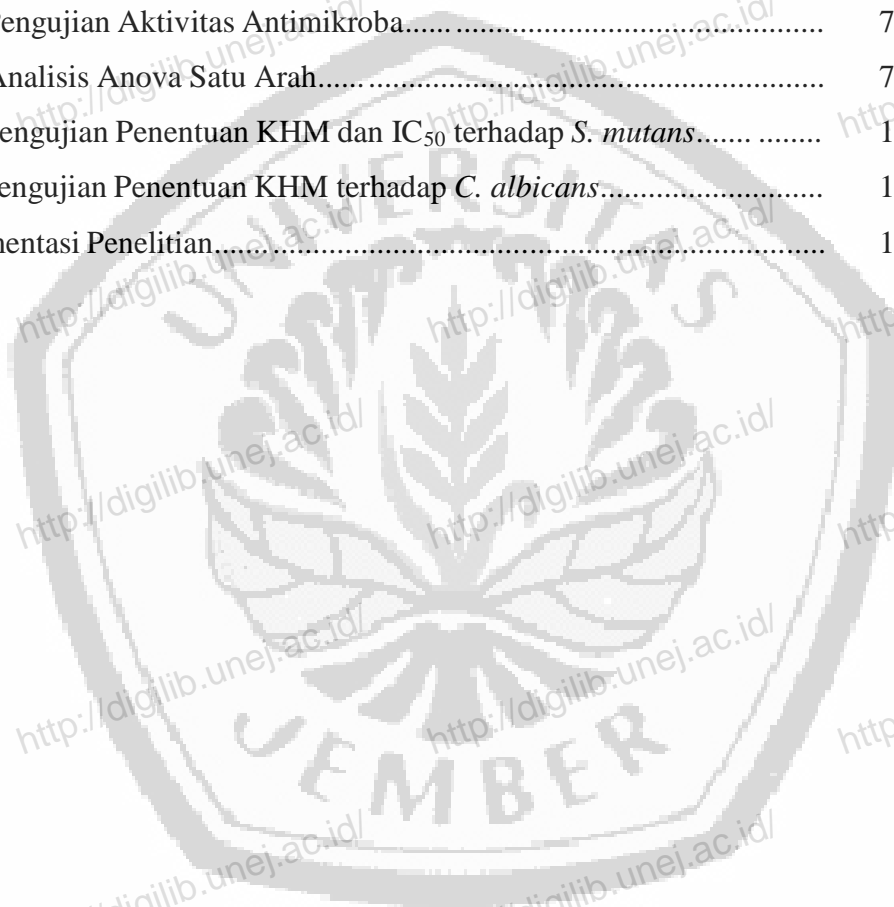
## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Kenampakan kakao terserang <i>P.palmivora</i> .....	10
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian penentuan aktivitas antimikroba.....	25
Gambar 3.2 Skema rancangan penelitian uji penentuan KHM dan IC <sub>50</sub> .....	26
Gambar 3.3 Skema rancangan penelitian uji penentuan KHM.....	27
Gambar 3.4 Pengamatan uji aktivitas antimikroba dengan metode sumuran.....	40
Gambar 3.5 Skema kerja penelitian.....	41
Gambar 4.1 Grafik rerata % rendemen ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang <i>P. palmivora</i> .....	41
Gambar 4.2 Hasil uji aktivitas antimikroba terhadap <i>S. mutans</i> metode sumuran.....	42
Gambar 4.3 Hasil uji aktivitas antimikroba terhadap <i>C. albicans</i> metode sumuran.....	43
Gambar 4.4 Hasil pengamatan uji penentuan KHM dan IC <sub>50</sub> terhadap <i>S. mutans</i> .....	51
Gambar 4.5 Kurva konsentrasi larutan uji dengan % penghambatan terhadap <i>S. mutans</i> .....	52
Gambar 4.6 Hasil pengamatan uji penentuan KHM terhadap <i>C. albicans</i> .....	54
Gambar 4.7 Hasil skrining polifenol dan flavonoid ekstrak biji kakao terserang <i>P. palmivora</i> dengan metode KLT.....	57



## DAFTAR LAMPIRAN

	<i>Halaman</i>
A. Rendemen Ekstrak Biji Kakao Kaya Polifenol Terserang <i>P. palmivora</i> .....	66
B. Pembuatan Larutan Uji.....	66
C. Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba.....	71
D. Hasil Analisis Anova Satu Arah.....	78
E. Hasil Pengujian Penentuan KHM dan IC <sub>50</sub> terhadap <i>S. mutans</i> .....	113
F. Hasil Pengujian Penentuan KHM terhadap <i>C. albicans</i> .....	115
G. Dokumentasi Penelitian.....	116



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kakao, dengan nama latin *Theobroma cacao* L., merupakan salah satu komoditas penting Indonesia dalam sektor perkebunan yaitu sebagai penyedia lapangan kerja, pendorong perkembangan agroindustri, serta menjadi sumber pendapatan dan devisa negara. Tahun 2002 perkebunan kakao menyediakan lapangan kerja dan sumber pendapatan bagi sekitar 900 ribu kepala keluarga petani Indonesia (Departemen Perindustrian, 2007).

Produksi kakao Indonesia juga memiliki tempat di mata internasional. Indonesia menjadi produsen kakao kedua terbesar dunia setelah Pantai Gading (1.380.000 ton) pada tahun 2009 dengan produksi 809.583 ton per tahun. Komoditas kakao pada tahun 2009 juga menjadi penghasil devisa terbesar ketiga Indonesia dalam subsektor perkebunan setelah kelapa sawit dan karet karena eksportnya mencapai 535.236 ton dengan nilai US \$ 1.413.535 (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012).

Agribisnis sektor perkebunan kakao Indonesia bukan berarti tanpa kendala. Salah satu kendala yang dialami oleh perkebunan kakao Indonesia yaitu serangan hama dan penyakit buah kakao. Hama yang paling sering menyerang kakao diantaranya belalang (*Valanga nigricornis*), ulat jengkal (*Hypsidra talaka* Walker), kutu putih (*Planococcus lilaci*), penghisap buah (*Helopeltis sp.*), dan penggerek batang (*Zeuzera sp.*). Penyakit yang kerap dijumpai dalam budidaya kakao antara lain penyakit jamur upas dan jamur akar akibat jamur *Oncobasidium thebromae* serta penyakit busuk buah akibat *Phytophthora sp.* (Departemen Perindustrian, 2007).

*Phytophthora palmivora* merupakan patogen yang mengakibatkan penyakit busuk buah dan kanker batang pada tanaman kakao. Kerugian yang ditimbulkan dari patogen ini pada tanaman kakao yaitu kehilangan hasil mencapai 40% (Van der Vossen dalam Motulo *et al.*, 2007). Munculnya bercak coklat kehitaman yang umumnya dimulai dari ujung atau pangkal buah merupakan gejala serangan *P.*

*palmivora*. Perkembangan jamur *P. palmivora* akan cepat menyebar ke seluruh bagian buah bila keadaan lingkungan mendukung sehingga buah berwarna hitam (Sunanto, 1992).

Di daerah yang beriklim basah, serangan *P. palmivora* memberikan dampak kerugian yang cukup berarti. Perkebunan kakao Jawa Tengah mengalami kerugian mencapai 49,8%, Jawa Timur 46,43%, dan Jawa Barat 42,30%. Secara umum, tingkat kerugian di beberapa kebun di Indonesia dapat mencapai 40% per tahunnya (Sulistiyowati *et al.*, 2003).

Kakao terserang *P. palmivora* akan mengalami peningkatan kadar asam lemak bebas dan produk kakao yang dihasilkan tidak memiliki cita rasa coklat normal (Misnawi, 2005). Serangan *P. palmivora* dapat mengakibatkan penurunan kandungan polifenol pada bubuk kakao (Zairisman, 2006). Penurunan total polifenol dan aktivitas antioksidan biji kakao terserang *P. palmivora* juga dinyatakan pada hasil penelitian Harmawan (2010).

Polifenol merupakan salah satu senyawa fitokimia dalam kakao yang bertanggung jawab atas rasa pahit dan sepat, serta warna khas dari coklat dari biji kakao (William dalam Misnawi *et al.*, 2003). Polifenol kakao memberikan banyak kontribusi untuk kesehatan, antara lain sebagai antikanker, *anti-atherogenic*, antitukaklambung, antitrombolitik, antiinflamasi, antialergi, imunmodulator, antimikroba, vasodilator, dan analgesik (Wollgast & Anklam dalam Hii *et al.*, 2009).

Hasil penelitian Setiadevi (2010) menunjukkan bahwa ekstrak air dan etanol 70% biji kakao normal (tidak terserang hama dan penyakit) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Setiadevi (2010) menggunakan variasi pelarut (air dan etanol 70 %) dan proses *defatting* (rendam dan tanpa rendam Petroleum Benzene) dimana ekstrak etanol 70% dan direndam PB memberikan aktivitas antibakteri paling tinggi.

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% biji kakao terhadap *E. coli* dan *B. subtilis* juga dilakukan oleh Harmawan (2010). Penelitian Harmawan membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% biji kakao normal, biji

kakao terserang *Conopomorpha cramerella*, dan biji kakao terserang *P. palmivora*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dari biji kakao normal memberikan aktivitas antibakteri paling tinggi sedangkan ekstrak dari biji kakao terserang *P. palmivora* memberikan aktivitas antibakteri paling rendah.

Ekstraksi komponen fenolik dipengaruhi oleh struktur kimia senyawa, metode ekstraksi, ukuran partikel bahan, dan adanya substansi pengganggu (Naczk & Shahidi, 2004). Polifenol memiliki gugus hidroksil yang berbeda jumlah dan posisinya sehingga ekstraksi polifenol dengan berbagai pelarut akan menghasilkan komponen polifenol yang berbeda. Perbedaan tersebut mengakibatkan perbedaan sifat antibakteri masing-masing ekstrak (Pambayun *et al.*, 2007). Metode tambahan untuk menghilangkan substansi pengganggu seperti lemak, terpen, dan klorofil sebaiknya dilakukan dalam mengekstrak polifenol (Naczk & Shahidi, 2004). Hasil penelitian Hii *et al.* (2009) menunjukkan bahwa bubuk kakao memiliki kandungan polifenol lebih tinggi dibandingkan susu coklat dan *dark chocolate* karena diperoleh dari nib (biji kakao yang telah dipisahkan dari kulit ari atau kulit biji) rendah lemak.

Potensi polifenol dalam ekstrak biji kakao terkena *P. palmivora* sebagai antimikroba serta adanya pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi dan kandungan lemak dalam ekstrak terhadap jumlah polifenol terekstrak yang tidak langsung mempengaruhi efek antimikrobanya menjadi acuan dalam penelitian ini. Penelitian uji antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* dengan pelarut etanol 70% dan air panas serta dengan *defatting* Petroleum Benzene (PB) dan *non-defatting* PB. Mikroba yang akan diujikan yaitu *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Bakteri *S. mutans* merupakan bakteri plak penyebab utama karies (Marsh & Martin, 1999) sedangkan *C. albicans* merupakan jamur penyebab penyakit kandidosis dalam mulut (Marsh & Martin, 1999).

## 1.2 Rumusan Permasalahan

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan di atas, maka permasalahan dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi etanol 70% dan air panas serta pengaruh *non-defatting* dan *defatting* PB terhadap efek antimikroba pada ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans* dan *C. albicans*?
2. Berapa KHM dan IC<sub>50</sub> ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans* dan *C. albicans*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan permasalahan di atas, tujuan yang ingin dicapai antara lain:

1. Mengetahui pengaruh perbedaan pelarut ekstraksi etanol 70% dan air panas serta pengaruh *non-defatting* dan *defatting* PB terhadap efek antimikroba pada ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans* dan *C. albicans*.
2. Mengetahui KHM dan IC<sub>50</sub> ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans* dan *C. albicans*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini antara lain:

1. Memberikan informasi tentang potensi ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* sebagai antimikroba.
2. Memberikan informasi pengaruh penggunaan pelarut ekstraksi etanol 70% dan air panas terhadap efek antimikroba dalam ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora*.
3. Memberikan informasi pengaruh *non-defatting* dan *defatting* PB terhadap efek antimikroba dalam ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora*.
4. Dapat meningkatkan nilai agrobisnis biji kakao mutu rendah akibat serangan *P. palmivora*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Buah Kakao

Asal tanaman kakao dari lembah Amazon, Amerika Selatan, dengan daerah utama penanamannya di hutan hujan tropis di Amerika Tengah (Siregar *et al.*, 2003).

Habitat asli kakao yaitu hutan hujan tropis dengan naungan pohon-pohon yang tinggi, curah hujan tinggi, suhu sepanjang tahun relatif sama, serta kelembaban tinggi dan relatif tetap (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dalam Tambunan, 2009).

Taksonomi kakao adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Super Divisi: Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Dilleniidae

Ordo : Malvales

Famili : Sterculiaceae

Genus : *Theobroma*

Spesies : *Theobroma cacao* L.

(United States Department of Agriculture, 2013).

Tiga komponen utama penyusun buah kakao yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen paling dominan yaitu kulit buah dengan presentase lebih dari 70% berat buah masak. Biji kakao memiliki presentase berkisar 27-29% berat buah masak, sedangkan sisanya merupakan pengikat dari 30-40 biji (plasenta). Biji diselubungi lapisan lendir atau pulpa berwarna putih (Widyotomo *et al.*, 2004).

Kulit pada buah kakao masak berwarna kuning atau oranye yang saat masih muda berwarna hijau atau merah. Buah masak memiliki kondisi optimal dalam hal pembentukan senyawa penyusun lemak dalam biji. Buah muda memiliki rendemen lemak rendah, presentase biji pipih (*flat beans*) tinggi, kadar kulit biji tinggi, dan biji

kakao yang dihasilkan tidak memiliki cita rasa khas yang maksimal (Widyotomo *et al.*, 2004).

Varietas kakao ada tiga, yaitu *criolo*, *forastero*, dan *trinitario*. Varietas *trinitario* atau hibrida merupakan hasil persilangan antara jenis *criolo* dan *forastero* (Departemen Perindustrian, 2007). Tanaman kakao yang dominan dibudidayakan di perkebunan rakyat adalah varietas *forastero*. Kakao tersebut biasa disebut kakao lindak atau *bulk cocoa* dalam dunia perdagangan kakao (Widyotomo *et al.*, 2004). Sentra produksi utama kakao lindak adalah di Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, dan Sulawesi Tengah, sedangkan kakao mulia (*criolo*) diusahakan perkebunan besar Negara di Jawa Timur dan Jawa Tengah (Departemen Perindustrian, 2007).

Proses yang dilalui untuk mendapatkan biji kakao antara lain pemeraman buah, pemecahan buah, fermentasi, perendaman dan pencucian, pengeringan, penyortiran atau pengelompokan, dan penyimpanan biji kakao kering (Departemen Perindustrian, 2007).

Pada sortasi atau pengelompokan, kakao dikelompokkan menjadi 3 yaitu:

- a. mutu A : dalam 100 g biji terdapat 90-100 butir biji
- b. mutu B : dalam 100 g biji terdapat 100-110 butir biji
- c. mutu C : dalam 100 g biji terdapat 110-120 butir biji

Sortasi dilakukan 1-2 hari setelah proses pengeringan agar kadar air seimbang (Departemen Perindustrian, 2007).

Proses pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air dalam biji kakao dari 60% menjadi 7-8% agar tidak menurunkan kualitas biji dan tidak ditumbuhi cendawan. Pengeringan dilakukan dengan penjemuran di bawah sinar matahari atau secara buatan dengan mesin pengering pada temperatur 65-68° C atau kombinasi keduanya (Departemen Perindustrian, 2007).

## 2.2 Tinjauan Kandungan Senyawa dalam Kakao

Biji kakao sehat dan cukup matang mengandung senyawa protein, karbohidrat, lemak, dan polifenol (Misnawi, 2005). Komposisi kimia buah kakao dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kakao sebelum fermentasi

No.	Bahan	Keping biji (%)	Kulit biji (%)
1	Air	2,1	3,8
2	Lemak	54,7	3,4
3	Abu	2,7	8,1
4	Nitrogen		
	□ Total N	2,2	2,8
	□ Protein	1,3	2,1
	□ Theobromin	1,4	1,3
	□ Cafein	0,7	0,1
5	Karbohidrat		
	□ Glukosa	0,1	0,1
	□ Sukrosa	-	-
	□ Pati	6,1	-
	□ Selulosa	1,9	15,7
	□ Serat kasar	2,1	18,6
	□ Pentaosa	1,2	7,1
6	Tannin		
	□ Asam tanat	2,0	1,3
	□ Cocoa purple	4,2	2,0
7	Asam organik		
	□ Asam asetat	0,1	0,1
	□ Asam sitrat	-	-
	□ Asam oksalat	0,2	0,3

Sumber: Rohan (dalam Setiadevi, 2010).

Senyawa fitokimia mulai dikenal pada tahun 1950 dan 1960-an dan disebut sebagai *secondary plants product* (San Lin dalam Zairisman, 2006). Salah satu senyawa fitokimia yang ada dalam kakao yaitu polifenol. Polifenol menyusun 12-18% dari berat total biji kering (Bravo dalam Rusconi & Conti, 2010). Polifenol dalam biji kakao disimpan dalam sel pigmen kotiledon. Warna biji kakao dari putih sampai ungu gelap dipengaruhi oleh jumlah antosianin dalam sel pigmen tersebut. Sel



pigmen kotiledon juga disebut sebagai sel penyimpan polifenol (*polyphenols-storage cells*) (Rusconi & Conti, 2010).

Komponen penyusun kotiledon kakao yaitu lemak, protein dan polifenol. Konsentrasi lemak, protein, dan polifenol dalam kotiledon (cadangan makanan) biji kakao pada penelitian Martini *et al.* (2008) yaitu 143,5; 492,4; dan 79,9 (mg/g) secara berturut-turut. Lemak menyusun lebih dari 50% kotiledon dalam bentuk globula dimana semakin terakumulasi di dekat dinding sel (Martini *et al.*, 2008). Protein yang dimiliki biji kakao yaitu albumin dan globulin dengan komposisi berturut-turut 52% dan 43% dari total protein (Voigt *et al.*, 1993).

Misnawi *et al.* dan Wollgast & Anklam dalam Misnawi (2005) menyatakan bahwa rentang kandungan polifenol dalam biji kakao non fermentasi yaitu 120-180 g/kg, sedangkan dalam biji terfermentasi berkurang menjadi <50 g/kg. Polifenol dalam buah kakao masak lebih tinggi dibandingkan buah yang masih muda karena pembentukan polifenol yang belum sempurna pada buah kakao muda (Misnawi, 2005).

Polifenol pada kakao memiliki tiga kelompok utama yaitu proantosianidin (58%), katekin atau flavan-3-ol (37%), dan antosianin (4%) (Hii *et al.*, 2009). Komponen-komponen polifenol tersebut berperan sebagai pembentuk rasa kelat (Burda & Oleszek dalam Zairisman, 2006). Katekin utama pada kakao yaitu (-)-epikatekin sebesar 35% dari kandungan polifenol dalam daging biji kakao kering varietas *forastero* non fermentasi (Wollgast & Anklam dalam Rusconi & Conti, 2010). Berikut ini adalah polifenol yang juga telah teridentifikasi dalam biji kakao atau produk kakao (Rusconi & Conti, 2010) :

- a. Prosianidin B3 = katekin-(4 $\alpha$   $\rightarrow$  8)-katekin
- b. Prosianidin B4 = katekin-(4  $\rightarrow$  8 $\alpha$ )-epikatekin
- c. Prosianidin B5 = epikatekin-(4 $\alpha$   $\rightarrow$  6)-epikatekin
- d. Prosianidin C1 = epikatekin-(4  $\rightarrow$  8 $\alpha$ )-epikatekin-(4  $\rightarrow$  8 $\alpha$ )-epikatekin
- e. Prosianidin D = epikatekin-(4 $\alpha$   $\rightarrow$  8)-epikatekin-(4  $\rightarrow$  8 $\alpha$ )-epikatekin-(4  $\rightarrow$  8 $\alpha$ )-epikatekin

- f. Oligo- dan polimer lebih tinggi = sebagian besar dari epikatekin homolog dengan 2-18 monomer
- g. Flavanol : quersetin, quersetin-3-O-glukosida (isoquersetin), quersetin-3-O-galaktosida (*hyperoside*), dan quersetin-3-O-arabinosida
- h. Flavon : apigenin, apigenin-8-C-glukosida (vitexin), apigenin-6-C-glukosida (isovitexin), luteolin dan luteolin-7-O-glukosida, dihidroquersetin, dihidrosikaempferol, kaempferolrutinosida, naringenin, naringenin-glukosida, myricetin-glukosida.
- i. Senyawa fenolik : kafeik, asam klorogenik, asam kumarik, asam ferulat, asam fenilasetat, asam floretik, asam protokatekuik, asam siringik, asam vanilat, clovamide dan dideoksiklovamid

Proantosianidin merupakan suatu polimer dari unit monomer flavan-3-ol ((+)-katekin dan (-)-epikatekin) yang memiliki berat molekul tinggi (Bravo dalam Fine, 2000). Flavanol atau flavan-3-ol biasa disebut dengan katekin. Katekin merupakan isomer dengan konfigurasi *trans* dan epikatekin merupakan isomer dengan konfigurasi *cis*. Kedua konfigurasi tersebut masing-masing memiliki dua stereoisomer yaitu (+)-katekin, (-)-katekin, (+)-epikatekin, dan (-)-epikatekin. Dua isomer yang sering ditemukan di tanaman yaitu (+)-katekin dan (-)-epikatekin (Tsao *et al.* dalam Tsao, 2010). Monomer katekin dan epikatekin serta derivatnya (contoh: galokatekin) merupakan flavonoid utama pada teh dan biji kakao (Si *et al.* dalam Tsao, 2010)

Antosianin merupakan subgrup flavonoid (Markakis dalam Arnnok *et al.*, 2012). Antosianin terbentuk dari pasangan antosianidin dengan gula sehingga molekulnya terdiri dari dua bagian, yaitu: kromofor (*a light-absorbent*) yang menyatakan antosianidin dan suatu tambahan glikosida. Antosianidin di alam selalu ditemukan berikatan dengan satu atau lebih gula dan atau gula terasilasi. Empat monosida pengganti utama antara lain: glukosa, galaktosa, rhamnosa, dan arabinosa (Delgado-Vargas & Paredes dalam Arnnok *et al.*, 2012).

### 2.3 Tinjauan *Phytophthora palmivora*

*P. palmivora* merupakan patogen yang mengakibatkan penyakit busuk buah dan kanker batang pada tanaman kakao. Kerugian yang ditimbulkan dari patogen ini yaitu penurunan hasil mencapai 40% (Van der Vossen dalam Motulo *et al.*, 2007).

Penampakan buah kakao terserang *P.palmivora* dan kondisi bijinya dapat dilihat pada Gambar 2.1.



(a)

(b)

Gambar 2.1 Kenampakan kakao terserang *P.palmivora* (a) Buah kakao terserang penyakit busuk buah; (b) Kondisi biji buah kakao terserang penyakit busuk buah. (Sumber: dokumentasi pribadi)

Serangan *P. palmivora* pada buah kakao yang masih muda (biji masih menempel pada daging buah) mengakibatkan biji mengerut dan pertumbuhannya terhambat. Buah kakao masak yang terserang *P. palmivora* tidak banyak terganggu bijinya, akan tetapi tetap harus dipisahkan dari biji yang sehat agar tidak mencemari biji sehat selama pengolahan (Sunanto, 1992).

*P. palmivora* tergolong spesies heterotalik yang memiliki tipe kawin A1 dan A2 sehingga interaksi antara keduanya mampu menghasilkan spora seksual (oospora) yang berbeda dengan kedua induknya. Jika dalam satu area terdapat kedua tipe tersebut, dapat menciptakan fenotipik yang lebih virulen (Goodwin *et al.*, dalam Motulo *et al.*, 2007). Penyebaran penyakit busuk buah akibat *P. palmivora* melalui sporangium atau klamidospora yang terbawa atau terpercik air hujan, angin atau aliran udara, serta melalui perantara serangga (Sunanto, 1992).

Serangan *P. palmivora* dapat mengakibatkan penurunan kandungan polifenol pada bubuk kakao (Zairisman, 2006). Penurunan kadar polifenol tersebut diduga akibat perubahan senyawa kimia dalam biji kakao karena serangan *P. palmivora* (Misnawi dalam Zairisman, 2006).

