



**EKSTRAKSI SENYAWA BIOAKTIF BUAH TAKOKAK (*Solanum torvum*)
SERTA PENGUJIAN SIFAT ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERINYA**

SKRIPSI

oleh :

**RIZKI KURNIAWAN
121710101009**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**EKSTRAKSI SENYAWA BIOAKTIF BUAH TAKOKAK (*Solanum torvum*)
SERTA PENGUJIAN SIFAT ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERINYA**

SKRIPSI

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

oleh :

**RIZKI KURNIAWAN
121710101009**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Allah SWT, puji syukur atas kehadiratNya yang telah memudahkan segala urusan hambaMu, semoga rahmat dan ampunanMu selalu mengiringi setiap langkah hambaMu dan berilah ampun atas segala dosa hamba;
2. Rosulullah SAW, terima kasih telah membimbing umat manusia menjadi khalifah di bumi serta menjadi teladan umatmu untuk mencapai sebuah kedamaian;
3. Orangtua tercinta, ibuku Anita dan ayahku Sumarno terima kasih atas kasih sayang, cinta dan do'anya serta semangat yang luar biasa;
4. Kakakku Nurainun dan Surya Bhakti Yudha serta seluruh keluarga besar Tambur Rachman yang telah memberi warna kehidupan, sayang selalu untukmu;
5. seluruh keluarga yang selalu memberikan doa, dukungan, bantuan dan semangat; dan
6. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Barang siapa yang menempuh suatu jalan untuk menuntut ilmu, Allah akan memudahkan baginya jalan ke surga”.

-HR. Muslim-

“ ... *Sesungguhnya sesudah kesulitan itu adalah kemudahan, sesungguhnya kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanlah hendaknya kamu berharap*”
(QS Alam Nasyrh 94;6-8)

“Keyakinan bahwa Allah lah yang memiliki segalanya yang membuat seseorang menjadi *the winner*”

-ust Yusuf Mansur-

“don't forget nuntut ilmu seriously, qiyaamullail, 'n shalah every fivetimes in masjid. Don't jauh-jauh from Allah SWT and Qur'an.”

-Ust Yusuf Mansur-

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Rizki Kurniawan

NIM : 121710101009

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Ekstraksi Senyawa Bioaktif Buah Takokak (*Solanum torvum*) serta Pengujian Sifat Antioksidan dan Antibakterinya”** Adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan 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 ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, November 2016

Rizki Kurniawan

NIM 121710101009

SKRIPSI

**EKSTRAKSI SENYAWA BIOAKTIF BUAH TAKOKAK (*Solanum torvum*)
SERTA PENGUJIAN SIFAT ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERINYA**

oleh :

Rizki Kurniawan
NIM 121710101009

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App. Sc.
Dosen Pembimbing Anggota : Nurul Isnaini Fitriyana, S.TP., MP

PENGESAHAN

Skripsi berjudul **“Ekstraksi Senyawa Bioaktif Buah Takokak (*Solanum torvum*) serta Pengujian Sifat Antioksidan dan Antibakterinya”** karya Rizki Kurniawan NIM 121710101009 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

Hari/tanggal : Jumat/16 September 2016

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc
NIP. 196411091989021002

Nurul Isnaini Fitriyana S.TP.,MP
NIP. 197809202012122001

Tim
Penguji:

Ketua

Anggota

Dr. Ir. Sih Yuwanti, MP
NIP. 196507081994032002

Ir. Giyarto, M.Sc
NIP. 196607181993031013

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Yuli Witono, S.TP, M.P.
NIP. 196912121998021001

SUMMARY

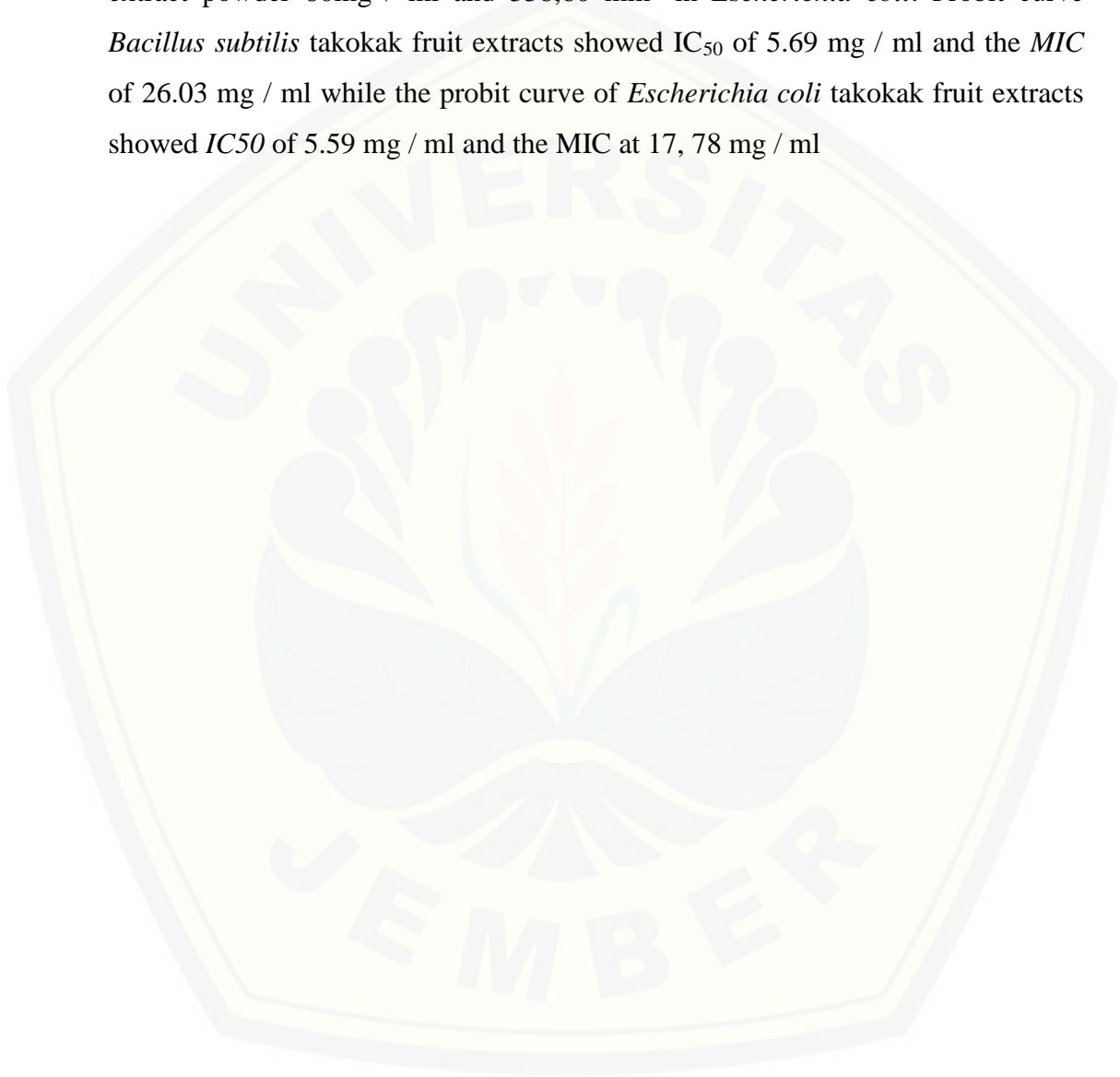
Antioxidant and antibacterial activity of takokak (*Solanum torvum*) fruit extract; Rizki Kurniawan; 121710101009; 2016; 63 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Takokak is an underutilized vegetable that is found in almost all regions in Indonesia. Takokak is a wild plant. Takokak fruit is a traditional medicine for the treatment of stomach diseases, stiffness waist, chronic cough, ulceration, heart disease, and high blood pressure. Takokak fruit contains isoflavones sulfate, steroid glycosides and alkaloids. Flavonoids and alkaloids that are expected to inhibit the growth of pathogenic bacteria including *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

Extraction of bioactive compounds in fruits takokak using a suitable solvent. Active compounds in takokak fruit are polar compounds that can be extracted using a polar solvent. The used of ethanol as solvent of bioactive compounds in food is highly recommended because ethanol is food grade. In a different context, the used of ethanol in food is reduced along with public awareness of halal food consumption. This study was conducted to determine the ratio of water and ethanol is most effective to extract flavonoids in takokak fruits and used for natural antibacterial.

This research was conducted in four stages. The first stage is a preliminary research to determine the extraction method. The second stage is making takokak fruit extract powder. The third stage is extract powder characterization includes color analysis, total polyphenols (Folin-Ciocalteu) and antioxidant activity (DPPH scavenging activity). The fourth stage is analysis of antibacterial activity in well diffusion method and the determination of minimum inhibitory concentration.

The results showed takokak fruit extracts powder that have appropriate criteria is the use of 50% ethanol as a solvent with a total of 265.44 polyphenols mgGAE / ml and antioxidant activity of 44.46%. The well diffusion method in *Bacillus subtilis* showed inhibition zone of 221,50mm² at a concentration of extract powder 80mg / ml and 338,60 mm² in *Escherichia coli*. Probit curve *Bacillus subtilis* takokak fruit extracts showed IC₅₀ of 5.69 mg / ml and the MIC of 26.03 mg / ml while the probit curve of *Escherichia coli* takokak fruit extracts showed IC₅₀ of 5.59 mg / ml and the MIC at 17, 78 mg / ml



RINGKASAN

Ekstraksi Senyawa Bioaktif Buah Takokak (*Solanum torvum*) serta Pengujian Sifat Antioksidan dan Antibakterinya; Rizki Kurniawan; 121710101009; 2016; 63 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Takokak merupakan jenis sayuran yang ditemukan hampir di seluruh wilayah Indonesia sebagai tanaman liar yang tidak dibudidayakan. Buah takokak sering dikonsumsi mentah sebagai lalapan maupun diolah terlebih dahulu menjadi masakan. Buah takokak mengandung komponen kimia seperti isoflavonoid sulfat, steroid glikosida, dan alkaloid. Buah takokak berpotensi menjadi sumber flavonoid dan alkaloid yang diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen diantaranya *Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*.

Senyawa aktif dalam buah takokak tergolong senyawa polar yang dapat diekstrak menggunakan etanol. Etanol banyak digunakan sebagai pelarut senyawa bioaktif dalam bahan pangan (bersifat *food grade*). Namun, penggunaan etanol mulai dikurangi seiring dengan kesadaran masyarakat akan konsumsi pangan halal. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui rasio air dan etanol yang efektif dalam ekstraksi senyawa flavonoid buah takokak dan pengujian lebih lanjut ekstrak buah takokak sebagai antibakteri.

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahapan, yaitu penelitian pendahuluan untuk menentukan metode ekstraksi, pembuatan bubuk ekstrak buah takokak, karakterisasi bubuk ekstrak meliputi analisis warna, total polifenol (*Follin-Ciocalteau*), aktivitas antioksidan (*DPPH scavenging activity*), dan analisis aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumur serta penentuan *minimum inhibitory concentration (MIC)*.

Hasil penelitian menunjukkan bubuk ekstrak buah takokak yang memiliki kriteria sesuai adalah pada penggunaan etanol 50% sebagai pelarut dengan total polifenol sebesar 265,44 mgGAE/ml dan aktivitas antioksidan sebesar 44,46%. Pengujian aktivitas antibakteri metode difusi sumur pada bakteri *Bacillus subtilis*

menghasilkan zona hambat sebesar $221,50\text{mm}^2$ pada konsentrasi 80mg/ml bubuk ekstrak dan pada bakteri *Eschericia coli* sebesar $338,60\text{ mm}^2$ pada konsentrasi yang sama. Kurva probit *Bacillus subtilis* dengan ekstrak buah takokak menghasilkan IC_{50} sebesar $5,69\text{ mg/ml}$ dan MIC sebesar $26,03\text{ mg/ml}$ sedangkan pada Kurva probit *Eschericia coli* dengan ekstrak buah takokak menghasilkan IC_{50} sebesar $5,59\text{ mg/ml}$ dan MIC sebesar $17,78\text{ mg/ml}$



PRAKATA

Rasa syukur kehadiran Allah SWT yang tak pernah lupa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya yang luar biasa besar, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekstraksi Senyawa Bioaktif Buah Takokak (*Solanum torvum*) serta Pengujian Sifat Antioksidan dan Antibakterinya” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karenanya penulis menyampaikan rasa terima kasih yang teramat dalam kepada:

1. Dr. Yuli Witono, S.TP, M.P., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam membimbing penelitian skripsi ini;
4. Nurul Isnaini Fitriyana, S.TP., M.P., selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan arahan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi ini;
5. Dr. Ir. Sih Yuwanti, MP. dan Ir. Giyarto, MSc., selaku tim penguji yang telah memberikan kritik, saran, serta bimbingan yang membangun dalam perbaikan penulisan skripsi ini;
6. Ibunda Anita, Ayahanda Sumarno dan Kakakku Nurainun dan Yudha terima kasih atas segala doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tak terhingga dan sangat luar biasa;
7. Shelvy, Victoria, Nurus, dan Rori terima kasih untuk semangat dan segala bantuannya pada saat penelitian hingga skripsi ini selesai;

8. Teman-teman THP A 2012 (CAZPER) terima kasih atas segala doa, semangat, bantuan dan motivasinya;
9. Teman-teman Himagihasta dan UK PSM Symphony Choir terima kasih atas cerita, segala doa, semangat, dan kasih sayang;
10. Keluarga, dan sahabat-sahabat THP dan TEP 2012 yang telah berbagi kisah, suka duka, dan pengalaman selama masa perkuliahan;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan serta membantu pelaksanaan penelitian skripsi ataupun dalam penulisan skripsi sehingga dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna dan memiliki banyak kesalahan. Penulis berharap kritik dan saran yang membangun dari pembaca demi sempurnanya tulisan ini. Semoga skripsi ini dapat menambah pengetahuan bagi pembaca.

