

Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Etanol Dan Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, Air Dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 Dengan Metode Difusi Dan Dilusi

Regita Fortunata

Universitas Duta Bangsa Surakarta

Desy Ayu Irma Permatasari

Universitas Duta Bangsa Surakarta

Tatiana Siska Wardani

Universitas Duta Bangsa Surakarta

Abstract. *Cacao fruit peel (Theobroma cacao L.) is a plant that can be used as an antibacterial. Cocoa pod shell contains chemical alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, triterpenoids. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of the ethanol extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction from cocoa pod shells to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC and Minimum Killing Concentration) of the most active fraction of cocoa pod shell on the growth of staphylococcus bacteria. epidermidis ATCC 12228. Cocoa pod powder was macerated using 96% ethanol, then fractionated using n-hexane, ethyl acetate, and water and tested for antibacterial activity using the diffusion and dilution method. Diffusion and dilution methods used the same concentration of 50% preliminary test 25%; 12.5%; 6.25%; 3.125%; 1.565% against Staphylococcus epidermidis ATCC 12228. The results of the antibacterial activity test using the diffusion method showed that the n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and water fraction from cocoa pod shell Each concentration of 50% inhibited the growth of bacteria in the presence of inhibition. The ethanol extract of cocoa pod shells had the greatest inhibition, namely 13.9 mm. The average diameter of the inhibition zone at a concentration of 25%; 12.5%; 6.25%; 3.125%; 1.565% respectively is 13.43 mm; 6.2mm; 4.23mm; 4.06mm; 3.46mm. The results of the dilution method test showed the MIC and KBM values of the ethanol extract, namely 12.5%, based on the results of the study it can be concluded that the ethanol extract has the most active antibacterial content.*

Keywords: *Antibacterial, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, (Theobroma cacao L.)*

Abstrak. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah salah satu tanaman yang dapat di gunakan sebagai antibakteri. Kulit buah kakao memiliki kandungan kimia alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari kulit buah kakao untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari fraksi teraktif kulit buah kakao terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Serbuk kulit buah kakao dimaserasi menggunakan etanol 96%, kemudian di fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air di uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dan dilusi menggunakan konsentrasi yang sama 50% uji pendahuluan 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,565% terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menunjukkan bahwa fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari kulit buah kakao konsentrasi masing-masing 50% dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan adanya daya hambat. Ekstrak etanol kulit buah kakao memiliki daya hambat paling besar yaitu 13,9 mm. Rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,565% berturut-turut adalah 13,43 mm; 6,2 mm; 4,23 mm; 4,06 mm; 3,46 mm. Hasil uji metode dilusi menunjukkan nilai KHM dan KBM ekstrak etanol yaitu 12,5% berdasarkan hasil penelitian dapat di simpulkan bahwa ekstrak etanol memiliki kandungan antibakteri teraktif.

Kata kunci: *Antibakteri, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228, (Theobroma cacao L.)*

Received Juni 30, 2023; Revised Agustus 02, 2023; Accepted September 19, 2023

* Regita Fortunata

LATAR BELAKANG

Penyakit infeksi terjadi akibat bakteri, virus parasit, dan jamur (Jawetz et al., 2001) yang masuk ke dalam tubuh inang mengadakan pertumbuhan atau replikasi (Pratiwi, 2008). Beberapa faktor yang ada, bahwa bakteri adalah faktor yang tidak kalah penting dalam menyebabkan penyakit infeksi (Brooks et al., 2001). Bakteri penyebab infeksi pada manusia, antaranya adalah bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Hampir semua orang pernah mengalami infeksi *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 selama hidupnya, dengan derajat keparahan yang beragam, dari keracunan makanan atau infeksi kulit ringan hingga infeksi berat yang mengancam jiwa (Jawetz et al., 2001).

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 merupakan salah satu spesies dari genus *Staphylococcus* yang banyak ditemui dalam kepentingan klinis. Bakteri ini adalah gram positif, kelompok coccus, nonmotil, non-spora yang memiliki koagulasi negatif, dan hidup disuasana fakultatif anaerob. Sebagian besar koloni bakteri ini adalah flora normal pada kulit manusia (Namvar et al., 2014).

