

PEMANFAATAN LIMBAH KULIT ARI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao L*) SEBAGAI SUMBER ANTIBAKTERI *Streptococcus mutans*

Utilization of Cocoa Beans Epidermis Waste (*Theobroma cacao L*) as Antibacterial *Streptococcus mutans*

Medan Yumas

Balai Besar Industri Hasil Perkebunan

Jl. Prof. Dr. Abdurrahman Basalamah No. 28 Makassar 90231

Pos-el: medan.yumas@yahoo.com

(Artikel diterima April 2017; revisi akhir 6 November 2017; disetujui 4 Desember 2017)

ABSTRACT: Epidermis of cocoa beans contain active compounds that are similar to the active compound in the cocoa pod husk. Epidermis of cocoa beans are suspected to contain active compounds such as polyphenols, flavonoids, terpenoids/steroids, condensed or polymerized tannins such as catechins and anthocyanins. The bioactive compounds were known to have antibacterial properties on *Streptococcus mutans* types. The aim of this research were to produce natural active compounds from cocoa bean husk, which have antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. Stages of the study consisted of powdering process of epidermis cocoa beans, extracting fat from epidermis cocoa beans powder, extracting of the antibacterial active compound, solvent evaporation of active compounds extracts from powdered cocoa beans husk, and testing of active compounds produced by *Streptococcus mutans*. Results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the cocoa bean husk extract againsts *Streptococcus mutans* on a half-day incubation period was 0.25% with an inhibitory diameter of 7.550 mm. While, a two- days incubation period was 0.25% with an inhibitory diameter of 9,900 mm and was bacteriostatic.

Keywords: cocoa beans husk, maceration extraction, methanol, antibacterial, active components, *Streptococcus mutans*.

ABSTRAK: Kulit ari biji kakao mengandung senyawa aktif yang tidak berbeda jauh dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah kakao dan biji kakao itu sendiri. Kulit ari biji kakao diduga mengandung senyawa aktif polifenol, flavonoid, terpenoid/steroid, tanin terkondensasi atau terpolimerisasi seperti katekin dan antosianin. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri jenis *Streptococcus mutans*. Tujuan penelitian ini adalah pemanfaatan kulit ari biji kakao sebagai sumber senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Tahapan penelitian terdiri dari proses pembuatan bubuk kulit ari biji kakao, proses ekstraksi lemak dari bubuk kulit ari biji kakao, proses ekstraksi senyawa aktif antibakteri dari bubuk kulit ari biji kakao, proses penguapan pelarut ekstrak senyawa aktif dari bubuk kulit ari biji kakao, dan proses pengujian senyawa aktif yang dihasilkan terhadap *Streptococcus mutans*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak limbah kulit ari biji kakao berpotensi sebagai senyawa aktif antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak kulit ari biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi satu setengah hari adalah 0,25% dengan diameter hambatan sebesar 7,550 mm dan masa inkubasi dua hari adalah 0,25% dengan diameter hambatan sebesar 9,900 mm dan bersifat bakteriostatik.

Kata kunci : kulit ari biji kakao, ekstraksi maserasi, metanol, antibakteri, komponen aktif, *Streptococcus mutans*

PENDAHULUAN

Seiring dengan kemajuan teknologi, berbagai penyakit banyak timbul di masyarakat, salah satunya adalah penyakit karies gigi yang disebabkan oleh plak gigi akibat infeksi mikroba *Streptococcus mutans* yang terdapat di dalam mulut. Berbagai jenis obat antibiotik berbahan sintetik sangat banyak diproduksi. Namun memiliki resiko yang cukup besar terhadap kesehatan karena dapat menimbulkan efek samping berupa fluorosis email (Yunilawati, 2002). Salah satu upaya mengurangi dampak negatif penggunaan bahan aktif sintetik adalah penggunaan bahan aktif alami. Sumber bahan aktif alami umumnya berasal dari tanaman pertanian dan perkebunan. Tanaman perkebunan yang memiliki potensi sebagai sumber bahan aktif adalah kakao. Kulit ari biji kakao belum dimanfaatkan sebagai sumber bahan aktif untuk antibakteri.

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditi andalan negara Indonesia yang mempunyai peluang untuk dikembangkan kearah diversifikasi produk dengan nilai jual yang cukup tinggi. Buah kakao terdiri dari kulit buah kakao dan biji kakao. Biji kakao diolah menjadi produk cokelat. Dalam pengolahan biji kakao menjadi produk cokelat menghasilkan limbah kulit biji kakao yang cukup banyak. Keberadaan limbah tersebut sering kali tidak dimanfaatkan secara baik dan kadang dibiarkan begitu saja menjadi sampah industri pengolahan cokelat. Beberapa penelitian tentang sumber antibakteri telah dilakukan antara lain Pasiga (2004) tentang Upaya Diversifikasi Manfaat Limbah Kulit Buah Kakao Sebagai Komponen Aktif Pasta Gigi; Mulyatni, *et al* (2012) tentang Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*; Sabir (2005) tentang Aktivitas Antibakteri Flavonoid

Propolis *Trigona sp* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* Secara *In Vitro*; Loppies dan Yumas (2014) tentang Ekstrak Komponen Aktif Kulit Buah Kakao Dan Pemanfaatannya Sebagai Bahan Pengawet Alami Pada Produk Makanan; Romas, *et al* (2015) tentang Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 11229 Dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Secara *In Vitro*; Siregar, *et al* (2011) tentang Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Pada Bioaktivitas Ekstrak Rimpang Lengkuas Secara *In Vitro* Dan Pemanfaatannya Sebagai Zat Aktif Pada Pasta Gigi; Siampa,(2016) tentang Aktivitas Antioksidan Dan Antimikroba Pada Berbagai Ukuran Partikel Sediaan Ekstrak Dan Nanokitosan Kulit Manggis. Namun penelitian bahan aktif sebagai antibakteri yang bersumber dari kulit ari biji kakao belum pernah dilakukan. Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian bahan aktif alami dari kulit biji kakao sebagai bahan aktif antibakteri pengganti bahan aktif sintesis.