Jember , November 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN.....	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
PENGESAHAN	vi
SUMMARY	vii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Buah Takokak(<i>Solanum torvum</i>)	4
2.2 Komponen Antibakteri Alami	5
2.2.1 Senyawa Fenolik.....	8
2.2.2 Alkaloid.....	8
2.2.3 Terpenoid	9
2.3 Metode Pengujian Antibakteri.....	9
2.3.1 Pengujian Antibakteri secara Difusi Agar	9
2.3.2 Pengujian Antibakteri secara Dilusi Cair.....	10
2.4 Bakteri Patogen	11
2.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	11

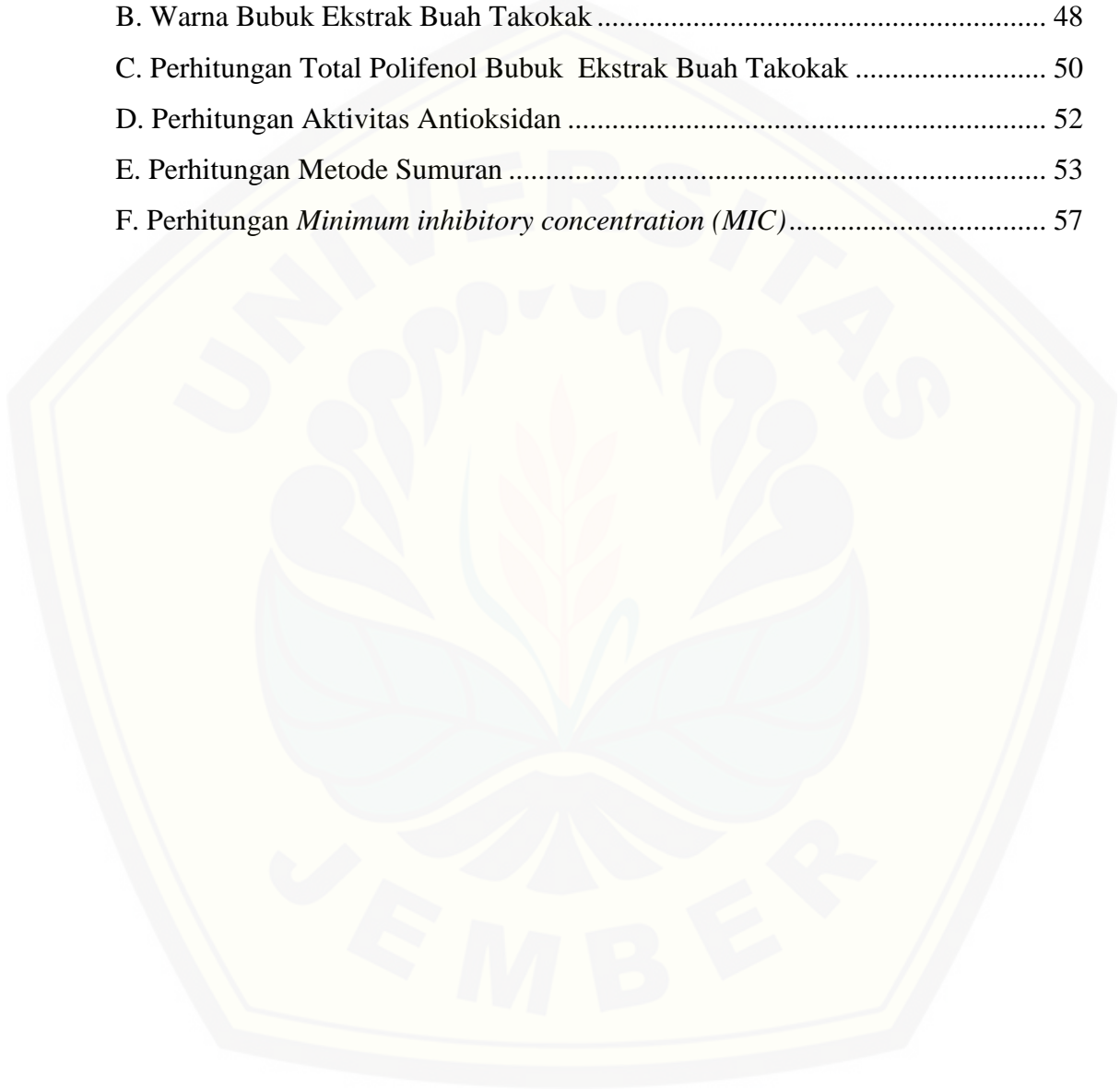
2.4.2	<i>Eschericia coli</i>	11
BAB 3. METODE PENELITIAN		13
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2	Bahan dan Alat Penelitian	13
3.2.1	Bahan Penelitian	13
3.2.2	Alat Penelitian.....	13
3.3	Pelaksanaan Penelitian	14
3.3.1	Rancangan Penelitian.....	14
3.3.2	Prosedur Pengamatan.....	18
3.4	Analisis Data	22
BAB 4. PEMBAHASAN		23
4.1	Pemilihan Metode Ekstraksi	23
4.2	Warna Bubuk Ekstrak Buah Takokak	25
4.3	Total Polifenol Bubuk Ekstrak Buah Takokak	27
4.4	Aktivitas Antioksidan Bubuk Ekstrak Buah Takokak	28
4.5	Zona Hambat Bakteri (Metode <i>Well Diffusion</i>)	30
4.5.1	<i>Bacillus subtilis</i>	31
4.5.2	<i>Eschericia coli</i>	33
4.6	Respon Penghambatan Pertumbuhan Bakteri	35
4.6.1	<i>Bacillus subtilis</i>	35
4.3.2	<i>Eschericia coli</i>	38
BAB 5. PENUTUP		42
5.1	Kesimpulan	42
5.2	Saran	42
DAFTAR PUSTAKA		43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
3.1 Pembuatan bubuk ekstrak buah takokak	14
3.2 Pembuatan bubuk ekstrak buah takokak	175
3.3 Pembuatan bubuk ekstrak buah takokak	17
3.4 Cara pengukuran daerah penghambatan	21
4.1 Total polifenol ekstrak polifenol buah takokak	23
4.2 Total Polifenol Ekstrak Polifenol Buah Takokak	24
4.3 Kecerahan bubuk ekstrak buah takokak.....	25
4.4 Derajat hue bubuk ekstrak buah takokak	26
4.5 Total polifenol ekstrak buah takokak.....	27
4.6 Aktivitas antioksidan ekstrak buah takokak.....	29
4.7 Kromatogram dan spektrum ekstrak buah takokak pelarut etanol 50%	24
4.8 Zona hambat metode sumuran terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.9 Zona hambat metode sumuran terhadap bakteri <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.10 Zona hambat metode sumuran terhadap bakteri <i>Eschericia coli</i>	33
4.11 Zona hambat metode sumuran terhadap bakteri <i>Eschericia coli</i>	34
4.12 Kurva reguler penghambatan ekstrak terhadap <i>Bacillus subtilis</i>	35
4.13 Kurva logaritmik penghambatan ekstrak terhadap <i>Bacillus subtilis</i>	36
4.14 Kurva probit penghambatan ekstrak terhadap <i>Bacillus subtilis</i>	37
4.15 Kurva reguler penghambatan ekstrak terhadap <i>Eschericia coli</i>	38
4.16 Kurva logaritmik penghambatan ekstrak terhadap <i>Eschericia coli</i>	39
4.17 Kurva probit penghambatan ekstrak terhadap <i>Eschericia coli</i>	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penelitian Pendahuluan	47
B. Warna Bubuk Ekstrak Buah Takokak	48
C. Perhitungan Total Polifenol Bubuk Ekstrak Buah Takokak	50
D. Perhitungan Aktivitas Antioksidan	52
E. Perhitungan Metode Sumuran	53
F. Perhitungan <i>Minimum inhibitory concentration (MIC)</i>	57



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Takokak (*Solanum torvum*) merupakan tanaman jenis sayuran yang jarang dikonsumsi masyarakat umum. Takokak ditemukan hampir di seluruh wilayah Indonesia sebagai tanaman liar yang tidak dibudidayakan. Selain di Indonesia, tanaman takokak juga dikenal di beberapa kawasan seperti di Asia Timur, Asia Selatan dan Amerika Latin. Pemanfaatan tanaman takokak di berbagai negara di dunia cukup beragam, diantaranya sebagai bahan makanan, campuran obat-obatan bahkan sebagai pengatur kesuburan tanah (Yousaf *et al.*, 2013). Di daerah Jawa Barat, takokak sering dikonsumsi dalam keadaan mentah sebagai lalapan (Hidayat dan Rodame, 2015). Buah takokak juga dijadikan obat tradisional untuk pengobatan penyakit lambung, pinggang kaku, batuk kronis, koreng, jantung, dan menurunkan tekanan darah tinggi (Sirait, 2009).

Penelitian Chah (2000) melalui uji penapisan fitokimia membuktikan bahwa buah takokak mengandung komponen flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, dan steroid glikosida. Buah takokak muda mengandung komponen steroid jenis solasodin 0,84%, sedangkan buah yang telah menguning mengandung steroid jenis solasonin 0,1%. Buah takokak muda juga mengandung klorogenin, sisologenenon, torvogenin, vitamin A, dan neo-klorogenin (Sirait, 2009).

Menurut penelitian Ambarwati (2007) kandungan flavonoid dalam suatu bahan dapat berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen sampai pada konsentrasi tertentu. Buah takokak merupakan sumber flavonoid dan alkaloid yang mudah ditemui dan memiliki harga relatif terjangkau. Kandungan flavonoid, alkaloid, dan steroid dalam ekstrak buah takokak diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Keberadaan bakteri patogen dalam bahan pangan merupakan salah satu penyebab kerusakan bahan pangan dan keracunan makanan. Konsumsi masyarakat akan produk pangan yang kurang higienis menyebabkan munculnya beragam penyakit salah satunya yaitu keracunan makanan. Berdasarkan data

BPOM (2016) kasus keracunan makanan di Indonesia pada rentangan bulan Januari hingga Maret 2016 menyebabkan sebanyak 1.544 orang korban, 30 orang diantaranya meninggal dunia. Artikel BPOM (2008) menyebutkan bahwa salah satu penyebab keracunan makanan adalah konsumsi makanan yang terkontaminasi oleh mikroorganisme patogen dan menghasilkan toksin yang berbahaya bagi manusia.

Efek negatif yang disebabkan bakteri patogen pada bahan makanan dan tubuh manusia dapat dihindari dengan penggunaan antibiotik sintetis. Penggunaan antibiotik sintetis yang berlebihan dapat mengakibatkan dampak degeneratif pada tubuh. Data BPOM (2015) pada tahun 2014 hampir seperempat jumlah obat yang menimbulkan efek samping berasal dari golongan antibiotik. Efek samping yang ditimbulkan antibiotik sintesis membuka fikiran masyarakat untuk beralih pada bahan-bahan alami.

Buah takokak merupakan salah satu bahan alami yang potensial untuk dikembangkan sebagai antibakteri. Kandungan senyawa bioaktif dalam buah takokak dapat diekstrak dan dimanfaatkan sebagai antibakteri alami. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian terkait aktivitas antibakteri ekstrak buah takokak sebagai alternatif pangan fungsional dan sediaan alami terapi penyembuhan terhadap efek negatif yang disebabkan bakteri patogen.

1.2 Perumusan Masalah

Buah takokak sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai antibakteri alami. Kandungan komponen flavonoid, steroid, dan alkaloid dalam buah takokak diharapkan dapat berperan sebagai antibakteri. Senyawa aktif dalam buah takokak perlu diekstrak untuk mengetahui konsentrasi penghambatan yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Ekstraksi senyawa bioaktif dalam buah takokak dilakukan menggunakan pelarut yang sesuai. Senyawa aktif dalam buah takokak merupakan senyawa polar yang dapat diekstrak menggunakan pelarut polar pula.

Etanol merupakan salah satu jenis pelarut semi polar yang umum digunakan dalam prosedur ekstraksi berbagai senyawa bioaktif dalam suatu

bahan. Penggunaan etanol sebagai pelarut senyawa bioaktif dalam bahan pangan sangat disarankan karena etanol bersifat food grade. Pada konteks yang berbeda, penggunaan etanol saat ini dalam bahan pangan juga mulai dikurangi seiring dengan kesadaran masyarakat akan konsumsi pangan halal. Menurut Stobiecki (2006), campuran etanol dan air dengan berbagai rasio dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa flavonoid dalam jaringan tumbuhan salah satunya buah takokak. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui rasio air dan etanol yang paling efektif untuk mengekstrak senyawa flavonoid dalam buah takokak dan selanjutnya dimanfaatkan sebagai antioksidan dan antibakteri. Pengujian antibakteri dilakukan secara *in vitro* yang diwakili *Bacillus subtilis* dari jenis bakteri gram positif dan *Escherichia coli* dari jenis bakteri gram negatif.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut,

- a. mengetahui konsentrasi pelarut yang tepat untuk mengekstrak senyawa bioaktif ekstrak buah takokak,
- b. mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak buah takokak, dan
- c. mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak buah takokak.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai ekstrak buah takokak sebagai sumber antioksidan dan antibakteri alami.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Buah Takokak(*Solanum torvum*)

Tanaman takokak merupakan salah satu tanaman obat tradisional untuk pengobatan penyakit lambung, pinggang kaku, batuk kronis, koreng, jantung, dan menurunkan tekanan darah tinggi. Bagian tanaman yang digunakan sebagai obat adalah akar, daun, dan buah. Tanaman ini termasuk tanaman perdu yang tumbuh tegak, tinggi tanaman sekitar 3 m. Batang bulat, berkayu, bercabang, berduri jarang, dan percabangan simpodial berwarna putih kotor. Daun tunggal, berwarna hijau, tersebar, berbentuk bulat telur, tepi rata, ujung meruncing, dan panjang sekitar 27- 30 cm dan lebar 20 – 24 cm, pertulangan menyirip dan ibu tulang berduri. Buah berbentuk buni dan bulat, apabila masih muda berwarna hijau setelah tua berwarna jingga. Buah berbiji pipih, kecil, licin, berwarna kuning pucat, berakar tunggang, dan berwarna kuning pucat. Buah pertama takokak dapat dipanen setelah tanaman berumur sekitar 3 – 4 bulan dari waktu tanam, buah yang dipetik biasanya adalah buah yang hampir tua (Sirait 2009). Bentuk buah takokak dapat dilihat pada **Gambar 2.1**



Gambar 2.1. Buah takokak (Dokumentasi pribadi, 2016)

Hasil beberapa penelitian menyebutkan bahwa takokak memiliki aktivitas antimikroba yang cukup baik. Sivapriya *et al.*, (2011) menunjukkan bahwa jumlah kandungan metabolit, seperti polifenol dan flavonoid pada ekstrak kulit buah takokak, berkaitan erat dengan efektivitas penghambatan bakteri. Penelitian lain

menunjukkan bahwa ekstrak metanolik takokak memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri-bakteri patogen. Dari hasil beberapa penelitian dapat diketahui bahwa aktivitas antibakteri dari tanaman takokak lebih efektif terhadap bakteri gram positif dibandingkan bakteri gram negatif (Yousaf *et al.*, 2013). Walaupun penelitian mengenai aktivitas antibakteri pada tanaman takokak telah banyak dilakukan, namun hingga saat ini penelitian yang dilakukan untuk mengetahui komponen yang berperan sebagai antibakteri dari ekstrak buah takokak belum banyak dilakukan.