Kulit kakao (*Theobroma cacao L.*) dapat digunakan sebagai antibakteri. Akan tetapi, hal tersebut belum banyak dikembangkan oleh masyarakat. Kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) diketahui memiliki kandungan metabolit sekunder berupa flavonoid yang dapat digunakan sebagai antimikroba dan antivirus (Adha & Ibrahim, 2021). Alkaloid juga merupakan salah satu metabolit sekunder yang terkandung dalam kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba dan antiparasit sehingga berperan dalam perlindungan tanaman sebagai agen kontrol (Kharisma, 2017). Selain itu, Metabolit sekunder tanin dan saponin memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Adha & Ibrahim, 2021)

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*)

Kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah pohon budidaya di perkebunan yang berasal dari Amerika Selatan, tetapi sekarang ditanam di berbagai kawasan tropika. Dari biji tumbuhan ini dihasilkan produk olahan yang dikenal sebagai coklat. Tanaman kakao memiliki sistem perakaran tunggang, daun tanaman kakao berbentuk bulat memanjang, dan meruncing pada kedua ujungnya, bunga tanaman kakao

tumbuh di bekas ketiak daun dengan warna yang berbeda setiap kultivarnya, buah kakao yang matang berwarna kuning ataupun oranye, sedangkan biji kakao berwarna agak kecoklatan dan diselubungi daging buah berwarna putih (Sulaswatty *et al.*, 2019).



Gambar 1. Kulit Buah Kakao

Sumber : (Sulaswatty et al., 2019)

B. Klasifikasi tanaman kakao menurut Crounist (2008) adalah sebagai berikut yaitu:

Klasifikasi tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) meliputi kerajaan, divisi, kelas, bangsa, suku, marga, dan jenis sebagai berikut:

Kerajaan : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Bangsa : *Malvales*
Suku : *Sterculiaceae*
Marga : *Thebroma*
Jenis : *Thebroma cacao* L

Kulit buah kakao diketahui mengandung senyawa aktif alkaloid yaitu theobromin (*3,7-dimethylxantine*). Salah satu efek dari theobromin adalah sebagai penenang, sehingga zat tersebut menjadi faktor pembatas pada pemakaian limbah kulit buah kakao sebagai pakan ternak (Helmestein, 2010). Kulit buah kakao mengandung senyawa aktif flavonoid atau tanin terkondensasi atau terpolimerisasi, seperti antosianidin, katekin, dan leukoantosianidin yang banyak terikat dengan glukosa. Senyawa-senyawa bioaktif tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri

(Matsumoto *et.al*, 2004). Keberadaan senyawa tersebut di dalam kulit buah kakao diduga menjadi salah satu penyebab tidak ditemukannya penyakit pada tanaman kakao yang disebabkan oleh bakteri. Penelitian mengenai potensi ekstrak kulit buah kakao jenis lindak (Forastero) telah dilakukan oleh Sartini *et al.* (2007). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella thypi* dengan tingkat konsentrasi yang berbeda. Bakteri uji yang paling rentan adalah *Streptococcus mutans*. Meskipun demikian aktivitas antibakteri dari ekstrak kulit buah kakao masih perlu dilakukan lebih mendalam. Tujuan penelitian ini untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao jenis hibrida secara in vitro terhadap bakteri *Stapylococus epidermidis* (Sartini *et al.*, 2007).

C. Kandungan Kimia Dan Khasiat

Daun berkhasiat sebagai antioksidan dan bunga kakao berkhasiat sebagai antiseptik, antidiuretik, ekbolik (meningkatkan rangsangan kontraksi uterus), dan emmenagogue (meningkatkan aliran darah haid). Biji kakao berpotensi sebagai bahan antioksidan alami. Buah sebagai antikanker dan mengurangi pembentukan plak gigi. Kulit buah sebagai antioksidan dan antimikroba. Biji kakao mengandung senyawa-senyawa fenolik, antara lain: katekin, epikatekin, protoantosianidin, asam fenolat, tanin dan flavonoid lainnya. Kulit buah kakao kaya akan senyawa fenolik, seperti asam sinamat, tanin, pirogalol, epikatekin-3-galat, kuersetin, dan resinol (Fapohunda & Alofayan, 2012).

Menurut penelitian Vasquez *et al.* (2019), kulit buah kakao memiliki kandungan kimia sebagai berikut: dapat dilihat pada tabel 1.