#### 2.4 Tinjauan Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang mempunyai paling tidak satu cincin aromatis dengan satu atau lebih grup hidroksil (Gracia-Salas *et al.*, 2010). Polifenol dapat dikelompokkan dalam berbagai subkategori berbeda, seperti komponen flavonoid dan non flavonoid (Markakis dalam Arnnok *et al.*, 2012).

Asam fenolat merupakan komponen non-flavonoid. Asam fenolat dapat dibagi dalam dua tipe utama, yaitu derivat asam benzoat dan asam sinamat. Kedua tipe asam fenolat ini hanya dapat dibebaskan atau dihidrolisis oleh hidrolisis asam atau alkalin, atau dengan enzim (Tsao, 2010).

Ciri umum flavonoid yaitu terdiri dari dua cincin aromatis yang terhubung oleh tiga karbon sehingga membentuk heterosiklik teroksigenasi. Flavonoid pada umumnya dapat ditemukan dalam bentuk glikosida, tetapi terkadang dapat pula ditemukan dalam aglikon. Peranan flavonoid yaitu membentuk warna (biru, merah tua, dan oranye) pada daun, bunga, dan buah. Flavonoid terbagi dalam 13 kelas, antara lain: kalkon, dihidrokalkon, auron, flavon, flavonol, dihidroflavonol, flavanon, flavanol (katekin), flavandioliol atau leukoantosianidin, antosianidin (glikosidanya disebut anthosianin), isoflavonon, flavonoid, dan tannin terkondensasi atau proanthosianidin (Escarpa *et al.*; Wu & Priol dalam Gracia-Salas *et al.*, 2010).

Polifenol terdistribusi luas pada tanaman. Polifenol pada tumbuhan tingkat tinggi umumnya terdapat pada bunga dan buah, tetapi juga ada di daun, akar, dan batang (Kong *et al.* dalam Arnnok *et al.*, 2012). Peranan polifenol dalam tanaman yaitu meningkatkan kualitas sifat organoleptis dan nutrisi pada tanaman yang meliputi warna, cita rasa, aroma, dan rasa (Serrano *et al.* dalam Gracia-Salas *et al.*, 2010) serta terlibat dalam rasa sepat (Gracia-Salas *et al.*, 2010).

Studi eksperimental pada sel hewan dan manusia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa polifenol mampu mencegah kanker dan penyakit jantung jika dikonsumsi dalam jumlah cukup setiap harinya (Wijngaard *et al.* dalam Gracia-Salas, 2010). Manfaat kesehatan yang diberikan polifenol melalui tiga mekanisme, antara lain (1) melawan radikal bebas, (2) melindungi dan meregenerasi antioksidan lainnya dalam makanan seperti vitamin E, dan (3) mengkelat ion-ion logam pro-oksidan (Gracia-Salas *et al.*, 2010).

Polifenol terbukti memiliki aktivitas mikrobisid terhadap sebagian besar bakteri patogen dan spesies fungal (Cowan dalam Okoro *et al.*, 2010). Polifenol dapat merusak membran plasma bakteri yang menyebabkan fungsi sel terganggu dan menonaktifkan komponen intraseluler seperti protein dan asam nukleat (Cano & Colome dalam Sunarintyas *et al.*, 2008).

Polifenol rentan terhadap temperatur, oksigen, dan sinar UV. Temperatur dapat menyebabkan pengurangan total polifenol karena dekomposisi, sama halnya dengan efek sinar UV. Oksigen dapat merusak polifenol karena proses oksidasi. (Escribano-Bailón & Santos-Buelga dalam Arnnok *et al.*, 2012).

## **2.5 Tinjauan Pembebasan Lemak Kakao**

Biji kakao mengandung lemak cukup tinggi yaitu 45-57%, dipengaruhi kultivarnya (Prawoto dan Sulistyowati, 1991). Pada dasarnya lemak kakao tidak berwarna. Warna kuning gading yang biasa menyertainya disebabkan oleh pigmen karoten yang larut dalam lemak tersebut (Djatkiko dan Widjaya dalam Prawoto dan Sulistyowati, 1991).

Kadar lemak dalam bubuk kakao dipengaruhi alat press yang digunakan. Bubuk kakao dibedakan menjadi tiga kelompok berdasarkan kadar lemaknya, yaitu: bubuk kadar lemak rendah (10-12%), medium (13-17%), dan kadar lemak tinggi (>17-22%) (Mulato *et al.* dalam Rosniati, 2010). Bubuk kakao bersifat higroskopis sehingga kandungan lemak yang cukup tinggi akan memudahkan terjadinya reaksi hidrolisis dan oksidasi jika dibiarkan dalam suhu ruang tanpa kemasan. Lemak dalam

suatu bahan dapat memberi kesempatan mikroba lipolitik tumbuh secara dominan. Keadaan tersebut dapat mengakibatkan kerusakan lemak oleh mikroorganisme dan menghasilkan asam lemak bebas dan keton yang memiliki bau dan rasa khas (tengik) (Rosniati, 2010).

Benzen adalah senyawa aromatik tersederhana. Sumber utama benzen adalah alkil benzena (toluene, xilena, etil benzen). Sampai tahun 1904 benzen diperoleh dari ter batu bara, sekarang diperoleh dari fraksi nafta hasil penyulingan bertingkat petroleum atau 2-gasolin hasil pirolisis solar (Sriyana *et al.*, 2007).

Analisis lemak kasar dan bagian-bagian lain yang ikut larut dalam pelarut petroleum benzen, petroleum eter atau hexan yaitu: lemak itu sendiri (trigliserida), phospholipia, asam-asam lemak bebas, sterol-sterol, pigmen, karotin, khlorofil dan malam (Sorayah dan Darwinsyah dalam Sriyana *et al.*, 2007).

Minyak atau lemak lain yang memiliki ukuran molekul besar dapat menurunkan aktivitas antibakteri suatu ekstrak karena menjadi penghalang masuknya senyawa antibakteri (senyawa fenolik) kedalam sel bakteri sehingga mengganggu proses difusi (Kanazawa *et al.* dalam Nurcahyanti *et al.*, 2011). Naufalin (dalam Nurcahyanti *et al.*, 2011) memperkirakan adanya interaksi antara lemak dan minyak dengan senyawa antibakteri (minyak atsiri atau senyawa fenolik) sehingga menurunkan aktivitas antibakteri.

## 2.6 Tinjauan Ekstraksi

Agen ekstraksi atau pelarut dikenal sebagai *menstruum* dalam pembuatan sediaan fitofarmasetika, sedangkan larutan ekstrak yang telah terpisah dari residu tak larut disebut *miscella*. Syarat *menstruum* antara lain: (List & Schmidt, 1989)

- a. Sesuai untuk melarutkan komponen bahan obat yang diinginkan dan memisahkannya dari substansi lain,
- b. Siap larut dan bersifat selektif,
- c. Ekonomis, aman, dan tidak merusak lingkungan.

Pelarut ekstraksi antara lain air, larutan organik murni, dan campuran air dengan larutan organik. Pelarut organik yang selalu digunakan yaitu hidrokarbon dan derivat-derivatnya seperti hidrokarbon terhalogenasi, alkohol, ester, keton, eter, dll (List & Schmidt, 1989).

Ekstraksi bahan obat dapat dilakukan dalam tiga macam ekstraksi, antara lain ekstraksi padat-padat, ekstraksi padat-cair, dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair adalah yang paling sering digunakan dimana bahan obat berbentuk padatan diekstrak dengan media cair (List & Schmidt, 1989).

Dua proses yang berlangsung paralel dalam ekstraksi bahan obat antara lain: (List & Schmidt, 1989)

1. Pembilasan senyawa terekstrak keluar dari sel tanaman yang terdisintegrasikan, dan
2. Pelarutan senyawa terekstrak keluar dari sel utuh tanaman secara difusi.

Hasil akhir ekstraksi memerlukan perendaman dan pengembangan materi tanaman obat untuk meningkatkan permeabilitas dinding sel.

Muravev (dalam List & Schmidt, 1989) membagi proses ekstraksi bahan obat menjadi 3 tahap, yaitu:

1. Penetrasi solven ke dalam sel tanaman dan membuat sel mengembang,
2. Pelarutan substansi terekstrak,
3. Difusi substansi terekstrak yang dapat larut keluar dari sel tanaman.

Proses ekstraksi untuk obat dapat dibagi dalam dua grup mayor: (List & Schmidt, 1989)

1. Proses yang menghasilkan pembentukan kesetimbangan konsentrasi antara larutan dan residu padatan,
2. Proses dimana obat terekstraksi secara mendalam.

### **2.6.1 Metode Penetapan Kesetimbangan Konsentrasi**

Kesetimbangan konsentrasi tercapai ketika proses ekstraksi berhenti karena distribusi senyawa terekstrak antara *miscela* dengan residu obat mencapai nilai  $K$ ,

Contohnya ketika gradien konsentrasi antara *miscela* dan residu sama dengan nol (List & Schmidt, 1989).

$$K = \frac{\text{konsentrasi substansi terekstrak dalam misela}}{\text{konsentrasi substansi terekstrak dalam residu obat}}$$

Kesetimbangan ekstraksi dipengaruhi oleh obat (kuantitas, jenis, kadar air, dan derajat kominusi (proses reduksi ukuran)) maupun pelarut (selektivitas dan kuantitas). Beberapa faktor yang mempengaruhi kesetimbangan pada proses ekstraksi paling sederhana antara lain: (List & Schmidt, 1989)

- a. Rasio campuran : hasil ekstrak akan meningkat dengan penambahan bagian materia obat dalam jumlah pelarut yang tetap.
- b. Pelarutan dari sel yang terdisintegrasi : senyawa-senyawa terlarut keluar dari sel yang terdisintregasi. Semakin tinggi derajat kominusi (proses reduksi ukuran) dari materi tanaman obat akan memperbanyak bagian sel yang terdinintegrase, sehingga semakin cepat pembentukan kesetimbangan.
- c. Perendaman dan pengembangan materi tanaman obat : sangat penting untuk ekstraksi karena memperbesar kapilaritas sel sehingga dapat meningkatkan difusi. Ekstraksi dapat terganggu secara keseluruhan pada tanaman obat yang mengandung mucilago dalam jumlah banyak, sehingga sebaiknya pengembangan hanya sebatas memfasilitasi difusi substansi terekstrak tanpa mengganggu ekstraksi.
- d. Difusi dari sel utuh : pelarut harus terlebih dulu berdifusi dalam sel utuh sebelum dapat melarutkan senyawa terekstrak keluar sel. Senyawa yang diekstrak harus cukup larut dalam pelarut untuk dapat meningkatkan konsentrasi bahan terlarut dalam sel sehingga kesamaan kensentrasi dengan lingkungan pelarut dapat digantikan atau ditempati oleh difusi.
- e. Laju pembentukan kesetimbangan : menentukan lama berakhirnya ekstraksi. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ini antara lain ukuran partikel, derajat pengembangan materi tanaman obat, suhu ekstraksi, kekentalan pelarut, polaritas



pelarut, tipe dan intensitas pergerakan obat, pelarut, maupun bahan tambahan seperti garam maupun surfaktan.

f. Suhu : peningkatan temperatur umumnya menyebabkan pergantian kesetimbangan ekstraksi menuju disolusi.

g. Nilai pH : pH pelarut mempengaruhi selektivitas ekstraksi. Selektivitas berhubungan dengan hasil kualitatif dan kuantitatif senyawa aktif yang terekstrak serta jenis dan kuantitas senyawa pengiringnya dimana dapat bervariasi dengan pemilihan nilai pH. Selektivitas pelarut dapat ditingkatkan dengan mengubah pH pelarut.

h. Interaksi antara unsur terlarut dan materi pelengkap tak larut dari tanaman: pelarut selektif tidak menjamin hilangnya kemungkinan adsorpsi konstituen terlarut dalam materi pelengkap tanaman obat.

i. Derajat lipofilitas : pemilihan derajat lipofilitas sangat penting dalam penggunaan pelarut organik maupun campuran pelarut. Perubahan derajat lipofilitas dapat merubah rasio kuantitatif senyawa terekstrak dan komposisi kualitatif ekstrak.

### **2.6.2 Metode Ekstraksi Maserasi**

Maserasi atau maserasi sederhana didefinisikan sebagai ekstraksi obat dengan pelarut pada suhu ruang disertai beberapa pengocokan atau pengadukan tiap harinya. Dibandingkan metode lainnya, metode ini memiliki intensitas pergerakan sangat lambat karena didiamkan dalam keadaan tetap. Metode maserasi lainnya antara lain maserasi kinetik, remaserasi, dan digesti (List & Schmidt, 1989).

Maserasi kinetik sama dengan maserasi sederhana yang dilakukan pada suhu ruang hanya saja material di jaga dalam pergerakan konstan. Remaserasi menambahkan sejumlah pelarut pada obat kemudian setelah penyaringan, residu d ekstraksi ulang keduanya dengan sisa pelarut dan residu diperas untuk mengeluarkan pelarut sebanyak mungkin Digesti merupakan maserasi pada temperatur tinggi, biasanya pada 40-50° C (List & Schmidt, 1989).

## 2.7 Tinjauan *Streptococcus mutans*

*S. mutans* merupakan bakteri gram-positif dengan dinding sel tebal. Dinding sel tersusun dari peptidoglikan (murein) dan asam teikoik yang berfungsi mencegah lisis osmotik protoplasma sel. Dinding sel tersebut juga berfungsi memberikan kekakuan dan bentuk sel. *S. mutans* memiliki kapsul yang tersusun oleh polisakarida. Polisakarida memiliki subunit struktural yaitu glukosa dekstran (Microbewiki, 2012).

Klasifikasi *S. mutans* menurut “National Center for Biotechnology Information” adalah sebagai berikut:

Domain : Bakteri

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli

Ordo : Lactobacillales

Famili : Streptococcaceae

Spesies : *Streptococcus mutans*

(Sumber: NCBI, 2013)

*S. mutans* merupakan kelompok bakteri yang paling menyebabkan karies gigi (kariogenik) (Marsh & Martin, 1999). Karies gigi didefinisikan sebagai kerusakan terlokalisasi dari lapisan gigi akibat fermentasi karbohidrat oleh bakteri. Awal mula karies yaitu munculnya area demineralisasi kecil di bawah permukaan enamel (lesi). Sekali enamel dirusak, karies dapat berkelanjutan sampai dentin dan sampai dalam pulpa. Demineralisasi enamel disebabkan oleh asam, terutama asam laktat, yang diproduksi dari fermentasi mikroba terhadap makanan karbohidrat. Pembentukan lesi diakibatkan keterlibatan rusaknya enamel dan transport ion kalsium dan fosfat sehingga menjauh menuju lingkungan sekitarnya. Tahap awal karies dapat balik atau reversibel dan dapat terjadi remineralisasi, terutama dengan adanya fluoride (Marsh & Martin, 1999).

Karakteristik-karakteristik *S. mutans* yang meningkatkan sifat kariogeniknya antara lain: (Marsh & Martin, 1999)

- a. Transpor gula: tinggi dan rendahnya afinitas sistem transpor sangat berpengaruh dalam menjamin pengambilan substrat walau dibawah kondisi ekstrim (contoh: pH rendah).
- b. Produksi asam : jalannya proses glikolisis yang efisien dapat memproduksi nilai pH rendah dalam plak gigi dengan cepat
- c. Asiduritas (ketahanan pada suasana asam) : sel memiliki komponen biokimia spesifik yang membuatnya mampu bertahan atau tetap hidup, bermetabolisme, dan tumbuh pada nilai pH yang rendah.
- d. Produksi polisakarida ekstraseluler (*Extracellular Polysaccharide/EPS*) : EPS memperbesar matrik plak, menggabungkan pelengkap sel, dan dapat menempatkan produk fermentasi yang bersifat asam.
- e. Produksi polisakarida intraseluler (*Intracellular Polysaccharide/IPS*) : Penggunaan IPS memberikan kemampuan untuk melanjutkan produksi asam walau tanpa adanya makanan mengandung gula.

## 2.8 Tinjauan *Candida albicans*

Menurut Boyd (1992), *C. albicans* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi : Thallophyta

Anak divisi : Fungi

Kelas : Ascomycetes

Bangsa : Moniliales

Suku : Cryptococaceae

Anak suku : Candidiodeae

Marga : *Candida*

Spesies : *Candida albicans*

*C. albicans* sering kali dideskripsikan sebagai fungi dimorfik karena memiliki bentuk blastospora dan misela. *C. albicans* pada kenyataannya merupakan fungi trimorfik karena ketika ditempatkan dalam media pertumbuhan khusus tertentu (contohnya *corn meal agar*), akan membentuk spora kecil yang sangat refraktif

dinamakan klamidospora. Fungsi pasti dari klamidospora masih belum diketahui dan tidak ditemukan pada kandidosis mulut, tetapi klamidospora berguna untuk identifikasi *C. albicans* dalam laboratorium. Transisi dari blastospora (yeast) menjadi miselium, sering dinamakan transformasi Y ke M, sama dengan perubahan dari fase awal menjadi fase patogenik (Marsh & Martin, 1999).

Fungi yang paling sering menyebabkan masalah mulut merupakan *yeast* yang tak sempurna dan sebagian besar merupakan infeksi akibat spesies *Candida*. *Yeast* ditemukan pada semua permukaan mukosa, tetapi paling sering ditemukan pada bagian mulut terutama pada lidah yaitu pada area dorsum posterior di bagian papila sirkumvalat. *Yeast* tersebut dapat menjadi bagian mikroflora normal, tetapi ketika ekosistem berubah (contohnya ketika pemberian antibiotik spektrum luas), dapat terjadi peningkatan pertumbuhan melebihi normal dan infeksi terjadi (Marsh & Martin, 1999).

Peningkatan jumlah misela ditemukan pada infeksi akibat *C. albicans* walaupun juga ditemukan pada mulut yang sehat. Transformasi dari *yeast* menjadi miselia penting, tetapi tidak selalu menjadi syarat untuk terjadinya infeksi. Miselia dapat berpenetrasi (menembus) jaringan mulut pada beberapa kondisi, tetapi hanya menyerang lapisan kreatin dan glanular dari epitelium, tidak pernah seluruh ketebalan (di tengah-tengah). Misela berpenetrasi ke epitelium untuk memperoleh nutrisi dan untuk mencegah pemindahan oleh sel epitel mulut (Marsh & Martin, 1999).

Kandidosis merupakan istilah yang tepat untuk infeksi yang disebabkan spesies *Candida* karena penambahan akhiran “osis” yang menjelaskan infeksi fungal. Kandidiasis terkadang digunakan untuk mendeskripsikan infeksi ini, tetapi secara teknis hal tersebut salah karena akhiran “iasis” biasanya diperuntukkan mendeskripsikan infeksi oleh parasit (Marsh & Martin, 1999).

Kandidosis mulut pada umumnya merupakan infeksi sekunder dari beberapa faktor lokal atau sistemik. Faktor yang mempengaruhi pemicuan kandidosis mulut adalah banyaknya dan adanya gangguan kesehatan sistemik yang menyebabkan pertumbuhan berlebih dari *Candida sp.* (Marsh & Martin, 1999).

Klasifikasi kandidosis oral digunakan sebagai dasar untuk mengetahui adanya inflamasi akut dan kronik. Klasifikasi kandidosis mulut primer antara lain: (Marsh & Martin, 1999)

- a. Pseudomembran akut (sinonim: *thrush*)
- b. Eritema akut (sinonim: Glositis candida atau antibiotik melukai mulut)
- c. Serupa plak kronis, nodular kronis (sinonim: Leukoplakia candida)
- d. Eritema kronis, pseudomembran kronis (sinonim: Denture (gigi buatan) menginduksi stomatitis atau denture melukai mulut)
- e. Candida bercampur seilitis angular (sinonim: perleche)

## 2.9 Tinjauan Antimikroba

Bahan antimikroba merupakan bahan yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Bahan antimikroba juga disebut antibakteri atau antifungal (antijamur) apabila dimaksudkan untuk kelompok-kelompok organisme khusus. Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba antara lain konsentrasi zat antimikroba, jumlah mikroba, suhu, spesies mikroba, adanya bahan organik, dan pH (Pelczar & Chan, 1988).

Antimikroba memiliki cara kerjanya masing-masing dalam mengganggu pertumbuhan mikroba. Macam-macam cara kerja senyawa antimikroba antara lain:

- a. Antimikroba menyebabkan kerusakan dinding sel

Antimikroba merusak peptidoglikan yang merupakan lapisan penyusun dinding sel bakteri (Pratiwi, 2008). Bakteri gram positif dan gram negatif memiliki dinding sel yang sensitivitasnya berbeda terhadap perlakuan fisik, enzim, dan antibiotik (Fardiaz dalam Nurcahyanti *et al.*, 2011). Bakteri gram positif lebih rentan terhadap senyawa antimikroba dibandingkan dengan bakteri gram negatif karena struktur dinding sel bakteri gram positif relatif lebih sederhana. Struktur dinding sel yang sederhana tersebut dapat memudahkan senyawa antimikroba untuk masuk sel bakteri. Struktur dinding sel bakteri gram negatif relatif lebih kompleks dimana tersusun dua lapis. Lapisan luar berupa lipoprotein dan lipopolisakarida (mampu

menyeleksi zat-zat asing) dan lapisan dalamnya berupa peptidoglikan (Pelezar & Chan dalam Nurcahyanti *et al.*, 2011).

b. Antimikroba menyebabkan kerusakan membran sel

Zat antimikroba yang berkumpul pada permukaan sel dapat mengubah sifat fisika dan kimia membran sel sehingga mengganggu membran berfungsi dengan normal, lebih lanjut akan membunuh atau menghambat sel (Brooks *et al.*, 2004). Gangguan atau kerusakan struktur pada membran sel dapat menghambat atau merusak kemampuan membran plasma sebagai penghalang (*barrier*) osmosis dan mengganggu sejumlah proses biosintesis yang diperlukan dalam membran (Pratiwi, 2008).

c. Antimikroba menyebabkan penghambatan kerja enzim

Penghambatan senyawa antimikroba terhadap penghambatan kerja enzim dapat melalui kompetisi dengan PABA (mengganggu pembentukan asam folat) ataupun penghambatan pembentukan asam tetrahidrofolat (bentuk aktif dari asam folat). Kedua mekanisme tersebut mengakibatkan hilangnya kofaktor esensial sel mikroba terhadap purin, pirimidin, dan sintesis asam amino (Mycek *et al.*, 1995).

d. Antimikroba menyebabkan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat berupa penghambatan replikasi DNA dan transkripsi mRNA (Pratiwi, 2008). Penghambatan terhadap sintesis protein berupa mengikat subunit ribosom sehingga menyebabkan kesalahan pembacaan kode genetik mRNA, menghambat langkah translokasi sintesis protein, dan mengganggu reaksi peptidil transferase (Mycek *et al.*, 1995).

## 2.10 Tinjauan Metode Antimikroba

Penentuan aktivitas antimikroba ekstrak dapat dilakukan apabila tiga persyaratan sebagai berikut: (Hostettmann, 1991)

a. Ekstrak tanaman kontak dengan dinding sel mikroorganisme,

b. Kondisi pengujian ditetapkan sehingga mikroorganisme dapat tumbuh pada saat tidak ada bahan antimikroba (ekstrak),

c. Parameter ukur tingkat pertumbuhan (atau penghambatan) mikroorganisme telah ditentukan.

Aktivitas antimikroba dapat ditentukan dengan beberapa metode sebagai berikut: (Hostettmann, 1991)

1. Metode penyebaran atau difusi

Metode difusi berdasarkan difusi bahan antimikroba pada permukaan media agar sehingga terjadi kontak langsung dengan mikroorganisme. Cara kerja umum dari metode ini yaitu dengan menanam mikroba dalam media agar padat yang sesuai lalu meletakkan cakram atau silinder yang telah ditetesi bahan uji pada permukaan agar tersebut. Bahan uji juga bisa dimasukkan kedalam lubang atau sumuran yang telah dibuat pada media. Media berisi inokulum dan bahan uji tersebut kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu  $36-37^{\circ}$  C. Aktivitas antimikroba dapat dilihat dengan mengukur daerah disekitar cakram, lubang, atau sumuran agar yang tidak ditumbuhi mikroba. Efektivitas aktivitas antimikroba bahan uji dilihat makin besarnya diameter hambatan tersebut. Metode penyebaran dibagi menjadi tiga jenis, yaitu metode cakram kertas (*filter paper disc method*), metode cairan dalam silinder/cincin (*cylinder plate method*), metode lubang (*hole plate method*).