Kulit ari biji kakao mengandung senyawa aktif yang tidak berbedah jauh dengan kandungan senyawa aktif yang terdapat pada kulit buah kakao dan biji kakao itu sendiri. Menurut Kusuma, *et al* (2013) bahwa biji kakao mengandung senyawa polifenol 5-18%, katekin 33-42%, leukosianidin 23-25%, dan antosianin 5% Kulit ari biji kakao diduga mengandung senyawa aktif antara lain polifenol, flavonoid, terpenoid/steroid, taninterkondensasi atau terpolimerisasi seperti katekin dan antosianin. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri (Matsumoto *et.al*, 2004). Penelitian ini bertujuan memanfaatkan kulit ari biji kakao sebagai sumber senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

METODOLOGI

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-November 2013 di Balai Besar Industri Hasil Perkebunan Makassar.

Bahan

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit ari biji kakao yang diperoleh dari hasil pengolahan produk cokelat oleh KUB Resopammase Kabupaten Luwu Provinsi Sulawesi Selatan, larutan etanol 96%, n-heksan (teknis), larutan BHIB, kertas saring Whatman no 41, dan aquades.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah blender merek Madato, alat pemisah kulit biji (*winnowing*), corong pisah, timbangan digital, cawan petri, *rotary evaporator*, gelas ukur 1500 ml, batang pengaduk kaca, alat uji KLT (*Chamber TLC*, pipa kapiler untuk penotol, pensil, *cutter*, mistar, lampu UV), alat uji antibakteri (autoklaf, sentrifugasi, *shaker incubator*, mikropipet, kawat ose), spektrofotometer IR (Merek Perkin Elmer *FT-IR*), GC merek Agilent 6890 – MS merek Agilent 5973 Inert MSD sistem, oven merek Venticell 404 dan 222 MMM Medcenter GmbH D 82152 Germany, Sentrifus merek Hettich, vortex mixer merek Barnstead International, ultrasonik merek Elma, AAS merek Contra AA 700, hot plate strirer Cimarec II, incubator merek INB 500, vortex merek Maxi mix II Thermo, pH meter merek Bench top pH meter GLP 21 crison, waterbath merek HH6 RRC, plastik, tabung reaksi (Pyrex), cawan petri (Pyrex), pH meter digital, timbangan kapasitas 5 kg, ayakan, neraca analitik (Sartorius), jarum ose, dan jangka sorong.

Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 4 tahapan yaitu proses pembuatan bubuk kulit ari biji kakao,

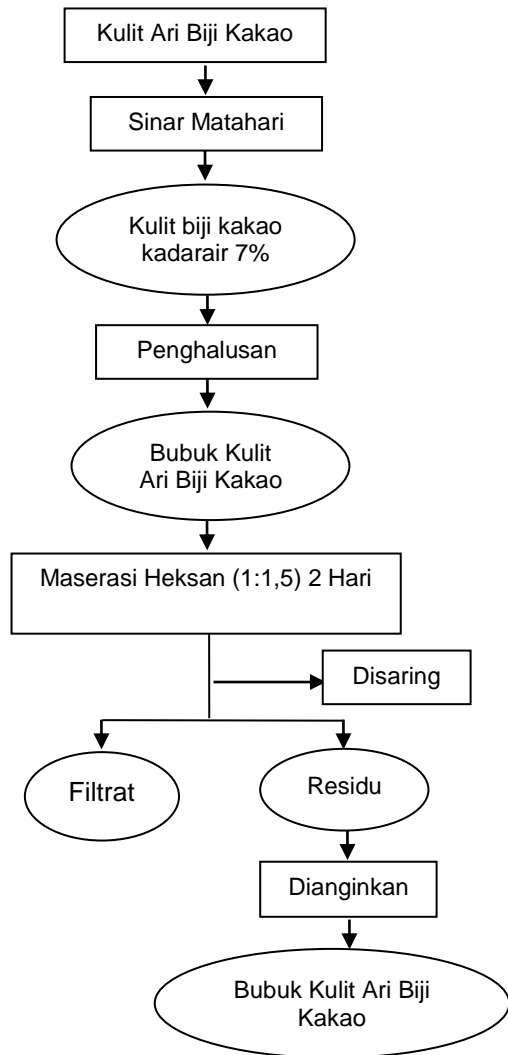
ekstraksi lemak bubuk kulit ari biji kakao, ekstraksi bahan aktif, dan uji aktivitas antibakteri.

Bubuk Kulit Biji Kakao

Kulit ari biji kakao yang diperoleh dari KUB Resopammase hasil pengolahan aneka produk cokelat dijemur di bawah sinar matahari hingga mencapai kadar air 7%. Kulit ari biji kakao yang telah mencapai kadar air 7% dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh bubuk kulit ari biji kakao. Bubuk kulit ari biji kakao yang diperoleh selanjutnya diayak. Hasil yang diperoleh bubuk kulit ari biji kakao lolos ayakan.

Ekstraksi Lemak Bubuk Kulit Biji Kakao

Bubuk kulit ari biji kakao lolos ayakan, dibebaskan dari lemak dengan cara diekstrak menggunakan pelarut heksan dengan perbandingan antara bahan yang diekstrak dengan pelarut adalah (1:1,5) secara maserasi selama dua hari. Pengadukan dilakukan setiap 60 menit atau setiap 1 jam selama perendaman. Pada hari ke dua dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara residu dengan pelarut sehingga diperoleh filtrat dan residu. Residu atau bubuk kulit ari biji kakao yang telah dipisahkan dari pelarut, kembali dimaserasi menggunakan pelarut n-heksan dengan lama perendaman dua hari. Proses ekstraksi secara maserasi ini diulang sebanyak dua kali. Residu yang diperoleh diangin-anginkan selama empat hari untuk digunakan sebagai bahan baku untuk diekstrak bahan aktifnya. Skema proses pembuatan bubuk kulit ari biji kakao bebas lemak dapat dilihat pada Gambar 1.