Table 1. Kandungan Kimia Kulit Buah Kakao

Senyawa	Kadar (%)
Tanin	5,2%
Theobromin	6,850%
Pektin	6,1% - 26,38%
Lignin	14,6% - 26,38%
Protein	4,21% - 10,74%
Serat	60,54% - 0,32%
Selulosa	24,24% - 35,0%
Hemiselulosa	87,2% - 6,9%
Fenolik	4,6% - 6,9%

Hasil penelitian diatas bahwa kulit buah kakao terkandung senyawa aktif alkaloid berupa theobromine yang memiliki efek sebagai penenang. Pada kulit buah kakao juga terdapat senyawa aktif tanin terpolimerisasi atau terkondensasi, seperti katekin, antosianidin, dan leukoantosianidin yang terikat dengan glukosa, dimana senyawa ini memiliki sifat antibakteri. Keberadaan senyawa ini di dalam kulit buah kakao dapat berpotensi menghambat beberapa pertumbuhan bakteri (Vasquez *et al.*, 2019).

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan sampel

1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dari Desa Jembrak, Dusun Pabelan, Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diambil dari Desa Jembrak, Dusun Pabelan, Kabupaten Semarang.

B. Waktu dan Tempat

1. Waktu

Penelitian dilakukan selama 2 bulan pada bulan April – Mei 2023.

2. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Duta Bangsa Surakarta dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

C. Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol.

1. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96% dan fraksi dari ekstrak etanol 96% kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air dalam beberapa konsentrasi yaitu (25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,565%,)

2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat yang dimaksud dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat ekstrak etanol dan fraksi kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum).
3. Variabel kontrol merupakan mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan klasifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali/kontrol dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Kondisi laboratorium meliputi alat dan bahan yang digunakan harus steril.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kain hitam, loyang, oven (*Memmert UN30 Oven Lab*), *blender* (*Cosmos*), pengayak No. 40, timbangan digital (*Durascale*), botol kaca berwarna coklat, batang pengaduk, kertas saring, beker gelas (*Pyrex*), bejana maserasi (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), *rotary evaporator* (*RV 10*), cawan porselin, pipet tetes, *waterbath* (*Memmert*), tabung reaksi (*Pyrex*), timbangan milligram (*Durascale*), corong pisah (*Pyrex*), erlenmeyer (*Pyrex*), sarung tangan, masker, sendok tanduk, batang pengaduk, cawan petri (*Normax*), *spreader glass*, bunsen, jarum ose, kapas, aluminium foil, autoklaf (*GEA*), mikropipet, *yellowtip*, *bluetip*, *incubator* (*Memmert*), *Laminar Air Flow* (LAF), penggaris (*Snowpeak*).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*), etanol 96%, pereaksi mayer, etanol, serbuk magnesium, HCl pekat, akuades, larutan FeCl₃, kloroform, asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, aquadest, *n*-heksan, etil asetat, NaCl 0,9%, bakteri *S. epidermidis*, media BHI (*Brain Heart Infusion*), media MHA (Mueller Hinton Agar), media NB (*Nutrient Broth*), *blank disc*, amoxicillin *disc*, amoxicillin 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui kebenaran dan kesesuaian identitas sampel kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang akan digunakan penelitian, untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain pada saat pengumpulan bahan. Determinasi tanaman kakao ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan sebagai sampel benar keaslian nya dapat dilihat pada lampiran 1.

B. Pengambilan Bahan

Sampel kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) sebanyak 3000 g di ambil dari Desa Jembrak, Dusun Pabelan, Kabupaten Semarang. Penyortiran kulit buah kakao dilakukan dengan memisahkan kulit dengan buah dan biji kakao, kemudian kulit buah kakao di cuci menggunakan air mengalir, kemudian di potong tipis-tipis lalu di jemur sampai kering.

Tabel 2. Persentase Bobot Kering Terhadap Bobot Basah Kulit Buah Kakao

Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Persentase (%)
3000 g	625 g	20,83%

Berdasarkan tabel 2 dapat di ketahui bahwa kulit buah kakao dengan bobot basah 3000 gram di keringkan dan di peroleh bobot kering yaitu 625 gram. presentasi bobot kering terhadap bobot basah sebesar 20,83%. Kulit buah kakao yang sudah kering di haluskan dengan cara di blender sampai halus dan di ayak dengan ayakan mesh 40 untuk memperkecil ukuran partikel serbuk. Hal ini dilakukan karena semakin kecil ukuran partikel maka semakin halus serbuk yang digunakan akan menghasilkan rendemen yang tinggi, selain itu ukuran bahan yang sesuai akan menjadikan proses ekstraksi berlangsung dengan baik dan tidak memakan waktu yang lama.