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi menggunakan pelarut cair atau gas yang melarutkan benda cair, padat, atau gas yang menghasilkan sebuah larutan melalui suatu pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya. Menurut hukum distribusi atau partisi dapat diketahui bahwa zat-zat tertentu lebih mudah larut dalam pelarut-pelarut tertentu yang dipengaruhi oleh konsentrasi iod, konstanta dielektrik, dan kepolaran. Pelarut merupakan cairan yang mampu melarutkan zat lain yang umumnya berbentuk padatan tanpa mengalami perubahan kimia. Dalam bentuk cairan dan padatan, tiap molekul saling terikat akibat adanya gaya tarik menarik antar molekul, gaya tarik menarik tersebut akan mempengaruhi pembentukan larutan. Apabila terdapat zat terlarut dalam suatu pelarut, maka partikel zat terlarut tersebut akan menyebar ke seluruh pelarut. Hal ini menyebabkan bentuk zat terlarut menyesuaikan dengan bentuk pelarutnya (Setiono, 1985).

Larutan terbentuk dari campuran zat-zat yang homogen, dimana pelarut memiliki komponen dengan jumlah yang lebih banyak daripada zat terlarut. Kemudahan partikel zat terlarut menggantikan molekul pelarut bergantung pada kekuatan relatif dari interaksi antara pelarut-pelarut, interaksi antara zat terlarut-zat terlarut, dan interaksi antara pelarut-zat terlarut. Jika tarik menarik zat terlarut-pelarut lebih kuat daripada tarik menarik pelarut-pelarut dan tarik menarik zat terlarut-terlarut, maka proses pelarutan akan berlangsung, proses ini disebut reaksi eksoterm. Jika interaksi zat terlarut-pelarut lebih lemah daripada interaksi pelarut-

pelarut dan interaksi zat-zat terlarut maka proses ini disebut reaksi endoterm (Setiono, 1985).

Biasanya pelarut yang digunakan untuk melarutkan suatu zat adalah air. Ada beberapa hal yang memungkinkan pelarut selain air digunakan seperti melarutkan basa kuat dalam air yang akan membuat basa kuat bereaksi dengan air memproduksi OH⁻. Pelarut organik merupakan pelarut yang umumnya mengandung atom karbon dalam molekulnya. Dalam pelarut organik, zat terlarut didasarkan pada kemampuan koordinasi dan konstanta dielektriknya. Pelarut organik dapat bersifat polar dan non-polar bergantung pada gugus kepolaran yang dimilikinya. Pada proses kelarutan dalam pelarut organik, biasanya reaksi yang terjadi berjalan lambat sehingga perlu energi yang didapat dengan cara pemanasan untuk mengoptimalkan kondisi kelarutan. Larutan yang dihasilkan bukan merupakan konduktor elektrik. Contoh pelarut organik adalah alkohol, eter, ester, etil asetat, keton, dan sebagainya (Agoes, 2007).

Pelarut dengan nilai permitivitas statis relatif (ϵ_r) lebih besar dari 15 (seperti kutub atau polarisasi) dapat dibagi menjadi protik dan aprotik. Pelarut protik melarutkan anion dengan kuat (larutan bermuatan negatif) melalui ikatan hidrogen. Air termasuk pelarut protik polar. Dalam reaksi kimia penggunaan polar protik pelarut mendukung mekanisme reaksi SN1. Reaksi SN1 adalah sebuah reaksi substitusi dalam kimia organik. SN1 adalah singkatan dari substitusi nukleofili dan "1" memiliki arti bahwa tahap penetapan laju reaksi ini adalah reaksi molekul tunggal. Reaksi ini melibatkan sebuah zat antara karbokation dan umumnya terjadi pada reaksi alkil halida sekunder ataupun tersier, atau dalam keadaan asam yang kuat, alkohol sekunder dan tersier (Stobiecki, 2006).

Metode dasar dari ekstraksi adalah maserasi dan perkolasi. Biasanya metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna. Sifat dari bahan merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes, 2007).

metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

2.3 Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron (electron donors) dan secara biologis antioksidan merupakan senyawa yang mampu mengatasi dampak negatif oksidan dalam tubuh seperti kerusakan elemen vital sel tubuh (Kanisus, 2007). Keseimbangan antara oksidan dan antioksidan sangat penting karena berkaitan dengan kerja fungsi sistem imunitas tubuh, terutama untuk menjaga integritas dan berfungsinya membran lipid, protein sel, dan asam nukleat, serta mengontrol transduksi signal dan ekspresi gen dalam sel imun. Produksi antioksidan di dalam tubuh manusia terjadi secara alami untuk mengimbangi produksi radikal bebas. Antioksidan tersebut kemudian berfungsi sebagai sistem pertahanan terhadap radikal bebas, namun peningkatan produksi radikal bebas yang terbentuk akibat faktor stress, radiasi UV, polusi udara dan lingkungan mengakibatkan sistem pertahanan tersebut kurang memadai, sehingga diperlukan tambahan antioksidan dari luar.

Antioksidan di luar tubuh dapat diperoleh dalam bentuk sintesis dan alami. Antioksidan sintetis seperti *buthylatedhydroxytoluene* (BHT), *buthylated hidroksianisol* (BHA) dan *ters-butylhydroquinone* (TBHQ) secara efektif dapat menghambat oksidasi. Namun, penggunaan antioksidan sintetis dibatasi oleh aturan pemerintah karena, jika penggunaannya melebihi batas justru dapat menyebabkan racun dalam tubuh dan bersifat karsinogenik, sehingga dibutuhkan antioksidan alami yang aman. Salah satu sumber potensial antioksidan alami adalah tanaman karena mengandung senyawa flavonoid, klorofil dan tanin (Lie dan Jin, 2012). Antioksidan ini menghambat pembentukan senyawa oksigen reaktif dengan cara pengelatan metal, atau dirusak pembentukannya. Prinsip kerja sistem antioksidan non enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan menangkap radikal tersebut, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler.

2.4 Komponen Antibakteri Alami

Antibakteri merupakan obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Antibiotik ialah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroba, terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba lain. Banyak antibiotik yang dibuat secara semisintetik atau sintetik penuh. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai *aktivitas bakteriostatik*; dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai *aktivitas bakterisid* (Pratiwi, 2008).

Komponen metabolit dari tanaman berpotensi sebagai bahan pengembangan obat-obatan. Salah satu pengembangan obat-obatan dari tanaman adalah sebagai antibiotik (Verpoorte 2000). Aktivitas antibiotik dari komponen metabolit tanaman tidak terlepas dari aktivitas komponen tersebut sebagai antibakteri. Beberapa komponen metabolit yang telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri dijelaskan sebagai berikut.

2.4.1 Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik merupakan istilah bagi substansi tanaman yang umumnya mengandung cincin aromatik yang berikatan dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Fenolik banyak terdapat di vakuola sel dan bersifat larut air karena umumnya senyawa ini berikatan dengan gugus gula seperti glukosida. Senyawa fenol sederhana, asam fenolat, dan flavonoid merupakan senyawa fenolik yang diketahui memiliki aktivitas antimikroba (Cowan 1999).

2.4.2 Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu komponen metabolit yang telah digunakan sebagai bahan baku obat-obatan. Alkaloid telah diteliti memiliki efek farmakologi termasuk bersifat sitotoksik dan sebagai antiprotozoa, namun masih sedikit yang meneliti tentang aktivitas alkaloid sebagai antibakteri (Karou *et al.*, 2005). Alkaloid merupakan senyawa siklik yang mengandung satu atau dua atom nitrogen yang biasanya merupakan bagian dari struktur siklik tersebut. Jenis

alkaloid yang umum ditemukan dalam tanaman famili *Solanaceae*, yang merupakan famili dari buah takokak khususnya adalah solanin, atropin, dan nikotin. Salah satu jenis alkaloid yang diketahui sebagai antimikroba adalah *berberine*. *Berberine* diduga berpotensi melawan beberapa mikroorganisme seperti plasmodia dan tripanosoma. Mekanisme dari komponen ini berhubungan erat dengan kemampuannya sebagai DNA *intercalator* (Cowan, 1999). DNA *intercalator* adalah senyawa yang dapat berikatan pada struktur DNA sehingga DNA yang seharusnya berbentuk heliks berubah menjadi tidak beraturan.

2.4.3 Terpenoid

Komponen terpen merupakan kelompok metabolit sekunder yang mengandung struktur isopren dalam jumlah banyak. Secara umum, komponen terpen memiliki struktur kimia $C_{10}H_{16}$ dan berada dalam bentuk diterpen (C_{20}), triterpen (C_{30}), tetraterpen (C_{40}), hemiterpen (C_5), dan sesquiterpen (C_{15}). Ketika komponen tersebut mengandung oksigen maka kelompok ini didefinisikan sebagai terpenoid (Cowan 1999). Terpenoid merupakan komponen yang berperan terhadap aroma dan kandungan minyak esensial dari suatu tanaman (Briellmann *et al.*, 2006). Salah satu triterpen glikosida yang memiliki berat molekul tinggi adalah saponin. Ekstrak saponin dari tanaman *Anabasis artadulata* diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14028. Aktivitas antibakteri dari saponin ini lebih baik dibandingkan dengan ekstrak alkaloid dari tanaman yang sama (Maatalah *et al.*, 2012).

2.5 Metode Pengujian Antibakteri

2.5.1 Pengujian Antibakteri secara Difusi Agar

Metode difusi agar diperkenalkan oleh William Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Selanjutnya, metode Kirby-Bauer digunakan untuk menentukan kemampuan bahan antimikrobal (Lay, 1994). Pada uji ini, cakram kertas steril berukuran 6 mm ditetesi ekstrak tanaman dengan konsentrasi tertentu. Beberapa penelitian melakukan penetesan ekstrak tanaman sebelum cakram diletakkan pada

permukaan media yang telah disemai bakteri uji, sedangkan pada penelitian yang lain dilakukan setelahnya. Ketika kertas cakram yang telah jenuh dengan bahan antibakteri berada pada media agar maka bahan antibakteri akan mulai berdifusi ke sekitar media. Laju difusi bahan antibakteri dalam media dipengaruhi oleh berat molekul bahan antibakteri dan kelarutannya dalam media agar (Pratiwi, 2008).

Penghambatan pertumbuhan bakteri oleh bahan antibakteri terlihat sebagai wilayah jernih di sekitar pertumbuhan bakteri. Luasnya wilayah jernih merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri. Luas atau ukuran wilayah hambatan berkaitan dengan kecepatan difusi antibakteri dalam medium. Kecepatan difusi ini harus dipertimbangkan dalam penentuan kemampuan antibakteri (Lay, 1994). Selain itu, ketebalan media juga dapat berpengaruh terhadap luas daerah hambatan karena bahan antibakteri berdifusi secara 3 dimensi, sehingga lapisan media agar yang tipis akan menghasilkan daerah hambatan yang lebih besar daripada lapisan media yang tebal (Amer *et al.*, 2013). Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi luas daerah hambatan antara lain jenis dan kondisi bakteri uji, kepadatan inokulum, jenis media, potensi dari bahan antibakteri, volume bahan antibakteri yang diaplikasikan dan temperatur inkubasi (Nurainy *et al.*, 2008)

2.5.2 Pengujian Antibakteri secara Dilusi Cair

Metode ini mengukur *MIC* (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambat minimum, *MIC*) dan *MBC* (*minimum bactericidal concentration* atau kadar bunuh minimum, *KBM*). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai *MIC*. Larutan yang ditetapkan sebagai *MIC* tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai *KBM* (Pratiwi, 2008).

2.4 Bakteri Patogen

Bakteri patogen merupakan penyebab utama dari kasus keracunan pangan yang masih menjadi masalah serius di berbagai negara. Bakteri patogen yang cukup menyita perhatian terkait kemampuannya mengkontaminasi produk pangan adalah *Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*

2.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis memerlukan suhu optimal dalam pertumbuhannya yakni antara 28 – 38°C. Apabila bakteri tersebut diisolasi dari seorang penderita, suhu optimal yang diperlukan adalah 37 C, pH optimum pertumbuhannya adalah 7,4. Bakteri *Bacillus subtilis* terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori, permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Infeksi *Bacillus subtilis* dapat berupa jerawat, bisul dan luka (Jawetz *et al.*, 2001). *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan kerusakan pada makanan kaleng yang juga dapat mengakibatkan gastroenteritis pada manusia yang mengkonsumsinya. Oleh sebab itu makanan yang disimpan dalam waktu lama perlu dilakukan pengawetan agar tidak membahayakan konsumen (Pratiwi, 2008).