Menurut Conner dan Buchat dalam Nurcahyanti (2011), daya hambat yang menentukan tingkat efektivitas antibakteri dibagi menjadi tiga yaitu:

1. Aktivitas kuat mempunyai DDH (Diameter Daya Hambat)  $> 1,1$  cm
2. Aktivitas lemah mempunyai DDH  $0,6-1,1$  cm
3. DDH  $< 0,6$  cm berarti ekstrak tidak menghambat bakteri

2. Metode pengenceran atau dilusi

Metode pengenceran dapat dilakukan pengenceran dalam tabung maupun dalam agar. Pengenceran dalam tabung disebut dengan metode dilusi cair, sedangkan dalam agar disebut metode dilusi padat.

Metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran bahan uji pada media cair yang ditambah mikroba uji. Seri pengenceran bisa dibuat dengan

pengenceran dua kali atau dengan pengenceran bebas. Pada seri pengenceran dua kali, bahan uji diencerkan dengan media cair menjadi kelipatan dua secara bertahap sehingga didapatkan konsentrasi dengan kelipatan setengahnya, sedangkan pada pengenceran bebas seri pengenceran dapat dibuat sesuai kondisi atau ditentukan sendiri. Media cair tersebut diinokulasi dengan suspensi bakteri dan diinkubasi selama 24 jam pada temperatur 36-37° C kemudian diamati hambatan pertumbuhan mikroba dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhannya dengan kontrol yang mengandung media. KHM didapatkan pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi atau pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji.

Metode dilusi padat serupa dengan metode dilusi cair dengan penambahan penggunaan satu seri lempeng agar dengan konsentrasi bahan uji yang berbeda. Metode dilusi agar dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba sekaligus.

### 3. Metode Bioautografi

Metode dengan prinsip difusi senyawa terpisah dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau Kromatografi Kertas (KK). Metode ini merupakan metode yang sangat bermanfaat untuk mengetahui senyawa baru atau senyawa yang belum diketahui aktivitas antimikrobanya, akan tetapi tidak dapat menentukan KHM dan KBM. Metode ini dibagi menjadi:

#### a) Metode bioautografi langsung

Metode ini memiliki dua macam cara yaitu penempelan dan penyemprotan. Cara penempelan dilakukan dengan menyentuhkan lempeng KLT pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme selama kira-kira 30 menit kemudian lempeng dipindahkan. Lempeng tersebut diinkubasi pada waktu tertentu dan diamati. Prinsip cara penempelan ini yaitu senyawa antimikroba akan berdifusi kedalam lapisan agar dan menghambat pertumbuhan mikroba. Letak senyawa aktif tampak sebagai area jernih dengan latar belakang keruh (zona hambatan). Cara penyemprotan dilakuksn dengan menyemprot plat KLT dengan suspensi mikroorganisme. Zona



hambatan diamati secara langsung pada lempeng kromatografi yang telah diinkubasi pada temperatur dan waktu yang sesuai.

b) Metode bioautografi *overlay*

Metode bioautografi ini bisa dilakukan dengan dua cara yaitu pencelupan dan penuangan. Cara pencelupan dilakukan dengan mencelupkan lempeng kromatografi ke dalam media dan dibiarkan mengeras. Lempeng kromatografi diinkubasi dan diamati daerah hambatannya. Cara penuangan dilakukan dengan menuangkan media agar yang telah dicampur dengan mikroorganisme di atas permukaan plat KLT. Media ditunggu hingga padat kemudian diinkubasi. Area hambatan dilihat dengan penyemprotan menggunakan tetrazolium klorida. Titik senyawa yang aktif sebagai antimikroba akan tampak sebagai area jernih dengan latar belakang ungu.

KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) merupakan parameter lain yang dapat diketahui dari senyawa antimikroba. KHM menunjukkan konsentrasi minimum suatu zat yang memiliki efek daya hambat pertumbuhan mikroorganisme (Wattimena dalam Rostinawati, 2009). Metode untuk menetapkan KHM meliputi dua cara yaitu dilusi cair dan dilusi padat seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.

Salah satu metode pengukuran pertumbuhan mikroba yaitu *plating technique*. Metode ini merupakan metode perhitungan jumlah sel tampak (*visible*) dimana berdasarkan pada anggapan bahwa bakteri hidup akan tumbuh, membelah, dan memproduksi satu koloni tunggal. Satuan perhitungan yang dipakai adalah CFU (*Colony Forming Unit*) dengan cara membuat seri pengenceran sampel dan menumbuhkan sampel pada media padat. Pengukuran dilakukan pada *plate* berisi koloni dengan rentang jumlah 25-250 atau 30-300 (Pratiwi, 2008).

Metode ini menggunakan alat *colony counter* sehingga sederhana, mudah, dan selektif. Kerugian metode ini yaitu harus digunakan media yang sesuai dan penghitungannya kurang akurat karena satu koloni tidak selalu berasal dari satu individu sel (Pratiwi, 2008).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

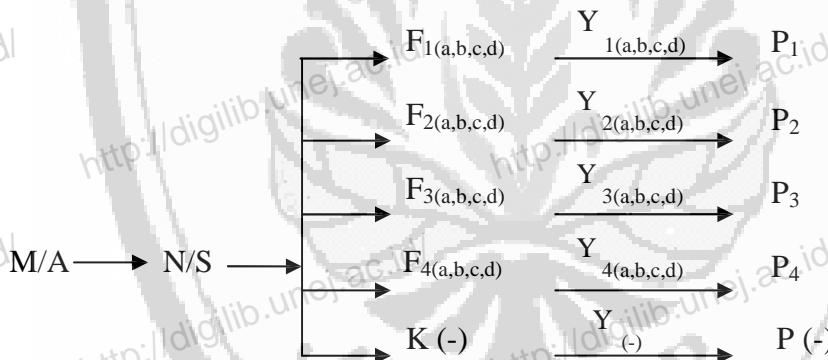
### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini tergolong dalam jenis penelitian *True Experimental Laboratoris*.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu *Post Test Only Control Group Design* dengan skema seperti yang tertera pada Gambar 3.1 dan Gambar 3.2.

#### 3.2.1 Uji Aktivitas Antimikroba Terhadap *S. mutans* dan *C. albicans* Dengan Metode Sumuran



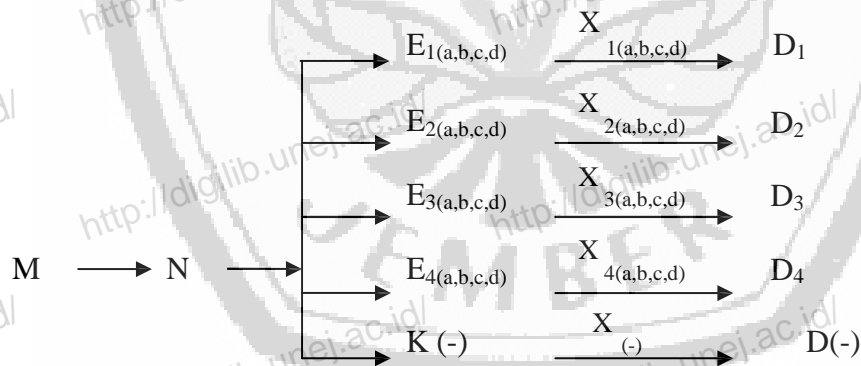
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian penentuan aktivitas antimikroba

Keterangan :

- M : Suspensi bakteri *S. mutans*
- N : Media Nutrien Agar (NA)
- A : Suspensi jamur *C. albicans*
- S : Media Sabouroud Dextrose Agar (SDA)
- F<sub>1-4</sub> : Berturut-turut kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4

- K(-) : Kelompok kontrol negatif (DMSO 2%)
- Y<sub>1-4</sub> : Berturut-turut perlakuan berupa kontak dengan ekstrak pada konsentrasi 30%; 35%; 40%; 45% (b/v) selama 24 jam (inkubasi)
- Y(-) : Perlakuan berupa kontak dengan kontrol negatif (DMSO 2%)
- P<sub>1-4</sub> : Berturut-turut data perlakuan dengan ekstrak pada konsentrasi 25%; 30%; 40%; 45% (b/v)
- P(-) : Data perlakuan dengan kontrol negatif (DMSO 2%) selama 24 jam (inkubasi)
- a : Ekstrak Etanol 70% *non-defatting* PB
- b : Ekstrak Etanol 70% *defatting* PB
- c : Ekstrak Air Panas *non-defatting* PB
- d : Ekstrak Air Panas *defatting* PB

### 3.2.2 Uji Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* Dengan Metode Dilusi Agar-Hitung Koloni



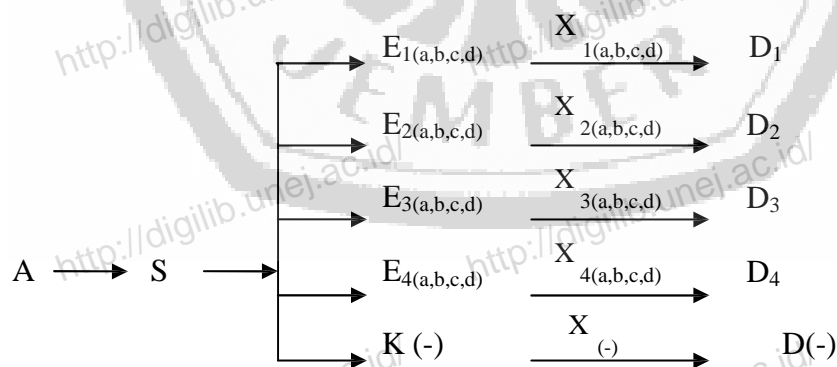
Gambar 3.2 Skema rancangan penelitian uji penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans*

Keterangan :

M : Suspensi bakteri *S. mutans*

- N : Media Nutrien Agar (NA)
- E<sub>1-4</sub> : Berturut-turut kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4
- K(-) : Kelompok kontrol negatif (DMSO 2%)
- X<sub>1-4</sub> : Berturut-turut perlakuan berupa kontak dengan ekstrak pada konsentrasi 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8% (b/v) untuk ekstrak etanol 70% dan 0,4%; 0,8%; 1,2%; 1,6% (b/v) untuk ekstrak air panas selama 24 jam (inkubasi)
- X(-) : Perlakuan berupa kontak dengan kontrol negatif (DMSO 2%)
- D<sub>1-4</sub> : Berturut-turut data perlakuan dengan ekstrak pada konsentrasi 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8% (b/v) untuk ekstrak etanol 70% dan 0,4%; 0,8%; 1,2%; 1,6% (b/v) untuk ekstrak air panas
- D(-) : Data perlakuan dengan kontrol negatif (DMSO 2%) selama 24 jam (inkubasi)
- a : Ekstrak Etanol 70% *non-defatting* PB
- b : Ekstrak Etanol 70% *defatting* PB
- c : Ekstrak Air Panas *non-defatting* PB
- d : Ekstrak Air Panas *defatting* PB

### 3.2.3 Uji Penentuan KHM terhadap *C. albicans* Dengan Metode Dilusi Agar-Gores



Gambar 3.3 Skema rancangan penelitian uji penentuan KHM terhadap *C. albicans*

Keterangan :

- A : Suspensi jamur *C. albicans*
- S : Media Sabouroud Dextrose Agar (SDA)
- E<sub>1-4</sub> : Berturut-turut kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4
- K(-) : Kelompok kontrol negatif (DMSO 2%)
- X<sub>1-4</sub> : Berturut-turut perlakuan berupa kontak dengan ekstrak pada konsentrasi 0,4%; 0,8%; 1,2%; 1,6% (b/v) untuk ekstrak etanol 70% dan 1%; 2%; 3%; 4% (b/v) untuk ekstrak air panas selama 24 jam (inkubasi)
- X(-) : Perlakuan berupa kontak dengan kontrol negatif (DMSO 2%)
- D<sub>1-4</sub> : Berturut-turut data perlakuan dengan ekstrak pada 0,4%; 0,8%; 1,2%; 1,6% (b/v) untuk ekstrak etanol 70% dan 1%; 2%; 3%; 4% (b/v) untuk ekstrak air panas selama 24 jam (inkubasi)
- D(-) : Data perlakuan dengan kontrol negatif (DMSO 2%) selama 24 jam (inkubasi)
- a : Ekstrak Etanol 70% *non-defatting* PB
- b : Ekstrak Etanol 70% *defatting* PB
- c : Ekstrak Air Panas *non-defatting* PB
- d : Ekstrak Air Panas *defatting* PB

### 3.3 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* dengan pelarut etanol 70% *non-defatting* PB, dengan pelarut etanol 70% *defatting* PB, dengan pelarut air panas *non-defatting* PB, dan dengan pelarut air panas *defatting* PB. Konsentrasi masing-masing sampel yang digunakan yaitu 30%, 35%, 40%, dan 45% (b/v) untuk uji penentuan aktivitas antimikroba, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,6%, 2%, 3% (b/v) untuk uji penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap bakteri *S. mutans*, dan 0,4%, 0,8%, 1,2%, 1,6%, 1%, 2%,

3%, 4% (b/v) untuk uji penentuan KHM terhadap jamur *C. albicans*. Kontrol negatif menggunakan DMSO 2%. Mikroba uji meliputi *S. mutans* dan *C. albicans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember.

### 3.4 Pengulangan

Jumlah pengulangan dalam pengujian aktivitas antimikroba dan penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> ditentukan dengan metode Hanafiah (2004) sebagai berikut :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5-1)(r-1) \geq 15$$

$$(4)(r-1) \geq 15$$

$$4r-4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \approx 5$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

Berdasarkan rumus pengulangan tersebut, maka pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali.

### 3.5 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* dengan pelarut etanol 70% *non-defatting* PB, pelarut etanol 70% *defatting* PB, pelarut air panas *non-defatting* PB, dan pelarut air panas *defatting* PB dengan konsentrasi 30%, 35%, 40%, dan 45% (b/v) untuk uji penentuan aktivitas antimikroba, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,6%, 2%, 3% (b/v) untuk uji penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap bakteri *S. mutans* dan 0,4%, 0,8%, 1,2%, 1,6%, 1%, 2%, 3%, 4% (b/v) untuk uji penentuan KHM terhadap jamur *C. albicans*.

### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas penghambatan pertumbuhan mikroba berupa pembentukan zona bening yang dinyatakan sebagai Diameter Daya Hambat (DDH), KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* berupa penurunan jumlah koloni mikroba yang dinyatakan sebagai % penghambatan, serta KHM terhadap *C. albicans* berupa ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba pada hasil goresan setelah kontak selama 24 jam (selama inkubasi).

### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah, sebagai berikut :

- a. Pembuatan biakan mikroba *S. mutans* dan *C. albicans*
- b. Pembuatan ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* dengan pelarut etanol 70% *non-defatting* PB, pelarut etanol 70% *defatting* PB, pelarut air panas *non-defatting* PB, dan pelarut air panas *defatting* PB.
- c. Media NA dan SDA.
- d. Cara ekstraksi biji kakao.
- e. Suhu dan waktu inkubator.
- f. Suhu dan waktu autoklaf
- g. Prosedur penelitian.

### 3.5.4 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini antara lain:

- a. Buah kakao yang digunakan merupakan buah kakao bulk terserang *P. palmivora* berasal dari Kebun Banjarsari PTPN XII Jember tanpa dilihat umur buahnya.
- b. Ekstrak biji kakao kaya polifenol yang digunakan untuk uji antimikroba didapat dari biji kering buah kakao terserang *P. palmivora* tanpa fermentasi yang diekstrak sesuai dengan prosedur penelitian. Ekstrak kaya polifenol yang digunakan telah

diketahui total polifenol dan aktivitas antioksidannya berdasarkan penelitian Wahyudin (belum dipublikasikan).

c. Air panas yang digunakan sebagai pelarut ekstraksi yaitu air dengan suhu 60°C. *defatting* merupakan proses pengurangan kadar lemak dalam biji kakao. Ekstrak dengan *non-defatting* PB merupakan ekstrak dari biji kering kakao yang hanya melalui proses *defatting* dengan presan hidrolik, sedangkan *defatting* PB merupakan ekstrak dari biji kering kakao yang melalui proses *defatting* dengan presan hidrolik dan perendaman PB.

d. Aktivitas antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terhadap *S. mutans* dan *C. albicans* merupakan kemampuan ekstrak dalam menunjukkan aktivitasnya sebagai senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau mematikan bakteri (bakterisida). Aktivitas antimikroba tersebut dinyatakan dalam Diameter Daya Hambat (DDH) berupa zona bening disekitar sumuran dan diukur menggunakan jangka sorong dikurangi diameter sumuran.

e. Konsentrasi hambat minimum (KHM) merupakan konsentrasi terkecil ekstrak polifenol biji kakao yang mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan *C. albicans*.  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan 50% mikroba. Nilai KHM ditunjukkan oleh tidak adanya koloni mikroba yang tumbuh pada *S. mutans* dan tidak adanya pertumbuhan hasil goresan *C. albicans*. Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi yang mampu memberikan 50% penghambatan terhadap pertumbuhan *S. mutans* berdasarkan persamaan garis dari kurva antara konsentrasi dengan % penghambatan.

### 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain timbangan analitik, blender, pengepres hidrolik, *rotary evaporator*, penangas air, *hot plate magnetic* (pemanas magnetik), vortex, *oven vacuum*, inkubator, *laminar air flow*, *colony*



counter, autoklaf, termometer, kain saring, pipet mikro, *blue tip*, *yellow tip*, pemanas bunsen, seperangkat alat gelas, *microtube*, stirer 5 cm, *aluminium foil*, plastik *wrap*, spatula, sengkeli, kertas label, dan kapas.

### 3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain buah kakao bulk terserang *P. palmivora* dari Kebun Banjarsari PTPN XII, etanol 70%, Petroleum Benzen, air panas, aquades, media NA, media SDA, media NB, NACl 0,9%, spiritus, dan kultur *S. mutans* dan *C. albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember.

### 3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Laboratorium Rekayasa Penelitian dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, dan Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan November 2011 sampai Desember 2012.

### 3.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan sebagai berikut:

#### 3.8.1 Perolehan biji kakao kering

Buah kakao terkena *P. palmivora* yang diperoleh dari perkebunan Banjarsari PTPN XII dipecah untuk memisahkan biji kakao basah dari kulit buah dan plasenta. Biji kakao basah yang diperoleh dijemur dengan sinar matahari sampai diperoleh biji kakao kering. Apabila cuaca kurang mendukung maka digunakan oven dengan suhu 50° C sampai diperoleh biji kering kakao.

3.8.2 Pembuatan Ekstrak Biji Kakao Kaya Polifenol Terserang *P. palmivora* dengan Maserasi sesuai dengan Prosedur dalam Setiadevi (2010).

a. Ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB

Biji kakao kering ditumbuk kasar kemudian dipisahkan lemaknya dengan menggunakan press hidrolis. Penumbukan bertujuan untuk mempermudah proses pengepresan. Biji kakao kering hasil pengepresan dipisahkan dari kulit ari yang menyelubungi biji kakao sehingga didapatkan keping biji. Keping biji kakao dihaluskan dengan menggunakan blender hingga didapatkan ukuran partikel berkisar mesh no.25-35 kemudian direndam dalam pelarut etanol 70% sambil diaduk sesekali (15-20 menit sekali) sehingga didapat ekstrak kaya polifenol. Waktu perendaman (maserasi) yaitu 3 jam, perbandingan halusan keping biji kakao dengan pelarut yaitu 1:3, dan dilakukan pada suhu ruang.

Ekstrak polifenol dipisahkan dari residunya dengan menggunakan kain saring. Filtratnya dipekatkan dengan menggunakan evaporator berputar (*rotary evaporator*). Filtrat pekat dikeringkan menggunakan oven vakum selama  $\pm 50$  jam pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ .

b. Ekstrak etanol 70% *defatting* PB

Biji kakao kering ditumbuk kasar kemudian dipisahkan lemaknya dengan menggunakan press hidrolis. Biji kakao kering hasil pengepresan dipisahkan dari kulit ari yang menyelubungi biji kakao sehingga didapatkan keping biji. Keping biji kakao kemudian direndam dalam PB dengan perbandingan 1:3 selama 2 jam sambil terus diaduk dengan stirer magnetik.

Keping biji hasil perendaman benzen dihaluskan dengan menggunakan blender hingga didapatkan ukuran partikel berkisar mesh no.25-35 kemudian direndam dalam pelarut etanol 70% sambil diaduk sesekali sehingga didapat ekstrak

polifenol. Waktu perendaman (maserasi) yaitu 3 jam, perbandingan halusan keping biji kakao dengan pelarut yaitu 1:3, dan dilakukan pada suhu ruang.

Ekstrak polifenol dipisahkan dari residunya dengan menggunakan kain saring. Filtratnya dipekatkan dengan menggunakan evaporator berputar (*rotary evaporator*). Filtrat pekat dikeringkan menggunakan oven vakum selama  $\pm 50$  jam pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ .

c. Ekstrak air panas *non-defatting* PB

Biji kakao kering ditumbuk kasar kemudian dipisahkan lemaknya dengan menggunakan press hidrolis. Biji kakao kering hasil pengepresan dipisahkan dari kulit ari yang menyelubungi biji kakao sehingga didapatkan keping biji. Keping biji kakao dihaluskan dengan menggunakan blender hingga didapatkan ukuran partikel berkisar mesh no.25-35 kemudian direndam dalam pelarut air panas suhu  $40-60^{\circ}\text{C}$  sambil diaduk sesekali sehingga didapat ekstrak polifenol. Waktu perendaman (maserasi) yaitu 3 jam dengan suhu pelarut yang dipertahankan pada  $40-60^{\circ}\text{C}$ , perbandingan halusan keping biji kakao dengan pelarut yaitu 1:3, dan dilakukan pada suhu ruang.

Ekstrak polifenol dipisahkan dari residunya dengan menggunakan kain saring. Filtratnya dipekatkan dengan menggunakan evaporator berputar (*rotary evaporator*). Filtrat pekat dikeringkan menggunakan oven vakum selama  $\pm 50$  jam pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ .

d. Ekstrak air panas *defatting* PB

Biji kakao kering ditumbuk kasar kemudian dipisahkan lemaknya dengan menggunakan press hidrolis. Biji kakao kering hasil pengepresan dipisahkan dari kulit ari yang menyelubungi biji kakao sehingga didapatkan keping biji. Keping biji kakao kemudian direndam dalam PB dengan perbandingan 1:3 selama 2 jam sambil terus diaduk dengan stirer magnetik.

Keping biji hasil perendaman benzen dihaluskan dengan menggunakan blender hingga didapatkan ukuran partikel berkisar mesh no.25-35 kemudian direndam dalam pelarut air panas bersuhu 40-60° C sambil diaduk sesekali sehingga didapat ekstrak polifenol. Waktu perendaman (maserasi) yaitu 3 jam dengan suhu pelarut yang dipertahankan pada 40-60° C, perbandingan halusan keping biji kakao dengan pelarut yaitu 1:3, dan dilakukan pada suhu ruang.

Ekstrak polifenol dipisahkan dari residunya dengan menggunakan kain saring. Filtratnya dipekatkan dengan menggunakan evaporator berputar (*rotary evaporator*). Filtrat pekat dikeringkan menggunakan oven vakum selama  $\pm$  50 jam pada suhu 60°C.

### 3.8.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi semua peralatan dan bahan (kecuali ekstrak) yang akan digunakan menggunakan autoklaf dengan lama sterilisasi 15 menit dan suhu sterilisasi 121° C. Tekanan autoklaf sebesar 15 dyne/cm<sup>3</sup> (1 atm) (Dwidjoseputro, 1990).

### 3.8.4 Pembuatan Media

#### a. Media NA

Agar NA sebanyak 5,75 g ditambahkan ke 250 ml aquades hangat dalam tabung erlenmeyer. Campuran dididihkan di atas plate pemanas magnetik sampai benar-benar larut kemudian disterilisasi.

#### b. Media SDA

Agar SDA sebanyak 16,25 g ditambahkan ke 250 ml aquades hangat dalam tabung erlenmeyer. Campuran dididihkan di atas plate pemanas magnetik sampai benar-benar larut kemudian disterilisasi.