C. Penetapan Kadar air serbuk kulit buah kakao

Penetapan kadar air serbuk kulit buah kakao dengan menimbang serbuk kulit buah kakao sebanyak 2 gram. Kadar air diukur dengan alat *Moisture Balance* dengan suhu yang diatur 105°C, ditunggu sampai alat berbunyi menandakan analisis telah selesai.

Tabel 3. Persentase Kadar Air Serbuk Kulit Buah Kakao

Bobot Sampel	Persentase Kadar Air
2.00 gram	9,5%

Hasil kadar air serbuk yaitu sebesar 9,5%. Kadar air serbuk Farmakope Herbal Indonesia bila suatu ekstrak tidak lebih dari 10%, jika terlalu tinggi dapat mengubah komposisi kimia dari ekstrak sehingga menurunkan kualitas simplisia dan mudah di tumbuhi bakteri (Indriana *et al.*, 2021).

D. Penetapan Susut Pengerinan Serbuk Kulit Buah Kakao

Penetapan susut pengerinan serbuk kulit buah kakao dengan menimbang serbuk kulit buah kakao sebanyak 2 gram. Susut pengerinan diukur dengan alat *Moisture Balance* dengan suhu yang diatur 105°C, ditunggu sampai alat berbunyi menandakan analisis telah selesai.

Tabel 4. Hasil Susut Pengerinan Serbuk Kulit Buah Kakao

Replikasi	Bobot sampel	Persentase susut pengerinan
I	2.00 gram	9,50%
II	2.02 gram	10.00%
III	2.02 gram	10.00%
Rata- rata		9,83%

Hasil susut pengerinan yaitu sebesar 9.83%. susut pengerinan memenuhi syarat Farmakope Herbal Indonesia bila suatu serbuk simplisia tidak lebih dari 10%, jika terlalu tinggi dapat mengubah komposisi kimia dari simplisia sehingga menurunkan kualitas simplisia dan mudah di tumbuhi bakteri (Mancak, 2018).

E. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Kulit Buah Kakao

Pembuatan ekstrak kulit buah kakao menggunakan metode maserasi. Serbuk daun kakao ditimbang 500 gram dimasukkan kedalam toples maserasi, ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:10 sebanyak 5 liter. Maserasi dilakukan selama 5 hari sesekali sambil diaduk, setelah itu disaring dengan kain flanel diperoleh hasil maserasi, kemudian hasil maserasi tadi disaring lagi menggunakan kertas saring agar tidak ada endapan pada hasil maserasi akhir. Filtrat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C sampai terbentuk ekstrak pekat. Hasil ekstrak etanol 96% dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 5. Hasil Presentase Ekstrak Kulit Buah Kakao

Bobot serbuk	Bobot ekstrak	Persentase	Pustaka (FHI)
500 gram	40 gram	8%	>7,2%

Berdasarkan tabel 3 dapat dilihat hasil persentase rendemen ekstrak etanol 96% pada kulit buah kakao diperoleh sebanyak 8%. Hasil ini memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia, yaitu rendemen tidak kurang dari 7,2% (Depkes RI, 2000). Hasil uji organoleptis ekstrak kulit buah kakao berwarna coklat tua dan bentuk kental bau khas rasa sedikit manis agak sepat.

F. Penetapan Kadar Air Ekstrak

Penetapan kadar air ekstrak kulit buah kakao dengan menimbang ekstrak kulit buah kakao sebanyak 2 gram. Susut pengeringan diukur dengan alat *Moisture Balance* dengan suhu yang diatur 105°C, ditunggu sampai alat berbunyi menandakan analisis telah selesai.

Tabel 6. Presentase Kadar Air Ekstrak

Bobot Sampel	Persentase Kadar Air
2.00 gram	8.0%

Hasil kadar air ekstrak yaitu sebesar 8.0%. Kadar air ekstrak Farmakope Herbal Indonesia bila suatu ekstrak tidak lebih dari 10%, jika terlalu tinggi dapat mengubah komposisi kimia dari ekstrak sehingga menurunkan kualitas simplisia dan mudah di tumbuhi bakteri (Indriana *et al.*, 2021).