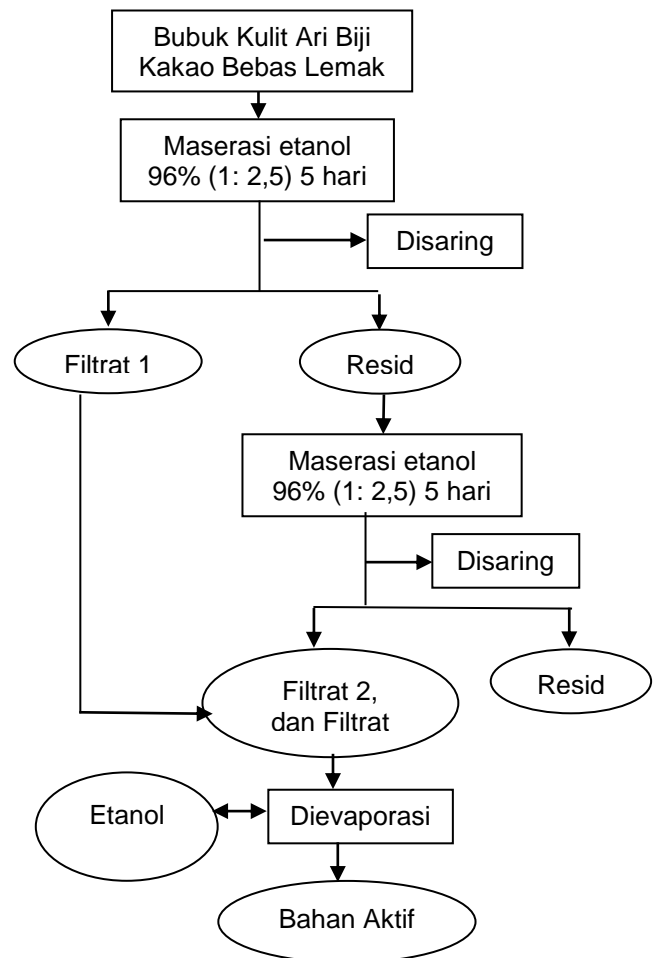


Gambar 1. Skema proses pembuatan bubuk kulit ari biji kakao

Ekstraksi Bahan Aktif

Bahan aktif diekstrak dari bubuk kulit ari biji kakao yang telah dibebaskan dari lemak dengan cara perendaman (maserasi) dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 1 kg bubuk kulit ari biji kakao dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1 : 2,5). Perendaman dilakukan selama 5 hari dan setiap hari dilakukan pengadukan dan pengadukan dilakukan setiap 2 jam. Pada hari ke lima dilakukan penyaringan sehingga diperoleh filtrat 1. Residu kembali dimasukkan

ke dalam gelas kimia dan ditambahkan pelarut etanol 96%, selanjutnya dimaserasi selama 5 hari. Hasil ekstrak kembali disaring diperoleh filtrat 2. Residu yang diperoleh kembali dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditambahkan larutan etanol 96%, selanjutnya dimaserasi selama 5 hari. Hasil ekstraksi kembali disaring diperoleh filtrat 3. Filtrat 1, filtrat 2 dan filtrat 3 digabungkan menjadi satu, selanjutnya dievaporasi pada tekanan rendah dan suhu 50°C diperoleh bahan aktif dalam bentuk ekstrak etanol kental atau dalam bentuk semi padat. Skema proses ekstraksi bahan aktif dari bubuk kulit ari biji kakao dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema proses ekstraksi bahan aktif dari bubuk kulit biji kakao bebas lemak

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan konsentrasi hambat minimal dari ekstrak bubuk kulit ari biji kakao yang bebas lemak mengacu ke metode pengenceran sesuai metode National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1985), Oewen (1997). Konsentrasi hambat minimum ditentukan oleh tabung yang berisi konsentrasi obat terendah yang masih menghambat pertumbuhan kuman (perbenihan tetap jernih).

Uji konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan dengan cara ekstrak etanol 96% bubuk kulit ari biji kakao bebas lemak dibuat beberapa seri konsentrasi sampel yaitu 0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml BHIB. Tabung reaksi tersebut dimasukkan bakteri *Streptococcus mutans*. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam untuk melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* di dalam tabung reaksi. Konsentrasi terendah sampel yang aktif adalah larutan jernih setelah inkubasi menunjukkan harga Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

Uji Zona Daya Hambat Antibakteri

Uji daya hambat antibakteri dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi dengan menggunakan kertas saring atau paperdisk oxid. Medium Nutrient Agar (NA), didinginkan pada suhu 40 – 45°C, lalu dituang ke dalam cawan petri secara aseptis di dalam Laminary Air Flow (LAF). Uji aktivitas antibakteri ekstrak bubuk kulit ari biji kakao dilakukan secara mono. Setelah medium NA pada cawan petri memadat, dilakukan suspensi bakteri dengan cara dioleskan secara merata pada permukaan medium menggunakan swab steril. Setelah pengolesan tersebut, kertas saring yang direndam pada masing-masing konsentrasi

0,25%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2% dan ditempelkan pada permukaan medium NA yang telah diolesi suspensi bakteri. Cawan petri kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 1,5 hari dan 2 hari. Diamati masa pertumbuhan bakteri pada masa inkubasi 1,5 hari dan 2 hari. Pertumbuhan bakteri dan zona hambat yang timbul disekitar kertas saring selanjutnya diukur diameternya menggunakan jangka sorong.

Pemeriksaan Senyawa Aktif

Uji polifenol dilakukan menggunakan fase diam yaitu kiesel gel GF 254, fase gerak kloroform-etil asetat-asam formiat (1:18:1), penampakan noda menggunakan pereaksi FeCl₃. Munculnya noda berwarna hitam pada KLT menunjukkan adanya senyawa aktif polifenol.

Uji flavonoid dilakukan menggunakan fase diam yaitu lapisan tipis kiesel gel GF 254. Fase gerak menggunakan kloroform-aseton-asam formiat (6:6:1) penampakan noda adanya uap ammonia. Munculnya noda berwarna kuning pada KLT menunjukkan adanya senyawa aktif flavonoid.