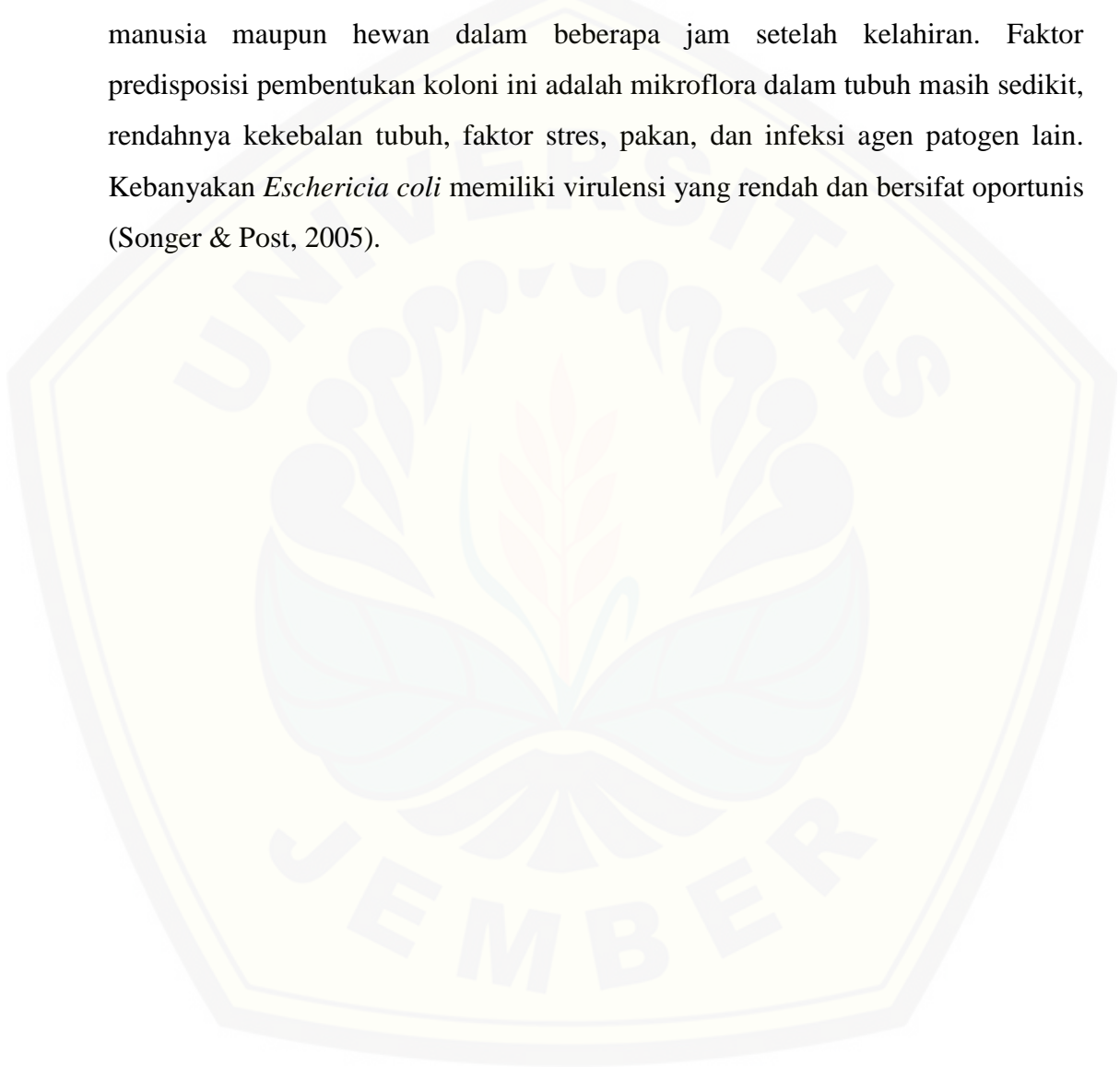
2.4.2 *Eschericia coli*

Eschericia coli merupakan bakteri batang gram negatif dan tidak membentuk spora, serta memiliki kapsul. Bakteri ini juga bersifat fakultatif, dan sering disebut sebagai *facultative intra-cellular parasites*. Dinding selnya terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS) dan tersusun sebagai lapisan-lapisan (Dzen, 2003).

Struktur sel *Eschericia coli* dikelilingi oleh membran sel, terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *Eschericia coli* ditutupi oleh dinding sel berlapis kapsul. Flagela dan pili *Eschericia coli* menjulur dari permukaan sel (Tizard 2004). Tiga struktur antigen utama permukaan yang digunakan untuk membedakan serotipe golongan *Eschericia coli* adalah dinding sel, kapsul dan flagela. Dinding sel *Eschericia coli* berupa lipopolisakarida yang bersifat pirogen dan menghasilkan endotoksin serta diklasifikasikan sebagai antigen O. Kapsul *Eschericia coli* berupa polisakarida yang dapat melindungi membran luar dari fagositik dan sistem komplemen, diklasifikasikan sebagai

antigen K. Flagela *Eschericia coli* terdiri dari protein yang bersifat antigenik dan dikenal sebagai antigen H. Faktor virulensi *Eschericia coli* juga disebabkan oleh enterotoksin, hemolisin, kolisin, 6 siderophor, dan molekul pengikat besi (aerobaktin dan entrobaktin) (Quinn *et al.*, 2002).

Bakteri *Eschericia coli* dapat membentuk koloni pada saluran pencernaan manusia maupun hewan dalam beberapa jam setelah kelahiran. Faktor predisposisi pembentukan koloni ini adalah mikroflora dalam tubuh masih sedikit, rendahnya kekebalan tubuh, faktor stres, pakan, dan infeksi agen patogen lain. Kebanyakan *Eschericia coli* memiliki virulensi yang rendah dan bersifat oportunistik (Songer & Post, 2005).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Teknologi dan Manajemen Agroindustri, dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada bulan Januari sampai Mei 2016.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah buah takokak hijau berdiameter 7 – 10 mm dari sekitar Kabupaten Jember, Aquades, NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), etanol 96%, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 2%, larutan garam fisiologis 0,85%, kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah peralatan gelas, *Shaker waterbath* (Memmert D-91126, Jerman), *rotary evaporator* (Butchi, German) , oven vacuum (Lab-line Instruments), penangas air (Medline MS300HS, German), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China) pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), *blue tip*, *yellow tip*, bunsen, vortex (Medline VM-3000-MD, German), cawan petri, *magnetic stirrer*(Medline MS300HS, German), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), inkubator (Heraeus Inst B6200, Jerman), *colony counter* (Stuart Scientific), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), neraca analitik (Ohaus, USA) dan ose.

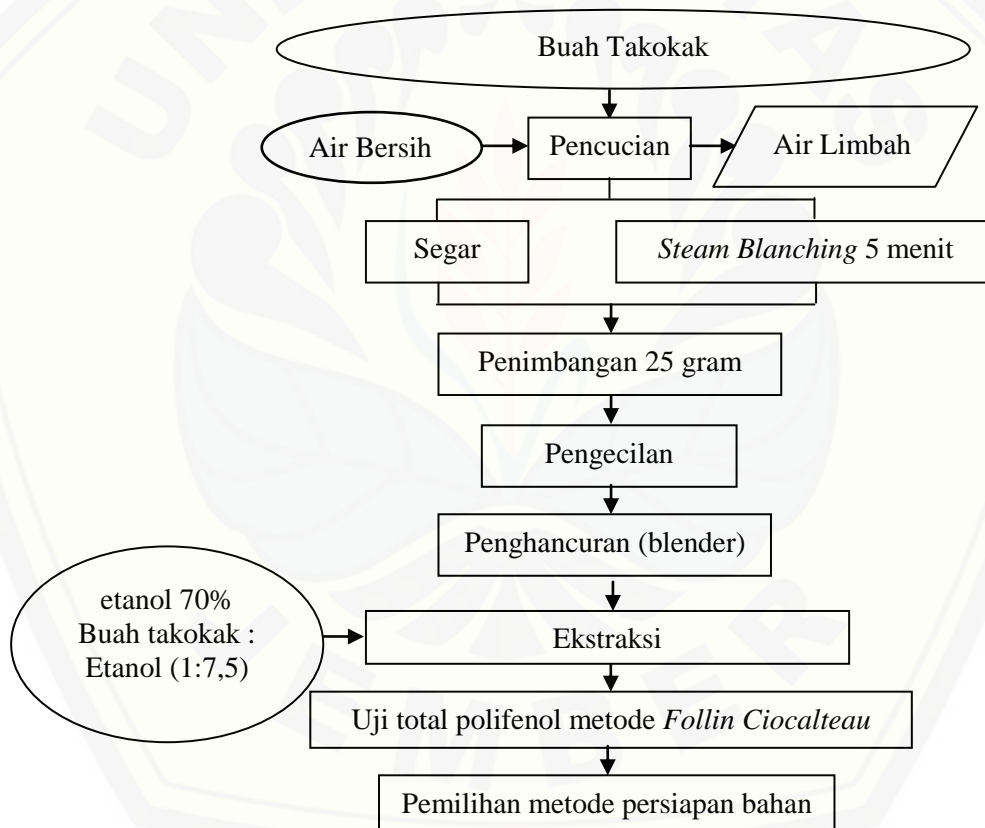
3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dilakukan dalam tiga ulangan yang terdiri dari empat tahap yaitu:

a. Penentuan persiapan bahan dan metode ekstraksi

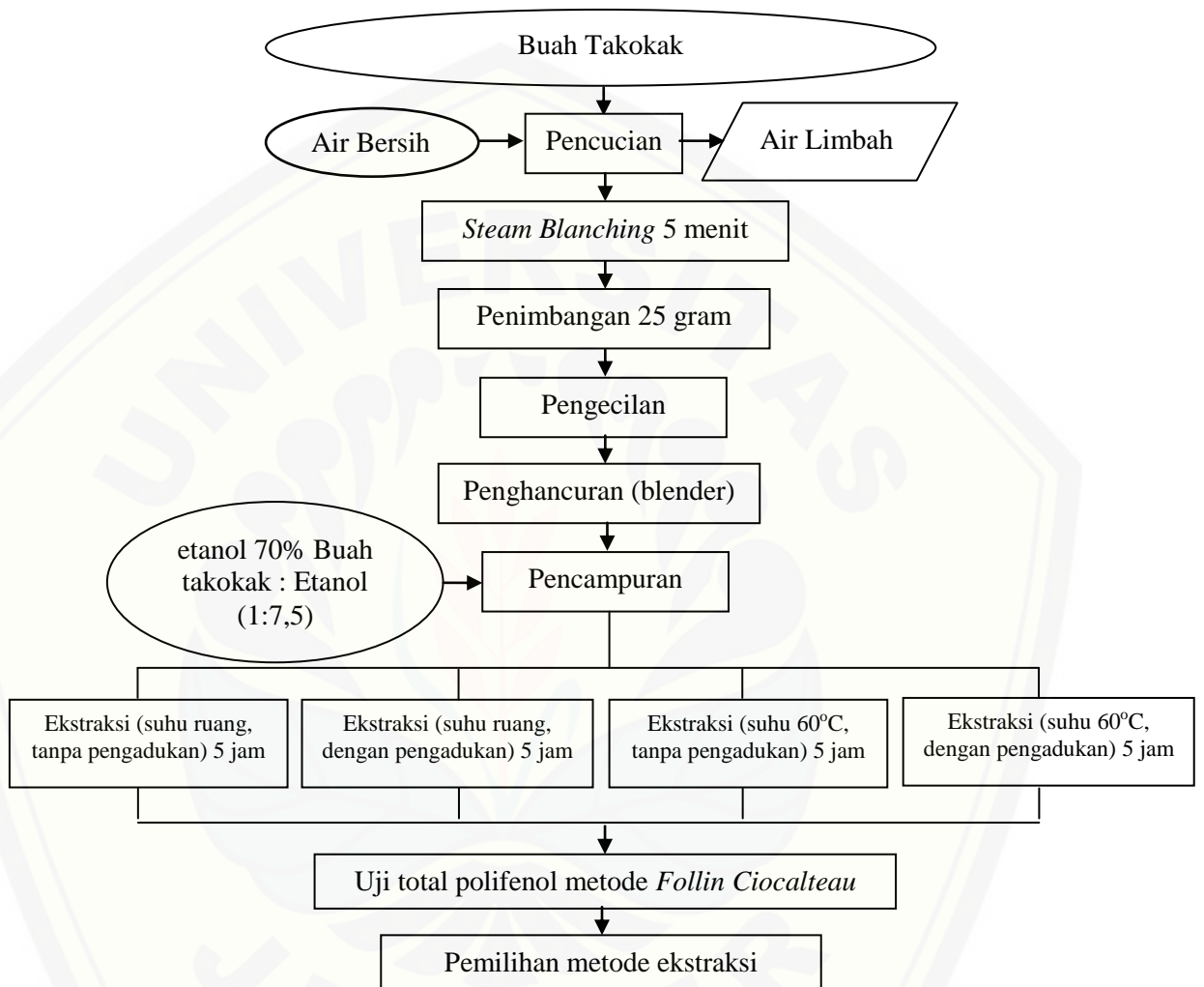
Penelitian tahap pertama adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui persiapan bahan dan metode yang sesuai dalam ekstraksi senyawa bioaktif buah takokak. Pemilihan metode persiapan bahan berdasarkan pengaruh *blanching* terhadap total polifenol sampel. Secara umum prosedur persiapan bahan dapat dilihat pada **Gambar 3.1**



Gambar 3.1 Pembuatan bubuk ekstrak buah takokak

Penelitian pendahuluan I dilakukan untuk mengetahui persiapan sampel yang tepat sebelum dilakukan ekstraksi. Buah takokak dipersiapkan dalam keadaan segar dan telah diblanching. Metode

blanching yang dipilih adalah *steam blanching*, hal ini bertujuan untuk mencegah larutnya senyawa dalam buah takokak jika dilakukan dengan metode *hot water blanching*.