G. Penetapan Susut Pengeringan Ekstrak

Penetapan susut pengeringan ekstrak kulit buah kakao dengan menimbang ekstrak kulit buah kakao sebanyak 2 gram. Susut pengeringan diukur dengan alat *Moisture Balance* dengan suhu yang diatur 105°C, ditunggu sampai alat berbunyi menandakan analisis telah selesai.

Tabel 7. Presentase Susut Pengeringan Ekstrak

Replikasi	Bobot Sampel	Persentase susut pengeringan
I	2.00 gram	11,00%
II	2.02 gram	9.10%
III	2.02 gram	9.00%
Rata – rata		9,73%

Hasil susut pengeringan yaitu sebesar 9.73%. susut pengeringan memenuhi syarat Farmakope Herbal Indonesia bila suatu ekstrak tidak lebih dari 10%, jika terlalu tinggi dapat mengubah komposisi kimia dari ekstrak sehingga menurunkan kualitas simplisia dan mudah di tumbuhi bakteri (Mancak, 2018).

H. Uji Bebas Etanol Ekstrak Kulit Buah Kakao

Uji bebas etanol di lakukan dengan cara ekstrak kental kulit buah kakaoditambah dengan H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH 1% kemudian di panaskan. Hasil uji bebas etanol ekstrak kulit buah kakao dapat di lihat pada tabel 4.

Tabel 8. Hasil Uji Bebas Etanol Ekstrak Kulit Buah Kakao

Uji Bebas Etanol	Hasil Pengamatan	Pustaka (Preapandi, 2006)
Ekstrak kulit buah kakao + H ₂ SO ₄ + CH ₃ COOH 1% dipanaskan	(+) tidak terdapat bau ester	Tidak terdapat bau ester yang khas dari etanol

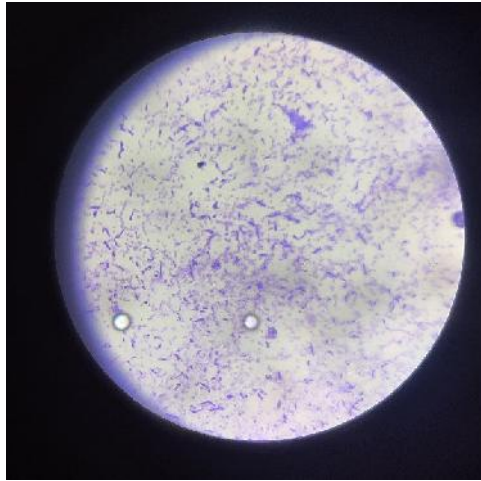
Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao bebas dari pelarut etanol 96% yang ditunjukkan tidak ada bau ester yang khas dari etanol (Agustie & Samsumaharto, 2013).

I. Hasil Identifikasi Bakteri *Staphylococcus Epidermidis* ATCC 12228

1. Hasil Identifikasi Mikroskopis Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk membedakan antara 2 kelompok bakteri yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram menggunakan 4 jenis reagen, Gram A (larutan kristal violet), Gram B (larutan lugol iodin), Gram C (alkohol), Gram D (larutan safranin). Bakteri Gram positif dapat mempertahankan warna ungu dari kristal violet sehingga saat diamati dengan mikroskop akan menunjukkan warna ungu sedangkan bakteri Gram negatif tidak akan mempertahankan warna ungu kristal violet, tetapi zat safranin dapat terserap pada dinding sel sehingga pada saat dilihat menggunakan mikroskop akan berwarna merah.

Hasil identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan Gram pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 menunjukkan bahwa bakteri termasuk golongan Gram positif karena pada saat diamati menggunakan mikroskop terdapat warna ungu pada bakteri *Staphylococcus epidermidis*.



Gambar 2. Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

2. Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Konsentrasi 50% Sebagai Uji Pendahuluan Secara Difusi

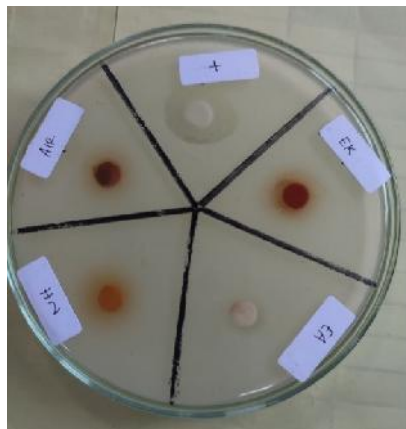
Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi kulit buah kakao dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Metode ini menggunakan kertas cakram yang sudah direndam dalam ekstrak etanol kulit buah kakao dengan konsentrasi 50%, *amoxicilin discs* 30 $\mu\text{g/mL}$ sebagai kontrol positif (+) dan DMSO 1% sebagai kontrol negatif (-). Kertas cakram diletakkan di atas permukaan media MHA yang telah diinokulasikan suspensi bakteri uji. Hasil yang diperoleh yaitu terbentuknya zona bening dengan diameter yang ditunjukkan pada tabel 12.

