

Daya Hambat Ekstrak Daun Kakao (*Theobroma Cacao L.*) terhadap Pertumbuhan *Candida Albicans*

(*Inhibitory Effect of Cocoa Leaf (Theobroma Cacao L.) Extract on the Growth of Candida Albicans*)

Nadya Indah Permataningrum, Leni Rokhma Dewi, Ayu Mashartini Prihanti
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: nadyaindah.p97@gmail.com

Abstract

Candidiasis is an infection caused by overgrowth of Candida species in the oral cavity dominated by C. albicans. One way to inhibit the growth of the fungi is by utilizing medical plants that contain antifungal compounds. Cocoa leaves is a plants that has antifungal compounds such as caffeine, flavonoids and alkaloids. The aim of study was analyzing the effect of cocoa leaf extract on the growth of C. albicans and determining the optimal concentration of cocoa leaf extract in inhibiting the growth of C. albicans. The study used macerated cocoa leaf extract. The inhibitive testing method conducted by disc diffusion method. The concentrations of cocoa leaf extract were 25%, 50%, 75%, 100%, and nystatin was used as positive control and aquadest was negative control. All were passed on the disc and further incubated for 24 hours. The inhibition effect was measured by a caliper. Cocoa leaf extract can inhibit the growth of C. albicans, and the largest co-concentration in inhibiting C. albicans was 100%.

Keywords: *Candida albicans, maceration, candidiasis, disc diffusion method*

Abstrak

Kandidiasis merupakan infeksi yang disebabkan oleh pertumbuhan berlebih dari spesies *Candida* dalam rongga mulut yang didominasi oleh *C. albicans*. Salah satu cara untuk menghambat pertumbuhan jamur adalah dengan memanfaatkan tanaman obat yang memiliki senyawa antijamur. Daun kakao merupakan salah satu tanaman yang memiliki senyawa antijamur seperti kafein, flavonoid dan alkaloid. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa pengaruh ekstrak daun kakao terhadap pertumbuhan *C. albicans* dan menentukan konsentrasi optimal ekstrak daun kakao dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Materi yang digunakan adalah ekstrak daun kakao hasil maserasi. Metode pengujian kemampuan inhibisi menggunakan *disc diffusion method*. Ekstrak daun kakao konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, nistatin dan aquades diberikan pada masing-masing disc lalu diinkubasi selama 24 jam dan dilakukan pengukuran menggunakan jangka sorong. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kakao dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* dan konsentrasi terbesar dalam menghambat *C. albicans* adalah 100%.

Kata kunci: *Candida albicans, maserasi, kandidiasis, metode difusi*

Pendahuluan

Candida albicans jamur komensal yang normal terdapat di mukosa rongga mulut pada individu yang sehat [1]. Jamur ini jumlahnya mencapai 40-80% dari populasi mikroorganisme di rongga mulut [2]. Walaupun demikian *C.*

albicans dapat menjadi patogen dalam kondisi tertentu sehingga dapat menimbulkan suatu infeksi yang disebut dengan kandidiasis oral [3].

Kandidiasis oral merupakan infeksi yang disebabkan oleh pertumbuhan berlebih dari spesies *Candida* dalam rongga mulut yang didominasi oleh *C. albicans* [4]. Infeksi ini sering

mengakibatkan rasa tidak nyaman pada mulut, nyeri, dan penurunan nafsu makan. Pada keadaan akut kandidiasis dapat menimbulkan keluhan seperti rasa terbakar (*burning sensation*), rasa sakit yang terjadi pada lidah, mukosa bukal, atau labial dan rasa kering (*xerostomia*) [3]. Oleh karena itu diperlukan suatu tindakan pencegahan maupun pengobatan yang dapat mengatasi keadaan tersebut.

Salah satu cara untuk menghambat pertumbuhan *C. albicans* adalah dengan memanfaatkan tanaman sebagai obat herbal yang diduga efektif dalam menghambat pertumbuhan jamur, memiliki efek samping minimal dan mudah didapatkan di lingkungan sekitar. Salah satu tanaman obat tersebut yang diduga memiliki khasiat terapi adalah daun kakao.