Gambar 3.2 Pembuatan bubuk ekstrak buah takokak

Penelitian pendahuluan II dilakukan untuk mengetahui suhu ekstraksi dan pengaruh pengadukan dalam ekstraksi. Sampel diekstraksi pada suhu ruang dan suhu 60°C. Selanjutnya sampel diekstraksi dengan maserasi dan dengan disertai pengadukan. Hasil penelitian pendahuluan digunakan sebagai prosedur ekstraksi dalam penelitian utama.

b. Pembuatan Bubuk Ekstrak Buah Takokak

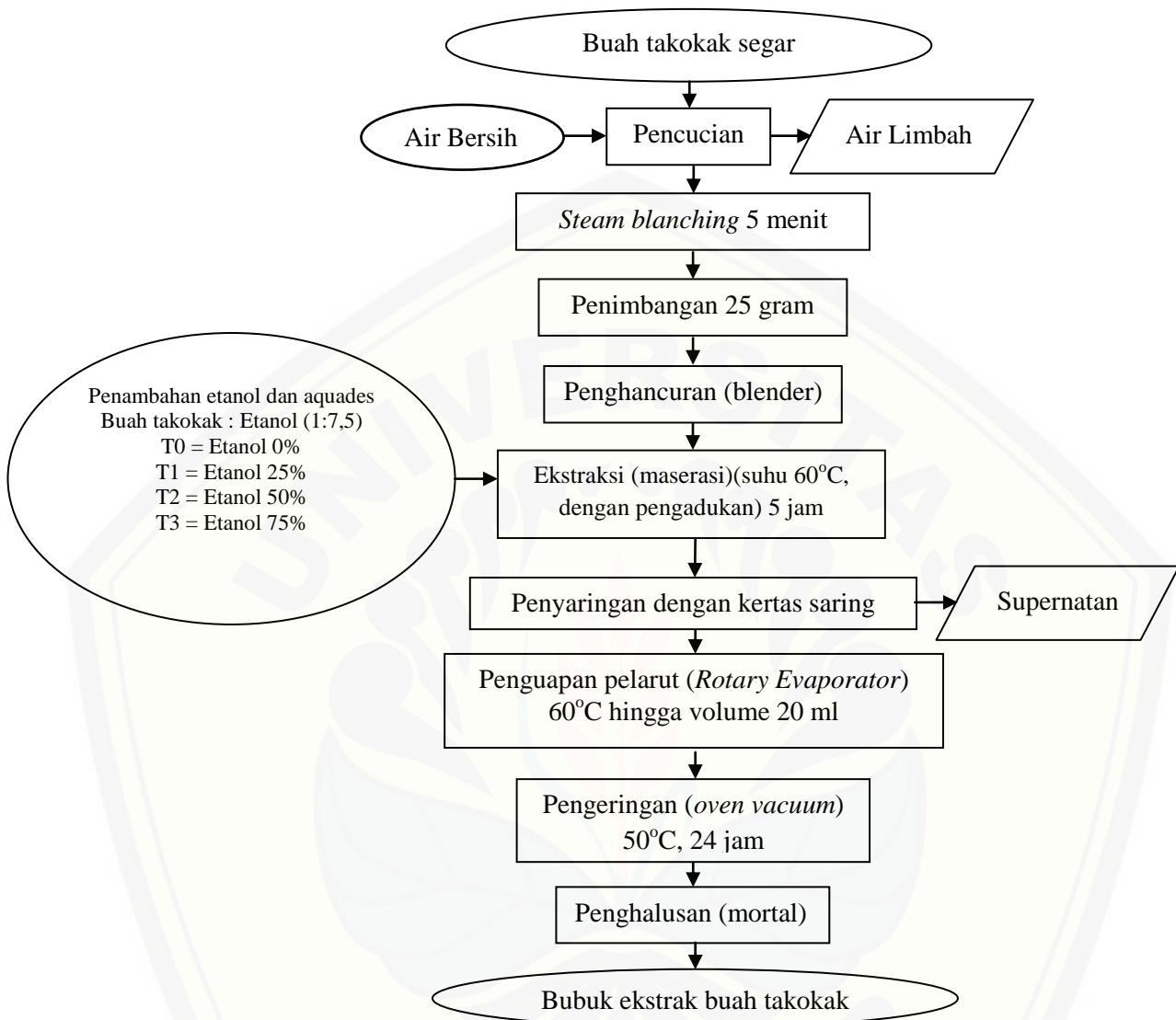
Penelitian tahap kedua adalah pembuatan bubuk ekstrak buah takokak. Prosedur yang dilakukan berdasarkan hasil penelitian tahap pertama pada **Gambar 3.2**

c. Karakterisasi Bubuk Ekstrak Buah Takokak

Penelitian tahap ketiga adalah karakterisasi bubuk ekstrak buah takokak dengan melakukan pengamatan yang meliputi analisis warna serbuk, total polifenol, analisis aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa ekstrak menggunakan LC-MS.

d. Uji Penghambatan Pertumbuhan Bakteri

Pada penelitian tahap keempat dilakukan uji penghambatan pertumbuhan bakteri dengan dua metode yaitu metode difusi sumur dan metode dilusi agar dari bubuk ekstrak buah takokak terhadap pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*. Pada pengujian penghambatan bakteri dilakukan peremajaan bakteri dan pembuatan media terlebih dahulu yang merupakan tahapan persiapan pada uji penghambatan pertumbuhan bakteri.



Gambar 3.3 Pembuatan bubuk ekstrak buah takokak

3.3.2 Prosedur Analisis

a. Warna bubuk ekstrak

Pengukuran warna dilakukan dengan menggunakan *colour reader* Minolta CR-10. Tiap sampel terdiri dari 3 ulangan dan setiap ulangan dilakukan pengukuran warna pada lima titik yang berbeda, dikonversi dan dirata-rata. Lensa diletakkan pada porselen standar secara tegak lurus dan menekan tombol “Target” maka muncul nilai pada layar (L, a, b) yang merupakan nilai standarisasi kemudian menekan kembali tombol “Target” sehingga muncul nilai dE, dL, da, dan db. Pada colour reader yang diamati adalah nilai kecerahan warna (L).

Dimana : $L = 0$ (gelap)

$L = 100$ (cerah)

$a^* = \text{standar } a + da$

$b^* = \text{standar } b + db$

$H = \arctan \frac{a^*}{b^*}$

$H = 180 - \tan^{-1} b/a$ (jika a positif dan b positif)

$= 180 + \tan^{-1} b/a$ (jika a negatif dan b positif)

$= 180 - \tan^{-1} b/a$ (jika a negatif dan b negatif)

b. Total Polifenol (Metode *Folin-Ciocalteu*)

Pembuatan kurva standard untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat dalam metanol (5,4 mg galid acid/5 ml). Larutan asam galat di *stirrer* selama 5-10 menit dan ditera sampai mencapai 10 ml. Siapkan 9 tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan asam galat dengan jumlah pengambilan (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 dan 400 μ l). Lalu ditambahkan 0,8 ml *reagen Follin-Ciocalteu* yang telah diencerkan 10 kali pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian *divortex* dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,8 ml larutan Na_2CO_3 7% dan 0,72 ml aquades (total volume 4 ml). Kemudian tabung reaksi yang berisi larutan kurva standart tersebut dibungkus/ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan ditempat gelap

selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa total polifenol ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode *Follin-Ciocalteu*. Pada penelitian ini sampel yang diuji berbentuk serbuk. Pada sampel serbuk sebanyak 0,02 gram sampel dilarutkan dalam 10 ml aquades lalu di *vortex*. Sebanyak 0,04 ml sampel ditambahkan 0,8 ml *reagen Follin-Ciocalteu* yang telah diencerkan 10 kali dan biarkan 5 menit, selanjutnya tambahkan 0,8 ml larutan Na_2CO_3 7% lalu di *vortex* dan diamkan selama 120 menit dengan cara ditutup semua lapisan tabung reaksi menggunakan aluminium foil. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standard asam galat yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standard asam galat, sehingga diperoleh nilai (x) yang kemudian dikali faktor pengenceran dan konversi berat molekul asam galat.

c. Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*))

DPPH adalah salah satu senyawa radikal bebas yang memiliki nitrogen tidak stabil dengan absorbansi maksimal pada panjang gelombang 517 nm dan berwarna biru gelap. Sebanyak 0,02 gram serbuk ekstrak buah takokak dilarutkan dalam 10ml etanol. Disiapkan DPPH yang dilarutkan dalam etanol p.a konsentrasi 0,1576 mg/ml. Sampel yang diencerkan diambil 0,1 ml ditambahkan ke tabung reaksi, ditambahkan 0,9 ml etanol dan 2 ml DPPH. Selanjutnya di *vortex* dan didiamkan selama 15 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517nm. Blanko dibuat dengan cara mengganti sampel dengan etanol. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

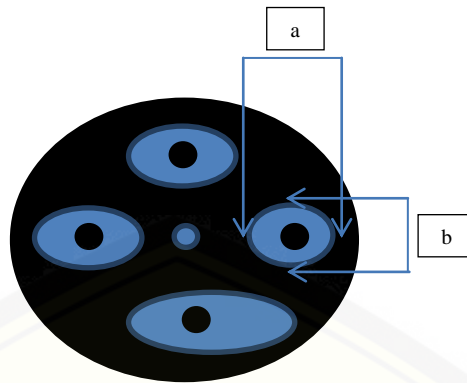
d. Identifikasi senyawa ekstrak (LC-MS)

Sampel yang memiliki total polifenol paling tinggi diidentifikasi menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectra*). Sampel di injeksi pada konsentrasi 1000 ppm, sebanyak 5µl pada alat Shimadzu LC-MS 2020 dengan kondisi fase gerak gradient pada menit ke 0 *mobile phase* B 0%, pada menit ke-60 *mobile phase* B 100%. Column yang digunakan ada dua, pada column 1 yaitu Shim-Pack GVP-ODS (5Lx2,0), column 2 yaitu Shim-Pack VP-ODS (250Lx4,6). *Mobile phase* A yaitu water for MIC acid 0,1%, *mobile phase* B yaitu acetonitrile. Kecepatan alir sampel sebesar 0,3ml/menit pada suhu 30°C. Data yang dihasilkan berupa *scan* berat molekul setiap zat yang terkandung di dalam sampel

e. Uji penghambatan serbuk ekstrak buah takokak terhadap pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*

1) Metode Difusi Sumur

Sebanyak 12 ml media (NA) yang masih cair dituang kedalam cawan petri yang telah berisi 200µl suspensi mikroba (pengenceran 10^{-5}) secara aseptis dan dicampur perlahan. Setelah padat dibuat 5 sumuran dengan diameter 5 mm. Setiap sumur diisi dengan 25µl ekstrak dengan berbagai berbagai penambahan polifenol yaitu 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, dan 80 mg/ml, kemudian dibiarkan 45 menit untuk berdifusi, selanjutnya diinkubasi 37°C selama 12 dan 24 jam. Diameter zona hambatan yang terbentuk diukur dengan menggunakan mistar. Daerah inhibisi (daerah yang jernih) diukur dan dicatat. Pengukuran daerah inhibisi yaitu dengan membalikkan cawan sehingga terlihat daerah hambatan yang tampak transparan. Cara pengukuran dapat disajikan pada **Gambar 3.4**.



Gambar 3.4 Cara pengukuran daerah penghambatan

2) Metode Dilusi Agar

Metode dilusi agar dilakukan dengan cara penentuan nilai *minimum inhibitory concentration (MIC)* dan *inhibitory concentration 50 (IC₅₀)* ekstrak buah takokak bubuk terhadap bakteri yang terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut:

a. Tahap persiapan sampel

Pada tahap persiapan sampel, peralatan dan bahan disterilisasi (kecuali ekstrak buah takokak bubuk). Selanjutnya pembuatan larutan uji yaitu pembuatan stok larutan ekstrak buah takokak dengan cara melarutkan ekstrak buah takokak dalam akuades steril. Kemudian larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi 0 mg/ml; 2 mg/ml; 4 mg/ml; 8 mg/ml; 16 mg/ml; 32 mg/ml. Setelah itu dilakukan penambahan DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) masing-masing sebanyak 20 μ l dan larutan fisiologis berturut-turut adalah 980 μ l, 930 μ l, 880 μ l, 780 μ l, 580 μ l, dan 180 μ l. Pada saat akan dilakukan uji ditambah dengan media NA yang masih hangat dengan perbandingan 1:4. Pembuatan kontrol negatif 0% yaitu hanya menggunakan DMSO 20 μ l yang ditambah dengan larutan fisiologis 980 μ l dan media NA yang masih hangat.

Selain itu disiapkan pula suspensi bakteri sebanyak 1 ose *Eschericia coli* atau *Bacillus subtilis* dari kultur stok agar miring NA diambil menggunakan ose steril kemudian dimasukkan kedalam endorff steril

yang berisi 1 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml media NB yang telah diinkubasi dengan 9 ml NaCl 0,85% sampai pengenceran 10^{-5}

b. Tahap pengujian

Penentuan *MIC* dan *IC*₅₀ pada bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis* dilakukan dengan metode dilusi agar dengan hitung koloni. Masing-masing media NA yang masih hangat ditambahkan pada larutan uji dengan perbandingan 4:1. Campuran media dan larutan uji yang telah divortex dimasukkan dalam cawan petri yang telah berisi 200µl suspensi mikroba (pengenceran 10^{-5}) diratakan dan dibiarkan memadat kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

c. Tahap pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh pada cawan petri. *MIC* merupakan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal (99%) yaitu hampir tidak ada mikroba dalam cawan petri yang tumbuh, sedangkan *IC*₅₀ merupakan konsentrasi yang mampu memberikan 50% penghambatan dari total koloni yang terdapat pada kontrol negatif.

3.4 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dibahas secara deskriptif disusun dalam tabel dan dimuat dalam bentuk grafik kemudian diinterpretasikan sesuai dengan pengamatan yang ada.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstraksi senyawa bioaktif antibakteri buah takokak paling tepat dilakukan menggunakan solven etanol konsentrasi 50%. Ekstrak buah takokak terbukti memiliki sifat antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*. Uji difusi sumuran menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak buah takokak terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen adalah pada 80 mg/ml menghasilkan zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* 221,50 mm² dan 338,60 mm² untuk *Eschericia coli* pada inkubasi 24 jam. Konsentrasi penghambatan untuk *Bacillus subtilis* lebih besar jika dibandingkan konsentrasi penghambatan *Eschericia coli*. Kurva probit *Bacillus subtilis* dengan ekstrak buah takokak menghasilkan *IC*₅₀ sebesar 5,69 mg/ml dan *MIC* sebesar 26,03 mg/ml sedangkan pada Kurva probit *Eschericia coli* dengan ekstrak buah takokak menghasilkan *IC*₅₀ sebesar 5,59 mg/ml dan *MIC* sebesar 17,78 mg/ml.

5.2 Saran

Hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar penelitian berikutnya untuk diaplikasikan pada produk pangan fungsional maupun sebagai pengawet al.,ami. Senyawa bioaktif dari ekstrak buah takokak bersifat antimikrostatik yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri pembusuk daging (*Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*).