Tabel 9. Uji Pendahuluan Antibakteri Konsentrasi 50% Secara Difusi

Bahan uji	Konsentrasi	Daya Hambat	Kategori Daya Hambat
Ekstrak	50%	7,9 mm	Sedang (<i>moderate</i>)
N-heksan	50%	0,6 mm	Lemah (<i>weak</i>)
Etil asetat	50%	2,7 mm	Lemah (<i>weak</i>)
Air	50%	2,3 mm	Lemah (<i>weak</i>)
Amoxicillin	30 μg	13,6 mm	kuat (<i>strong</i>)

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dilakukan dengan metode difusi didapatkan hasil yang teraktif ialah ekstrak Kemampuan ekstrak dan fraksi kulit buah kakao dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas

cakram. Ekstrak memiliki diameter hambat yang paling besar dibandingkan dengan fraksi lainnya yaitu dengan diameter zona hambat 7,9 mm dikategorikan sedang (*moderate*), lalu fraksi etil asetat dengan diameter 2,7 mm dikategorikan lemah (*weak*), fraksi air 2,3 mm dikategorikan lemah (*weak*), fraksi n-Heksan dengan diameter 0,6 mm dikategorikan lemah (*weak*). Adanya perbedaan diameter hambat yang terbentuk dari ekstrak dan fraksi terhadap bakteri uji menunjukkan bahwa adanya perbedaan senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak dan fraksi kulit buah kakao, sehingga kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* juga berbeda-beda. Semakin besar diameter hambat yang terbentuk berarti kemampuannya sebagai antibakteri juga besar atau dapat dikatakan memiliki aktifitas antibakteri teraktif (Erlyn, 2016). Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan fraksi konsentrasi 50% sebagai uji pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Uji Pendahuluan Antibakteri Konsentrasi 50% Dengan Metode Difusi

3. Pengujian Antibakteri Fraksi Teraktif dengan Metode Difusi

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dengan metode *disc diffusion* dilakukan pada ekstrak kulit buah kakao. Digunakan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,5625% dengan 3 kali pengulangan.

Tabel 10. Uji Aktifitas Anti Bakteri Fraksi Teraktif Secara Difusi

Bahan uji	konsentrasi	Daya hambat (mm)			Rata -rata (mm) ± SD
		I	II	III	
Ekstrak	25%	13,4 mm	13,3 mm	13,6 mm	13,43 mm
	12,5%	6,0 mm	6,1 mm	6,5 mm	6,2 mm
	6,25%	4,2 mm	4,5 mm	4,0 mm	4,23 mm
	3,125%	4,0 mm	4,2 mm	4,0 mm	4,06 mm
	1,565%	3,2 mm	3,3 mm	4,0 mm	3,46 mm
<i>Amoxicillin disc</i>	30 µg/mL	29,0 mm	29,0 mm	28,3 mm	28,76 mm
DMSO 1%	1 %	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Berdasarkan tabel 10 konsentrasi 25% diameter hambat yang terbentuk paling besar dan diameter hambat terkecil pada konsentrasi 1,565%. Hasil gambar pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif dapat pada Lampiran 8. Dari hasil zona bening menunjukkan adanya diameter hambat pada masing-masing konsentrasi dimana diameter hambat dari masing-masing konsentrasi mengalami penurunan sesuai dengan penurunan nilai konsentrasi, sehingga dapat diketahui bahwa besarnya konsentrasi dan diameter hambat memiliki hubungan yang berbanding lurus satu sama lain (Erlyn, 2016).

**Gambar 4. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teraktif Dengan Metode Difusi**

4. Pengujian Antibakteri dengan Penentuan Nilai KHM dengan Metode Dilusi Cair

Penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan terhadap ekstrak kulit buah kakao dengan tujuan untuk mengetahui jumlah terkecil zat aktif antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus*

epidermidis. Penentuan nilai KHM dilakukan dengan beberapa konsentrasi, tujuannya untuk mengetahui jumlah terkecil zat aktif antibakteri yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan organisme bakteri yang diuji.