### 3.8.5 Pembuatan standar Mc Farland 0,5

BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 ml dicampur dengan 9,95 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sehingga setara dengan <math>300 \times 10^8</math> CFU (koloni/ml) (Sutton, 2011).

### 3.8.6 Pembuatan NaCl 0,9%

0,9 gram NaCl dilarutkan dalam 100 ml aquades kemudian disterilisasi.

### 3.8.7 Pembuatan Suspensi Mikroba

#### a. Bakteri *S. mutans*

Sebanyak 1 ose *C. albicans* dari kultur stok agar plate SDA diambil menggunakan sengkeli steril kemudian dimasukkan tabung reaksi berisi 10 ml NaCl 0,9% steril secara aseptis dan diencerkan dengan NaCl 0,9% hingga sama dengan standar Mc Farland 0,5 untuk pengujian aktivitas antimikroba, sedangkan untuk penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai 4 kali pengenceran.

#### b. Jamur *C. albicans*

Sebanyak 1 ose *C. albicans* dari kultur stok agar plate SDA diambil menggunakan sengkeli steril kemudian dimasukkan tabung reaksi berisi 10 ml NaCl 0,9% steril secara aseptis dan diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai sama dengan standar Mc Farland 0,5.

### 3.8.8 Pembuatan Kontrol

Penelitian ini hanya menggunakan kontrol negatif sebagai pembanding. Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO 2%.

### 3.8.9 Pembuatan Ekstrak Polifenol dengan Beragam Konsentrasi Uji

Ekstrak polifenol untuk pengujian aktivitas antimikroba dibuat dalam konsentrasi uji 30%, 35%, 40% , dan 45% (b/v). Ekstrak polifenol kering ditimbang

secara berturut-turut sebanyak 0,3 g; 0,35 g; 0,40 g; 0,45 g kemudian ditambah dengan DMSO masing-masing sebanyak 20 µl dan 680 µl; 630 µl; 580µl; 530 µl aquades steril, kemudian divortek hingga didapat konsentrasi 30%, 35%, 40% , dan 45% (b/v).

Ekstrak polifenol untuk pengujian KHM dan IC<sub>50</sub> dibuat dalam konsentrasi uji 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%, 1,2%, 1,6%, 2%, 3%, dan 4% (b/v). Ekstrak polifenol kering ditimbang secara berturut-turut sebanyak 0,01 g; 0,02 g; 0,03 g; 0,04 g; 0,05 g; 0,06 g; 0,08 g; 0,1 g; 0,15 g; 0,2 g kemudian ditambah dengan DMSO masing-masing 20 µl dan 970 µl; 960 µl; 950 µl; 940 µl; 930 µl; 920 µl; 900 µl; 880 µl; 830 µl; 780 µl aquadest steril dan 4 ml media hangat kemudian divortex.

### 3.9 Tahap Pengujian

#### 3.9.1 Uji Aktivitas Antimikroba

##### a. Uji Aktivitas Antimikroba terhadap *S. mutans*

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* yaitu metode difusi sumuran agar oleh Murray *et al.* yang dimodifikasi oleh Olurinola (dalam Koppula *et al.*, 2010). 20 ml media NA diletakkan dalam botol steril kemudian diinokulasikan dengan 200µl suspensi mikroba yang telah distandarisasi dengan larutan *Mc Farland 0,5* dan dicampur perlahan. Campuran media NA dengan mikroba dituangkan dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Media padat dibuat 5 sumuran dengan diameter 7 mm. Tiap sumur diisi dengan 70 µl ekstrak dengan konsentrasi berbeda dan kontrol negatif kemudian dibiarkan 45 menit untuk berdifusi. Pelarut yang digunakan untuk merekonstitusi ekstrak juga dianalisis dengan perlakuan sama. Cawan petri diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

##### b. Uji Aktivitas Antimikroba terhadap *C. albicans*

Media SDA dituang dalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 ml. Media dibiarkan memadat kemudian 500 µl suspensi *C. albicans* yang telah

disetarakan dengan standar *Mc Farland* 0,5 diusapkan di permukaan media secara merata menggunakan lidi kapas steril. Media padat dibuat 5 sumuran dengan diameter 7 mm. Tiap sumur diisi dengan 70  $\mu$ l ekstrak dengan konsentrasi berbeda dan kontrol negatif kemudian dibiarkan 45 menit untuk berdifusi. Pelarut yang digunakan untuk merekonstitusi ekstrak juga dianalisis dengan perlakuan sama. Cawan petri diinkubasi pada 37° C selama 24 jam.

### 3.9.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans*

Penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* dilakukan dengan metode dilusi agar dengan hitung koloni. Masing-masing media yang masih hangat (cair) ditambah larutan sampel (ekstrak polifenol dan kontrol negatif aquades dengan perbandingan 4:1 sehingga didapatkan konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% (b/v) untuk ekstrak etanol 70% dan 0,4%, 0,8%, 1,2%, 1,6% (b/v) untuk ekstrak air panas. Campuran media dan larutan uji dimasukkan cawan petri berisi 200  $\mu$ l suspensi mikroba. Campuran dibiarkan sampai memadat kemudian diinkubasi suhu 37° C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh. KHM merupakan konsentrasi dimanasudah tidak terdapat pertumbuhan mikroba, sedangkan IC<sub>50</sub> merupakan konsentrasi yang mampu memberikan 50% penghambatan dari total koloni yang terdapat pada kontrol negatif.

### 3.9.3 Penentuan KHM terhadap *C. albicans*

Penentuan KHM terhadap *C. albicans* dilakukan dengan metode dilusi agar sistem gores. Masing-masing media yang masih hangat (cair) ditambah larutan sampel (ekstrak polifenol dan kontrol negatif aquades dengan perbandingan 4:1 sehingga didapatkan konsentrasi 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% (b/v) untuk ekstrak etanol 70% dan 0,4%, 0,8%, 1,2%, 1,6% (b/v) untuk ekstrak air panas. Campuran media dan larutan uji dimasukkan cawan petri steril kosong dan dibiarkan memadat. Kultur *C. albicans* diambil dengan sengkeli steril yang telah kemudian digoreskan di atas

campuran media agar dan larutan uji yang telah memadat. Cawan petri diinkubasi suhu 30° C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan *C. albicans* pada hasil goresan. KHM dinyatakan oleh konsentrasi yang sudah tidak menunjukkan adanya pertumbuhan *C. albicans*.

#### 3.9.4 Skrining Polifenol dan Flayonoid

Skrining polifenol dan flavonoid ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fase diam menggunakan silika gel GF 254, sedangkan fase gerak menggunakan eluen dari fase atas campuran Butanol:As.asetat:Air dengan perbandingan 4:1:2,2.

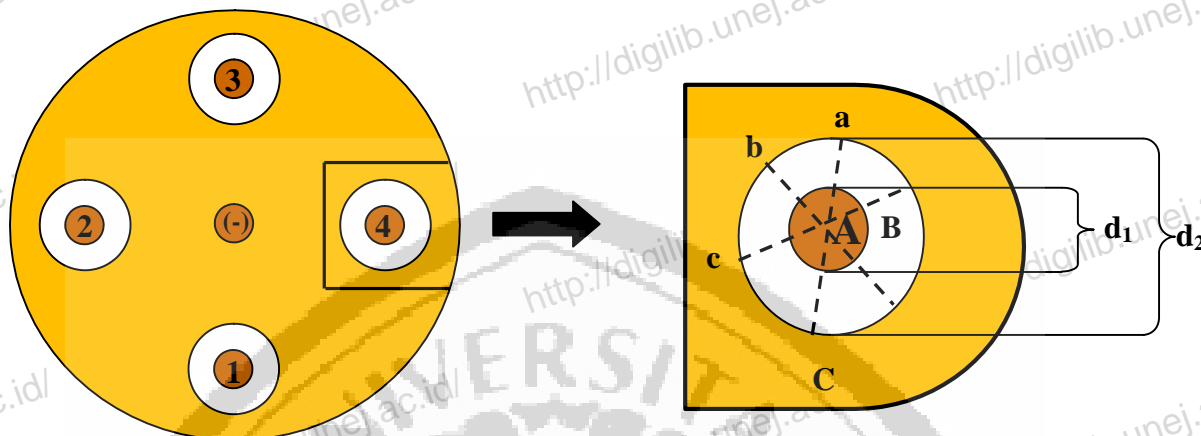
Pembuatan eluen sebanyak 20 ml dilakukan dengan mencampur 11,11 ml butanol, 2,78 ml asam asetat, dan 6,11 ml aquades. Campuran dimasukkan dalam corong pisah dan dikocok beberapa kali kemudian dipasangkan pada statip dan didiamkan selama semalam agar terpisah dengan baik. Fase atas campuran dipisahkan dan digunakan sebagai eluen.

#### 3.10 Tahap Pengamatan

Pengamatan untuk pengujian aktivitas antimikroba dengan mengukur DDH yang dihasilkan ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* pada berbagai konsentrasi uji menggunakan jangka sorong, sedangkan untuk pengujian KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* dilakukan dengan menghitung pertumbuhan koloni *S. mutans* dan menentukan % penghambatan yang diberikan oleh tiap-tiap konsentrasi uji sehingga dapat dinyatakan dalam kurva, dan pengujian KHM terhadap *C. albicans* dengan pengamatan ada tidaknya pertumbuhan mikroba hasil goresan. (Gambar 3.4). Hasil pengujian skrining polifenol dan flayonoid dilakukan dengan pengamatan noda di bawah UV 254 nm dan 366 nm serta dengan penampak noda amonia dan FeCl<sub>3</sub>.



$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{selisih jumlah koloni pada larutan uji dengan kontrol}}{\text{jumlah koloni pada kontrol}} \times 100\%$$



Gambar 3.4 Pengamatan Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Sumuran

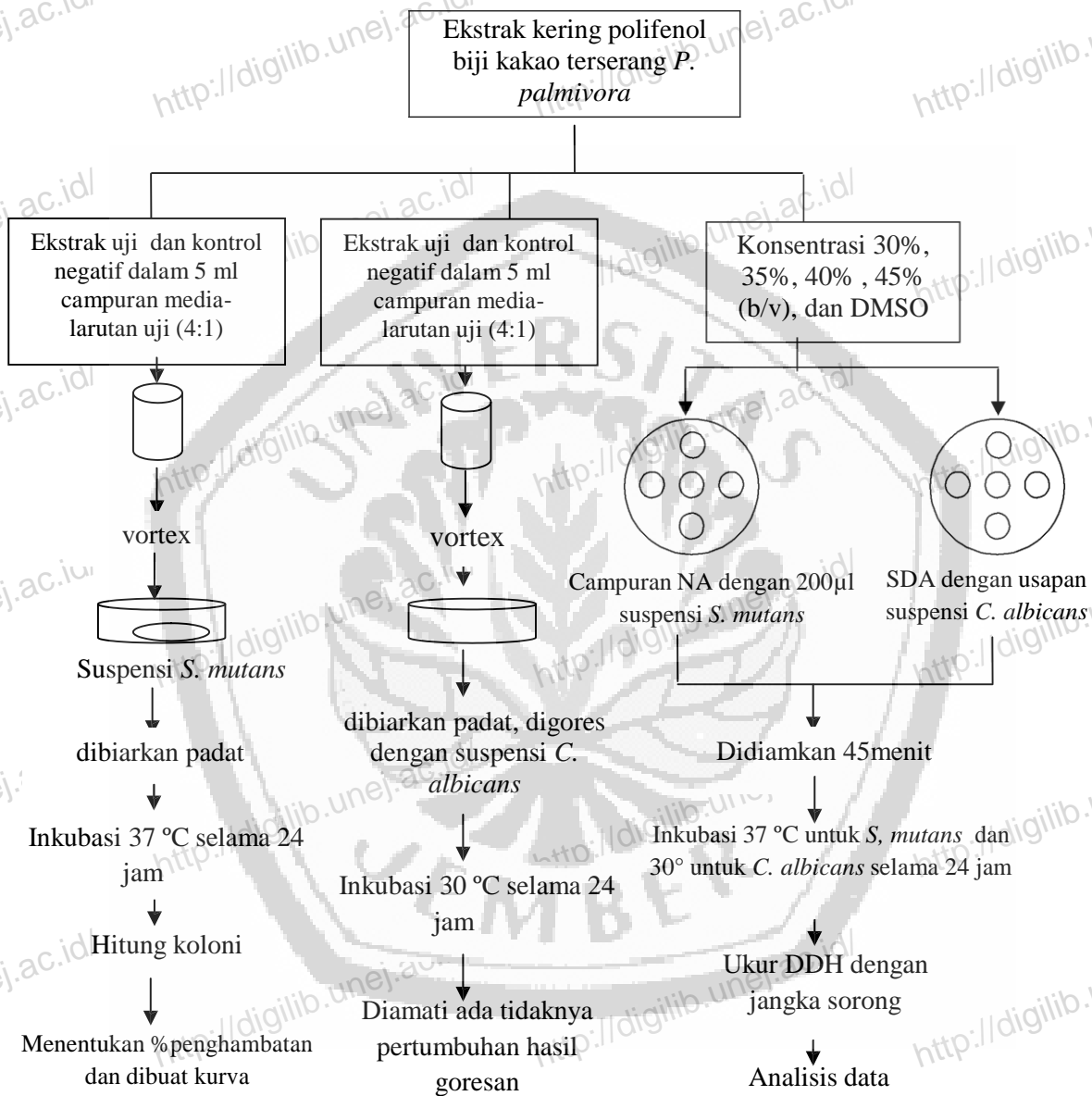
Keterangan:

- A = ekstrak polifenol
- B = zona bening / DDH (Diameter Daya Hambat)
- C = media agar
- 1 = konsentrasi uji 30%
- 2 = konsentrasi uji 35%
- 3 = konsentrasi uji 40%
- 4 = konsentrasi uji 45%
- a, b, c = pengukuran diameter sumuran + zona bening ( $d_2$ )
- $d_1$  = diameter sumuran (7 mm)
- $d_2$  = diameter sumuran + diameter rata-rata zona bening
- $d = \text{DDH (diameter daya hambat)} = d_2 - d_1$

### 3.11 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan beberapa uji analisis dalam analisis data. Pertama-tama, mencari tahu normal atau tidaknya data terdistribusi menggunakan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov kemudian melihat distribusi data yang dibandingkan memiliki kesamaan varian atau tidak menggunakan uji varians Levene's. Jika varian data yang diuji menunjukkan adanya kesamaan, maka data tersebut dapat analisis lebih lanjut dengan analisis variansi satu arah (*One Way Analysis of Variance*).

### 3.12 Skema Kerja Penelitian

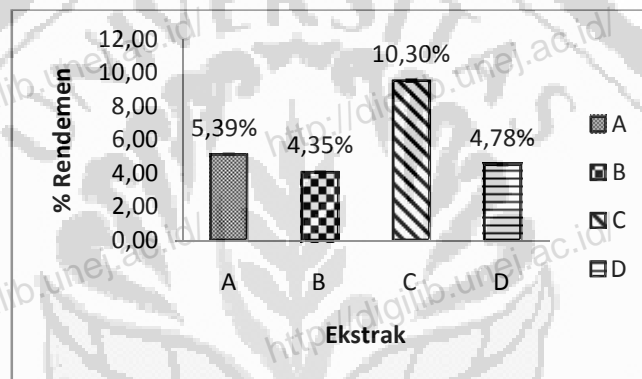


Gambar 3.5 Skema Kerja Penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Rendemen Ekstrak Biji Kakao Kaya Polifenol Terserang *Phytophthora palmivora*

Ekstrak diperoleh dari buah kakao terserang *P. palmivora* yang diambil bijinya dan dikeringkan. Biji kakao kering diberi perbedaan perlakuan *defatting* PB kemudian masing-masing diekstrak dengan dua pelarut yang berbeda yaitu etanol 70% dan air panas sehingga dihasilkan empat macam ekstrak biji kakao kaya polifenol dengan rendemen terhadap biji kering seperti pada Gambar 4.1.



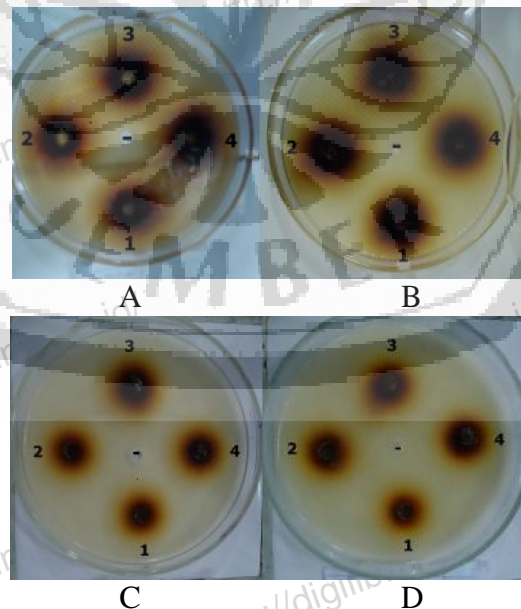
Gambar 4.1 Grafik rerata % rendemen ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* (A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

Hasil rerata rendemen empat macam ekstrak pada gambar 4.1 menunjukkan ekstrak air panas *non-defatting* PB memiliki rendemen tertinggi, sedangkan terendah pada ekstrak etanol 70% *defatting* PB. Pelarut air panas dan *non-defatting* PB dapat meningkatkan rendemen. Air sebagai pelarut ekstraksi menghasilkan ekstrak yang mengandung senyawa tidak murni seperti asam-asam organik, gula, dan protein terlarut (Arnnok *et al.*, 2012). Perlakuan *non-defatting* PB menyebabkan biji kakao masih mengandung lemak lebih banyak dibandingkan *defatting* PB sehingga lemak yang ikut terekstrak lebih banyak. Adanya senyawa tidak murni dan lemak yang ikut terekstrak tersebut berperan dalam peningkatan jumlah rendemen.

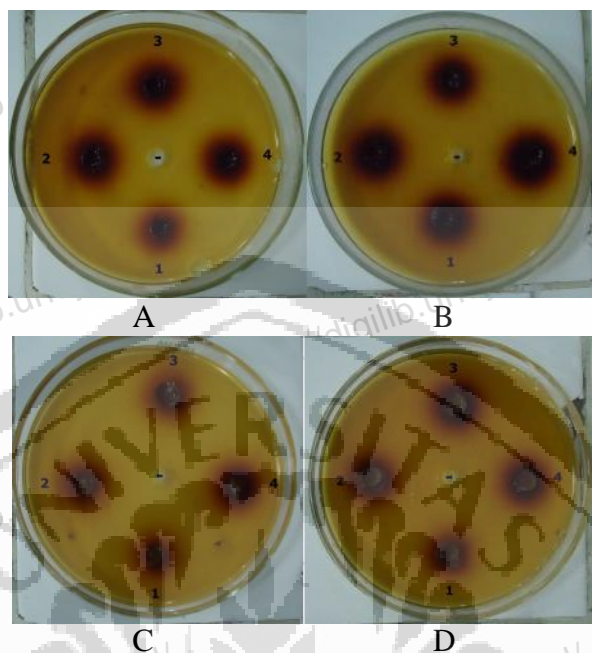
Nilai total polifenol dari keempat ekstrak telah dilakukan oleh Wahyudin (belum dipublikasikan) dengan menggunakan metode *Folin Ciocalteu*. Total polifenol dinyatakan dalam 29,51 %; 30,31 %; 23,92 %; dan 23,93 % (b/b) pada ekstrak A, B, C, dan D berturut-turut. Nilai total polifenol tersebut menunjukkan bahwa perbedaan penggunaan pelarut ekstraksi dengan perlakuan *defatting* PB tidak memberikan pengaruh besar terhadap jumlah polifenol yang terekstrak.

#### 4.2 Uji Aktivitas Antimikroba Metode Sumuran

Aktivitas antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans* dan *C. albicans* ditandai dengan munculnya zona bening disekitar sumuran yang berisi larutan uji setelah inkubasi 24 jam dalam cawan petri berisi campuran media agar dan suspensi mikroba. Hasil uji aktivitas antimikroba dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan 4.3. Kekuatan aktivitas antimikroba sampel uji berdasarkan pada besar Diameter Daya Hambat (DDH) hasil pengujian yang ditampilkan pada Tabel 4.1 dan 4.2



Gambar 4.2 Hasil uji aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* metode sumuran (A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB



Gambar 4.3 Hasil uji aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* metode sumuran  
 (A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB,  
 (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

Keterangan:

- : Kontrol negatif (DMSO 2%)

1,2,3,4: Larutan uji konsentrasi 30%, 35%, 40%, 45%

Tabel 4.1 Data DDH ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans*

Ekstrak	30%	35%	40%	45%	Negatif
A	7,80±1,07	9,10±0,88	9,98±0,89	11,11±0,94	-
B	9,80±0,55	10,59±0,97	10,35±0,97	11,58±0,57	-
C	2,81±0,65	3,68±0,35	4,20±0,61	4,71±0,46	-
D	4,29±1,09	4,96±0,75	5,75±0,55	7,04±0,68	-

Keterangan :

(A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

Kontrol Negatif = DMSO 2%

Tabel 4.2 Data DDH ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *C. albicans*

Ekstrak	30%	35%	40%	45%	Negatif
A	3,59±0,29	4,43±0,33	5,02±0,57	5,37±0,40	-
B	4,45±0,23	5,25±0,40	5,96±0,13	6,58±0,39	-
C	3,15±0,27	4,01±0,14	4,54±0,19	4,94±0,37	-
D	3,24±0,16	4,19±0,43	4,67±0,26	5,02±0,35	-

Keterangan :

(A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB; Kontrol Negatif = DMSO 2%

Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* berupa data nilai DDH (Tabel 4.1 dan 4.2) menunjukkan bahwa empat macam ekstrak yang diujikan memiliki aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* dan *C. albicans*. Masing-masing konsentrasi uji memberikan nilai DDH yang berbeda terhadap dua mikroba uji. Tiga dari empat ekstrak, yaitu ekstrak A, B, dan D memberikan aktivitas penghambatan pertumbuhan *S. mutans* lebih tinggi dibandingkan terhadap *C. albicans* dengan konsentrasi yang sama berupa DDH yang lebih besar pada penghambatan *S. mutans*. Aktivitas penghambatan berbeda karena *S. mutans* merupakan sel prokariotik sedangkan *C. albicans* sel eukariotik dimana struktur dinding selnya berbeda (Pratiwi, 2008). Polifenol dapat bereaksi dengan membran protein, enzim, dan lemak (Ferrazzano, 2011) sehingga lebih efektif terhadap *S. mutans* yang memiliki struktur dinding terdiri dari peptidoglikan, protein, dan fosfolipid (Pratiwi, 2008) dibandingkan *C. albicans* yang memiliki dinding sel terdiri mannan, glukukan, dan kitin (Grubb *et al.*, 2008).

Pengaruh peningkatan konsentrasi juga dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan 4.2 dimana peningkatan konsentrasi dapat memberikan peningkatan aktivitas antimikroba yang dilihat dari peningkatan nilai DDH, akan tetapi ada penyimpangan salah satu data ekstrak B terhadap *S. mutans* konsentrasi 40% yang lebih rendah dibandingkan 35% yang tidak berbeda nyata. Pengaruh peningkatan konsentrasi larutan uji empat macam ekstrak terhadap nilai DDH dianalisis lebih lanjut menggunakan uji statistik

parametrik Anova satu arah. Seluruh data hasil analisis Anova telah dicantumkan dalam lampiran (Lampiran D) yang terangkum dalam Tabel 4.3.

Hasil uji Anova peningkatan konsentrasi dengan nilai DDH dinyatakan dengan huruf a, b, c, dan d pada ekstrak yang sama dengan konsentrasi berbeda. Uji Anova satu arah juga dilakukan untuk mengetahui hubungan antara perbedaan pelarut dan perlakuan *defatting* PB terhadap aktivitas antimikroba. Hasil uji Anova dinyatakan dengan angka 1, 2, 3, dan 4 pada ekstrak berbeda dalam konsentrasi yang sama.

Hasil uji normalitas data aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* dan *C. albicans* (lampiran D) menunjukkan nilai signifikansi keempat ekstrak dengan empat konsentrasi  $> 0,05$ . Hal ini menunjukkan data memenuhi persyaratan normalitas dimana data terdistribusi normal. Hasil uji *Levene statistic* keempat ekstrak juga memenuhi persyaratan yaitu memiliki nilai signifikansi  $> 0,05$  yang menunjukkan bahwa varian data homogen.