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan fase diam yaitu kiesel gel GF 254. Fase gerak menggunakan etil asetat-metanol-air (6:4:2). Penampakan noda dengan pereaksi dragendorf. Munculnya noda berwarna jingga pada KLT menunjukkan adanya senyawa aktif alkaloid.

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan menggunakan fase diam yaitu kiesel gel GF 254. Fase gerak heksana-etil asetat (4:1). Penampakan noda anisaldehyda asam sulfat. Munculnya noda berwarna merah ungu-ungu pada KLT menunjukkan adanya terpenoid dan steroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Bahan Aktif Bubuk Kulit Biji Kakao

Ekstraksi bahan aktif dari bubuk kulit ari biji kakao dilakukan secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Tujuan dilakukan proses ekstraksi adalah untuk menarik keluar senyawa aktif yang bersifat antibakteri yang terdapat pada kulit biji kakao.

Etanol dapat melarutkan komponen senyawa aktif yang terdapat di dalam kulit biji kakao berupa senyawa fenolik. Dari 1 kg bubuk kulit ari biji kakao yang diekstrak secara maserasi diperoleh bahan aktif sebanyak 112,5 gr atau sekitar 11,25% dari bahan baku. Banyaknya ekstrak bahan aktif yang diperoleh karena waktu perendaman bahan yang diekstrak cukup lama dengan pengadukan setiap dua jam sehingga proses difusipun berlangsung cepat dan lama. Akibat adanya pengadukan dan cepatnya proses difusi terjadi maka pada kondisi tertentu akan tercapai dengan cepat keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selain waktu dan pengadukan yang mempengaruhi diperolehnya rendemen bahan aktif lebih banyak, ukuran partikel bahan yang diekstrak turut mempengaruhi rendemen bahan aktif yang diperoleh. Pada penelitian ini ukuran partikel bubuk kulit biji kakao berada pada 40 mesh dan tergolong ukuran partikelnya sangat kecil sehingga proses terekstraknya bahan aktif sangat cepat dan rendemen bahan aktif yang diperoleh lebih banyak. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Siampa (2016) pada kulit buah manggis bahwa secara berurutan rendemen bahan aktif terbanyak diperoleh dimulai pada ukuran partikel ukuran nano disusul ukuran partikel 20 mesh dan terakhir ukuran partikel 40 mesh, ini menunjukkan bahwa semakin kecil ukuran

partikel yang diekstrak semakin banyak rendemen bahan aktif yang diperoleh.

Jika dibandingkan pula dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Gramza-Michalowska *et al.* (2007) menggunakan ekstrak daun teh, rendemen yang diperoleh sebesar 12,2%; Justus dan Yumas (2014) menggunakan kulit buah kakao dengan pelarut aseton: air (7:3), rendemen yang diperoleh 10,8% dan Lestari (2009) sebesar 12% menunjukkan bahwa rendemen komponen aktif yang diperoleh dari hasil penelitian tidak berbeda jauh. Menurut Maulida dan Guntarti (2015) bahwa semakin kecil ukuran partikel akan lebih mudah terekstraksi dan semakin mempercepat senyawa berdifusi keluar sel sehingga rendemen yang dihasilkan lebih banyak dan Menurut Sembiring *et al.* (2006) banyaknya jumlah ekstrak yang dihasilkan (rendemen) dipengaruhi oleh beberapa hal di antaranya kehalusan bahan dan lama ekstraksi. Selain kehalusan bahan dan lama ekstraksi, keberhasilan suatu proses ekstraksi juga dipengaruhi oleh frekuensi pengadukan saat perendaman dan pengeringan bahan (Suparjana, 2000).

B. Karakteristik Bahan Aktif Ekstrak Kulit Biji Kakao

Berdasarkan hasil pemeriksaan secara fitokimia menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap ekstrak etanol bubuk kulit biji kakao menunjukkan hasil yang positif adanya metabolit sekunder golongan flavonoid, polifenol, alkaloid dan terpenoid.

Senyawa Aktif Flavonoid

Hasil analisis secara fitokimia dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa ekstrak kulit ari biji kakao positif mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid yang ditandai dengan munculnya warna kuning setelah penyemprotan dengan uap amoniak (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil uji KLT flavonoid ekstrak etanol kulit ari biji kakao.

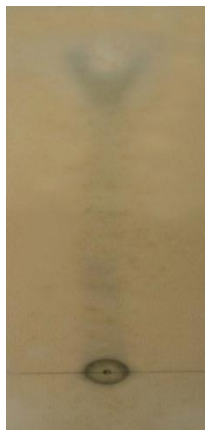
Dari gambar 3 di atas terlihat bahwa warna noda kuning sangat terlihat jelas atau terang. Ini menunjukkan bahwa senyawa aktif flavonoid keberadaannya dalam ekstrak kulit ari biji kakao lebih banyak. Cincin benzen yang terdapat pada flavonoid mempunyai pola oksigenasi yang saling berselang-seling. Cincin benzen yang lain mempunyai pola oksigenasi dari fenol, katekol, atau pirogaloid. Flavonoid yang ditemukan pada kulit biji kakao tidak berbeda dengan flavonoid yang ditemukan pada kulit buah kakao dan biji kakao. Hasil identifikasi senyawa flavonoid pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Justus (2013); Azizah, *et al* (2014) yang mengidentifikasi senyawa aktif dari kulit buah kakao dan hasilnya positif mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid serta hasil penelitian yang dilakukan oleh Aida (2015) yang mengidentifikasi senyawa flavonoid dari biji kakao dan hasilnya positif mengandung flavonoid. Flavonoid hasil ekstrak kulit ari biji kakao digolongkan sebagai senyawa fenolik yang mempunyai ikatan glikosida. Senyawa fenolik tersebut akan berinteraksi dengan protein membran sel bakteri melalui proses adsorpsi dengan cara terikat pada bagian hidrofilik membran sel. Flavonoid merupakan sebuah senyawa polar yang mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol. Flavonoid mengandung fenol yang berfungsi sebagai antibakteri. Mekanisme toksisitas flavonoid

terhadap bakteri diduga akibat adanya senyawa fenolik yang mendenaturasi protein sel bakteri melalui proses adsorpsi dengan cara terikat pada bagian hidrofilik membran sel, sehingga dapat membuat membran sel menjadi lisis dan terjadi kerusakan pada membran sel bakteri.