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati. 2007. Efektivitas Zat Antibakteri Biji Mimba (*Azadirachta indica*) untuk Menghambat Pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Bacillus subtilis*. Surakarta. *Jurnal Biodiversitas*, Vol. 8: 320-325
- Amer, Mady, Yusef, dan Sabry. 2013. Determination of decimal reduction time (D-value) of cheMICal agents used in hospitals for killing airborne isolated bacteria. *African Journal of MICRobiology Research*, Vol. 7(26):3321-3330
- Andarwulan N, Kurniasih D, Apriady RA, Rahmat H, Rotoc AV, Bolling BW. 2012. Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *J Func F*, Vol. 1(1) :96-103
- Atanassova M, Georgieva S, Ivancheva K. 2011. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of CheMICal Technology and Metallurgy*, Vol. 46(1): 81-88.
- BPOM. 2014. Profil Laporan Efek Samping Obat Tahun 2013. *Buletin Berita MESO*. Vol. 32(1): 9
- Brielmann. 2006. *Natural Product from Plants*. Boca Raton. US: Taylor & Francis Group
- Brooks, G. F., Butel, J.S., dan Morse, S. A. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika
- Chah, K. F., Muko, K. N., dan Oboegbulem, S. I. 2000. AntiMICRobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia* Vol. 71: 187-189
- Cowan, M. M. 1999. Plant product as antiMICRobial agents. *Clin MICr Rev*, Vol. 12 (4): 564-568
- Dzen, Sjoekoer, M., dan Morse, S. A. 2003. *Bakteriologik Medik*. Malang: Bayumedia.

- Gangopadhyay, Rai, Brunton, Gallagher, dan Hossain. 2016. Antioxidant-guided Isolation and Mass Spectrometric Identification Of The Major Polyphenols in Barley (*Hordeum vulgare*) grain. *Food Chemistry*, Vol. 210: 212-220
- Gaspersz dan Vincent. 1991. *Analisis Sistem Terapan Berdasarkan Pendekatan Teknik Industri*. Bandung: Tarsito
- Harborne, J. B. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan oleh Padmawinata dan Soediro. 1973. Bandung: Penerbit ITB.
- Hidayat dan Napitupulu. 2015. *Kitab Tumbuhan Obat*. Jakarta: Penebar Swadaya Grup
- Jadhav VM, Kamble SS, Kadam VJ. 2009. Herbal Medicine: Syzgium cumini. A Review. *Journal of Pharmacy Research*, Vol.2(8): 1212-1219.
- Jawetz, Fortas, dan Lay 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medical
- Karou, Savadogo, Canini, Yameogo, Montesano, Simpure, Colizzi, dan Traore. 2005. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *Afr J Biotech*, Vol.4 (12):1452-1457.
- Koppula, S., Ammani, K., dan 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.
- Lay BW. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Rajawali Pers.
- Maatalah, Bouzidi, Bellahouel, Merah, Fortas, Soulimani, Saidi, dan Dourdour. 2012. AntiMICRobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulata*. *J of Bio and Phar R*, 3(3):54-57.
- Nurainy, F., Rizal, S., dan Yudiantoro. 2008. Pengaruh Konsentrasi Kitosan Terhadap Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Difusi Agar (Sumur). *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*, Vol.13(2):117-125
- Perez-Amador. Ocotero, V. M., Castaneda, J. M. G., dan Esquinca, A. R. G. 2007. Alkaloids in *Solanum torvum* Sw (Solanaceae). *Int J Exp Bot*, Vol.1(76) : 39-45.

- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga
- Quinn, Dunlop, R. H., dan Williams, D. J. 2002. *Veterinary MICRobiology and MICRobial Disease*. USA: Blackwell Science
- Rahayu, T., dan Tuti R. 2009. Uji Antijamur Kombucha Coffe terhadap *Candida albicans* dan *Tricophyton mentagrophytes*. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 10(1):10-17
- Schiller. 2010. Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A Report from the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*, Vol.23(7):685-713.
- Sirait N. 2009. Terong Cepoka (*Solanum torvum*) Herba yang Berkhasiat sebagai Obat. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, Vol.15(3):10-12
- Sivapriya M, Dinesha R, Harsha R, Gowda SST, Srinivas L. 2011. Antibacterial activity of different extracts of sundakai (*Solanum torvum*) fruit coat. *Int J Bio Chem*, Vol.5(1):61-67.
- Songer, J.G. dan Post, K.W. 2005. *Veterinary MICRobiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*, California: Elsvier Saunders
- Stobiecki. 2006. Isolation and Identification of Flavonoids. *The Science of Flavonoid*. Ohio: Springer Science Business Media
- Syamsuni, H. A. 2006. *Ilmu Resep*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Tizard IR. 2004. *Veterinary Immunology an Introduction*. 7 th Ed. USA: Saunders.
- Verpoorte R. 2000. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Dordrecht: Kluwer AcadeMIC Publishers
- Winn Jr, Washington C., et al., 2006, *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic MICRobiology*, 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins
- Yousaf, Z., Wang, Y., dan Baydoun, E. 2013. Phytochemistry and Pharmacological Studies on *Solanum torvum* Swartz. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, Vol.3(04):152-160



Lampiran A. Penelitian Pendahuluan

buah takokak disiapkan segar dan sudah diblanching, lalu diekstrak menggunakan etanol 70% dan di aduk menggunakan strirrer selama 5 jam

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	konstanta	x	konesentrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg GAE/ml)	rata	stdev
Segar	1	0,594	0,0003	0,1358	1527,333333	76366,66667	0,17012	12,9915	12,96314	0,040098
	2	0,592	0,0003	0,1358	1520,666667	76033,33333	0,17012	12,93479		
Blanching	1	0,773	0,0003	0,1358	2124	106200	0,17012	18,06674	18,03839	0,040098
	2	0,771	0,0003	0,1358	2117,333333	105866,6667	0,17012	18,01004		

buah takokak yang telah diblanching, lalu diekstrak menggunakan etanol 70% dan di maserasi selama 24 jam pada suhu ruang dan suhu 60C

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	konstanta	X	konesentrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg GAE/ml)	rata	stdev
E1S1	1	0,775	0,0003	0,1358	2130,666667	106533,3333	0,17012	18,12345	18,12345	0
	2	0,775	0,0003	0,1358	2130,666667	106533,3333	0,17012	18,12345		
E1S2	1	0,819	0,0003	0,1358	2277,333333	113866,6667	0,17012	19,371	19,34264	0,040098
	2	0,817	0,0003	0,1358	2270,666667	113533,3333	0,17012	19,31429		
E2S1	1	0,795	0,0003	0,1358	2197,333333	109866,6667	0,17012	18,69052	18,64799	0,060147
	2	0,792	0,0003	0,1358	2187,333333	109366,6667	0,17012	18,60546		
E2S2	1	0,964	0,0003	0,1358	2760,666667	138033,3333	0,17012	23,48223	23,59564	0,160391
	2	0,972	0,0003	0,1358	2787,333333	139366,6667	0,17012	23,70906		

Lampiran B. Warna Bubuk Ekstrak Buah Takokak

PERLAKUAN	U	NILAI A					RATA2	NILAI B					RATA2	NILAI L					RATA2
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
T0	1	2,4	2,4	3,7	2,8	3,3	2,92	3,7	3	8,1	5	3,7	4,7	44,3	44,1	44,1	42,6	45,3	44,08
	2	2,2	4,1	1	4	5,1	3,28	3,5	5,6	8,4	7,8	5,5	6,16	42,2	43,1	36,1	42,8	42,7	41,38
	3	2,4	2,2	2,7	3,5	4,1	2,98	4	5,2	3,1	5,4	5	4,54	42,9	43,1	42,8	44,2	44,2	43,44
T1	1	2,5	2,5	2,9	2,4	2,9	2,64	4,4	6,7	7,8	7,5	8,1	6,9	48,3	45,3	49,3	46,8	46,5	47,24
	2	3	2,1	2,4	2,2	2,6	2,46	4,3	4,5	8	7,7	8,3	6,275	47,5	44,3	44,3	45,9	47,2	45,84
	3	2,2	2,2	4	3,1	2,1	2,72	6,5	5,3	6,7	7,2	7,1	6,56	44,2	45,2	47,3	47,3	47,8	46,36
T2	1	2,9	3,3	4,1	3	3,5	3,36	3,8	4,4	3,6	3,5	4,7	4	47,3	48,4	48,8	49,2	49,2	48,58
	2	4,2	2,8	3,4	3,1	3,5	3,4	4,2	4,2	3,5	5	3,3	4,04	46,9	48,1	47,6	48,2	47,9	47,74
	3	2,7	3,1	3,7	3,1	3,7	3,26	4	3,8	3,5	4,3	4,2	3,96	47,7	47,2	49,6	44,3	45,8	46,92
T3	1	3,4	2,4	3,3	2,8	4,4	3,26	10,5	12,4	12,6	10	13,4	11,78	49,8	51	52	50,7	52	51,1
	2	2,7	3,5	3,5	2,4	3,7	3,16	11,2	10,8	13,5	10,6	12,1	11,64	50,9	51,3	52	52	49,6	51,16
	3	3,7	3,5	2,1	2,5	3,5	3,06	12,5	12,5	11,7	10,8	11,5	11,8	53	52	52	51,5	50,1	51,72

Kecerahan Bubuk Ekstrak Buah Takokak

PERLAKUAN	L	stdev
T0	42,97	1,41
T1	46,48	0,71
T2	47,75	0,83
T3	51,33	0,34

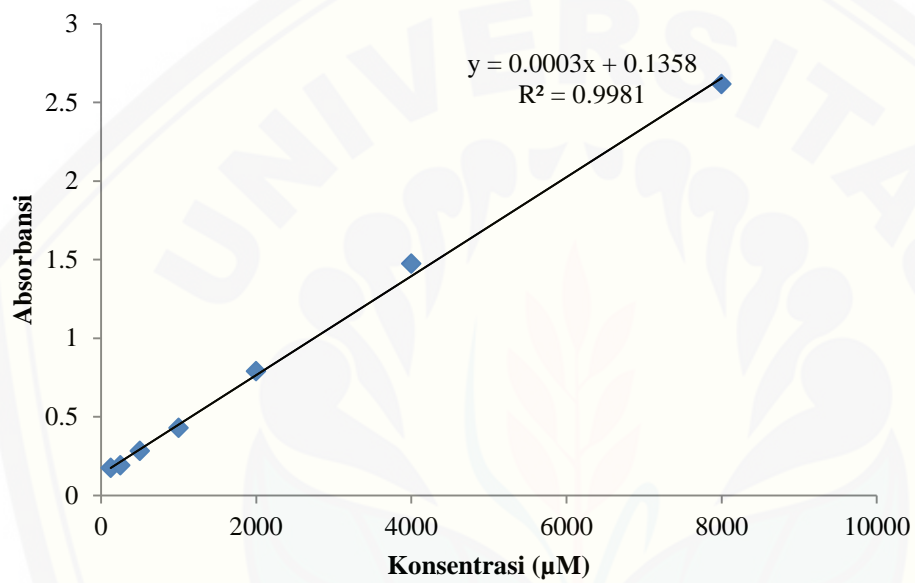
Nilai Hue Bubuk Ekstrak Buah Takokak

PERLAKUAN	ULANGAN	L	A	B	Hue	Rata	stdev
T0	1	44,08	2,92	4,7	121,8517	121,0553	2,712425
	2	41,38	3,28	6,16	118,0339		
	3	43,44	2,98	4,54	123,2804		
T1	1	47,24	2,64	6,9	110,9373	111,6215	0,813198
	2	45,84	2,46	6,275	111,4068		
	3	46,36	2,72	6,56	112,5206		
T2	1	48,58	3,36	4	130,0303	129,8587	0,344281
	2	47,74	3,4	4,04	130,0834		
	3	46,92	3,26	3,96	129,4623		
T3	1	51,1	3,26	11,78	105,4689	105,0651	0,477649
	2	51,16	3,16	11,64	105,1885		
	3	51,72	3,06	11,8	104,5378		

Lampiran C. Perhitungan Total Polifenol Bubuk Ekstrak Buah Takokak

Kurva Standard Asam Galat

Konsentrasi (μM)	Absorbansi
125	0,173
250	0,19
500	0,282
1000	0,428
2000	0,789
4000	1,473
8000	2,615



Total Polifenol Bubuk Ekstrak Buah Takokak

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	konstanta	x	konesentrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg)		
								GAE/ml)	rata	stdev
T0	1	0,657	0,0003	0,1358	1737,333333	868666,6667	0,17012	147,7775733	153,0701956	4,994803
	2	0,692	0,0003	0,1358	1854	927000	0,17012	157,70124		
	3	0,678	0,0003	0,1358	1807,333333	903666,6667	0,17012	153,7317733		
T1	1	0,848	0,0003	0,1358	2374	1187000	0,17012	201,93244	184,8259289	22,23945
	2	0,816	0,0003	0,1358	2267,333333	1133666,667	0,17012	192,8593733		
	3	0,699	0,0003	0,1358	1877,333333	938666,6667	0,17012	159,6859733		
T2	1	1,073	0,0003	0,1358	3124	1562000	0,17012	265,72744	265,4439067	2,14063
	2	1,064	0,0003	0,1358	3094	1547000	0,17012	263,17564		
	3	1,079	0,0003	0,1358	3144	1572000	0,17012	267,42864		
T3	1	1,123	0,0003	0,1358	3290,666667	1645333,333	0,17012	279,9041067	283,9680844	13,64598
	2	1,191	0,0003	0,1358	3517,333333	1758666,667	0,17012	299,1843733		
	3	1,098	0,0003	0,1358	3207,333333	1603666,667	0,17012	272,8157733		

Lampiran D. Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Sampel	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% penghambatan	Rata	stdev
T0	1	2,851	1,793	37,10978604	36,0795	0,981722
	2	2,752	1,762	35,97383721		
	3	2,873	1,863	35,15489036		
T1	1	2,851	1,742	38,89863206	39,24946	0,419811
	2	2,752	1,675	39,13517442		
	3	2,873	1,732	39,71458406		
T2	1	2,851	1,594	44,08979306	44,46196	0,493536
	2	2,752	1,513	45,02180233		
	3	2,873	1,601	44,27427776		
T3	1	2,851	1,585	44,40547176	45,00412	0,581526
	2	2,752	1,498	45,56686047		
	3	2,873	1,579	45,04002785		