Peningkatan konsentrasi 35 % dan 40 % (b/v) pada ekstrak A tidak berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 95% terhadap aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* tetapi tidak nyata pada konsentrasi 30% dan 45% (b/v). Peningkatan konsentrasi 30%, 35%, dan 40% (b/v) tidak berbeda nyata pada ekstrak B dan D tetapi berbeda nyata pada konsentrasi 45% b/v. Ekstrak C menunjukkan peningkatan konsentrasi 30%, 40%, dan 45% (b/v) tidak berbeda nyata tetapi perbedaan nyata ditunjukkan pada konsentrasi 30% b/v. Aktivitas antimikroba ekstrak B dan C menunjukkan peningkatan pada konsentrasi 30%, 35%, 40%, dan 45% (b/v) serta konsentrasi 30%, 35%, dan 40% (b/v) pada ekstrak A dan D berbeda nyata terhadap penghambatan pertumbuhan *C. albicans*. Perbedaan tidak nyata didapat pada konsentrasi 45% pada ekstrak A dan D.

Tabel 4.3 Hasil uji Anova satu arah aktivitas antimikroba ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* terhadap *S. mutans* dan *C. albicans*

Ekstrak	Konsentrasi	Rerata DDH <i>S. mutans</i>	Rerata DDH <i>C. albicans</i>
A	Kontrol negatif	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
	30%	7,80±1,07 <sup>b,1</sup>	3,59±0,23 <sup>b,1</sup>
	35%	9,10±0,88 <sup>c,1</sup>	4,43±0,4 <sup>c,1</sup>
	40%	9,98±0,89 <sup>c,1</sup>	5,02±0,13 <sup>d,1</sup>
	45%	11,11±0,94 <sup>d,1</sup>	5,37±0,39 <sup>d,1</sup>
B	Kontrol negatif	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
	30%	9,80±0,55 <sup>b,2</sup>	4,45±0,27 <sup>b,1</sup>
	35%	10,59±0,97 <sup>b,2</sup>	5,25±0,14 <sup>c,2</sup>
	40%	10,35±0,97 <sup>b,1</sup>	5,96±0,19 <sup>d,1</sup>
	45%	11,58±0,57 <sup>c,1</sup>	6,58±0,37 <sup>e,2</sup>
C	Kontrol negatif	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
	30%	2,81±0,65 <sup>b,3</sup>	3,15±0,27 <sup>b,2</sup>
	35%	3,68±0,35 <sup>c,3</sup>	4,01±0,14 <sup>c,1</sup>
	40%	4,20±0,61 <sup>c,2</sup>	4,54±0,19 <sup>d,2</sup>
	45%	4,71±0,46 <sup>c,2</sup>	4,94±0,37 <sup>e,1</sup>
D	Kontrol negatif	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>
	30%	4,29±1,09 <sup>b,4</sup>	3,24±0,16 <sup>b,3</sup>
	35%	4,96±0,75 <sup>b,4</sup>	4,19±0,43 <sup>c,1</sup>
	40%	5,75±0,55 <sup>b,3</sup>	4,67±0,26 <sup>d,3</sup>
	45%	7,04±0,68 <sup>c,3</sup>	5,02±0,35 <sup>d,1</sup>

Keterangan :

(A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

huruf kecil yang sama dalam satu kolom (ekstrak yang sama) menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%. Angka pada baris konsentrasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

a-d : hasil uji Anova pada ekstrak yang sama tetapi beda konsentrasi

1-4 : hasil uji Anova pada konsentrasi yang sama tetapi beda ekstrak

Pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* yang tidak nyata terhadap aktivitas antimikroba lebih banyak dilihat pada uji aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* dibandingkan *C. albicans*. Pengaruh peningkatan konsentrasi yang tidak beda nyata dengan aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* menunjukkan bahwa konsentrasi larutan uji yang



digunakan merupakan konsentrasi yang sudah memberikan aktivitas antimikroba kuat sehingga peningkatan konsentrasi tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* yang berbeda nyata dengan peningkatan konsentrasi menunjukkan bahwa konsentrasi larutan uji yang digunakan masih memberikan kekuatan aktivitas antimikroba lemah sehingga peningkatan konsentrasi dapat meningkatkan aktivitas secara signifikan.

Perbedaan perlakuan *defatting* dan perbedaan pelarut ekstraksi juga dianalisis dengan uji statistik Anova satu arah (Lampiran D3 dan D4). Uji statistik ini bertujuan untuk mengetahui apakah perlakuan *defatting* dan perbedaan pelarut ekstraksi memberikan perbedaan yang nyata atau tidak. Hasil uji statistik dirangkum dalam Tabel 4.3 yang dinyatakan dalam angka 1, 2, 3, dan 4 berdasarkan perbedaan jenis ekstrak pada setiap konsentrasi yang sama.

Hasil uji Anova pada Tabel 4.3 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans* berbeda nyata akibat perbedaan pelarut pada semua konsentrasi dan berbeda nyata akibat perbedaan *defatting* pada konsentrasi 30% dan 35% tetapi tidak nyata pada konsentrasi 40% dan 45% pada ekstrak A dan B. Hasil uji Anova tersebut menunjukkan bahwa perbedaan pelarut lebih memberikan perbedaan nyata dibandingkan perlakuan *defatting* PB dalam aktivitas antimikroba ekstrak. Hal tersebut dapat diakibatkan kurang maksimalnya proses *defatting* akibat kurangnya lama waktu perendaman serta ukuran partikel biji kakao yang terlalu besar pada proses perendaman PB.

Total polifenol keempat ekstrak tidak berbeda nyata tetapi aktivitas antimikroba menunjukkan pengaruh yang nyata akibat perbedaan pelarut pada semua konsentrasi dan perlakuan *defatting* PB pada konsentrasi 30% dan 35% (b/v). Perbedaan nilai total polifenol dengan aktivitas antimikroba ekstrak dengan pelarut berbeda dapat disebabkan perbedaan komponen terlarut pada setiap ekstrak dimana pelarut air panas dapat melarutkan senyawa lain seperti asam-asam organik, gula, dan protein (Arnnok *et al.*, 2012) yang memiliki ukuran molekul lebih besar sehingga dapat mengganggu proses difusi senyawa aktif polifenol ke dalam sel mikroba.

Perbandingan nilai total polifenol yang berbeda dengan aktivitas antimikroba ekstrak dengan perbedaan perlakuan *defatting* PB dapat disebabkan kandungan lemak yang lebih banyak pada biji kakao *non-defatting* menyebabkan jumlah lemak yang ikut terekstrak jadi lebih banyak. Adanya lemak dalam ekstrak dapat menghalangi polifenol masuk dalam sel bakteri sehingga dapat menurunkan aktivitas antimikroba (Kanazawa *et al.* dalam Nurcahyanti *et al.*, 2011).

Faktor lain yang dapat menyebabkan perbedaan perbandingan nilai total polifenol keempat ekstrak dengan aktivitas antimikrobanya masing-masing yaitu adanya senyawa terekstrak lain dalam biji kakao terserang *P. palmivora* yang juga memiliki aktivitas antimikroba. Adanya senyawa terekstrak lain selain polifenol dapat dilihat dari nilai rerata rendemen yang berbeda-beda tiap ekstrak.

Komponen lain yang terdapat dalam biji kakao yaitu lemak dan protein dengan jumlah besar dalam kotiledon biji kakao (Voigt *et al.*, 1993). Beberapa protein tanaman memiliki aktivitas antimikroba (Candido *et al.*, 2011). Protein yang terdapat dalam biji kakao yaitu albumin dan globulin (Voigt *et al.*, 1993) dimana keduanya memiliki sifat antimikroba. Albumin larut dalam air, sedangkan globulin larut dalam garam sehingga protein albumin merupakan senyawa yang dapat ikut terekstrak dan memberikan pengaruh pada aktivitas antimikroba keempat ekstrak dari biji kakao terserang *P. palmivora*.

Perbedaan pelarut memberikan beda nyata terhadap aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 30% dan 40 %, tetapi tidak nyata pada konsentrasi 35% dan 45% yaitu ekstrak A dengan ekstrak C dan D. Ekstrak A dan B menunjukkan perbedaan bermakna pada perlakuan “defatting” pada konsentrasi 30%, 35%, dan 45% tetapi tidak bermakna pada konsentrasi 40%. Ekstrak C dan D menunjukkan perbedaan bermakna pada perlakuan “defatting” hanya pada konsentrasi 40%, tetapi tidak bermakna pada konsentrasi 30%, 35%, dan 45%. Hasil uji Anova yang bervariasi pada uji aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* disebabkan rentang perbedaan konsentrasi yang kurang besar karena nilai DDH pada tiap konsentrasi uji tidak berbeda nyata.

#### 4.3 Uji Penentuan IC<sub>50</sub> dan KHM (Konsentrasi Hambat Minimal) terhadap *S. mutans* dan Penentuan KHM untuk *C. albicans*

Metode sumuran yang digunakan dalam pengujian aktivitas antimikroba tidak dapat menentukan nilai KHM dan IC<sub>50</sub> dari ekstrak uji sehingga dibutuhkan metode lain untuk menentukan KHM dan IC<sub>50</sub> dari tiap ekstrak. Pengujian terhadap *S. mutans* dilakukan dengan dilusi agar yaitu penumbuhan koloni pada media agar yang telah dicampur dengan larutan uji sehingga pengamatan berdasarkan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh setelah masa inkubasi 24 jam. Data dilusi agar-hitung koloni dapat digunakan untuk menentukan KHM dan IC<sub>50</sub>. Pengujian untuk *C. albicans* dilakukan dengan dilusi agar tetapi dengan cara gores. Kultur *C. albicans* digores di atas campuran media dan larutan uji yang telah memadat. Pengamatan dilakukan berdasarkan tumbuh atau tidaknya goresan, sehingga data yang didapat hanya sebatas KHM dan tidak bisa menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Perbedaan metode yang digunakan untuk *S. mutans* dan *C. albicans* dikarenakan *C. albicans* sukar untuk ditumbuhkan per koloni. Pengamatan koloni *S. mutans* yang tumbuh pada tiap-tiap cawan petri dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Larutan uji yang digunakan dalam uji penentuan IC<sub>50</sub> dan KHM terdiri dari 4 konsentrasi larutan uji dan kontrol (0% ekstrak). Peningkatan konsentrasi larutan uji dapat mengakibatkan penurunan jumlah koloni. Koloni pada tiap-tiap cawan petri dihitung dan dirangkum pada Tabel 4.4. Data penurunan jumlah koloni pada peningkatan konsentrasi dapat dinyatakan dalam % penghambatan *S. mutans*.

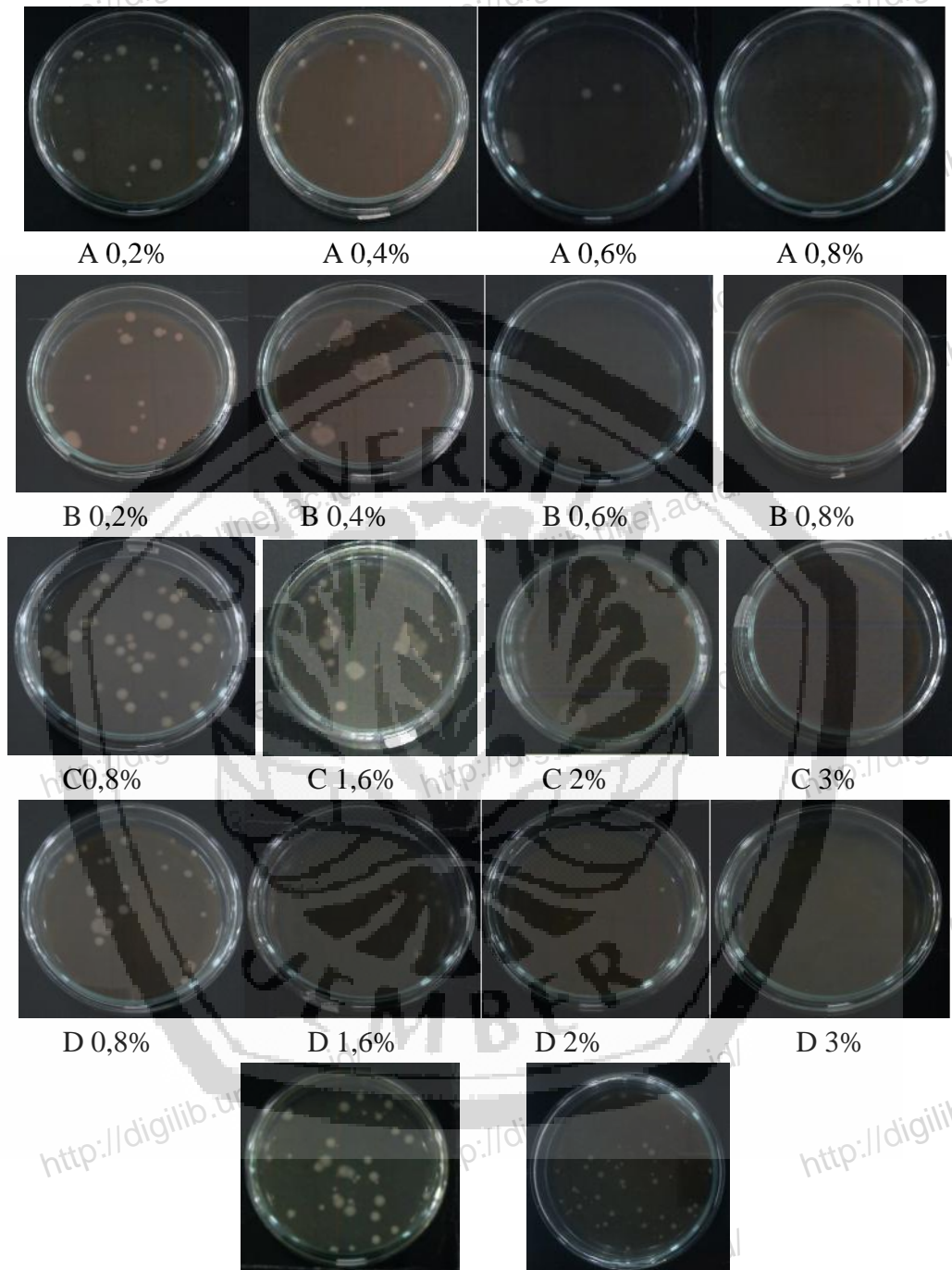
Nilai KHM dinyatakan oleh konsentrasi uji dengan dengan % penghambatan 100% atau konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan *S. mutans* dengan pertumbuhan 0 koloni. Data % penghambatan dari masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Data jumlah koloni dan % penghambatan terhadap pertumbuhan *S. mutans*

Ekstrak	Konsentrasi	Rerata Jumlah Koloni ( $\pm$ SD)	% penghambatan terhadap <i>S. mutans</i> (%)
A	0,0%	160	0
	0,2%	93 $\pm$ 23,61	41,88
	0,4%	29 $\pm$ 8,22	81,88
	0,6%	13 $\pm$ 8,37	91,88
	0,8%	0	100
B	0,0%	160	0
	0,2%	66 $\pm$ 16,73	58,75
	0,4%	42 $\pm$ 4,47	73,75
	0,6%	5 $\pm$ 3,54	96,875
	0,8%	0	100
C	0,0%	210	0,00
	0,8%	118 $\pm$ 23,08	43,81
	1,6%	69 $\pm$ 18,51	67,14
	2,0%	19 $\pm$ 4,18	90,95
	3,0%	0	100
D	0,0%	210	0,00
	0,8%	110 $\pm$ 15,41	47,62
	1,6%	21 $\pm$ 4,18	90,00
	2,0%	10 $\pm$ 5	95,24
	3,0%	0	100

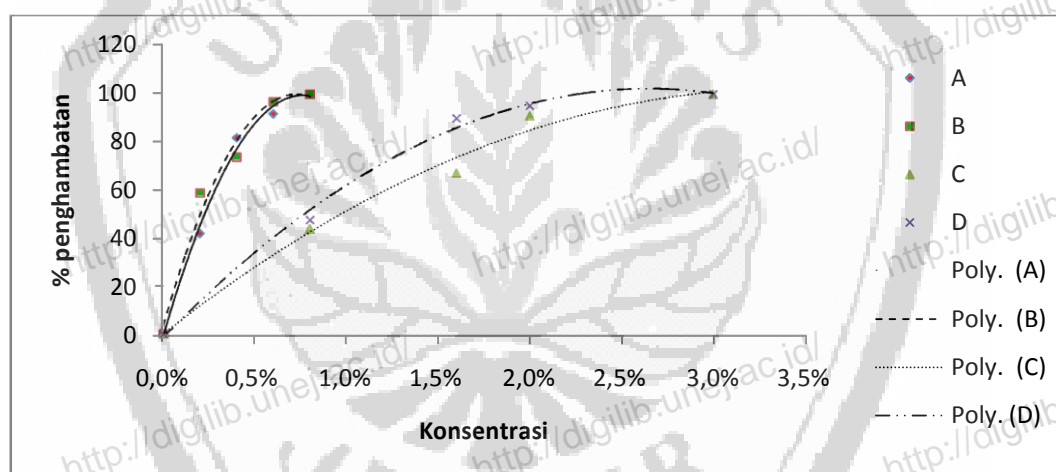
Keterangan :

(A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB



- (untuk ekstrak etanol 70%)      - (untuk ekstrak air panas)  
 Gambar 4.4 Hasil pengamatan uji penentuan KHM dan  $IC_{50}$  terhadap *S. mutans*  
 (A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB,  
 (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB  
 - : Kontrol negatif (DMSO 2%)

Nilai  $IC_{50}$  ditentukan dari persamaan garis polinomial kurva antara konsentrasi dengan % penghambatan. Kurva hubungan antara konsentrasi dengan % penghambatan dapat dilihat pada Gambar 4.4. Data yang diperoleh dari uji dilusi agar-hitung koloni yaitu jumlah koloni CFU per ml ( $10^4$ ) *S. mutans* pada tiap-tiap konsentrasi seperti yang telah tertera pada Tabel 4.4. Nilai KHM dapat dilihat langsung dari data Tabel 4.4 yaitu konsentrasi yang sudah tidak ada koloni *S. mutans* yang tumbuh, sedangkan untuk menentukan  $IC_{50}$  tiap ekstrak diperlukan suatu persamaan garis polinomial yang didapat dari grafik konsentrasi (sumbu x) dengan % penghambatan (sumbu y).



Gambar 4.5 Kurva konsentrasi larutan uji dengan % penghambatan terhadap *S. mutans*, (A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

Konsentrasi larutan uji yang digunakan untuk ekstrak A dan B antara lain 0,2%, 0,4%, 0,6%, dan 0,8% (b/v) sedangkan untuk ekstrak C dan D antara lain 0,8%, 1,6%, 2%, dan 3% (b/v) untuk *S. mutans*. Perbedaan pengaruh keempat ekstrak terhadap nilai  $IC_{50}$  dianalisis dengan uji Anova. Persamaan garis, nilai  $IC_{50}$ , nilai KHM *S. mutans*, dan hasil uji Anova dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Nilai KHM dan IC<sub>50</sub> *S. mutans*

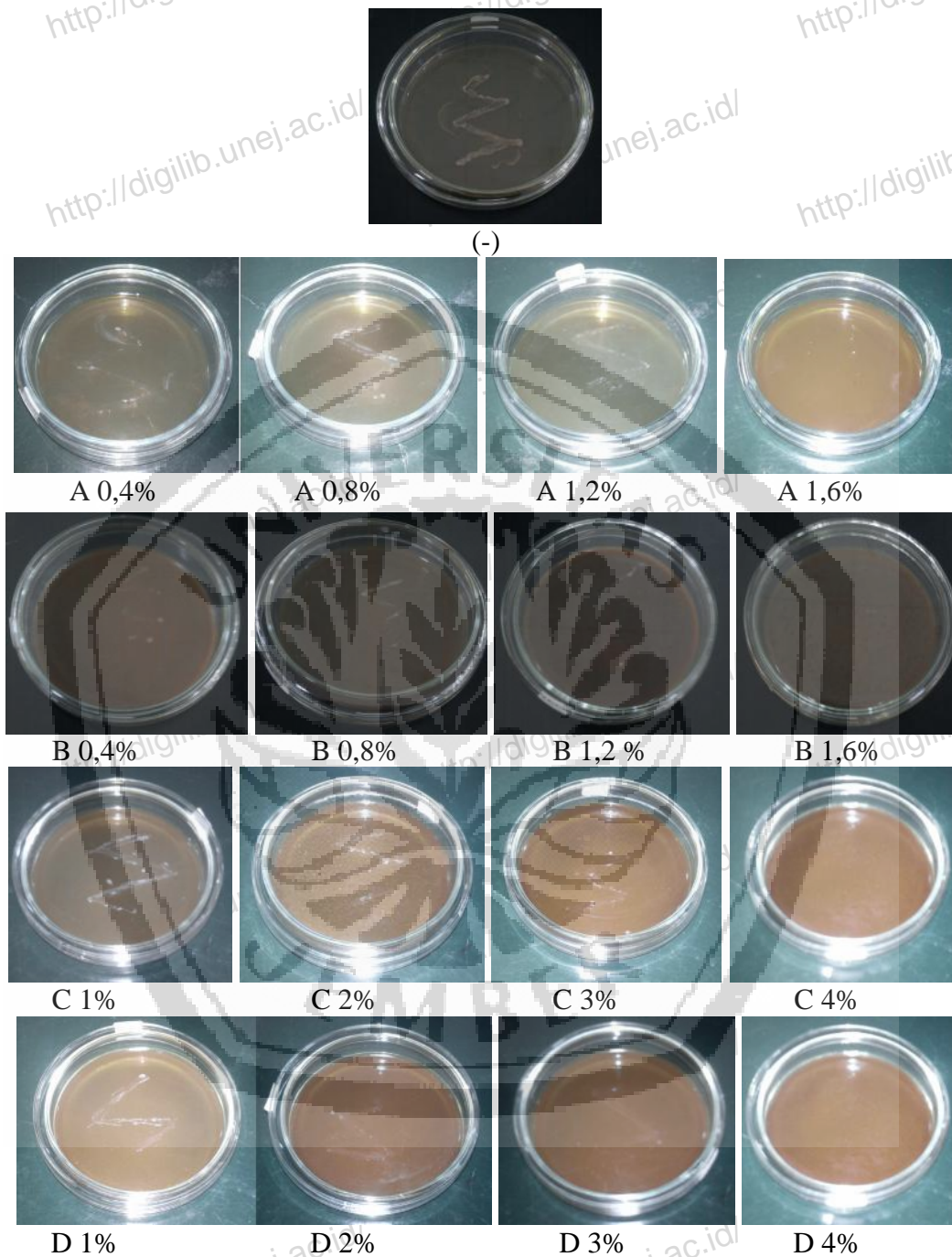
Ekstrak	Persamaan	R	IC <sub>50</sub>	KHM
A	$y = -2E+06x^2 + 26429x - 0,8036$	0,9967	0,23% <sup>a</sup>	0,80%
B	$y = -2E+06x^2 + 26638x + 3,5179$	0,9887	0,21% <sup>a</sup>	0,80%
C	$y = -88207x^2 + 6010,8x + 0,0001$	0,9937	0,97% <sup>b</sup>	3%
D	$y = -147811x^2 + 7831,6x - 1,4451$	0,9976	0,77% <sup>c</sup>	3%

Keterangan :

(A)ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB  
huruf kecil yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%

Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak A, B, C, dan D dinyatakan dalam 2,3; 2,1; 9,7; dan 7,7 (mg/ml) secara berturutan. Semakin rendah nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan semakin baik aktivitas antimikrobanya, sehingga sesuai dengan uji aktivitas antimikroba dengan metode sumuran bahwa urutan ekstrak dari paling baik ke lemah sebagai antimikroba terhadap *S. mutans* yaitu ekstrak B, A, D, dan C. Hasil uji Anova satu arah menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan *defatting* pada ekstrak 70% tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai IC<sub>50</sub> *S. mutans*, tetapi perbedaan pelarut ekstraksi dan perlakuan *defatting* pada ekstrak air panas memberikan pengaruh yang nyata terhadap nilai IC<sub>50</sub> *S. mutans*.