Pada daun kakao terdapat beberapa senyawa aktif seperti kafein, flavonoid dan alkaloid [5]. Kafein dapat menghambat sintesis dinding sel yang menyebabkan sel jamur menjadi lisis dan berakhir dengan kematian sel [6]. Flavonoid berfungsi menghambat pembelahan atau proliferasi sel [7]. Alkaloid mampu untuk mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel sehingga menyebabkan lapisan dinding sel jamur tidak terbentuk secara utuh dan mengakibatkan kematian sel [8].

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisa pengaruh inhibisi ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap pertumbuhan *C. albicans* dan menganalisa konsentrasi optimal ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao* L.) dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan bagi penelitian selanjutnya untuk dikembangkan sebagai obat yang dapat mencegah terjadinya kandidiasis, yang diharapkan memiliki efek samping minimal dibandingkan dengan obat kimia.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *experimental laboratories in vitro* dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design* [9]. Penelitian ini dilakukan di bagian Biomedik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Sampel penelitian dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok ekstrak daun kakao dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, nistatin sebagai kontrol positif (K(+)) dan aquades

sebagai kontrol negatif (K(-)).

Cara pembuatan ekstrak daun kakao yaitu daun kakao sebanyak ½ kg dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian didiamkan dan tidak boleh terpapar sinar matahari secara langsung. Daun kakao dipotong melintang dengan lebar ½ cm kemudian dikeringkan pada oven. Setelah itu potongan melintang daun kakao dihaluskan menggunakan alat selep sampai menjadi serbuk atau bubuk. Sediaan ekstrak dibuat dengan metode maserasi, yaitu simplisia daun kakao ditimbang kemudian direndam pada pelarut etanol 96% sebanyak 1,5 L sesuai perbandingan 1: 7,5 b/v. Perendaman dilakukan selama 3 hari didalam wadah toples tertutup dan dilakukan pengadukan setiap hari. Rendaman simplisia daun kakao disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan corong *buncher* sehingga menghasilkan filtrat. Setelah itu dilanjutkan dengan penguapan maserat menggunakan *rotary evaporator* dan didapatkan ekstrak dalam bentuk cair. Kemudian ekstrak daun kakao dipekatkan dengan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40-50°C untuk mendapatkan ekstrak daun kakao yang murni 100%. Konsentrasi 100% tersebut kemudian dilakukan pengenceran dengan aquades untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

Suspensi *C. albicans* dibuat dengan cara mencampurkan 1 ose isolat *C. albicans* dengan 2 ml larutan SDB kemudian diinkubasi. Setelah masa inkubasi, suspensi divorteks menggunakan *thermolyne* dan diukur absorbasinya dengan standar Mc Farland 0,5 menggunakan spektrofotometer. Suspensi *C. albicans* sebanyak 0,5 ml kemudian diinokulasikan pada media SDA dan diratakan dengan gigaskrin, lalu ditunggu 15 menit hingga media menjadi padat. Setelah itu pada media SDA diberi 6 *paper disc* yang berdiameter 5 mm.

Identifikasi jamur *C. albicans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dengan menggunakan uji germ tube dan menunjukkan hasil yang positif. Metode untuk uji kemampuan inhibisi ekstrak daun kakao terhadap pertumbuhan *C. albicans* menggunakan metode difusi (*disc diffusion method*). Ekstrak daun kakao konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, nistatin sebagai kontrol positif dan aquades sebagai kontrol negatif diberikan pada masing-masing *disc* sebanyak 20 µl. Petridish lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam

masa inkubasi. Area jernih disekeliling *paper disc* petunjuk kepaakan jamur terhadap antijamur yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona inhibisi. Pengukuran zona hambat ini menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm). Cara pengukurannya yaitu diameter zona hambat diukur dari tepi (*break point*) ke tepi (*break point*) bersebrangan dengan melewati pusat *paper disc* dan dilakukan secara tegak lurus. Jika tidak terdapat zona inhibisi disekeliling *paper disc*, maka dapat dikatakan bahwa nilai diameter zona inhibisi sebesar 0,00 mm. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali oleh 3 orang pengamat yang berbeda yang sebelumnya telah diberikan penjelasan untuk menyamakan persepsi dalam menghitung zona hambat, kemudian hasil pengukuran diambil rata-rata.