Tabel 11. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Secara Dilusi

Konsentrasi Ekstrak	Hasil
50%	-
25%	-
12,5%	-
6,25%	+
3,125%	+
1,565%	+
Kontrol (-) DMSO 1%	+
Kontrol (+) amoxicillin 1%	-

Keterangan: (-) tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) ada pertumbuhan bakteri

Hasil uji antibakteri dengan penentuan nilai KHM pada konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,565%. Pada tabung 2, 3, dan 4 dengan masing-masing konsentrasi larutan uji 50%; 25%; dan 12,5% larutan terlihat jernih dan tidak tampak adanya gumpalan atau selaput yang tumbuh. Sedangkan pada tabung 5 sampai tabung 7 dengan masing-masing konsentrasi larutan uji 6,25%, 3,125%, 1,5625% larutan terlihat keruh dan terdapat gumpalan/selaput yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri *Straphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pada larutan tersebut. Dari hasil yang didapatkan, dapat diketahui bahwa konsentrasi 12,5% merupakan konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Straphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Hal tersebut ditunjukkan dengan warna larutan tidak keruh dan tidak adanya gumpalan/selaput biofilm yang terbentuk di dalam larutan. Dengan demikian, larutan sampel pada tabung 4 yaitu larutan uji dengan konsentrasi 12,5% dapat dinyatakan sebagai nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

5. Pengujian Antibakteri dengan Penentuan Nilai KBM dengan Metode Dilusi Padat

Penentuan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum) pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan semua larutan uji, diharapkan 3 konsentrasi yang sudah diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 pada media agar tetap jernih yang berarti larutan uji dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5% yang diberikan dapat membunuh bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Hasil tersebut menunjukkan bahwa cawan petri yang sudah diisi dengan media MHA dan digores dengan larutan uji dengan masing-masing konsentrasi, bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 tidak dapat tumbuh pada konsentrasi 50%; 25%; 12,5% ditandai dengan media yang tetap jernih dan pada konsentrasi 6,25%; 3,125%; 1,565%; bakteri masih dapat tumbuh yang ditandai dengan munculnya bercak-bercak pada media yang digunakan. Pada konsentrasi 12,5% bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 sudah tidak dapat beradaptasi dan bertumbuh. Hal itu menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut mampu digunakan untuk membunuh bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Dengan demikian, nilai KBM dapat dinyatakan pada konsentrasi 12,5%. Ekstrak kulit buah kakao dapat membunuh *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 diperkirakan memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, saponin dan triterpenoid yang digunakan sebagai anti mikroba dan anti virus (Adha & Ibrahim, 2021).



Gambar 5. Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Teraktif Dengan Metode Dilusi Padat

6. Analisis Data Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao

Analisis data ini dilakukan untuk membuktikan hipotesis bahwa diameter zona hambat yang diperoleh pada pengujian ekstrak teraktif konsentrasi 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,525% memiliki perbedaan yang bermakna. Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa diameter zona hambat yang dihasilkan berbeda-beda dari ekstrak dari beberapa konsentrasi tersebut

terhadap hasil diameter zona hambat secara signifikan, maka dilakukan dengan uji statistik yang tepat dengan taraf kepercayaan 95%.

	Bahan Uji	Tests of Normality ^b				
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df
Daya Hambat (mm)	Ekstrak 25%	.253	3	.	.964	3
	Ekstrak 12,5%	.314	3	.	.893	3
	Ekstrak 6,25%	.219	3	.	.987	3
	Ekstrak 3,125%	.385	3	.	.750	3
	Ekstrak 1,565%	.343	3	.	.842	3
	Amoxicillin	.385	3	.	.750	3

Data daya hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pada ekstrak kulit buah kakao dengan kontrol positif, negatif dan konsentrasi diperoleh akan di uji analisis data normalitas sampel Shapiro-wilk diperoleh signifikan dari semuasampel $0,964 > 0,05$ maka data diterima dan akan di lanjutkan uji One Way ANOVA (Vebliani *et al.*, 2020).

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	Daya Hambat (mm)		Sig.
	df1	df2	
3.718	6	14	.020

Kemudian dilakukan uji *Test of Homogeneity of Variances* dengan hasil $0,020 > 0,05$ maka data diterima dan sampel memiliki varian yang sama atau homogen (Vebliani *et al.*, 2020).