Lampiran E. Perhitungan Metode Sumuran

Bakteri *Bacillus subtilis* pengamatan 12 jam

polifenol mg/ml	r sumuran (L1) (mm)	replikasi	d			L			L2-L1 (mm2)			rata-rata	rata-rata	stdev
			1	2	3	1	2	3	1	2	3			
20	19,625	d1	6	7	6	28,26	38,465	28,26	8,635	18,84	8,635	12,03666667	13,7375	1,963953166
	19,625	d2	7	6	7	38,465	28,26	38,465	18,84	8,635	18,84	15,43833333		
	19,625	d3	6	7	6	28,26	38,465	28,26	8,635	18,84	8,635	12,03666667		
	19,625	d4	6	7	7	28,26	38,465	38,465	8,635	18,84	18,84	15,43833333		
40	19,625	d1	9	10	10	63,585	78,5	78,5	43,96	58,875	58,875	53,90333333	47,81958333	4,628739604
	19,625	d2	10	9	9	78,5	63,585	63,585	58,875	43,96	43,96	48,93166667		
	19,625	d3	8	9	10	50,24	63,585	78,5	30,615	43,96	58,875	44,48333333		
	19,625	d4	9	9	9	63,585	63,585	63,585	43,96	43,96	43,96	43,96		
60	19,625	d1	13	12	12	132,665	113,04	113,04	113,04	93,415	93,415	99,95666667	106,76	9,499617244
	19,625	d2	12	12	13	113,04	113,04	132,665	93,415	93,415	113,04	99,95666667		
	19,625	d3	14	13	13	153,86	132,665	132,665	134,235	113,04	113,04	120,105		
	19,625	d4	12	12	14	113,04	113,04	153,86	93,415	93,415	134,235	107,0216667		
80	19,625	d1	16	14	15	200,96	153,86	176,625	181,335	134,235	157	157,5233333	151,4395833	7,405289948
	19,625	d2	15	15	14	176,625	176,625	153,86	157	157	134,235	149,4116667		
	19,625	d3	14	15	14	153,86	176,625	153,86	134,235	157	134,235	141,8233333		
	19,625	d4	15	15	15	176,625	176,625	176,625	157	157	157	157		

Bakteri *Bacillus subtilis* pengamatan 24 jam

polifenol mg/ml	r sumuran (L1) (mm)	replikasi	d			L			L2-L1 (mm ²)			rata-rata	rata-rata	stdev
			1	2	3	1	2	3	1	2	3			
20	19,625	d1	10	12	11	78,5	113,04	94,985	58,875	93,415	75,36	75,88333333	74,37875	7,157671535
	19,625	d2	12	11	11	113,04	94,985	94,985	93,415	75,36	75,36	81,37833333		
	19,625	d3	11	10	10	94,985	78,5	78,5	75,36	58,875	58,875	64,37		
	19,625	d4	11	11	12	78,5	94,985	113,04	58,875	75,36	93,415	75,88333333		
40	19,625	d1	13	13	14	132,665	132,665	153,86	113,04	113,04	134,235	120,105	113,4325	9,498415901
	19,625	d2	14	12	13	153,86	113,04	132,665	134,235	93,415	113,04	113,5633333		
	19,625	d3	14	13	13	153,86	132,665	132,665	134,235	113,04	113,04	120,105		
	19,625	d4	12	13	12	113,04	132,665	113,04	93,415	113,04	93,415	99,95666667		
60	19,625	d1	15	14	14	176,625	153,86	153,86	157	134,235	134,235	141,8233333	146,2716667	7,517320987
	19,625	d2	16	15	14	200,96	176,625	153,86	181,335	157	134,235	157,5233333		
	19,625	d3	14	13	16	153,86	132,665	200,96	134,235	113,04	181,335	142,87		
	19,625	d4	13	16	14	132,665	200,96	153,86	113,04	181,335	134,235	142,87		
80	19,625	d1	17	18	17	226,865	254,34	226,865	207,24	234,715	207,24	216,3983333	221,5008333	5,321985236
	19,625	d2	19	18	16	283,385	254,34	200,96	263,76	234,715	181,335	226,6033333		
	19,625	d3	16	19	17	200,96	283,385	226,865	181,335	263,76	207,24	217,445		
	19,625	d4	17	18	18	226,865	254,34	254,34	207,24	234,715	234,715	225,5566667		

Bakteri *Eschericia coli* pengamatan 12 jam

polifenol mg/ml	r sumuran (L1) (mm)	replikasi	d			L			L2-L1 (mm2)			rata-rata	rata-rata	stdev
			1	2	3	1	2	3	1	2	3			
20	19,625	d1	10	9	8	78,5	63,585	50,24	58,875	43,96	30,615	44,48333333	47,95041667	4,488555896
	19,625	d2	9	10	10	63,585	78,5	78,5	43,96	58,875	58,875	53,90333333		
	19,625	d3	10	9	9	78,5	63,585	63,585	58,875	43,96	43,96	48,93166667		
	19,625	d4	10	8	9	78,5	50,24	63,585	58,875	30,615	43,96	44,48333333		
40	19,625	d1	12	14	13	113,04	153,86	132,665	93,415	134,235	113,04	113,56333333	115,0679167	3,36710541
	19,625	d2	13	13	13	132,665	132,665	132,665	113,04	113,04	113,04	113,04		
	19,625	d3	14	13	12	153,86	132,665	113,04	134,235	113,04	93,415	113,56333333		
	19,625	d4	13	14	13	132,665	153,86	132,665	113,04	134,235	113,04	120,105		
60	19,625	d1	18	16	18	254,34	200,96	200,96	234,715	181,335	181,335	199,12833333	192,6520833	4,338593255
	19,625	d2	16	18	15	200,96	254,34	176,625	181,335	234,715	157	191,01666667		
	19,625	d3	17	15	17	226,865	176,625	226,865	207,24	157	207,24	190,49333333		
	19,625	d4	17	16	16	226,865	200,96	200,96	207,24	181,335	181,335	189,97		
80	19,625	d1	20	21	16	314	346,185	200,96	294,375	326,56	181,335	267,42333333	263,115625	11,75915686
	19,625	d2	19	19	20	283,385	283,385	314	263,76	263,76	294,375	273,965		
	19,625	d3	18	20	19	200,96	314	283,385	181,335	294,375	263,76	246,49		
	19,625	d4	19	18	20	284,2875	254,34	314	264,6625	234,715	294,375	264,5841667		

Bakteri *Eschericia coli* pengamatan 24 jam

polifenol mg/ml	r sumuran (L1) (mm)	replikasi	d			L			L2-L1 (mm2)			rata-rata	rata-rata	stdev
			1	2	3	1	2	3	1	2	3			
20	19,625	d1	11	11	9	94,985	94,985	63,585	75,36	75,36	43,96	64,89333333	70,65	4,577297237
	19,625	d2	11	11	10	94,985	94,985	78,5	75,36	75,36	58,875	69,865		
	19,625	d3	12	10	11	113,04	78,5	94,985	93,415	58,875	75,36	75,88333333		
	19,625	d4	13	9	10	132,665	63,585	78,5	113,04	43,96	58,875	71,95833333		
40	19,625	d1	14	16	15	153,86	200,96	176,625	134,235	181,335	157	157,52333333	161,1866667	4,537232596
	19,625	d2	15	15	16	176,625	176,625	200,96	157	157	181,335	165,1116667		
	19,625	d3	15	15	15	176,625	176,625	176,625	157	157	157	157		
	19,625	d4	15	16	15	176,625	200,96	176,625	157	181,335	157	165,1116667		
60	19,625	d1	19	18	20	283,385	254,34	314	263,76	263,76	294,375	273,965	274,0958333	14,18561586
	19,625	d2	19	20	18	283,385	314	254,34	263,76	263,76	234,715	254,0783333		
	19,625	d3	20	17	19	314	226,865	283,385	294,375	294,375	263,76	284,17		
	19,625	d4	20	20	19	314	314	283,385	294,375	294,375	263,76	284,17		
80	19,625	d1	22	23	19	379,94	415,265	283,385	360,315	360,315	263,76	328,13	338,5966667	19,97255575
	19,625	d2	22	21	22	379,94	346,185	379,94	360,315	360,315	360,315	360,315		
	19,625	d3	20	22	22	314	379,94	379,94	294,375	294,375	360,315	316,355		
	19,625	d4	21	20	23	346,185	314	415,265	326,56	326,56	395,64	349,5866667		

Lampiran F. Perhitungan *Minimum inhibitory concentration (MIC)*1. *Bacillus subtilis*Jumlah Koloni *Bacillus subtilis*

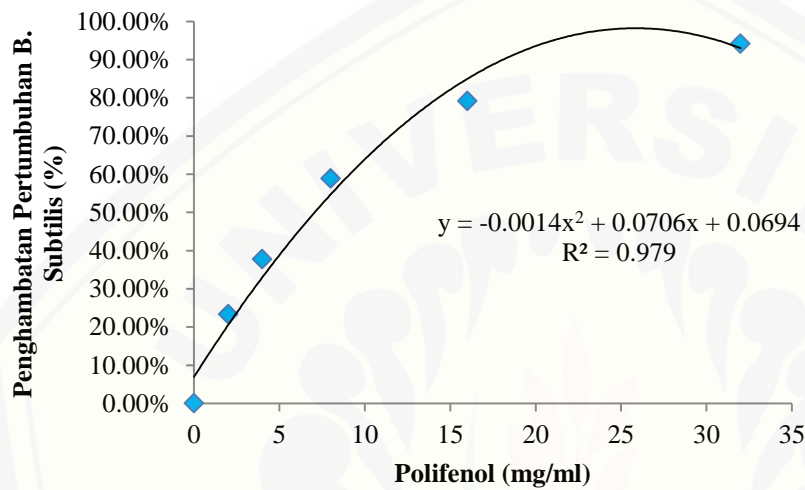
Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni/200 μ l (U1)	jumlah koloni/200 μ l (U2)	jumlah koloni/200 μ l (U3)	rata-rata	SD
0	816	824	802	814,00	11,14
2	612	629	632	624,33	10,79
4	498	509	514	507,00	8,19
8	342	327	335	334,67	7,51
16	169	184	157	170,00	13,53
32	42	48	53	47,67	5,51

Jumlah Koloni *Bacillus subtilis* dalam CFU/ml

Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	rata-rata (CFU/ml)	log jumlah koloni	SD	% penghambatan
0	4,1E+08	412000000	401000000	4,1E+08	8,60959	5567764	0
2	3,1E+08	314500000	316000000	3,1E+08	8,49439	5392897	0,233006
4	2,5E+08	254500000	257000000	2,5E+08	8,40398	4092676	0,37715
8	2E+08	163500000	167500000	1,7E+08	8,22358	3752777	0,58886
16	8E+07	92000000	78500000	8,5E+07	7,92942	6763875	0,791155
32	2E+07	24000000	26500000	2,4E+07	7,37718	2753785	0,941441

Kurva Reguler Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

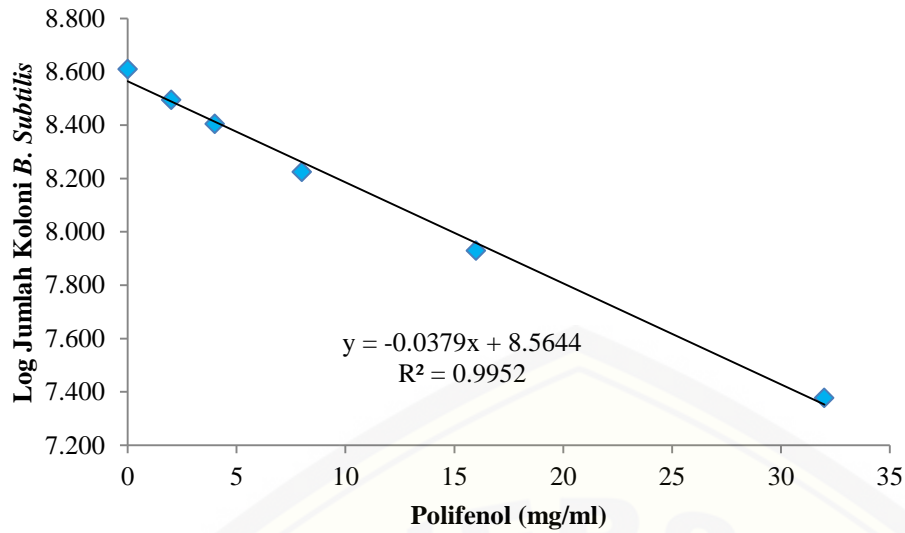
Polifenol (mg/ml)	% Penghambatan
0	0,00%
2	23,30%
4	37,71%
8	58,89%
16	79,12%
32	94,14%



$Y = -0,0014X^2 + 0,0706X + 0,0694$ $50\% = -0,0014X^2 + 0,0706X + 0,0694$ $0,5 = -0,0014X^2 + 0,0706X + 0,0694$	$Y = -0,0014X^2 + 0,0706X + 0,0694$ $90\% = -0,0014X^2 + 0,0706X + 0,0694$ $0,9 = -0,0014X^2 + 0,0706X + 0,0694$
$X^2 - 50X + 307$ $(X - 42,83)(X - 7,17)$	$X^2 - 50X + 593$ $(X - 19,63)(X - 30,65)$
$X = 42,83 \text{ mg/ml}$ $X = 7,17 \text{ mg/ml}$	$X = 30,65 \text{ mg/ml}$ $X = 19,35 \text{ mg/ml}$

Kurva Logaritmik Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Polifenol (mg/ml)	Log jumlah koloni
0	8,610
2	8,494
4	8,404
8	8,224
16	7,929
32	7,377



			Kons. Polifenol (mg/ml)
1 log	7	41,277	26,385
	6	67,662	
2 log	7	41,277	52,770
	5	94,047	
3 log	7	41,277	52,770
	5	94,047	

IC ₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	14,892
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	22,835
		IC ₅₀	7,943

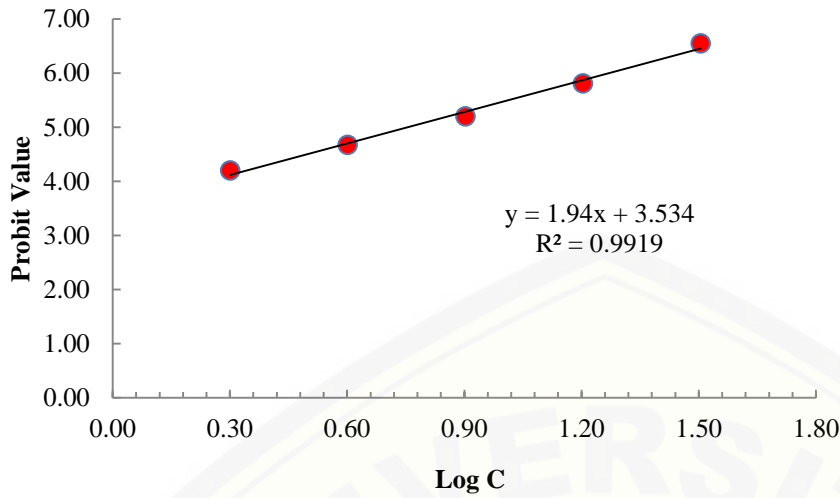
IC ₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	41,277
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	67,662
		IC ₉₀	26,385

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Polifenol (mg/ml)	rata-rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	4,07E+08	8,610	100,00	0,00	0,00	0,00
2	3,12E+08	8,494	76,70	23,30	0,30	4,20
4	2,54E+08	8,404	62,29	37,71	0,60	4,67
8	1,67E+08	8,224	41,11	58,89	0,90	5,20
16	8,50E+07	7,929	20,88	79,12	1,20	5,81
32	2,38E+07	7,377	5,86	94,14	1,51	6,55

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09



$$Y = 1,94 X + 3,534$$

$$5 = 1,94 X + 3,534$$

$$5 - 3,534 = 1,94 X$$

$$1,466 = 1,94 X$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 1,466 / 1,94 = 0,75567$$

$$\text{LOG } C_{50} = 0,75567$$

$$\text{IC}_{50} = 5,6973 \text{ (mg/ml)}$$

$$Y = 1,94 X + 3,534$$

$$6,28 = 1,94 X + 3,534$$

$$6,28 - 3,534 = 1,94 X$$

$$2,746 = 1,94 X$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 2,746 / 1,94 = 1,41546$$

$$\text{LOG } C_{90} = 1,41546$$

$$\text{IC}_{90} = 26,02938 \text{ (mg/ml)}$$

2. *Eschericia coli*Jumlah Koloni *Eschericia coli*

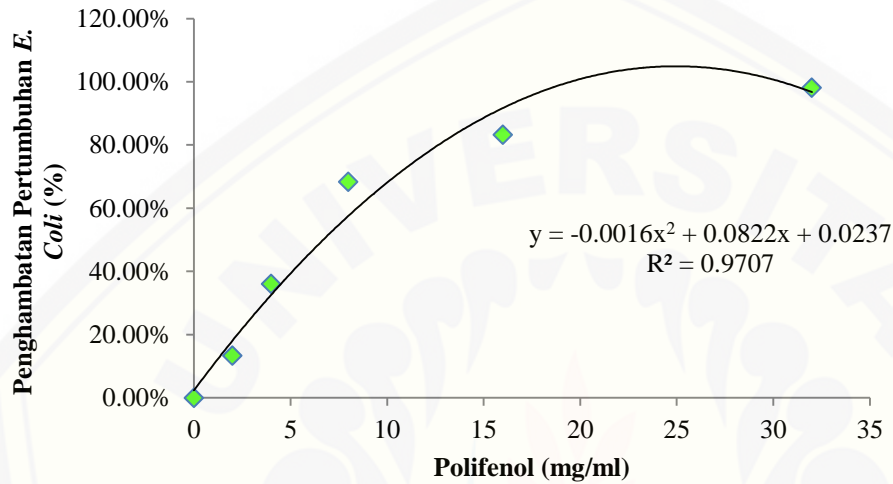
Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni/200µl (U1)	jumlah koloni/200µl (U2)	jumlah koloni/200µl (U3)	rata-rata	SD
0	732	716	698	715,33	17,01
2	622	594	643	619,67	24,58
4	488	436	448	457,33	27,23
8	236	228	216	226,67	10,07
16	108	117	134	119,67	13,20
32	17	14	9	13,33	4,04

Jumlah Koloni *Eschericia coli* dalam CFU/ml

Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	rata-rata (CFU/ml)	log jumlah koloni	SD	% penghambatan
0	3,66E+08	3,58E+08	3,49E+08	3,58E+08	8,553478	8504901	0
2	3,11E+08	2,97E+08	3,22E+08	3,1E+08	8,491128	12291596	0,133737
4	2,44E+08	2,18E+08	2,24E+08	2,29E+08	8,359203	13613719	0,360671
8	1,18E+08	1,14E+08	1,08E+08	1,13E+08	8,054358	5033223	0,683131
16	54000000	58500000	67000000	59833333	7,776943	6601767	0,832712
32	8500000	7000000	4500000	6666667	6,823909	2020726	0,981361

Kurva Reguler Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

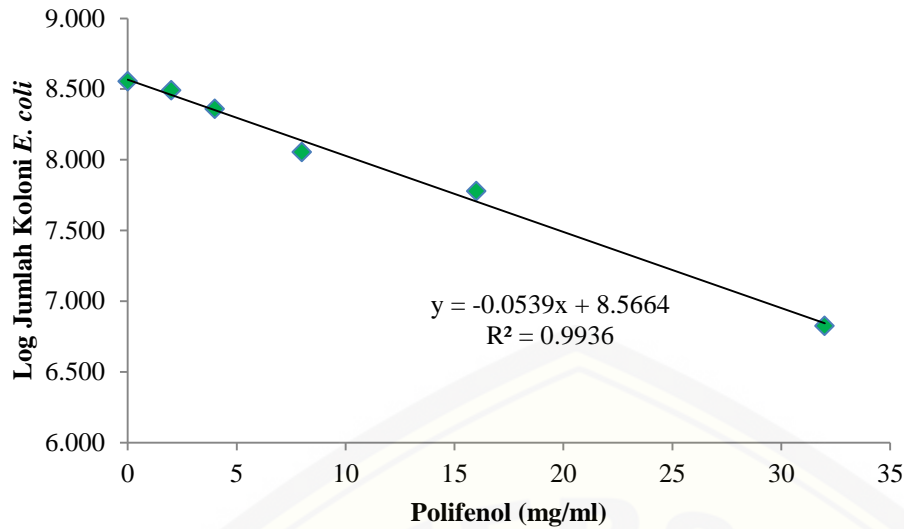
Polifenol (mg/ml)	% Penghambatan
0	0,00%
2	13,37%
4	36,07%
8	68,31%
16	83,27%
32	98,14%



$y = -0,0016x^2 + 0,0822x + 0,0237$	$y = -0,0016x^2 + 0,0822x + 0,0237$
$50\% = -0,0016x^2 + 0,0822x + 0,0237$	$90\% = -0,0016x^2 + 0,0822x + 0,0237$
$0,5 = -0,0016x^2 + 0,0822x + 0,0237$	$0,9 = -0,0016x^2 + 0,0822x + 0,0237$
<hr/>	<hr/>
$X^2 - 51X + 297$	$X^2 - 51X + 547$
$(X - 44,3)(X - 6,7)$	$(X - 35,65)(X - 15,35)$
$X = 44,3 \text{ mg/ml}$	$X = 35,65 \text{ mg/ml}$
$X = 6,7 \text{ mg/ml}$	$X = 15,35 \text{ mg/ml}$

Kurva Logaritmik Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	Log jumlah koloni
0	8,553
2	8,491
4	8,359
8	8,054
16	7,777
32	6,824



			Kons. Polifenol (mg/ml)
1 log	7	29,02411874	18,5528757
	6	47,57699443	
2 log	7	29,02411874	37,10575139
	5	66,12987013	
3 log	7	29,02411874	37,10575139
	5	66,12987013	

IC 50%

Polifenol (mg/ml)

$Y1 = 1 \times 10^8$	Log Y1 =	8,000	X1 = 10,4712
$Y2 = 50\% (Y1) = 5 \times 10^7$	Log Y2 =	7,699	X2 = 16,0562
			X% = 5,58497

IC 90%

Polifenol (mg/ml)

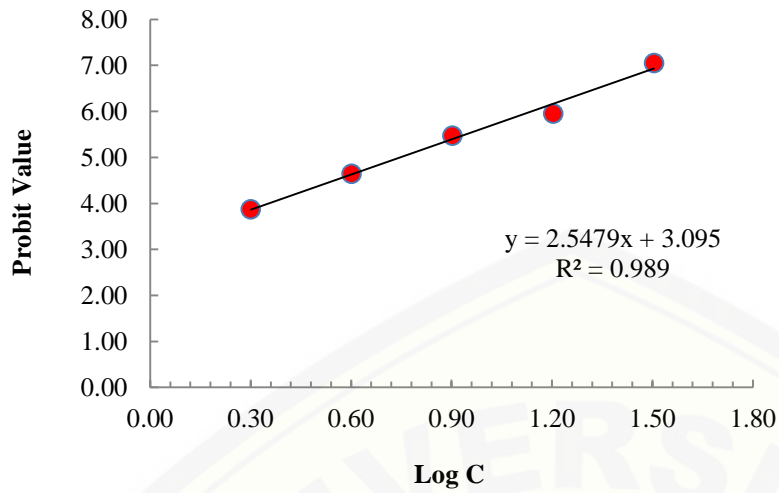
$Y1 = 1 \times 10^8$	Log Y1 =	7,000	X1 = 29,0241
$Y2 = 90\% (Y1) = 5 \times 10^7$	Log Y2 =	6,000	X2 = 47,577
			X% = 18,5529

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	rata-rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	3,58E+08	8,553	100,00	0,00	0,00	0,00
2	3,10E+08	8,491	86,63	13,37	0,30	3,87
4	2,29E+08	8,359	63,93	36,07	0,60	4,64
8	1,13E+08	8,054	31,69	68,31	0,90	5,47
16	5,98E+07	7,777	16,73	83,27	1,20	5,95
32	6,67E+06	6,824	1,86	98,14	1,51	7,05

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09



$$Y = 2,5479x + 3,095$$

$$5 = 2,5479x + 3,095$$

$$5 - 3,095 = 2,5479x$$

$$1,905 = 2,5479 X$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 1,905/2,5479 = 0,74767456$$

$$\text{LOG } C_{50} = 0,74767456$$

$$\text{IC}_{50} = 5,5933 \text{ (mg/ml)}$$

$$Y = 2,5479x + 3,095$$

$$6,28 = 2,5479x + 3,095$$

$$6,28 - 3,095 = 2,5479x$$

$$3,185 = 2,5479 X$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 3,185/2,5479 = 1,25$$

$$\text{LOG } C_{90} = 1,25$$

$$\text{IC}_{90} = 17,7827 \text{ (mg/ml)}$$

Lampiran G. Dokumentasi Foto Penelitian



Buah takokak segar



Buah takokak setelah *Steam blanching* 5 menit



Penghancuran menggunakan blender



Buah takokak dalam pelarut sebelum dimasukkan *shaker waterbath*



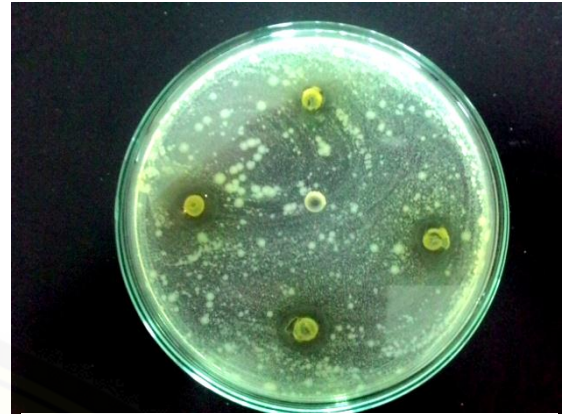
Buah takokak dalam pelarut setelah ekstraksi dalam *shaker waterbath*



Ekstrak cair buah takokak



Zona hambat bakteri *B. subtilis*
pengamatan 12 jam



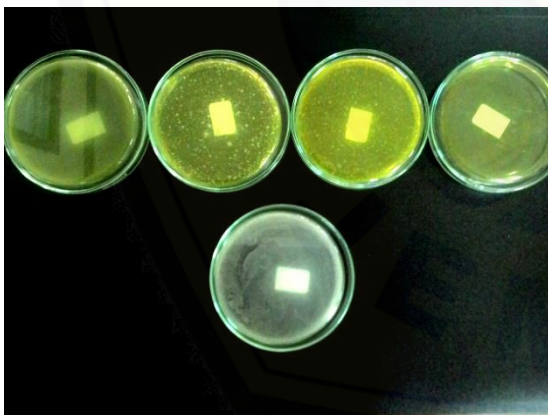
Zona hambat bakteri *B. subtilis*
pengamatan 24 jam



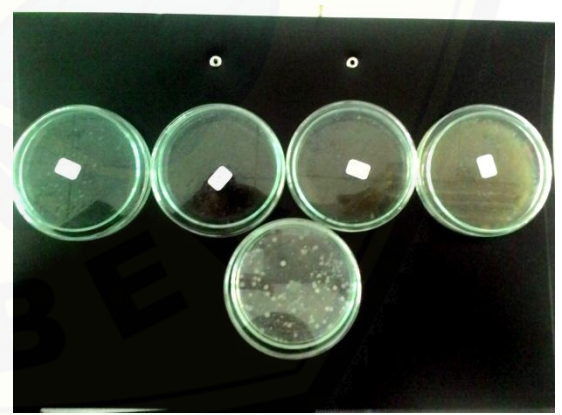
Zona hambat bakteri *E. coli*
pengamatan 12 jam



Zona hambat bakteri *E. coli*
pengamatan 24 jam



Uji MIC bakteri *B. subtilis*



Uji MIC bakteri *E. coli*