Senyawa Aktif Polifenol

Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT) terhadap ekstrak etanol bubuk kulit ari biji kakao setelah pemberian pereaksi FeCl_3 tampak noda berwarna hitam yang menunjukkan hasil positif mengandung metabolit sekunder golongan polifenol (Gambar 4).

Dari gambar 4 di atas terlihat bahwa warna noda hitam terlihat sangat jelas atau terang. Ini menunjukkan bahwa senyawa aktif polifenol keberadaannya dalam ekstrak kulit ari biji kakao lebih banyak. Adanya metabolit sekunder golongan polifenol pada kulit ari biji kakao karena kulit ari biji kakao merupakan bagian dari biji kakao dan buah kakao. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nofitahesti (2014) menyatakan bahwa kadar polifenol total tertinggi pada kadar air 80% dimiliki oleh kulit terluar kakao sebesar 321,95 ppm, salut biji kakao (kulit ari) sebesar 291,59 ppm, daging buah kakao sebesar 240,29 ppm, dan kulit dalam kakao sebesar 189,14 ppm. Polifenol berfungsi sebagai antibakteri, mekanisme toksisitas fenolik terhadap bakteri dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri, dimana fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Menurut Cowan (1999) dalam Pasiga, (2004) bahwa mekanisme toksisitas fenolik terhadap mikroorganisme melalui interaksi yang non spesifik dengan protein.



Gambar 4. Hasil uji KLT polifenol ekstrak etanol kulit ari biji kakao.

Senyawa Aktif Alkaloid

Hasil analisis senyawa aktif alkaloid terhadap ekstrak kulit ari biji kakao menggunakan uji kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa ekstrak kulit ari biji kakao positif mengandung metabolit sekunder golongan alkaloid yang ditandai dengan munculnya warna jingga tetapi tingkat kecerahan warna yang ditampilkan sangat tipis dan hampir tidak terlihat adanya noda warna yang ditimbulkan, setelah dilakukan penyemprotan dengan dragendorf Gambar 5).



Gambar 5. Hasil uji KLT alkaloid ekstrak etanol kulit ari biji kakao.

Dari gambar 5 di atas terlihat bahwa warna noda jingga terlihat kurang jelas atau kurang terang. Ini menunjukkan bahwa

senyawa aktif alkaloid keberadaannya dalam ekstrak kulit ari biji kakao lebih sedikit.

Terdeteksinya senyawa aktif alkaloid pada ekstrak kulit ari biji kakao karena kulit ari biji kakao merupakan bagian dari biji kakao dan bagian dari buah kakao itu sendiri. Hal ini sejalan hasil penelitian yang dilakukan oleh Yumas (2013) bahwa hasil identifikasi senyawa aktif dari biji kakao non fermentasi positif mengandung senyawa aktif alkaloid. Namun terdapat perbedaan kekuatan warna jingga yang dihasilkan setelah penyemprotan dengan dragendorf. Senyawa aktif alkaloid dari biji kakao non fermentasi memiliki warna jingga yang terang dibandingkan dengan senyawa aktif alkaloid dari ekstrak kulit ari biji kakao. Ini menunjukkan bahwa keberadaan senyawa alkaloid di dalam kulit ari biji kakao lebih sedikit bila dibandingkan dengan keberadaan senyawa alkaloid pada biji kakao non fermentasi. Justus (2013) dan Mulyatni, *et al* (2012) melakukan identifikasi senyawa aktif golongan alkaloid pada kulit buah kakao menunjukkan bahwa kulit buah kakao positif mengandung senyawa aktif alkaloid yang ditandai dengan warna jingga yang jelas terlihat, sehingga dapat diduga bahwa keberadaan senyawa aktif golongan alkaloid di kulit buah kakao lebih banyak dibandingkan senyawa aktif alkaloid pada kulit ari biji kakao. Mekanisme toksisitas senyawa aktif alkaloid terhadap bakteri diduga akibat senyawa aktif alkaloid memiliki atom nitrogen dan bersifat basa. Proses penghambatan senyawa aktif alkaloid pada bakteri melalui proses koagulasi protein sel bakteri, sehingga terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri. Koagulasi protein akan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri yang menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, sehingga terjadi kematian sel bakteri.

Senyawa Aktif Terpenoid/Steroid

Hasil analisis secara fitokimia dengan uji kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa ekstrak kulit ari biji kakao positif mengandung metabolit sekundergolongan terpenoid/steroid yang ditandai dengan munculnya warna merah ungu-ungu setelah dilakukan pemberian anisaldehida asam sulfat (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil uji KLT terpenoid ekstrak etanol kulit ari biji kakao.

Terdeteksinya senyawa aktif terpenoid atau steroid pada ekstrak kulit ari biji kakao karena kulit ari biji kakao merupakan bagian dari biji kakao dan bagian dari buah kakao itu sendiri yang tidak terpisahkan. Terpenoid merupakan senyawa fenol yang bersifat lipofilik. Mekanisme kerja terpenoid terhadap penghambatan bakteri tidak berbeda dengan mekanisme kerja flavonoid, polifenol, dan alkaloid yaitu dengan cara merusak membran sel atau dirupsinya dinding sel bakteri oleh kumpulan lipofilik. Terpenoid merupakan bentuk senyawa dengan keragaman struktur yang diturunkan dari unit isoprena (C_5) yang bergandengan dalam model kepala ke ekor, sedangkan unit isoprena diturunkan dari metabolisme asam mevalonat (Febriani *et al*, 2010). Disebut terpenes karena struktur kimia adalah $C_{10}H_{16}$ dan bersifat aktif terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri, fungi, virus, dan protozoa (Pasiga, 2004).

C. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Ari Biji Kakao terhadap *Streptococcus mutans*

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit ari biji kakao terhadap bakteri jenis *Streptococcus mutans* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi hambat minimal dan zona daya hambat ekstrak metanol bubuk kakao terhadap *Streptococcus mutans*.