ANOVA

Daya Hambat (mm)					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2136.806	6	356.134	5623.173	.000
Within Groups	.887	14	.063		
Total	2137.692	20			

Hasil signifikans dari uji ANOVA yaitu $0,000 < 0,05$ data uji dari sampel perbedaan dari zona hambat, maka dapat di lanjutkan dengan uji Post Hoc Test (hendrawan, 2018).

Daya Hambat (mm)							
Tukey HSD							
Bahan Uji	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
DMSO 1%	3	.00					
Ekstrak 1,565%	3		9.50				
Ekstrak 3,125%	3		10.07	10.07			
Ekstrak 6,25%	3			10.23			
Ekstrak 12,5%	3				12.20		
Ekstrak 25%	3					19.43	
Amoxicillin	3						34.83
Sig.		1.000	.154	.980	1.000	1.000	1.000

Pengujian ekstrak kulit buah kakao dengan konsentrasi 1,525%; 3,125%; 6,25% memiliki perbedaan signifikan yaitu dapat dilihat dari nilai signifikan yang berbeda antara konsentrasi 1,525%; 3,125%; 6,25% berturut-turut yaitu 1.000; 0,154; 0,980. Tetapi pada konsentrasi 12,5%; 25% dan kontrol positif memiliki kesamaan pada nilai signifikan nya yaitu 1.000 pada tabel dapat dilihat bahwa hasil tabel semakin kekanan artinya kontrol positif memiliki daya hambat paling baik disusul dengan konsentrasi 25% dan 12,5% sebagai ekstrak kulit buah kakao dengan zona hambat yang kuat (Hendrawan, 2018).

KESIMPULAN

A. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air Kulit buah kakao 50% memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dengan diameter zona hambat berturut-turut sebesar 7,9 mm, 0,6 mm, 2,7 mm, dan 2,3 mm.
2. Fraksi teraktif dari kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah ekstrak kulit buah kakao. Rata-rata diameter zona hambat dari setiap variasi konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,565 berturut-turut 19,43 mm, 10,83 mm, 10,23 mm, 10,06 mm, dan 9,5 mm.
3. Nilai Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dari fraksi teraktif (ekstrak) kulit buah kakao (*Theobroma cacao L.*) terdapat pada konsentrasi 12,5%.

B. Saran

1. Dilakukan penelitian tentang aktivitas antibakteri pada fraksi *n*-heksan, etil asetat dan fraksi air dengan variasi konsentrasi 40%; 30%; 20%; 10%; dan 5%.
2. Dilakukan penelitian aktivitas antibakteri dari kombinasi ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dan daun anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan metode fraksi dan infusa.

Dilakukan uji bioautografi pada ekstrak etanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

DAFTAR REFERENSI

- Adha, S. D., & Ibrahim, M. (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 10(2), 140-145
- Diyantika, Dafista, Diana Chusna Mufida, and Misnawi Misnawi. "Perubahan Morfologi *Staphylococcus aureus* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) secara In Vitro." *Pustaka Kesehatan 2.2* (2014): 337-345.
- Kursia, Sukriani, Julianri Sari Lebang, and Nursamsiar Nursamsiar. "Uji aktivitas antibakteri ekstrak etilasetat daun sirih Hijau (*Piper betle* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*." *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology 3.2* (2016): 72-77.
- Miswan, Miswan,. "Efektifitas Ekstrak Limbah Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Antibakteri *Escherecia coli*." *Jurnal Kolaboratif Sains 1.1* (2018).
- Miswan & Andi R., A., C., N. Efektifitas Ekstrak Limbah Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Sebagai Antibakteri *Escherecia coli*. *Jurnal Kolaboratif Sains*, 2018, 1.1.
- Pratiwi, S. T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi* (R. Astikawati & A. Safitri (eds.)). Bagian Produksi Penerbit Erlangga PT Gelora Aksara Pratama.
- Trisia, Adelgrit, Regina Philyria, and Angeline Novia Toemon. "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kalanduyung (*Guazuma ulmifolia* Lam.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Cakram (Kirby-Bauer): Antibacterial Activity Test of Ethanol Extract from Kalanduyung Leaf (*Guazuma ulmifolia* Lam.) on *Staphylococcus aureus* Growth with Diffusion Method (Kirby-Bauer)." *Anterior Jurnal 17.2* (2018): 136-143.