Metode yang digunakan untuk menentukan KHM *C. albicans* yaitu difusi agar dengan sistem gores. Metode ini dilakukan dengan mencampur media agar dan ekstrak berbagai konsentrasi kemudian dimasukkan dalam cawan petri dan didiamkan hingga memadat. Suspensi *C. albicans* digores diatas campuran media agar dan ekstrak yang telah padat. Metode ini hanya dapat menentukan nilai KHM dan tidak dapat menentukan nilai IC<sub>50</sub>. KHM dinyatakan oleh konsentrasi yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *C. albicans* hasil goresan. Hasil pengamatan uji ini dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Hasil pengamatan uji penentuan KHM terhadap *C. albicans*

(A) ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB,  
 (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB



Nilai KHM *C. albicans* merupakan konsentrasi minimal yang mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans* yaitu ditandai dengan tidak tumbuhnya hasil goresan. Data hasil pengamatan uji penentuan KHM *C. albicans* dicantumkan dalam Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil pengujian KHM terhadap *C. albicans*

Ekstrak	Ada tidaknya pertumbuhan <i>C. albicans</i> tiap konsentrasi								Kontrol Negatif
	0,4%	0,8%	1,0%	1,2%	1,6%	2,0%	3,0%	4,0%	
A	+	+	TD	+	-	TD	TD	TD	+
B	+	+	TD	+	-	TD	TD	TD	+
C	TD	TD	+	TD	TD	+	+	-	+
D	TD	TD	+	TD	TD	+	+	-	+

Keterangan :

(A)ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

TD :Tidak Dilakukan

+ : ada pertumbuhan *C. albicans*

- : tidak ada pertumbuhan *C. albicans*

Konsentrasi larutan uji yang digunakan untuk uji terhadap *C. albicans* yaitu 0,4%, 0,8%, 1,2%, dan 1,6% (b/v) untuk ekstrak A dan B sedangkan untuk ekstrak C dan D antara lain 1%, 2%, 3%, dan 4% (b/v). Data pada tabel 4.6 menunjukkan bahwa pada ekstrak A dan B konsentrasi 1,6% b/v sudah tidak ada pertumbuhan sedangkan pada ekstrak C dan D *C. albicans* tidak tumbuh pada konsentrasi 4% b/v. Hal tersebut menunjukkan nilai KHM ekstrak A dan B yaitu 16 mg/ml sedangkan nilai KHM ekstrak C dan D yaitu 40 mg/ml.

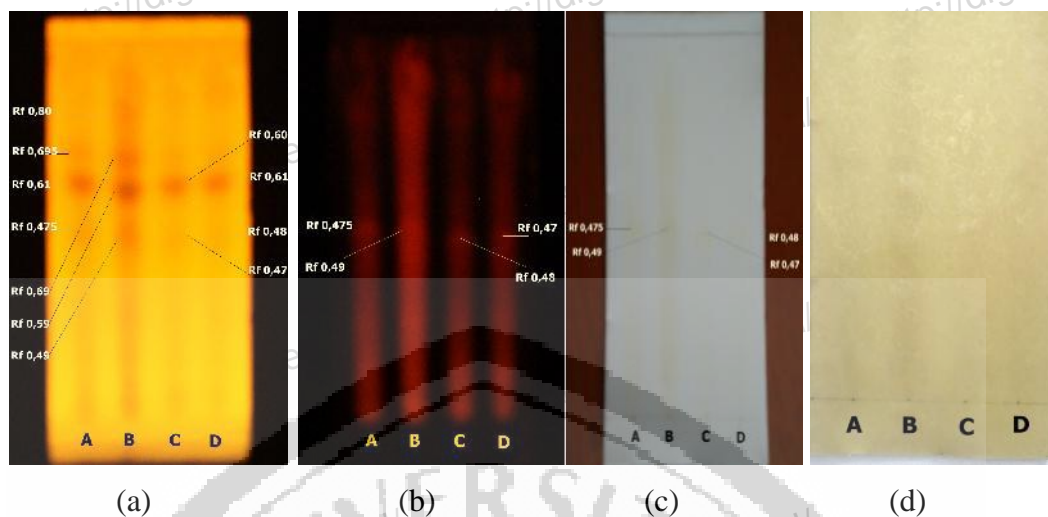
Usaha peningkatan nilai agribisnis kakao mutu rendah akibat serangan *P. palmivora* dapat dilakukan dengan memanfaatkan ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* untuk pembuatan sediaan farmasi. Hasil penelitian nilai KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* dan KHM terhadap *C. albicans* dari ekstrak biji kakao terserang *P. palmivora* ini dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan dosis sediaan farmasi untuk antiseptik mulut seperti obat kumur. Ekstrak dengan KHM dan IC<sub>50</sub> terbaik dari keempat ekstrak yang diujikan yaitu ekstrak etanol 70% *defatting* PB. Ekstraksi dalam skala industri diharapkan menggunakan pelarut yang ramah

lingkungan dan ekonomis. Penggunaan pelarut air panas bertekanan dalam ekstraksi bahan alam dapat mengurangi biaya produksi dan aman untuk uji lebih lanjut, proses pembuatan, dan konsumsi manusia (Teo *et al.*, 2010). Proses *defatting* yang dapat meningkatkan aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa ekstrak air panas *defatting* PB dari biji kakao terserang *P. palmivora* dapat digunakan untuk produksi antiseptik mulut skala produksi dengan meningkatkan efektivitas *defatting* dalam proses ekstraksi. Peningkatan efektivitas *defatting* dapat dilakukan dengan pengecilan ukuran partikel pada saat perendaman PB dan menambah lama waktu perendaman PB.

#### 4.4 Skrining Polifenol dan Flavonoid

Identifikasi polifenol dan flavonoid dalam ekstrak biji kakao kaya polifenol terserang *P. palmivora* menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Fase gerak yang digunakan yaitu butanol-as.asetat-air, dengan perbandingan 4:1:2,2. Noda pada lempeng KLT dilihat dibawah UV 254 dan 366 nm serta diberi penampak noda  $\text{FeCl}_3$  untuk identifikasi polifenol dan penampak noda amonia untuk identifikasi flavonoid.

Pemilihan fase gerak sesuai dengan penelitian Alemanno (2003) yaitu menggunakan fase atas dari Butanol:As.Asetat:Air dengan perbandingan 4:1:2,2. Lempeng KLT dikeringkan setelah eluasi berakhir kemudian dilihat di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm seperti pada gambar 4.7. Noda terlihat paling jelas di bawah UV 254 nm. Noda pada ekstrak A ada tiga dengan nilai  $R_f$  0,475; 0,61; dan 0,475. Ekstrak B memiliki empat noda dengan nilai  $R_f$  0,49; 0,59; 0,69; dan 0,8, sedangkan ekstrak C dan D hanya memiliki dua noda dengan nilai  $R_f$  berturut-turut 0,47 dan 0,60 untuk ekstrak C dan 0,48 dan 0,61 untuk ekstrak D.



Gambar 4.7 Hasil skrining polifenol dan flavonoid ekstrak biji kakao terserang *P. palmivora* dengan metode KLT (a) di bawah UV 254 nm (b) di bawah UV 366 nm (c) dengan penampak noda amonia (d) dengan penampak noda  $\text{FeCl}_3$

**Keterangan:**

Uji KLT flavonoid menggunakan fase gerak BuOH:As. Asetat:Air (4:1:2,2)

(A)ekstrak etanol 70% *non-defatting* PB, (B) ekstrak etanol 70% *defatting* PB, (C) ekstrak air panas *non-defatting* PB, (D) ekstrak air panas *defatting* PB

Pemberian penampak noda  $\text{FeCl}_3$  tidak menunjukkan adanya noda pada keempat ekstrak seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.7 (d), akan tetapi hanya tampak *tailing* noda berwarna kehitaman. Adanya *tailing* berarti senyawa dalam ekstrak tidak terpisah sempurna. Penampak noda amonia untuk membuktikan adanya senyawa flavonoid pada Gambar 4.7 (c) menunjukkan adanya noda pada masing-masing ekstrak walaupun tidak terlalu jelas terlihat. Keempat ekstrak hanya memiliki satu noda pada pemberian penampak noda amonia. Hasil skrining dengan metode KLT penampak noda amonia dan  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan bahwa keempat ekstrak mengandung polifenol yang beberapa bagian merupakan flavonoid. Noda yang tidak tampak dengan penampak noda amonia dan  $\text{FeCl}_3$  tetapi tampak dibawah UV 254 nm menunjukkan adanya senyawa lain selain polifenol dan flavonoid dalam keempat ekstrak. Hal tersebut memperkuat dugaan adanya senyawa lain, yaitu protein albumin, yang juga bertanggung jawab sebagai antimikroba dalam ekstrak.

Polifenol kakao memiliki mekanisme antimikroba dengan mengganggu permeabilitas membran sel. Polifenol berinteraksi dengan protein membran mikroba, enzim, dan lemak yang dapat mengganggu permeabilitas membran sel sehingga sel mikroba kehilangan proton, ion, dan makromolekul (Ferrazzano *et al.*, 2011).

Senyawa polifenol yang paling banyak terkandung dalam biji kakao yaitu proantosianidin (Hii *et al.*, 2009). Mekanisme aksi proantosianidin sebagai antimikroba adalah menyebabkan proteolisis dan inhibisi sintesis dinding sel mikroba (Kylli *et al.*, 2011).

Mekanisme aksi flavonoid beragam tergantung dari jenis senyawanya. Senyawa flavonoid yang ada pada kakao yaitu (-)-epigalokatekin dan katekin. (-)-epigalokatekin memiliki mekanisme aksi antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, sedangkan katekin mengganggu fungsi membran sel (Cushine & Lamb, 2005). Epigalokatekin-3-galat memiliki aktivitas antifungal dengan menghambat sintesis ergosterol *C. albicans* dengan mengganggu metabolisme asam folat (Navarro-Martines *et al.*, 2006).

Peptida dan protein secara umum menunjukkan mekanisme aksi yang beragam. Aktivitas perlawanan peptida dan protein tanaman terhadap fungi dan bakteri fitopatogen dengan mengganggu permeabilitas membran plasma. Albumin dapat mengganggu permeabilitas membran plasma dengan berinteraksi kuat dengan fosfolipid, menyebabkan kerusakan signifikan pada plasmalemma fungi, dan juga dapat menyebabkan modifikasi hifa fungi (Candido *et al.*, 2011).

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang telah dilakukan, kesimpulan yang dapat diambil mengacu pada rumusan masalah antara lain sebagai berikut:

- a. Perbedaan pelarut ekstraksi dan perlakuan *defatting* menyebabkan efek antimikroba yang berbeda pula. Urutan ekstrak dengan aktivitas antimikroba paling tinggi ke paling rendah yaitu ekstrak etanol 70% “defatting” PB, ekstrak etanol 70% “non-defatting” PB, ekstrak air panas “defatting” PB, dan ekstrak air panas “non-defatting” PB.
- b. Nilai IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans*, KHM terhadap *S. mutans*, dan KHM terhadap *C. albicans* ekstrak etanol 70% “non-defatting” PB yaitu 0,23%, 0,8%, dan 1,6% (b/v); ekstrak etanol 70% “defatting” PB yaitu 0,21%, 0,8%, dan 1,6% (b/v); ekstrak air panas “non-defatting” PB yaitu 0,97%, 3%, dan 4% (b/v); dan ekstrak air panas “defatting” PB yaitu 0,77%, 3%, dan 4% (b/v).

### 5.2 Saran

Saran yang bisa diberikan untuk pengembangan penelitian ini antara lain:

- a. Dilakukan skrining protein pada ekstrak biji ekstrak kaya polifenol dari biji kakao terserang *P. palmivora*
- b. Dilakukan penelitian lanjutan *in vivo*
- c. Dilakukan penelitian pembuatan sediaan farmasetik untuk kesehatan mulut seperti obat kumur dengan ekstrak kaya polifenol dari biji kakao terserang *P. palmivora*.

## DAFTAR PUSTAKA

### BUKU

Boyd, R. F. 1992. *Basic Medical Microbiology 5<sup>th</sup> Ed.* New York: Litle Brown and Company.

Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg Ed 23.* Jakarta: ECG.

Dwidjoseputro, D. 1990. *Dasar-dasar Mikrobiologi.* Jakarta: Djambatan.

Departemen Perindustrian. 2007. *Gambaran Sekilas Industri Kakao.* Jakarta: Departemen Perindustrian.

Direktorat Jenderal Perkebunan. 2012. *Peningkatan Produksi, Produktivitas, dan Mutu Tanaman Rempah dan Penyegar "Pedoman Teknis Unit fermentasi Biji Kakao (UFBK)".* Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan.

Hanafiah, K. A. 2005. *Rancangan Percobaan, Teori, dan Aplikasi.* Jakarta: Raja Grafindo Persada.

Harmawan, S. 2010. "Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L) Kering Non Fermented Terserang *Conopomorpha cramerella* Snellen dan *Phytophthora palmivora* Butler sebagai Antibakteri." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Hostettmann, K. 1991. *Methods in Plant Biochemistry.* San Diego: Academic Press.

List, P. H. & Schmidt, P. C. 1989. *Phytopharmaceutical Technology.* Florida: CRC Press..

Marsh, P. & Martin, M. V. 1999. *Oral Microbiology.* Oxford: Reed Educational and Professional Publisng Ltd.

Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Fisher, B. D. 1995. *Farmakologi: Ulasan Bergambar Edisi 2.* Jakarta: Widya Medika.

Pelczar, M dan Chan.1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid1.* Jakarta: UI Press.

Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi.* Jakarta: Erlangga.

- Rostinawati, T. 2009. "Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar." Tidak Diterbitkan. Penelitian Mandiri. Bandung: Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran.
- Setiadevi, S. 2010. "Karakterisasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao *Nonfermented* dari Berbagai Macam Metode Ekstraksi." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Siregar, T. H. S., Slamet., R., dan Laeli, N. 2003. *Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Cokelat*. Cetakan ke-13. Jakarta: PT. Penebar Swadaya,
- Sriyana, Umiyasih, U., dan Krishna, N. H. 2007. *Petunjuk Teknis Pemanfaatan Bensin Sebagai Bahan Pengganti Ekstraksi Pada Analisis Kadar Lemak*. Pasuruan: Loka Penelitian Sapi Potong.
- Sunanto, H. 1992. *Cokelat: Budidaya, Pengolahan Hasil, dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Tambunan, E. R. 2009. "Respon Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Media Tumbuh *Sub Soil* dengan Aplikasi Kompos Limbah Pertanian dan Pupuk Anorganik". Tidak Diterbitkan. Tesis. Medan: Fakultas Pertanian Pasca Sarjana Universitas Sumatra Utara.
- Wahyudin, A. Belum terbit. "Ekstraksi Zat Antimikroba (Polifenol) Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) terserang *Phytophthora palmivora* dengan Variasi Pelarut." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Zairisman, S. Z. 2006. "Potensi Imunomodulator Bubuk Kakao Bebas Lemak sebagai Produk Substandar secara *In Vitro* pada Sel Limfosit Manusia." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

## JURNAL

- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., & Ferriere, N. 2003. Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis. *Annals of Botany*. Vol. 92:613-623.

- Arnnok, P., Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techawongsterin, S., & Chanthai, S. 2012. Determination of Total Phenolic and Anthocyanin Contents in Pericarp of Hot Chilli Pepper (*Capsicum annum L.*). *International Food Research Journal*. Vol. 19 (1): 235-243.
- Candido, E. S., Pinto, M. F. S., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., Grossi-de-Sa, M. F., & Franco, O. L. 2011. Plant Storage Proteins with Antimicrobial Activity: Novel Insights into Plant Defense Mechanisms. *The FASEB Journal Article*. Vol.25.
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 26: 343-356.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. 2011. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties. *Molecules*. Vol. 16: 1486-1507.
- Fine, A. M., 2000. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. *Alternative Medicine Review*. Vol. 5(2): 144-151.
- Grubb, S. E. W., Murdoch, C., Sudbery, P. E., Saville, S. P., Lopez-Ribot, J. L., & Thornhill, M. H. 2008. Candida albicans-Endothelial Cell Interactions: a Key Step in the Pathogenesis of Systemic Candidiasis. *Infection and Immunity*. Vol. 76(10): 4370.
- Gracia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernandes-Gutierrez, A. 2010. Phenolic-Compound-Extraction System for Fruit and Vegetables Samples. *Molecules*. Vol. 15: 8813-8826.
- Hii, C.L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. 2009. Polyphenols in Cocoa (*Theobroma cacao L.*). *Research Article. Asian Journal of Food and Agro-Industry*. Vol. 2 (4): 702-722.
- Koppula, S., Ammani, K., & Bobbarala, V. 2010. In Vitro Screening of Nine Indian Medicinal Plant Species Against Selected Clinical Pathogens. *Research Article. Journal of Pharmacy Research*. Vol. 3 (1): 166-168.
- Kylli, P., Nohynek, L., Puupponen-Pimia, R., Westerlund-Wikstrom, B., Leppanen, T., Welling, J. Moilanen, E., & Heinonen, M. 2011. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European Cranberry (*Vaccinium microcarpon*) Proanthocyanidins: Isolation, Identification, and Bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol (59): 3373-3384



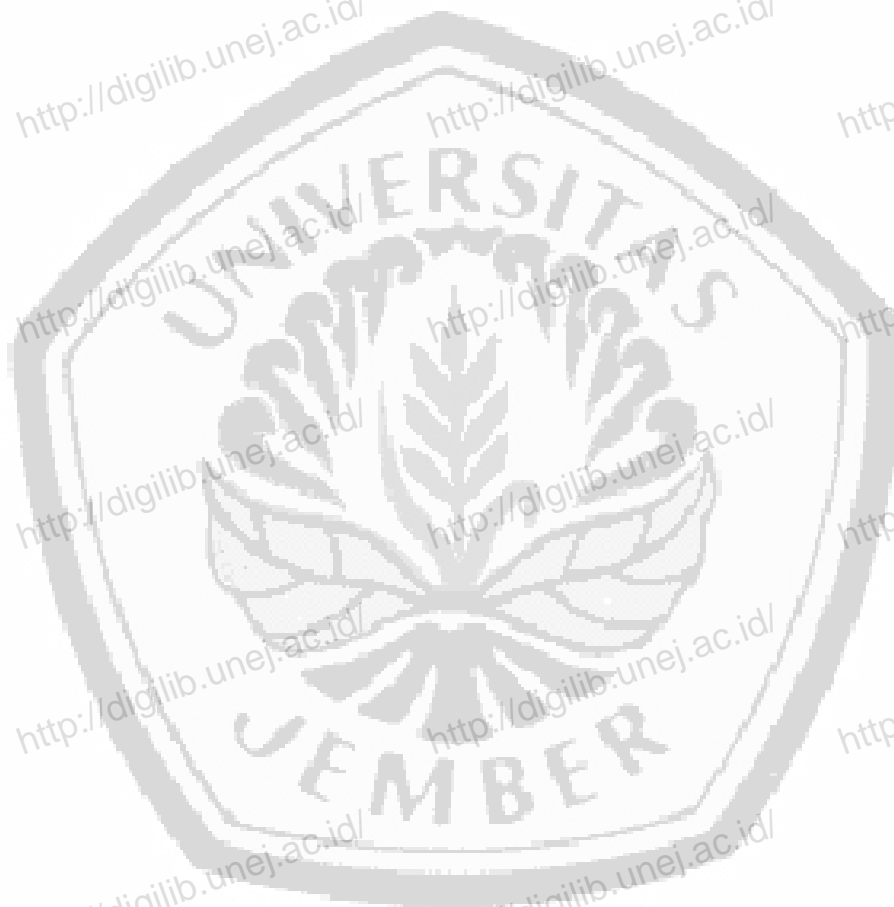
- Martini, M. H., Lenci, C. G., Figuera, A., Tavares, D. D. Q. 2008. Localization of The Cotyledon Reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L.. *International Revista Brasil Bot.* Vol. 31: 147-154.
- Misnawi, Jinap, S., Jamilah, B., & Nazamid, S. 2003. Effect of Cocoa Liquor Roasting on Polyphenol Content, Hydrophobicity Astringency. *ASEAN Food Journal.* Vol. 12 (2): 103-113.
- Misnawi. 2005. Peranan Pengolahan terhadap Pembentukan Cita Rasa Cokelat. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.* Vol. 21 (3): 136-144.
- Motulo, H. F. J., Sinaga, M. S., Hartana, A., Suastika, G., dan Aswidinnoor, Hajrial. 2007. Karakter Morfologi dan Molekuler Isolat *Phytophthora palmivora* Asal Kelapa dan Kakao. Vol. 13 (3): 111-118.
- Nam-Young, K., Min-Kyung, J., Dong-Geun, L., Ki, H. Y., HyeJi, J., Mihyang, K., Sung, G. K., Byung, H. Y., & Sang-Hyeon, L. 2010. Comparison of Methods for Proanthocyanidin Extraction from Pine (*Pinus densiflora*) Needles and Biological Activities of The Extracts. *Nutrition Research and Practice.* Vol. 4 (1): 16-22.
- Navarro-Martinez, M. D., Garcia-Canovas, F., & Rodrigues-Lopez, J. N. 2006. Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Ergosterol Synthesis by Disturbing Folic Acid Metabolism in *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Vol. 57: 1083-1092.
- Naczki, M. & Shahidi, F. 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography A.* Vol. 57: 1083-1092.
- Nurchayanti, A. D. R., Dewi, L., dan Timotius, K.H. 2011. Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Polar dan Non Polar Biji Selasih (*Ocimum sanctum* Linn). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan.* Vol. 22 (1).
- Okoro, I. O., Osagie, A., & Asibor E. O. 2010. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Polyphenols from Ethnomedicinal Plants of Nigeria. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 9 (20): 2989-2993.
- Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmadji, S., dan Kuswanto, K. R. 2007. Kandungan Fenol dan Sifat Antibakteri dari Berbagai Jenis Ekstrak Produk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Majalah Farmasi Indonesia.* Vol. 18(3): 141-146.

- Prawoto, A. A. dan Sulistyowati. 1991. Sifat-sifat Fisiko-Kimia Lemak Kakao dan Faktor-faktor yang Berpengaruh. *Pusat Penelitian Perkebunan Jember*. Vol. 7 (2).
- Rosniati. 2010. Pengaruh Jenis Kemasan dan Lama Penyimpanan terhadap Mutu Bubuk Kakao. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*. Vol. 5 (1).
- Rusconi, M. & Conti, A. 2010. *Theobroma cacao L.*, The Foods of Gods: A Scientific Approach Beyond Myths and Claims. *Pharmacological Research*. Vol. 61 (2010): 5-13.
- Sabir, A. 2005. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona sp* Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). *Journal of Dentistry* . Vol. 38: 135-141.
- Sulistyowati, E., Yohanes, D., Junianto, Sri-Sukanto, Wiryadiputra, S., Winarto, L., dan Primawati, N. 2003. *Analisis Status Penelitian dan Pengembangan PHT pada Pertanaman Kakao*. Risalah Simposium Nasional Penelitian PHT Perkebunan Rakyat Bogor.
- Sunarintyas, S., Siswomiharjo, W., dan Maryanti, N. 2008. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Air dan Etanol Kulit Batang *Azadirachta indica* terhadap Penghambatan Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *M. I. Kedokteran Gigi*. Vol. 23 (4).
- Sutton, S. 2011. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology*. Vol. 17.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., Ong, E. 2010. Pressurized Hot Water Extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*. Vol. 1217: 2484-2494.
- Tsao, R., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, Vol. 2:1231-1246.
- Voigt, J., Biehl, B., & Wazir, S. K. S. 2008. The Major Seed Protein of *Theobroma cacao L.* *Food Chemistry*. Vol. 47: 145-151.
- Widyatomo, S., Sri-Mulato, dan Suharyanto, E. 2004. Pemecahan Buah dan Pemisahan Biji Kakao secara Mekanis. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. Vol. 20 (3): 138-143.