No.	Konsentrasi Ekstrak Kulit Ari Biji Kakao (%)	Rata-rata diameter zona hambatan (mm)	
		1,5 Hari	2 Hari
1.	0,25	5,640	9,900
2.	0,5	7,550	10,850
3.	1,0	9,900	11,095
4.	1,5	11,040	11,650
5.	2,0	11,850	10,800

Dari Tabel 1 terlihat bahwa senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak kulit ari biji kakao, memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, ini ditandai dengan terbentuknya diameter zona bening disekitar lubang yang merupakan zona hambat pertumbuhan bakteri. Hasil pengukuran diameter zona hambatan terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, pada inkubasi satu setengah hari terbesar diperoleh pada konsentrasi 2,0% sebesar 11,850 mm dan terendah pada konsentrasi 0,25% sebesar 5,640 mm. Sedangkan masa inkubasi dua hari diameter zona hambatan terbesar diperoleh pada konsentrasi 1,5% sebesar 11,650 mm dan terendah pada konsentrasi 0,25% sebesar 9,900 mm. Pada konsentrasi 0,25% hingga konsentrasi 1,5% terjadi

peningkatan luasan hambatan atau diameter zona hambatan terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, sedangkan pada konsentrasi 2% terjadi penurunan luasan hambatan atau diameter zona hambatan sebesar 10,800 mm. Terjadinya penurunan diameter hambatan pada konsentrasi 2% pada masa inkubasi dua hari disebabkan senyawa aktif antibakteri ekstrak kulit ari biji kakao hanya bersifat bakteriostatik yaitu hanya mampu menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi dua hari dan apabila tidak dilakukan pemberian bahan aktif lagi maka pertumbuhan bakteri akan meningkat kembali ditandai dengan berkurangnya luasan penghambatan atau diameter zona hambatan. Menurut Mycek (2001) bahwa antimikroba bersifat bakteriostatik karena hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri jika pemberian senyawa aktif terus dilakukan.

Berdasarkan aturan Depkes RI (1989) bahwa suatu bahan aktif dikatakan efektif jika bahan aktif tersebut memiliki penghambatan terhadap bakteri jika diameter hambatan yang terbentuk adalah 6mm atau 0,6 cm. Jika dilihat dari aturan Depkes RI (1989), maka konsentrasi ekstrak kulit ari biji kakao yang memenuhi syarat pada inkubasi satu setengah hari dimulai pada konsentrasi 0,5% dengan diameter hambatan 7,550 mm namun pada inkubasi dua hari dimulai pada konsentrasi 0,25% dengan diameter hambatan 9,900 mm (Tabel 1).

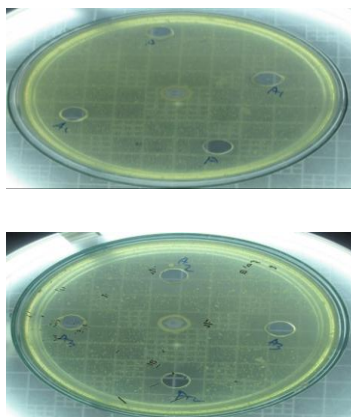
Menurut David and Stout (1971) dalam Ambarawati (2007) bahwa tingkat penghambatan pertumbuhan bakteri jika zona hambatan 5 mm atau kurang maka tingkat hambatannya dikategorikan lemah, zona hambatan sekitar 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambatan sekitar 10-19 mm dikategorikan kuat, dan zona hambatan

sekitar 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Dengan demikian ekstrak kulit ari biji kakao pada konsentrasi 0,25% dengan masa inkubasi satu setengah hari terhadap *Streptococcus mutans* termasuk kategori sedang. Sedangkan masa inkubasi dua hari pada konsentrasi 0,25%-2% dikategorikan kuat. Berdasarkan klasifikasi respon hambatan pertumbuhan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* maka efektifitas zat aktif dari kulit ari biji kakao dikategorikan berada pada level sedang sampai level kuat. Hal ini sejalan hasil penelitian yang dilakukan oleh Anindya (2012) yang menggunakan bahan aktif dari kulit buah manggis bahwa pada konsentrasi 0,25% telah terjadi penghambatan dengan diameter hambatan diatas 5 mm. Jika dibandingkan dengan amoksilin sebagai bahan antibakteri dan control positif (Anindya, 2012) terhadap pertumbuhan bakteri ternyata penggunaan amoksilin dalam menghambat pertumbuhan bakteri, zona hambatan yang dihasilkan lebih luas yaitu 40,2 mm dibandingkan dengan zona hambatan yang terbentuk menggunakan bahan aktif dari kulit ari biji kakao.

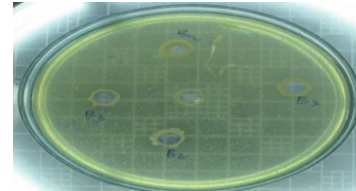
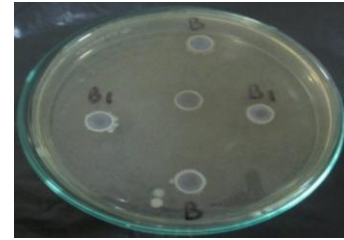
Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak kulit ari biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi satu setengah hari dan dua hari telah terjadi pada konsentrasi 0,25% dengan diameter hambatan masing-masing adalah 5,640 mm dan 9,900 mm. Jika dilihat dari diameter hambatan yang dibentuk maka terdapat perbedaan zona hambatan yang terbentuk antara masa inkubasi satu setengah hari maupun masa inkubasi dua hari. Nilai konsentrasi hambat minimum tersebut menunjukkan bahwa bahan aktif dari ekstrak kulit ari biji kakao telah efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 0,25%. Terdapatnya perbedaan nilai

konsentrasi hambat minimum (KHM) antara masa inkubasi satu setengah hari dan dua hari karena keberadaan populasi bakteri *Streptococcus mutans* jumlahnya tidak banyak, struktur dinding sel atau membran sel lebih sederhana, dan jenis bakterinya adalah bakteri gram positif yang memiliki struktur membran sel atau dinding selnya yang sederhana. Kelompok bakteri ini cenderung lebih rentan terhadap aktifitas senyawa aktif antibakteri seperti senyawa fenolik dan penisilin.