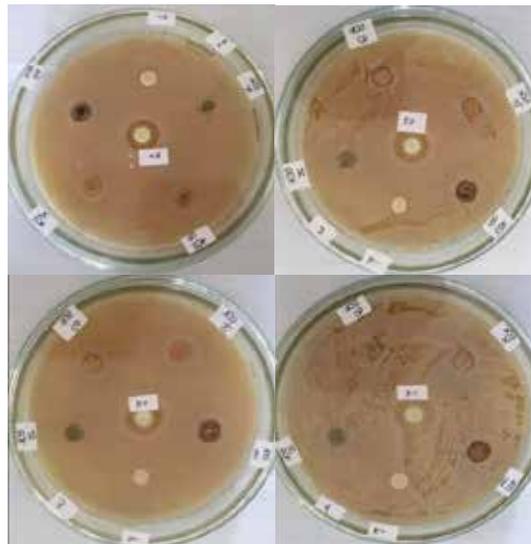
Data hasil uji kemampuan inhibisi ekstrak daun kakao terhadap pertumbuhan *C. albicans* dilakukan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas dengan uji *Levene test* kemudian dianalisis secara statistik non-parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

Hasil

Hasil penelitian mengenai kemampuan inhibisi ekstrak daun kakao terhadap pertumbuhan *C. albicans*, dapat dilihat pada gambar 1. Dari gambar 1 diperoleh nilai rata-rata diameter zona hambat terbesar terdapat pada kelompok K(+), yaitu sebesar 13,92 mm, kemudian diikuti kelompok Ekstrak Daun Kakao 100% sebesar 7,98 mm dan kelompok Ekstrak Daun Kakao 75% sebesar 6,30 mm. Pada kelompok Ekstrak Daun Kakao 50%, Ekstrak Daun Kakao 25% dan kelompok K(-) memiliki nilai rata-rata diameter zona hambat sebesar 0,00 mm.

Hasil penelitian kemudian dilakukan uji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas dengan uji *Levene test* sebelum dilakukan uji statistik. Hasil kedua uji tersebut diketahui bahwa data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen. Analisis data tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Data dilakukan uji *Kruskal-Wallis* bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada seluruh kelompok penelitian. Sedangkan uji *Mann-Whitney* digunakan untuk mengetahui

perbedaan antara kelompok penelitian. Hasil uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* menunjukkan terdapat perbedaan pada seluruh kelompok penelitian karena didapatkan nilai ($p < 0,05$) yaitu 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok ekstrak daun kakao memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*.



Gambar 1. Zona inhibisi (area jernih) ekstrak daun kakao terhadap pertumbuhan *C. albicans*

Uji hasil penelitian kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok penelitian. Hasil dari uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa antar kelompok penelitian terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok penelitian Ekstrak Daun Kakao 25%, Ekstrak Daun Kakao 50%, Ekstrak Daun Kakao 75%, Ekstrak Daun Kakao 100%, K(+) dan K(-) ditandai dengan ($p < 0,05$).

Pembahasan

Kemampuan inhibisi merupakan kemampuan suatu zat untuk menghambat pertumbuhan *C. albicans* dengan cara mengukur diameter zona hambat di sekeliling *paper disc* pada media yang sudah diinokulasi dengan *C. albicans*. Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kakao memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* yang ditandai dengan terbentuknya zona inhibisi disekeliling *paper*

disk. Nilai rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk disekeliling zona hambat pada konsentrasi 100% adalah 7,98 mm, pada konsentrasi 75% adalah 6,30 mm dan pada konsentrasi 50% dan 25% adalah 0,00 mm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kakao, maka semakin besar pula diameter zona hambat yang menunjukkan semakin kuat daya antijamur yang dimiliki oleh ekstrak daun kakao tersebut.