**WEBSITE**

NCBI. 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=857155&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin:s> (16 Januari 2013)

United States Department of Agriculture. 2013. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=THCA> (16 Januari 2013)



## LAMPIRAN

### A. Rendemen Ekstrak Biji Kakao Kaya Polifenol Terserang *P. palmivora*

Ekstrak	Berat Biji Kering Kakao (g)	Ekstrak Kering (g)	% Rendemen (% b/b)
A	258	6,09	2,36
	200	17,15	8,58
	150	7,86	5,24
Rata-rata	202,67	10,367	5,39
SD	54,05	5,94	3,11
B	278	6,65	2,39
	256	12,28	4,80
	150	8,79	5,86
Rata-rata	228	9,24	4,35
SD	68,44	2,84	1,78
C	257	10,52	4,09
	200	28,2	14,10
	150	19,05	12,70
Rata-rata	202,33	19,2567	10,30
SD	53,54	8,84	5,42
D	250	7,75	3,10
	227	10,61	4,67
	150	9,85	6,57
Rata-rata	209	9,4	4,78
SD	52,37	1,48	1,74

### B. Pembuatan Larutan Uji (asumsi BJ ekstrak = 1 g/ml)

#### B.1 Larutan Uji Untuk Pengujian Aktivitas Antimikroba (Metode Sumuran)

a. Konsentrasi 30% b/v sebanyak 1000  $\mu$ l

0,3 g ekstrak kering + 20  $\mu$ l DMSO, didiamkan, + 680  $\mu$ l aquades steril,

kemudian divortek hingga homogen.

b. Konsentrasi 35% b/v sebanyak 1000  $\mu$ l

0,35 g ekstrak kering + 20  $\mu$ l DMSO, didiamkan, + 630  $\mu$ l aquades steril,

kemudian divortek hingga homogen.

c. Konsentrasi 40% b/v sebanyak 1000  $\mu$ l

0,4 g ekstrak kering + 20  $\mu$ l DMSO, didiamkan, + 580  $\mu$ l aquades steril, kemudian divortek hingga homogen.

d. Konsentrasi 45% b/v sebanyak 1000  $\mu$ l

0,45 g ekstrak kering + 20  $\mu$ l DMSO, didiamkan, + 530  $\mu$ l aquades steril, kemudian divortek hingga homogen.

## B.2 Larutan Uji Untuk Pengujian KHM dan IC<sub>50</sub> (Metode Difusi Agar)

a. Konsentrasi 0,2% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 0,2\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 1\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 1% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,06 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 0,2% :

1ml larutan konsentrasi 1% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

b. Konsentrasi 0,4% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 0,4\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 2\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 2% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,12 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 0,4% :

1ml larutan konsentrasi 2% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

c. Konsentrasi 0,6% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 0,6\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 3\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 3% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,18 g ekstrak kering + 120  $\mu\text{l}$  DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 0,6% :

1ml larutan konsentrasi 3% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

d. Konsentrasi 0,8% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 0,8\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 4\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 3% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,24 g ekstrak kering + 120  $\mu\text{l}$  DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 0,8% :

1ml larutan konsentrasi 4% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

e. Konsentrasi 1% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 1\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 5\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 5% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,3 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 1% :

1ml larutan konsentrasi 5% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

f. Konsentrasi 1,2% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$5\text{ml} \times 1,2\% = 1\text{ml} \times M_2$$

$$M_2 = 6\%$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 6% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,36 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 1,2% :

1ml larutan konsentrasi 6% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

g. Konsentrasi 1,6% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$5\text{ml} \times 1,6\% = 1\text{ml} \times M_2$$

$$M_2 = 8\%$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 8% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,48 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml, divortek hingga homogen.

Larutan uji 1,6% :

1ml larutan konsentrasi 8% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

h. Konsentrasi 2% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$5\text{ml} \times 2\% = 1\text{ml} \times M_2$$

$$M_2 = 10\%$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 10% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,6 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml,  
divortek hingga homogen.

Larutan uji 2% :

1ml larutan konsentrasi 10% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

i. Konsentrasi 3% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 3\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 15\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 15% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

0,9 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml,  
divortek hingga homogen.

Larutan uji 3% :

1ml larutan konsentrasi 15% + 4 ml media, divortek hingga homogen.

j. Konsentrasi 4% b/v sebanyak 1 ml dalam 5 ml campuran media dan larutan uji

$$\begin{aligned} V_1 M_1 &= V_2 M_2 \\ 5\text{ml} \times 4\% &= 1\text{ml} \times M_2 \\ M_2 &= 20\% \end{aligned}$$

Pembuatan larutan uji konsentrasi 20% dalam 6 ml (untuk 5 replikasi):

1,2 g ekstrak kering + 120  $\mu$ l DMSO lalu didiamkan, + aquades steril *ad* 6 ml,  
divortek hingga homogen.

Larutan uji 4% :

1ml larutan konsentrasi 20% + 4 ml media, divortek hingga homogen.



### C. Hasil Pengujian Aktivitas Antimikroba

Aktivitas antimikroba ditunjukkan oleh besarnya Diameter Daya Hambat (DDH) sebagai zona bening disekitar sumuran.

$$DDH = d_2 - d_1,$$

$$d_1 = \text{lebar sumur} = 7 \text{ mm}$$

$$d_2 = \text{hasil pengukuran zona bening dan lebar sumur}$$

#### C.1 Tabel Hasil Pengamatan Aktivitas Antimikroba terhadap *S. mutans*

##### C.1.1 Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Non-defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	9,90	9,35	10,40	12,15
	b	9,00	11,20	13,00	12,50
	c	9,55	11,10	10,85	13,00
2	a	6,35	8,55	8,90	11,70
	b	7,50	9,90	8,20	8,85
	c	7,20	8,00	10,65	11,35
3	a	6,90	9,00	8,85	11,30
	b	7,10	6,70	12,85	12,75
	c	7,70	8,85	8,75	10,65
4	a	8,75	9,10	9,25	9,55
	b	8,15	8,95	9,40	11,50
	c	7,85	9,40	9,10	9,90
5	a	8,10	8,40	10,00	9,65
	b	6,75	8,65	9,75	11,95
	c	6,20	9,35	9,80	9,85

C.1.2 Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	9,35	10,55	11,75	10,50
	b	12,30	10,35	10,70	11,80
	c	10,25	12,50	10,45	13,75
2	a	9,60	8,75	9,65	11,00
	b	9,25	11,00	9,25	10,60
	c	9,55	9,45	11,20	10,35
3	a	9,20	13,75	11,45	14,15
	b	12,00	10,50	12,25	10,30
	c	9,10	11,15	10,00	11,55
4	a	9,70	8,20	10,00	10,30
	b	9,70	10,30	12,15	14,00
	c	8,70	10,00	10,00	10,00
5	a	9,30	10,35	10,00	13,75
	b	10,00	11,00	8,05	11,30
	c	9,00	11,05	8,40	10,40

C.1.3 Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Non-defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	2,90	3,70	3,85	3,65
	b	1,70	3,15	2,75	4,20
	c	1,00	2,95	3,80	4,30
2	a	2,75	3,70	3,75	5,15
	b	2,20	3,20	4,50	5,20
	c	2,60	3,15	2,65	5,55
3	a	4,10	3,80	4,30	4,45
	b	3,50	3,65	5,00	4,25
	c	2,60	4,00	4,90	5,20
4	a	4,05	4,50	4,00	5,20
	b	3,45	4,35	5,60	4,75
	c	2,80	3,25	4,55	4,00
5	a	2,55	3,50	4,55	5,30
	b	2,80	3,75	4,25	4,75
	c	3,15	4,50	4,50	4,00

### C.1.4 Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	4,75	5,85	6,40	8,20
	b	5,00	5,85	5,65	7,85
	c	6,05	5,75	6,55	7,76
2	a	3,05	4,35	5,35	7,20
	b	3,20	3,50	5,00	5,90
	c	3,10	4,55	4,70	6,00
3	a	4,65	5,90	5,30	7,60
	b	4,95	5,70	7,25	7,15
	c	3,25	5,05	6,65	7,00
4	a	4,10	5,00	6,10	6,55
	b	2,75	3,50	5,10	5,85
	c	3,00	4,30	5,35	6,60
5	a	6,00	4,85	6,10	7,95
	b	5,70	5,00	5,85	6,40
	c	4,75	5,30	4,95	7,60

### C.1.5 Tabel nilai Standar Deviasi

#### a. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Non-defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	9,48	10,55	11,42	12,55	-
2	7,02	8,82	9,25	10,63	-
3	7,23	8,18	10,15	11,57	-
4	8,25	9,15	9,25	10,32	-
5	7,02	8,80	9,85	10,48	-
Rata-rata	7,80	9,10	9,98	11,11	-
SD	1,07	0,88	0,89	0,94	-

b. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	10,63	11,13	10,97	12,02	-
2	9,47	9,73	10,03	10,65	-
3	10,10	11,80	11,23	12,00	-
4	9,37	9,50	10,72	11,43	-
5	9,43	10,80	8,82	11,82	-
Rata-rata	9,8	10,59	10,35	11,58	-
SD	0,55	0,97	0,97	0,57	-

c. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Non-defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	1,87	3,27	3,47	4,05	-
2	2,52	3,35	3,63	5,30	-
3	3,40	3,82	4,73	4,63	-
4	3,43	4,03	4,72	4,65	-
5	2,83	3,92	4,43	4,92	-
Rata-rata	2,81	3,68	4,20	4,71	-
SD	0,65	0,35	0,61	0,46	-

d. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	5,27	5,82	6,20	7,94	-
2	3,12	4,13	5,02	6,37	-
3	4,28	5,55	6,40	7,25	-
4	3,28	4,27	5,52	6,33	-
5	5,48	5,05	5,63	7,32	-
Rata-rata	4,29	4,96	5,75	7,04	-
SD	1,09	0,75	0,55	0,68	-

## C.2 Tabel Hasil Pengamatan Aktivitas Antimikroba terhadap *C. albicans*

### C.2.1 Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Non-defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	3,50	4,80	5,75	6,70
	b	3,75	4,75	5,00	5,40
	c	3,00	5,45	6,70	5,70
2	a	3,20	4,80	4,90	4,75
	b	5,00	4,75	4,50	4,80
	c	3,85	3,00	4,20	5,50
3	a	3,25	3,80	4,25	6,25
	b	3,75	4,80	5,00	4,35
	c	3,50	4,60	4,90	4,70
4	a	4,70	4,50	5,25	5,20
	b	3,20	4,15	4,50	5,45
	c	3,30	4,00	4,10	5,00
5	a	3,15	4,50	5,10	6,00
	b	3,20	3,50	5,50	5,50
	c	3,50	5,10	5,70	5,00

### C.2.2 Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	3,80	6,70	5,20	5,70
	b	4,50	4,60	5,80	6,80
	c	4,35	5,45	6,25	6,55
2	a	4,10	4,00	5,80	5,50
	b	4,50	5,00	6,80	7,75
	c	4,70	5,50	5,40	6,00
3	a	4,20	6,70	6,60	7,25
	b	4,50	5,10	6,00	7,15
	c	4,30	5,45	5,50	7,30
4	a	4,60	6,90	6,20	7,20
	b	5,00	3,90	6,80	6,00
	c	3,75	4,60	5,20	6,80
5	a	4,70	4,45	6,85	5,75
	b	5,45	6,10	6,70	6,25
	c	4,35	4,25	4,30	6,75

C.2.3 Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Non-defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	3,05	4,35	5,20	5,55
	b	3,20	3,50	5,00	5,85
	c	3,10	4,55	4,00	5,00
2	a	3,10	3,00	5,00	5,35
	b	2,75	5,10	3,50	5,00
	c	3,00	4,35	4,30	4,70
3	a	4,10	3,80	4,45	4,70
	b	3,50	3,65	4,25	5,35
	c	2,60	4,00	5,20	4,90
4	a	4,05	4,50	5,20	4,00
	b	3,45	4,35	4,75	5,65
	c	2,80	3,25	4,00	4,75
5	a	2,55	3,50	4,55	4,55
	b	2,80	3,75	4,25	4,25
	c	3,15	4,50	4,50	4,50

C.2.4 Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Defatting* PB

Replikasi	Pengambilan Data DDH	DDH (mm)			
		30% b/v	35% b/v	40% b/v	45% b/v
1	a	4,30	5,25	5,00	5,70
	b	3,00	4,50	5,40	6,35
	c	3,10	4,50	4,25	4,25
2	a	3,00	4,40	4,00	4,00
	b	3,20	4,50	4,75	5,50
	c	3,10	3,50	5,00	5,10
3	a	3,25	5,10	5,00	5,50
	b	3,75	4,40	4,75	5,20
	c	3,00	3,30	5,00	5,00
4	a	2,90	4,40	3,50	4,50
	b	3,35	3,10	4,35	4,35
	c	3,20	3,15	5,00	4,70
5	a	3,05	4,25	5,45	4,25
	b	3,20	4,50	4,00	5,85
	c	3,15	4,00	4,60	5,00

## C.2.5 Tabel Nilai Standar Deviasi

a. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Non-defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	3,42	5,00	5,82	6,00	-
2	4,02	4,18	4,53	5,02	-
3	3,50	4,40	4,72	5,10	-
4	3,73	4,22	4,62	5,22	-
5	3,28	4,37	5,43	5,50	-
Rata-rata	3,59	4,43	5,02	5,37	-
SD	0,29	0,33	0,57	0,40	-

b. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	4,22	5,58	5,75	6,35	-
2	4,43	4,83	6,00	6,42	-
3	4,33	5,75	6,03	7,23	-
4	4,45	5,13	6,07	6,67	-
5	4,83	4,93	5,95	6,25	-
Rata-rata	4,45	5,25	5,96	6,58	-
SD	0,23	0,40	0,13	0,39	-

c. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Non-defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	3,12	4,13	4,73	5,47	-
2	2,95	4,15	4,27	5,02	-
3	3,40	3,82	4,63	4,98	-
4	3,43	4,03	4,65	4,80	-
5	2,83	3,92	4,43	4,43	-
Rata-rata	3,15	4,01	4,54	4,94	-
SD	0,27	0,14	0,19	0,37	-

d. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Defatting* PB

Replikasi	DDH (mm)				Kontrol negatif
	30%	35%	40%	45%	
1	3,47	4,75	4,88	5,43	-
2	3,10	4,13	4,58	4,87	-
3	3,33	4,27	4,92	5,23	-
4	3,15	3,55	4,28	4,52	-
5	3,13	4,25	4,68	5,03	-
Rata-rata	3,24	4,19	4,67	5,02	-
SD	0,16	0,43	0,26	0,35	-

**D. Hasil Analisis Anova Satu Arah**D.1 Uji Aktivitas Antimikroba terhadap *S. mutans*a. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Non-defatting* PB**Tests of Normality**

Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH 30%	,303	5	,150	,817	5	,111
35%	,277	5	,200*	,883	5	,323
40%	,226	5	,200*	,865	5	,245
45%	,295	5	,178	,861	5	,233

a. Lilliefors Significance Correction

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

**Test of Homogeneity of Variances**

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,764	4	20	,056



## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	390,268	4	97,567	135,433	,000
Within Groups	14,408	20	,720		
Total	404,676	24			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konsentrasi (I)	Konsentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
30 %	35%	-1,30000 <sup>*</sup>	,53681	,025	-2,4198	-,1802
	40%	-2,18400 <sup>*</sup>	,53681	,001	-3,3038	-1,0642
	45%	-3,31000 <sup>*</sup>	,53681	,000	-4,4298	-2,1902
	0%	7,80000 <sup>*</sup>	,53681	,000	6,6802	8,9198
35 %	30%	1,30000 <sup>*</sup>	,53681	,025	,1802	2,4198
	40%	-,88400 <sup>*</sup>	,53681	,115	-2,0038	,2358
	45%	-2,01000 <sup>*</sup>	,53681	,001	-3,1298	-,8902
	0%	9,10000 <sup>*</sup>	,53681	,000	7,9802	10,2198
40 %	30%	2,18400 <sup>*</sup>	,53681	,001	1,0642	3,3038
	35%	,88400 <sup>*</sup>	,53681	,115	-,2358	2,0038
	45%	-1,12600 <sup>*</sup>	,53681	,049	-2,2458	-,0062
	0%	9,98400 <sup>*</sup>	,53681	,000	8,8642	11,1038
45 %	30%	3,31000 <sup>*</sup>	,53681	,000	2,1902	4,4298
	35%	2,01000 <sup>*</sup>	,53681	,001	,8902	3,1298
	40%	1,12600 <sup>*</sup>	,53681	,049	,0062	2,2458
	0%	11,11000 <sup>*</sup>	,53681	,000	9,9902	12,2298
0%	30%	-7,80000 <sup>*</sup>	,53681	,000	-8,9198	-6,6802
	35%	-9,10000 <sup>*</sup>	,53681	,000	-10,2198	-7,9802
	40%	-9,98400 <sup>*</sup>	,53681	,000	-11,1038	-8,8642
	45%	-11,11000 <sup>*</sup>	,53681	,000	-12,2298	-9,9902

## Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konsentrasi (I)	Konsentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
30 %	35%	-1,30000*	,53681	,025	-2,4198	-,1802
	40%	-2,18400*	,53681	,001	-3,3038	-1,0642
	45%	-3,31000*	,53681	,000	-4,4298	-2,1902
	0%	7,80000	,53681	,000	6,6802	8,9198
35 %	30%	1,30000*	,53681	,025	,1802	2,4198
	40%	-,88400	,53681	,115	-2,0038	,2358
	45%	-2,01000*	,53681	,001	-3,1298	-,8902
	0%	9,10000*	,53681	,000	7,9802	10,2198
40 %	30%	2,18400*	,53681	,001	1,0642	3,3038
	35%	,88400	,53681	,115	-,2358	2,0038
	45%	-1,12600*	,53681	,049	-2,2458	-,0062
	0%	9,98400*	,53681	,000	8,8642	11,1038
45 %	30%	3,31000*	,53681	,000	2,1902	4,4298
	35%	2,01000*	,53681	,001	,8902	3,1298
	40%	1,12600*	,53681	,049	,0062	2,2458
	0%	11,11000*	,53681	,000	9,9902	12,2298
0%	30%	-7,80000*	,53681	,000	-8,9198	-6,6802
	35%	-9,10000*	,53681	,000	-10,2198	-7,9802
	40%	-9,98400*	,53681	,000	-11,1038	-8,8642
	45%	-11,11000*	,53681	,000	-12,2298	-9,9902

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Defatting* PB

## Tests of Normality

Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH 30%	,326	5	,089	,825	5	,128
35%	,214	5	,200*	,935	5	,629
40%	,247	5	,200*	,894	5	,380
45%	,260	5	,200*	,835	5	,153

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,239	3	16	,328

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,338	3	2,779	4,451	,019
Within Groups	9,991	16	,624		
Total	18,329	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konsentrasi (I)	Konsentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-9,80000*	,44701	,000	-10,7324	-8,8676
	35%	-10,59200*	,44701	,000	-11,5244	-9,6596
	40%	-10,35400*	,44701	,000	-11,2864	-9,4216
	45%	-11,58400*	,44701	,000	-12,5164	-10,6516
30%	0%	9,80000*	,44701	,000	8,8676	10,7324
	35%	-,79200	,44701	,092	-1,7244	,1404
	40%	-,55400	,44701	,230	-1,4864	,3784
	45%	-1,78400*	,44701	,001	-2,7164	-,8516
35%	0%	10,59200*	,44701	,000	9,6596	11,5244
	30%	,79200	,44701	,092	-,1404	1,7244
	40%	,23800	,44701	,600	-,6944	1,1704
	45%	-,99200*	,44701	,038	-1,9244	-,0596
40%	0%	10,35400*	,44701	,000	9,4216	11,2864
	30%	,55400	,44701	,230	-,3784	1,4864
	35%	-,23800	,44701	,600	-1,1704	,6944
	45%	-1,23000*	,44701	,012	-2,1624	-,2976
45%	0%	11,58400*	,44701	,000	10,6516	12,5164
	30%	1,78400*	,44701	,001	,8516	2,7164
	35%	,99200*	,44701	,038	,0596	1,9244
	40%	1,23000*	,44701	,012	,2976	2,1624

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

c. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Non-defatting* PB

**Tests of Normality<sup>b</sup>**

Konsentrasi		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH	30%	,217	5	,200 <sup>*</sup>	,918	5	,515
	35%	,260	5	,200 <sup>*</sup>	,867	5	,253
	40%	,251	5	,200 <sup>*</sup>	,828	5	,135
	45%	,231	5	,200 <sup>*</sup>	,969	5	,866

a. Lilliefors Significance Correction

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

b. DDH is constant when Konsentrasi = 0%. It has been omitted.

**Test of Homogeneity of Variances**

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,357	3	16	,292

**ANOVA**

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21,014	3	7,005	11,056	,000
Within Groups	10,137	16	,634		
Total	31,151	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konzentrasi (I)	Konzentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-2,81000*	,29923	,000	-3,4342	-2,1858
	35%	-3,67800*	,29923	,000	-4,3022	-3,0538
	40%	-4,19600*	,29923	,000	-4,8202	-3,5718
	45%	-4,71000*	,29923	,000	-5,3342	-4,0858
30%	0%	2,81000*	,29923	,000	2,1858	3,4342
	35%	-,86800*	,29923	,009	-1,4922	-,2438
	40%	-1,38600*	,29923	,000	-2,0102	-,7618
	45%	-1,90000*	,29923	,000	-2,5242	-1,2758
35%	0%	3,67800*	,29923	,000	3,0538	4,3022
	30%	,86800*	,29923	,009	,2438	1,4922
	40%	-,51800	,29923	,099	-1,1422	,1062
	45%	-1,03200*	,29923	,003	-1,6562	-,4078
40%	0%	4,19600*	,29923	,000	3,5718	4,8202
	30%	1,38600*	,29923	,000	,7618	2,0102
	35%	,51800	,29923	,099	-,1062	1,1422
	45%	-,51400	,29923	,101	-1,1382	,1102
45%	0%	4,71000*	,29923	,000	4,0858	5,3342
	30%	1,90000*	,29923	,000	1,2758	2,5242
	35%	1,03200*	,29923	,003	,4078	1,6562
	40%	,51400	,29923	,101	-,1102	1,1382

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

d. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Defatting* PBTests of Normality<sup>b</sup>

Konsentrasi		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH	30%	,222	5	,200*	,881	5	,313
	35%	,222	5	,200*	,907	5	,452
	40%	,190	5	,200*	,954	5	,769
	45%	,236	5	,200*	,895	5	,385

a. Lilliefors Significance Correction

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

b. DDH is constant when Konsentrasi = 0%. It has been omitted.

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,069	3	16	,390

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,852	3	3,284	11,737	,000
Within Groups	4,477	16	,280		
Total	14,329	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konzentrasi (I)	Konzentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-4,28600*	,45026	,000	-5,2252	-3,3468
	35%	-4,96400*	,45026	,000	-5,9032	-4,0248
	40%	-5,75400*	,45026	,000	-6,6932	-4,8148
	45%	-7,04200*	,45026	,000	-7,9812	-6,1028
30%	0%	4,28600	,45026	,000	3,3468	5,2252
	35%	-,67800	,45026	,148	-1,6172	,2612
	40%	-1,46800*	,45026	,004	-2,4072	-,5288
	45%	-2,75600*	,45026	,000	-3,6952	-1,8168
35%	0%	4,96400*	,45026	,000	4,0248	5,9032
	30%	,67800	,45026	,148	-,2612	1,6172
	40%	-,79000	,45026	,095	-1,7292	,1492
	45%	-2,07800*	,45026	,000	-3,0172	-1,1388
40%	0%	5,75400*	,45026	,000	4,8148	6,6932
	30%	1,46800*	,45026	,004	,5288	2,4072
	35%	,79000	,45026	,095	-,1492	1,7292
	45%	-1,28800*	,45026	,010	-2,2272	-,3488
45%	0%	7,04200*	,45026	,000	6,1028	7,9812
	30%	2,75600*	,45026	,000	1,8168	3,6952
	35%	2,07800*	,45026	,000	1,1388	3,0172
	40%	1,28800*	,45026	,010	,3488	2,2272

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



## D.2 Uji Aktivitas Antimikroba terhadap *C. albicans*

### a. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Non-defatting* PB

#### Tests of Normality

Konsentrasi		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH	30%	,222	5	,200*	,951	5	,745
	35%	,341	5	,058	,794	5	,073
	40%	,303	5	,149	,854	5	,207
	45%	,245	5	,200*	,885	5	,335

a. Lilliefors Significance Correction.