Menurut Hawley (2003) menyatakan bahwa struktur dinding sel yang sederhana menyebabkan senyawa aktif antibakteri mudah untuk menembus dinding sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Sedangkan Brooks (2001) menyatakan, bahwa semakin besar jumlah sel inokulum bakteri, maka semakin berkurang tingkat kepekaannya terhadap senyawa aktif. Menurut Nurwahyuni (2012) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula diameter zona hambat yang dibentuk. Diameter hambatan ekstrak kulit ari biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi satu setengah hari dan dua hari dapat dilihat pada Gambar 7 dan Gambar 8.



Gambar 7. Diameter hambat ekstrak bubuk kulit ari biji kakao terhadap *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi satu setengah hari



Gambar 8. Diameter hambat ekstrak bubuk kulit ari biji kakao terhadap *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi dua hari

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit ari biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, terbukti bahwa aktifitas penghambatan dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak pada kertas cakram. Aktifitas antibakteri semakin meningkat, dengan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak kulit ari biji kakao. Banyaknya kandungan senyawa aktif dalam ekstrak kulit ari biji kakao menyebabkan senyawa aktif akan lebih mudah merusak sel bakteri (Tabel 1, Gambar 7, dan Gambar 8).

Bahan aktif yang memberikan pengaruh penghambatan terhadap aktivitas bakteri *Streptococcus mutans* adalah ekstrak etanol kulit ari biji kakao yang mengandung beberapa metabolit sekunder antara lain flavonoid, polifenol, alkaloid, dan terpenoid/steroid. Beberapa hasil penelitian yang melakukan identifikasi terhadap senyawa aktif dari kulit buah kakao dan biji kakao antara lain Loppies (2013), Mulyatni, et al (2012), Yumas (2013), Kusuma, et al (2013), Pasiga (2004) menyatakan bahwa kulit buah kakao dan biji kakao mengandung senyawa fitokimia flavonoid, polifenol, tanin, katekin, alkaloid, epikatekin, dan

terpenoid. Secara umum, (Plezardan Chan 1998) menyatakan bahwa mekanisme kerja senyawa antibakteri dan antifungi dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur dapat melalui beberapa cara, yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri dan jamur, mengganggu membran sel bakteri dan jamur, menginaktivasi enzim-enzim metabolik dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein.

Ekstrak etanol kulit ari biji kakao dengan komponen aktif senyawa flavonoid merupakan senyawa aktif yang berfungsi sebagai antibakteri *Streptococcus mutans* yang bekerja dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga merusak membran sel bakteri yang diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid bersifat lipofilik dan mengandung senyawa fenol bersifat asam yang memiliki kemampuan mendenaturasikan protein sehingga aktivitas biologis dari protein menjadi rusak, akibatnya protein tidak dapat melakukan fungsinya bagi kehidupan sel. Flavonoid dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid. Sifat lipofilik yang dimiliki oleh senyawa aktif flavonoid akan berinteraksi dengan protein membran sel bakteri melalui proses adsorpsi dengan cara terikat pada bagian hidrofilik membran sel. Senyawa aktif fenolik akan masuk ke dalam membran sel dan menyebabkan presipitasi protein sel, sehingga membran sel dapat mengalami lisis. Nurmillah (2009) menyatakan bahwa senyawa fenolik bekerja dengan mengubah permeabilitas membran sitoplasma, mendenaturasi dan menginaktivasi protein seperti enzim.

Senyawa aktif lain yang terdapat dalam ekstrak kulit ari biji kakao dan berfungsi sebagai antibakteri *Streptococcus mutans*

adalah jenis polifenol, alkaloid dan terpenoid/steroid. Senyawa aktif polifenol dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menurunkan pertumbuhan sel bakteri pada konsentrasi tinggi, serta menurunkan interaksi antar sel pada konsentrasi lebih rendah. Polifenol dengan fenolnya secara umum dapat merusak substrat dan menghambat enzim sehingga bakteri tidak dapat bertumbuh (Pleazar dan Chan, 1998). Senyawa aktif alkaloid lebih efektif menghambat jenis bakteri gram positif dibandingkan jenis bakteri gram negatif. Senyawa aktif alkaloid dalam melakukan proses penghambatan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan cara mengganggu penyusunan peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara sempurna akibatnya terjadi kematian pada sel bakteri tersebut. Menurut Pasaribu, *et al* (2008) menyatakan bahwa senyawa alkaloid dalam melakukan penghambatan terhadap bakteri, memanfaatkan sifat reaktif gugus basahnya untuk bereaksi dengan gugus asam amino pada bakteri. Senyawa aktif terpenoid merupakan senyawa antibakteri yang merupakan senyawa fenol yang bersifat lipofilik. Terpenoid dalam melakukan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri pada dasarnya hampir sama dengan senyawa aktif lainnya dengan cara merusak membran sel. Penghambatan terpenoid terhadap bakteri disebabkan oleh adanya perubahan permeabilitas membran sel. Gangguan permeabilitas tersebut disebabkan karena terpenoid dapat berperan sebagai pelarut yang mampu memasukkan metabolit sekunder lainnya ke dalam membran (Haraguchi *et al.*, 1999; Gershenzon dan Dudareva, 2007).