Pada penelitian ini peneliti menggunakan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% dikarenakan pada penelitian sebelumnya menyatakan bahwa konsentrasi tersebut memiliki kemampuan antibakteri tetapi pada variabel yang berbeda. Pada hipotesis awal konsentrasi yang paling optimum pada konsentrasi berapa. Kriteria dari konsentrasi yang optimal yaitu daya hambat pada konsentrasi tersebut memiliki kekuatan yang sedang. Untuk mengetahui kriteria zona hambat, terdapat teori David dan Stout, 1971, kriteria kekuatan antijamur adalah sebagai berikut: lemah yaitu zona hambat kurang dari 5 mm, sedang yaitu zona hambat 5-10 mm, kuat yaitu zona hambat 11-20 mm dan sangat kuat yaitu zona hambat lebih dari 20 mm [10]. Pada penelitian ini zona hambat yang terbentuk pada kelompok Ekstrak Daun Kakao 75% sebesar 6,30, kelompok Ekstrak Daun Kakao 100% sebesar 7,98 tetapi pada kelompok Ekstrak Daun Kakao 25% dan kelompok Ekstrak Daun Kakao 50% tidak terdapat zona inhibisi. Dapat disimpulkan bahwa berdasarkan data yang didapat dalam penelitian ini ekstrak daun kakao pada konsentrasi 75% dan 100% digolongkan sebagai daya antijamur yang sedang. Hasil tersebut sesuai dengan hipotesis awal yaitu semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antijamur maka aktivitas antijamur juga akan semakin kuat. Sedangkan ekstrak daun kakao pada konsentrasi 25% dan 50% tergolong daya antijamur yang lemah. Hal ini kemungkinan kemampuan difusi yang rendah disebabkan oleh terlalu banyaknya kandungan aquadest pada ekstrak sehingga menyebabkan senyawa aktif pada ekstrak tidak dapat berdifusi maksimal ke dalam medium yang mengandung inokulum [11].

Hasil penelitian menunjukkan kelompok konsentrasi 100% memiliki diameter zona hambat yang besar dibandingkan dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25%. Selain faktor konsentrasi, jenis bahan antimikroba yang dihasilkan juga menentukan kemampuan menghambat pertumbuhan jamur [12]. Didalam penelitian ini aktivitas antijamur ekstrak daun

kakao diduga karena adanya kandungan senyawa-senyawa berkhasiat, seperti kafein flavonoid dan alkaloid.

Kafein pada daun kakao terdiri dari senyawa organik yang mengandung nitrogen dengan struktur dua-cincin atau dua-siklik. Kandungan senyawa kafein pada daun kakao berfungsi sebagai pestisida alami untuk membunuh bakteri, jamur maupun serangga pada daun kakao [7]. Mekanisme kerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel sehingga sel jamur akan mengalami kerusakan dan sel jamur tersebut akan mengalami kematian [13].

Flavonoid adalah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun kakao dan berperan sebagai antijamur. Flavonoid pada daun kakao terdiri dari senyawa fenol dan derivatnya. Senyawa fenol ini merupakan senyawa antioksidan yang berfungsi mendenaturasi protein sel jamur dan bersifat lipofilik. Mekanisme kerja dengan mendenaturasi protein dengan mengganggu lapisan lipid dan mengakibatkan kerusakan dinding sel. Sifat lipofilik pada flavonoid tersebut yang akan mengikat fosfolipid-fosfolipid pada membran sel jamur dan mengganggu permeabilitas membran sel [14]. Senyawa flavonoid berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ketidakstabilan dinding sel dan membran sitoplasma jamur ini menyebabkan sel jamur menjadi terganggu [15]. Sehingga, gangguan integritas sitoplasma menyebabkan lolosnya makromolekul dan ion dari sel sehingga sel jamur kehilangan bentuknya dan menjadi lisis.

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang paling banyak ditemukan di alam. Mekanisme kerja alkaloid pada daun kakao yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel sehingga menyebabkan lapisan dinding sel jamur tidak terbentuk secara utuh dan mengakibatkan kematian sel [8].

Salah satu obat yang digunakan untuk terapi kandidiasis adalah nistatin [16]. Pada penelitian ini aquadest steril digunakan sebagai kontrol negatif yang bertujuan sebagai pembanding, sedangkan nistatin digunakan sebagai kontrol positif. Alasan digunakannya nistatin sebagai kontrol positif dikarenakan obat tersebut merupakan golongan poliene yang efektif mengobati kandidiasis oral dan mampu memberikan efek optimal dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* [17]. Hal ini didukung dengan hasil penelitian dimana nistatin memiliki

diameter zona inhibisi terbesar yaitu 13,92 mm. Antijamur nistatin bekerja dengan cara mengikat ergosterol secara irreversible yang merupakan komponen utama dinding sel jamur. Pada konsentrasi yang cukup, akan membentuk pori pada membran sel jamur yang menyebabkan kebocoran kalium dan kematian sel jamur [18].

Simpulan dan Saran

Ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao L.*) memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dan konsentrasi terbesar pada ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao L.*) dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* adalah konsentrasi 100%.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya hambat ekstrak daun kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap mikroflora lain pada rongga mulut. Selain itu uji biokompatibilitas sebelum digunakan sebagai bahan alternatif terapi kandidiasis oral secara *in vivo* untuk mengetahui efek samping yang ditimbulkan juga perlu dilakukan serta penelitian lebih lanjut mengenai senyawa antijamur (flavonoid, alkaloid dan kafein) dalam ekstrak daun kakao yang memiliki kemampuan paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*.

Daftar Pustaka

- [1] Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. *Postgrad Med J.* 2014; 78: 455–459.
- [2] Grenbeerg MS, Glick M, Ship JA. *Burket's Oral Medicine.* 11th Edition. Canada: BC Decker Inc Hamilton. 2008.
- [3] Dangi, YS, Soni M, Namdeo. 2010. Oral Candidiasis: A Review. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences.* 2010; 2(4): 36-39.
- [4] Maharani S, Santoso O. Pengaruh Pemberian Larutan Ekstrak Siwak (*Salvadora persica*) Pada Berbagai Konsentrasi Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Jurnal PDGI.* 2012; 61(2):61-64.
- [5] Sulistiawati D, Mulyati S. Uji Antijamur Infusa Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale*) terhadap *Candida albicans*. *Biomedica.* 2009; 2(1): 337-339.
- [6] Candrasari A, Romas MA, Hasbi M, Astuti OR. Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun

- Sirih Merah (*Piper Crocatum Ruiz dan Pav.*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Eschericia coli* ATCC 11229 dan *Candida albicans* ATCC 10231 secara In Vitro. *Biomedika.* 2012; 4(1): 9-16.
- [7] Janzen SO. *Chemistry of Coffe.*Hamburg: Elsevier. 2010.
- [8] Rahmawati W, Winarsih S, Nurdiana. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kopi Robusta terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* secara *invitro*. 2013.
- [9] Notoatmodjo S. *Metodologi Penelitian Kesehatan.* Jakarta : Rineka Cipta. 2010.
- [10] David WW, Stout TR. *Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay.* *Appl Microbiol.* 1971; 22(4):659-665.
- [11] Dewi FK. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar.* *Skripsi.* Surakarta: Universitas Sebelas Maret. 2010.
- [12] Ajizah A, 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava L.* *Bioscientiae,* 2004; 1 (1): 31-38.
- [13] Lamothe RG, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bourab K. *Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens.* *Int J Mol Sci.* 2009; 10(8): 19
- [14] Putri AMS. *Efek Antifungi Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus Kunth.*) Terhadap Pertumbuhan *C. albicans* Secara *In Vitro.** *Skripsi.* Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. 2015.
- [15] Jung WS, Chung K, Ahmad A. *In Vitro Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoids From Celery Leaves.* *JMPR.* 2011; (5): 7022-7030.
- [16] Michel GW. *Analytical profiles of drug substances.* New Jersey: Academic Press, 1972.
- [17] Ermayanti A. *Pengaruh Pemberian Profilaksis Nistatin Terhadap Kandidiasis Oral Pada Neonatus Di HCU Neonatus.* *Tesis.* Surakarta: Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret. 2014.
- [18] Kicklighter, S. D. *Antifungal Agents and Fungal Prophylaxis in The Neonate.* *Neo Reviews.* 2002; 3:249-254.