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

#### Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,027	3	16	,151

#### ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,086	3	3,029	17,926	,000
Within Groups	2,703	16	,169		
Total	11,789	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konzentrasi (I)	Konzentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-3,59000*	,23252	,000	-4,0750	-3,1050
	35%	-4,43400*	,23252	,000	-4,9190	-3,9490
	40%	-5,02400*	,23252	,000	-5,5090	-4,5390
	45%	-5,36800*	,23252	,000	-5,8530	-4,8830
30%	0%	3,59000*	,23252	,000	3,1050	4,0750
	35%	-,84400*	,23252	,002	-1,3290	-,3590
	40%	-1,43400*	,23252	,000	-1,9190	-,9490
	45%	-1,77800*	,23252	,000	-2,2630	-1,2930
35%	0%	4,43400*	,23252	,000	3,9490	4,9190
	30%	,84400*	,23252	,002	,3590	1,3290
	40%	-,59000*	,23252	,020	-1,0750	-,1050
	45%	-,93400*	,23252	,001	-1,4190	-,4490
40%	0%	5,02400*	,23252	,000	4,5390	5,5090
	30%	1,43400*	,23252	,000	,9490	1,9190
	35%	-,59000*	,23252	,020	-,1050	1,0750
	45%	-,34400	,23252	,155	-,8290	-,1410
45%	0%	5,36800*	,23252	,000	4,8830	5,8530
	30%	1,77800*	,23252	,000	1,2930	2,2630
	35%	,93400*	,23252	,001	,4490	1,4190
	40%	,34400	,23252	,155	-,1410	,8290

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

b. Ekstrak dengan Pelarut Etanol 70% *Defatting* PB

## Tests of Normality

Konsentrasi		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH	30%	,303	5	,149	,890	5	,356
	35%	,211	5	,200*	,906	5	,441
	40%	,268	5	,200*	,857	5	,218
	45%	,262	5	,200*	,859	5	,225

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,766	3	16	,076

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12,680	3	4,227	43,781	,000
Within Groups	1,545	16	,097		
Total	14,225	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konsentrasi (I)	Konsentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-4,45200*	,17577	,000	-4,8186	-4,0854
	35%	-5,24400*	,17577	,000	-5,6106	-4,8774
	40%	-5,96000*	,17577	,000	-6,3266	-5,5934
	45%	-6,58400*	,17577	,000	-6,9506	-6,2174
30%	0%	4,45200*	,17577	,000	4,0854	4,8186
	35%	-,79200*	,17577	,000	-1,1586	-,4254
	40%	-1,50800*	,17577	,000	-1,8746	-1,1414
	45%	-2,13200*	,17577	,000	-2,4986	-1,7654
35%	0%	5,24400*	,17577	,000	4,8774	5,6106
	30%	,79200*	,17577	,000	,4254	1,1586
	40%	-,71600*	,17577	,001	-1,0826	-,3494
	45%	-1,34000*	,17577	,000	-1,7066	-,9734
40%	0%	5,96000*	,17577	,000	5,5934	6,3266
	30%	1,50800*	,17577	,000	1,1414	1,8746
	35%	,71600*	,17577	,001	,3494	1,0826
	45%	-,62400*	,17577	,002	-,9906	-,2574
45%	0%	6,58400*	,17577	,000	6,2174	6,9506
	30%	2,13200*	,17577	,000	1,7654	2,4986
	35%	1,34000*	,17577	,000	,9734	1,7066
	40%	,62400*	,17577	,002	,2574	,9906

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

c. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Non-defatting* PB

## Tests of Normality

Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH 30%	,230	5	,200*	,906	5	,445
35%	,204	5	,200*	,928	5	,580
40%	,280	5	,200*	,911	5	,476
45%	,338	5	,064	,839	5	,163

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,725	3	16	,552

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9,877	3	3,292	69,450	,000
Within Groups	,759	16	,047		
Total	10,636	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konsentrasi (I)	Konsentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-3,14600*	,14647	,000	-3,4515	-2,8405
	35%	-4,01000*	,14647	,000	-4,3155	-3,7045
	40%	-4,54200*	,14647	,000	-4,8475	-4,2365
	45%	-4,94000*	,14647	,000	-5,2455	-4,6345
30%	0%	3,14600*	,14647	,000	2,8405	3,4515
	35%	-,86400*	,14647	,000	-1,1695	-,5585
	40%	-1,39600*	,14647	,000	-1,7015	-1,0905
	45%	-1,79400*	,14647	,000	-2,0995	-1,4885
35%	0%	4,01000*	,14647	,000	3,7045	4,3155
	30%	,86400*	,14647	,000	,5585	1,1695
	40%	-,53200*	,14647	,002	-,8375	-,2265
	45%	-,93000*	,14647	,000	-1,2355	-,6245
40%	0%	4,54200*	,14647	,000	4,2365	4,8475
	30%	1,39600*	,14647	,000	1,0905	1,7015
	35%	,53200*	,14647	,002	,2265	,8375
	45%	-,39800*	,14647	,013	-,7035	-,0925
45%	0%	4,94000*	,14647	,000	4,6345	5,2455
	30%	1,79400*	,14647	,000	1,4885	2,0995
	35%	,93000*	,14647	,000	,6245	1,2355
	40%	,39800*	,14647	,013	-,0925	,7035

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

d. Ekstrak dengan Pelarut Air Panas *Defatting* PB

## Tests of Normality

Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH 30%	,306	5	,142	,859	5	,226
35%	,244	5	,200 <sup>*</sup>	,938	5	,652
40%	,194	5	,200 <sup>*</sup>	,928	5	,586
45%	,137	5	,200 <sup>*</sup>	,987	5	,969

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,102	4	20	,119

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	82,139	4	20,535	258,443	,000
Within Groups	1,589	20	,079		
Total	83,728	24			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

Konzentrasi (I)	Konzentrasi (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	30%	-3,23600*	,17828	,000	-3,6079	-2,8641
	35%	-4,19000*	,17828	,000	-4,5619	-3,8181
	40%	-4,66800*	,17828	,000	-5,0399	-4,2961
	45%	-5,01600*	,17828	,000	-5,3879	-4,6441
30%	0%	3,23600*	,17828	,000	2,8641	3,6079
	35%	-,95400*	,17828	,000	-1,3259	-,5821
	40%	-1,43200*	,17828	,000	-1,8039	-1,0601
	45%	-1,78000*	,17828	,000	-2,1519	-1,4081
35%	0%	4,19000*	,17828	,000	3,8181	4,5619
	30%	,95400*	,17828	,000	,5821	1,3259
	40%	-,47800*	,17828	,014	-,8499	-,1061
	45%	-,82600*	,17828	,000	-1,1979	-,4541
40%	0%	4,66800*	,17828	,000	4,2961	5,0399
	30%	1,43200*	,17828	,000	1,0601	1,8039
	35%	,47800*	,17828	,014	,1061	,8499
	45%	-,34800	,17828	,065	-,7199	,0239
45%	0%	5,01600*	,17828	,000	4,6441	5,3879
	30%	1,78000*	,17828	,000	1,4081	2,1519
	35%	,82600*	,17828	,000	,4541	1,1979
	40%	,34800	,17828	,065	-,0239	,7199

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



### D.3 Uji Perbandingan Perbedaan Perlakuan *Defatting* dan Variasi Pelarut Ekstraksi terhadap *S. mutans*

#### a. Konsentrasi 30%

#### Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH	A	,303	5	,150	5	,111
	B	,326	5	,089	5	,128
	C	,217	5	,200*	5	,515
	D	,222	5	,200*	5	,313

a. Lilliefors Significance Correction

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

#### Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,575	3	16	,234

#### ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	153,364	3	51,121	66,813	,000
Within Groups	12,242	16	,765		
Total	165,606	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-2,00000	,55323	,002	-3,1728	-,8272
	C	4,99000	,55323	,000	3,8172	6,1628
	D	3,51400	,55323	,000	2,3412	4,6868
B	A	2,00000	,55323	,002	,8272	3,1728
	C	6,99000	,55323	,000	5,8172	8,1628
	D	5,51400	,55323	,000	4,3412	6,6868
C	A	-4,99000	,55323	,000	-6,1628	-3,8172
	B	-6,99000	,55323	,000	-8,1628	-5,8172
	D	-1,47600	,55323	,017	-2,6488	-,3032
D	A	-3,51400	,55323	,000	-4,6868	-2,3412
	B	-5,51400	,55323	,000	-6,6868	-4,3412
	C	1,47600	,55323	,017	,3032	2,6488

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## b. Konsentrasi 35%

**Tests of Normality**

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH A	,277	5	,200*	,883	5	,323
B	,214	5	,200*	,935	5	,629
C	,260	5	,200*	,867	5	,253
D	,222	5	,200*	,907	5	,452

a. Lilliefors Significance Correction

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

**Test of Homogeneity of Variances**

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,354	3	16	,292

**ANOVA**

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	162,328	3	54,109	90,326	,000
Within Groups	9,585	16	,599		
Total	171,912	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-1,49200	,48951	,008	-2,5297	-,4543
	C	5,42200	,48951	,000	4,3843	6,4597
	D	4,13600	,48951	,000	3,0983	5,1737
B	A	1,49200	,48951	,008	,4543	2,5297
	C	6,91400	,48951	,000	5,8763	7,9517
	D	5,62800	,48951	,000	4,5903	6,6657
C	A	-5,42200	,48951	,000	-6,4597	-4,3843
	B	-6,91400	,48951	,000	-7,9517	-5,8763
	D	-1,28600	,48951	,018	-2,3237	-,2483
D	A	-4,13600	,48951	,000	-5,1737	-3,0983
	B	-5,62800	,48951	,000	-6,6657	-4,5903
	C	1,28600	,48951	,018	,2483	2,3237

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

c. Konsentrasi 40%

### Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
DDH	A	,226	5	,200*	,865	5	,245
	B	,247	5	,200*	,894	5	,380
	C	,251	5	,200*	,828	5	,135
	D	,190	5	,200*	,954	5	,769

a. Lilliefors Significance Correction

### Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
DDH	A	,226	5	,200*	,865	5	,245
	B	,247	5	,200*	,894	5	,380
	C	,251	5	,200*	,828	5	,135
	D	,190	5	,200*	,954	5	,769

a. Lilliefors Significance Correction

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

### Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,582	3	16	,635

### ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	141,299	3	47,100	78,409	,000
Within Groups	9,611	16	,601		
Total	150,910	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-,37000	,49018	,461	-1,4091	,6691
	C	5,78800*	,49018	,000	4,7489	6,8271
	D	4,23000*	,49018	,000	3,1909	5,2691
B	A	,37000	,49018	,461	-,6691	1,4091
	C	6,15800*	,49018	,000	5,1189	7,1971
	D	4,60000*	,49018	,000	3,5609	5,6391
C	A	-5,78800*	,49018	,000	-6,8271	-4,7489
	B	-6,15800*	,49018	,000	-7,1971	-5,1189
	D	-1,55800*	,49018	,006	-2,5971	-,5189
D	A	-4,23000*	,49018	,000	-5,2691	-3,1909
	B	-4,60000*	,49018	,000	-5,6391	-3,5609
	C	1,55800*	,49018	,006	,5189	2,5971

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## d. Konsentrasi 45%

## Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
DDH	A	,295	5	,178	,861	5	,233
	B	,260	5	,200*	,835	5	,153
	C	,231	5	,200*	,969	5	,866
	D	,236	5	,200*	,895	5	,385

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,665	3	16	,214

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	163,816	3	54,605	115,341	,000
Within Groups	7,575	16	,473		
Total	171,391	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-,47400	,43517	,292	-1,3965	,4485
	C	6,40000*	,43517	,000	5,4775	7,3225
	D	4,06800*	,43517	,000	3,1455	4,9905
B	A	,47400	,43517	,292	-,4485	1,3965
	C	6,87400*	,43517	,000	5,9515	7,7965
	D	4,54200*	,43517	,000	3,6195	5,4645
C	A	-6,40000*	,43517	,000	-7,3225	-5,4775
	B	-6,87400*	,43517	,000	-7,7965	-5,9515
	D	-2,33200*	,43517	,000	-3,2545	-1,4095
D	A	-4,06800*	,43517	,000	-4,9905	-3,1455
	B	-4,54200*	,43517	,000	-5,4645	-3,6195
	C	2,33200*	,43517	,000	1,4095	3,2545

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



#### C.4 Uji Perbandingan Perbedaan Perlakuan *Defatting* dan Variasi Pelarut Ekstraksi terhadap *C. albicans*

##### a. Konsentrasi 30%

##### Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DDH A	,222	5	,200*	,951	5	,745
B	,303	5	,149	,890	5	,356
C	,230	5	,200*	,906	5	,445
D	,306	5	,142	,859	5	,226

a. Lilliefors Significance Correction

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

##### Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,741	3	16	,543

##### ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,322	3	1,774	30,375	,000
Within Groups	,935	16	,058		
Total	6,257	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-.86200 <sup>*</sup>	,15285	,000	-1,1860	-,5380
	C	,44400 <sup>*</sup>	,15285	,010	,1200	,7680
	D	,35400 <sup>*</sup>	,15285	,034	,0300	,6780
B	A	,86200 <sup>*</sup>	,15285	,000	,5380	1,1860
	C	1,30600 <sup>*</sup>	,15285	,000	,9820	1,6300
	D	1,21600 <sup>*</sup>	,15285	,000	,8920	1,5400
C	A	-,44400 <sup>*</sup>	,15285	,010	-,7680	-,1200
	B	-1,30600 <sup>*</sup>	,15285	,000	-1,6300	-,9820
	D	-,09000 <sup>*</sup>	,15285	,564	-,4140	,2340
D	A	-,35400 <sup>*</sup>	,15285	,034	-,6780	-,0300
	B	-1,21600 <sup>*</sup>	,15285	,000	-1,5400	-,8920
	C	,09000 <sup>*</sup>	,15285	,564	-,2340	,4140

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## b. Konsentrasi 35%

## Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
DDH	A	,341	5	,058	,794	5	,073
	B	,211	5	,200*	,906	5	,441
	C	,204	5	,200*	,928	5	,580
	D	,244	5	,200*	,938	5	,652

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,175	3	16	,350

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,452	3	1,484	12,475	,000
Within Groups	1,903	16	,119		
Total	6,355	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-,81000 <sup>*</sup>	,21813	,002	-1,2724	-,3476
	C	,42400	,21813	,070	-,0384	,8864
	D	,24400	,21813	,280	-,2184	,7064
B	A	,81000 <sup>*</sup>	,21813	,002	,3476	1,2724
	C	1,23400 <sup>*</sup>	,21813	,000	,7716	1,6964
	D	1,05400 <sup>*</sup>	,21813	,000	,5916	1,5164
C	A	-,42400	,21813	,070	-,8864	,0384
	B	-1,23400 <sup>*</sup>	,21813	,000	-1,6964	-,7716
	D	-,18000	,21813	,421	-,6424	,2824
D	A	-,24400	,21813	,280	-,7064	,2184
	B	-1,05400 <sup>*</sup>	,21813	,000	-1,5164	-,5916
	C	,18000	,21813	,421	-,2824	,6424

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## c. Konsentrasi 40%

## Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
DDH	A	,226	5	,200*	,865	5	,245
	B	,247	5	,200*	,894	5	,380
	C	,251	5	,200*	,828	5	,135
	D	,190	5	,200*	,954	5	,769

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,582	3	16	,635

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	141,299	3	47,100	78,409	,000
Within Groups	9,611	16	,601		
Total	150,910	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-,37000	,49018	,461	-1,4091	,6691
	C	5,78800	,49018	,000	4,7489	6,8271
	D	4,23000	,49018	,000	3,1909	5,2691
B	A	,37000	,49018	,461	-,6691	1,4091
	C	6,15800	,49018	,000	5,1189	7,1971
	D	4,60000	,49018	,000	3,5609	5,6391
C	A	-5,78800	,49018	,000	-6,8271	-4,7489
	B	-6,15800	,49018	,000	-7,1971	-5,1189
	D	-1,55800	,49018	,006	-2,5971	-,5189
D	A	-4,23000	,49018	,000	-5,2691	-3,1909
	B	-4,60000	,49018	,000	-5,6391	-3,5609
	C	1,55800	,49018	,006	,5189	2,5971

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## d. Konsentrasi 45%

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
DDH	A	,245	5	,200*	,885	5	,335
	B	,262	5	,200*	,859	5	,225
	C	,216	5	,200*	,974	5	,902
	D	,137	5	,200*	,987	5	,969

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

DDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,063	3	16	,979

## ANOVA

DDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,691	3	2,897	20,128	,000
Within Groups	2,303	16	,144		
Total	10,994	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

DDH  
LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-1,21600*	,23994	,000	-1,7247	-,7073
	C	,42800	,23994	,093	-,0807	,9367
	D	,35200	,23994	,162	-,1567	,8607
B	A	1,21600*	,23994	,000	,7073	1,7247
	C	1,64400*	,23994	,000	1,1353	2,1527
	D	1,56800*	,23994	,000	1,0593	2,0767
C	A	-,42800	,23994	,093	-,9367	,0807
	B	-1,64400*	,23994	,000	-2,1527	-1,1353
	D	-,07600	,23994	,756	-,5847	,4327
D	A	-,35200	,23994	,162	-,8607	,1567
	B	-1,56800*	,23994	,000	-2,0767	-1,0593
	C	,07600	,23994	,756	-,4327	,5847

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



D.4 Uji terhadap nilai IC<sub>50</sub> *S. mutans*

## Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
IC50	A	,217	5	,200*	,925	5	,566
	B	,300	5	,161	,833	5	,146
	C	,237	5	,200*	,852	5	,200
	D	,319	5	,105	,793	5	,071

a. Lilliefors Significance Correction

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

## Test of Homogeneity of Variances

IC50

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6,992	3	16	,053

## ANOVA

IC50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,232	3	,744	215,381	,000
Within Groups	,055	16	,003		
Total	2,288	19			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

IC50

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	,01800	,03718	,635	-,0608	,0968
	C	-,74600	,03718	,000	-,8248	-,6672
	D	-,54000	,03718	,000	-,6188	-,4612
B	A	-,01800	,03718	,635	-,0968	,0608
	C	-,76400	,03718	,000	-,8428	-,6852
	D	-,55800	,03718	,000	-,6368	-,4792
C	A	,74600	,03718	,000	,6672	,8248
	B	,76400	,03718	,000	,6852	,8428
	D	,20600	,03718	,000	,1272	,2848
D	A	,54000	,03718	,000	,4612	,6188
	B	,55800	,03718	,000	,4792	,6368
	C	-,20600	,03718	,000	-,2848	-,1272

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### E. Hasil Pengujian Penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> Terhadap *S. mutans*

Hasil pengujian penentuan KHM dan IC<sub>50</sub> terhadap *S. mutans* dinyatakan dalam jumlah koloni per ml. Data jumlah koloni merupakan jumlah koloni yang dihitung pada setiap cawan petri dikalikan 5 karena suspensi *S. mutans* yang diberikan dalam setiap cawan petri sejumlah 200 µl. Suspensi *S. mutans* yang digunakan pada pengujian ini yaitu hasil pengenceran 10<sup>-4</sup>, sehingga penghitungan koloni:

$$\text{Jumlah koloni} = \text{jumlah koloni dalam plate} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

Koloni dinyatakan dalam jumlah koloni CFU per ml ( $10^4$ ). Data jumlah koloni tertera dalam tabel sebagai berikut:

Ekstrak	Replikasi	IC50 (% b/v)
A	1	0,19
	2	0,18
	3	0,28
	4	0,24
	5	0,25
B	1	0,21
	2	0,19
	3	0,19
	4	0,21
	5	0,25
C	1	0,88
	2	1,06
	3	0,99
	4	0,87
	5	1,07
D	1	0,82
	2	0,72
	3	0,74
	4	0,74
	5	0,82

Ekstrak	Replikasi	Jumlah Koloni <i>S. mutans</i> CFU per ml ( $10^4$ )				
		0,0%	0,2%	0,4%	0,6%	0,8%
A	1		65	25	15	0
	2		70	20	5	0
	3	160	115	40	25	0
	4		105	35	15	0
	5		110	25	5	0
	Rata-rata		93	29	13	0
	SD		23,61	8,22	8,37	0
B	1		70	40	5	0
	2		50	45	5	0
	3	160	50	45	10	0
	4		70	35	5	0
	5		90	45	0	0
	Rata-rata		66	42	5	0
	SD		16,73	4,47	3,54	0
Ekstrak	Replikasi	Jumlah Koloni <i>S. mutans</i> per ml ( $10^4$ )				
		0,0%	0,8%	1,6%	2%	3,0%
C	1		100	65	15	0
	2		155	55	20	0
	3	210	125	70	15	0
	4		100	55	25	0
	5		110	100	20	0
	Rata-rata		118	69	19	0
	SD		23,08	18,51	4,18	0
D	1		125	25	5	0
	2		90	25	10	0
	3	210	110	15	5	0
	4		100	20	15	0
	5		125	20	15	0
	Rata-rata		110	21	10	0
	SD		15,41	4,18	5	0

Keterangan :

A: Ekstrak Etanol 70% *non-defatting* PB

B: Ekstrak Etanol 70% *defatting* PB

C: Ekstrak Air Panas *non-defatting* PB

D: Ekstrak Air Panas *defatting* PB

### F. Hasil Pengujian Penentuan KHM Terhadap *C. albicans*

Ekstrak	Replikasi	Ada tidaknya pertumbuhan <i>C. albicans</i> tiap konsentrasi				
		0,4%	0,8%	1,2%	1,6%	Kontrol Negatif (DMSO 2%)
A	1	+	+	+	-	+
	2	+	+	+	-	+
	3	+	+	+	-	+
	4	+	+	+	-	+
	5	+	+	+	-	+
B	1	+	+	-	-	+
	2	+	+	-	-	+
	3	+	+	-	-	+
	4	+	+	-	-	+
	5	+	+	-	-	+
Ekstrak	Replikasi	Ada tidaknya pertumbuhan <i>C. albicans</i> tiap konsentrasi				
		1,0%	2,0%	3,0%	4,0%	Kontrol Negatif (DMSO 2%)
C	1	+	+	+	-	+
	2	+	+	+	-	+
	3	+	+	+	-	+
	4	+	+	+	-	+
	5	+	+	+	-	+
D	1	+	+	+	-	+
	2	+	+	+	-	+
	3	+	+	+	-	+
	4	+	+	-	-	+
	5	+	+	-	-	+

Keterangan :

+ : ada pertumbuhan *C. albicans*

- : tidak ada pertumbuhan *C. albicans*

A: Ekstrak Etanol 70% *non-defatting* PB

B: Ekstrak Etanol 70% *defatting* PB

C: Ekstrak Air Panas *non-defatting* PB

D: Ekstrak Air Panas *defatting* PB

## G. Dokumentasi Penelitian



Gambar D.1 Buah Kakao Terserang *P. palmivora*. (a) Bagian luar buah kakao; (b) bagian dalam buah kakao

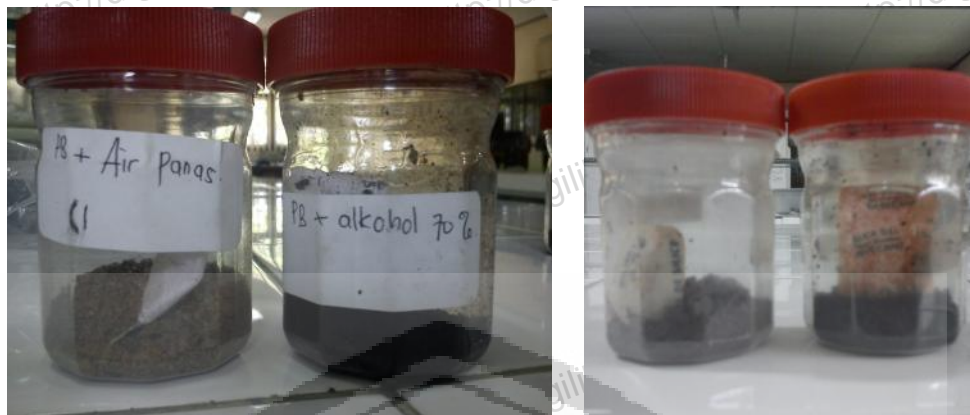


Gambar D.2 Biji Kering Kakao terserang *P. palmivora*



Gambar D.3 Perendaman dengan PB

Gambar D.4 Ekstraksi Biji Kakao terserang *P. palmivora*  
(a) Proses Maserasi; (b) Ekstrak Kaya Polifenol hasil EkstraksiGambar D.5 Proses Perolehan Ekstrak Kering (a) Pemekatan Ekstrak dengan *Rotary Evaporator*; (b) Pengeringan dengan Oven Vakum



Gambar D.6 Sampel Ekstrak Kering