SIMPULAN

Ekstrak limbah kulit ari biji kakao berpotensi sebagai senyawa aktif antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Ekstrak limbah kulit ari biji kakao bersifat bakteriostatik terhadap *Streptococcus mutans*. Konsentrasi Hambat Minimum

(KHM) ekstrak limbah kulit ari biji kakao terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada masa inkubasi satu setengah hari dan dua hari adalah 0,25% dengan diameter hambatan masing-masing sebesar 7,550 mm dan 9,900 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aida, N.A., 2015. Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao L*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Propionibacterium acnes* Secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
2. Ambarwati. 2007. Efektivitas Zat Antibakteri Biji Mimba (*Azadirachta indica*) untuk menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Biodiversitas* Vol 8. No. 3.
3. Anindya, D., 2012. Efek Ekstrak Kulit Buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. *Laporan Penelitian Pendidikan Dokter*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
4. Azizah, N.D, Kumolowati, E, Faramayuda, F., 2014. Penetapan Kadar Flavonoid Metode $AlCl_3$ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, Des 2014, 2(2), 45-49.
5. Brooks GF, JS Butel and SA Morse (2001). *mJawetz, Melnick, and Adelberg's: Mikrobiologi Kedokteran*. Alih Bahasa: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNAIR. Salemba Medika, Jakarta.
6. Depkes RI. 1989. *Vademekum Bahan Obat Alam*. Depkes RI. Dirjen POM. Jakarta: 56. Dewan Standardisasi Nasional 1995. *Pasta Gigi* Dewan Standardisasi Nasional, Jakarta.
7. Febriyati, 2010. Analisis Komponen Kimia Fraksi Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper bettla Linn.*) dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Beberapa Jenis Bakteri Gram Positif. *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah: Jakarta
8. Gershenzon, J. dan N. Dudareva. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 5 (3) : 408-414.
9. Gramza-Michalowska, A., J. Korczak and M. Hes. 2007. Purification process influence on green tea extracts' polyphenol content and antioxidant activity. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 6 (2) : 41-48
10. Haraguchi, H., S. Kataoka, S. Okamoto, M. Hanafi dan K. Shibata. 1999. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. *Phytotherapy Research*, Vol 13 (2) : 151-156.
11. Hawley LB (2003). *Intisari Mikrobiologi dan Penyakit Infeksi*. Alih Bahasa: Brahm U. Pendit. Jakarta, Hipokrates.
12. Kusuma, Y.T.C., Suwasono, S dan Yuwanti, S. 2013. Pemanfaatan Biji Kakao Inferior Campuran Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antibakteri. *Berkala Ilmiah Pertanian* Vol. 1 (2): 33-37.
13. Lestari, P.I., 2009. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Daun Teh (*Camelia sinensis*) Terhadap *Aspergillus flavus*. *Skripsi*. Fakultas Biologi Universitas Jenderal Sudirman. Purwokerto.
14. Matsumoto M, M Tsuji, J Okuda, H Sasaki, Nakano, K Osawa, S Shimura & T Ooshima (2004). Inhibitory effects of cacao bean husk extract on plaque formation in vitro and in vivo. *Eur J Oral Sci* 112 (3), 249-52.
15. Maulida R, Guntarti A. 2015. The influence of particle size of black rice (*Oryza sativa L.*) on extract yield and total anthocyanin content. *Pharmaciana*. 5(1): 9-16.
16. Mulyatni, S.A., Budiani, A., dan Taniwiryono, D., 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L*) Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *Menara Perkebunan* 80(2):77-84

17. Mycek, M. J., 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar* Edisi 2. Widya Medika. Jakarta.
18. Nofitahesti, I., 2014. Kandungan Polifenol Sebagai Potensi Kulit Buah Dan Salut Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Sebagai Antioksidan. *Skripsi*. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta.
19. Nurmillah dan Ovi Yulianti. 2009. *Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor: Bogor
20. Nurwahyuni dan Rani, 2012. *Uji Aktivitas Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis.) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus epidermidis Pada Jerawat*. UIN Sunan Gunung Djati: Bandung
21. Oewen, R.R, Mahmud, H.M., dan Hardjawanata, K., 1997. Daya Hambat Minimal Catechin dari The Hijau Terhadap *Streptococcus viridans*. *Jurnal Kedokteran Gigi Unpad* : 9 (1-6)
22. Pasaribu, S.P., Eva, M., dan Bobby, S.N. 2008. Uji Fitokimia, Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Jarak Cina (*Jatropha multifida* L.). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 5 (2).ISSN 1693-5616.
23. Pasiga, B.D., 2004. *Upaya Diversifikasi Manfaat Limbah Kulit Buah Kakao Sebagai Komponen Aktif Pasta Gigi*. Program Pascasarjana. UNHAS.
24. Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 1 dan 2*. UI Press, Jakarta.
25. Romas, A., Rosyidah, U.D., Aziz, A.M., 2015. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L) Terhadap Bakteri Escherichia coli ATCC 11229 Dan Staphylococcus aureus ATCC 6358 Secara In Vitro*. University Research Colloquium 2015 ISSN 2407-9189. Hal 127-132.
26. Sabir, A., 2005. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *Streptococcus mutans* Secara In Vitro. *Majalah Kedokteran Gigi (Dentist Journal)*; Vol. 38 (2):135-141.
27. Sembiring, B.B., Ma'mun dan E.I. Ginting (2006). Pengaruh kehalusan bahan dan lama ekstraksi terhadap mutu ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorriza Roxb*). *Bul. Littro*, 17 (2) : 53-58.
28. Siampa, H.R.S., 2016. Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Pada Berbagai Ukuran Partikel Sediaan Ekstrak Dan Nanokitosan Kulit Manggis. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
29. Siregar, T., Dhiksawan, S.F., dan Farida, A., 2011. Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Pada Bioaktivitas Ekstrak Rimpang Lengkuas Secara in vitro Dan Pemanfaatannya Sebagai Zat Aktif Pada Pasta Gigi. *Jurnal Kimia* 5 (1), Januari 2011 : 9-23.
30. Suparjana, T.B. 2000. Kajian Toksisitas Beberapa Fraksi Ekstraktif Kayu Sonokembang (*Pterocarpus indicus* Wild.) dan Nyatoh (*Palaquium gutta* Baill.) terhadap Rayap Tanah dan Jamur Pelapuk kayu. *Tesis*. Tidak Dipublikasikan. Program Pascasarjana IPB, Bogor.
31. Yumas, M., 2013. Efek Antibakteri Komponen Aktif Ekstrak Bubuk Kakao Non Fermentasi Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* Pada Formulasi Pasta Gigi Secara In Vitro. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan* Vol. 8 No. 1: 47-58
32. Yunilawati, R., 2002. *Minyak Atsiri Daun Sirih Sebagai Antibakteri Streptococcus mutans Dalam Pasta Gigi*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor.