

Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*  
(*The Effect of Ethanolic Extract of Cocoa Beans (Theobroma cacao) as an Antibacterial against Pseudomonas aeruginosa In Vitro*)

Devi Chintya Kumalasari<sup>1</sup>, Enny Suswati<sup>1</sup>, Misnawi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

e-mail: chinchintya21@gmail.com

### Abstract

Nosocomial infection is one of the most serious healthy problem in the world. It causes by *Pseudomonas aeruginosa* which has a high resistance to antibiotic. One alternative to overcome this problem is the utilization of chocolate (*Theobroma cacao*) because it contains polifenol that can be used as an antibacterial agent. The aim of this research was to determine antibacterial effect and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ethanolic extract of cocoa beans to *P. aeruginosa* by in vitro method. Antibacterial activity test used disk diffusion (Kirby Bauer) method. This type of research was a quasi-experimental with posttest only control group design. Samples used was colony of *P. aeruginosa*. Concentrations of test solution used were 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; and 1000 mg / ml. Positive control used cefepime suspension and negative control used sterile distilled water. The result showed that inhibition zones formed at a concentration of 7,81 mg/ml to 1000 mg/ml. The higher the concentration of the cocoa beans extract, the wider the inhibition zones formed. By direct measurement, MIC was obtained at the dose of 7.81 mg / ml while statistical analysis yielded an MIC value of more than 6.95 mg / ml. In conclusion, the ethanolic extract of cocoa beans had antibacterial effect on *P. aeruginosa* in vitro.

**Keywords:** antibacterial effect, cocoa beans, *Pseudomonas aeruginosa*

### Abstrak

Infeksi nosokomial adalah salah satu masalah kesehatan serius di dunia. Penyebab terbanyak adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang memiliki resistensi tinggi terhadap antibiotik. Alternatif dari masalah ini adalah dengan pemanfaatan buah kakao (*Theobroma cacao*) karena mengandung senyawa polifenol yang berpotensi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya efek antibakteri dan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol biji kakao terhadap *P. aeruginosa* secara *in vitro*. Metode uji yang digunakan adalah metode *disk diffusion* (Kirby Bauer). Jenis penelitian adalah *Quasi Experimental Design* dengan rancangan penelitian *Post test Only Control Group Design*. Sampel yang digunakan adalah koloni bakteri *P. aeruginosa* dengan konsentrasi larutan uji : 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; dan 1000 mg/ml. Kontrol positif menggunakan suspensi sefepime dan kontrol negatifnya aquadest steril. Hasil penelitian menunjukkan zona hambat terbentuk pada konsentrasi 7,81 mg/ml hingga 1000 mg/ml. Semakin meningkat konsentrasi, zona hambat yang terbentuk semakin lebar. Hasil KHM secara kualitatif pada konsentrasi 7,81 mg/ml dan secara kuantitatif di atas konsentrasi 6,95 mg/ml. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji kakaomempunyai efek sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* secara *in vitro*.

**Kata kunci:** efek antibakteri, biji kakao, *Pseudomonas aeruginosa*

## Pendahuluan

Penyakit infeksi masih menjadi salah satu masalah kesehatan serius yang dihadapi oleh dunia. Salah satu jenis penyakit infeksi yang beberapa tahun terakhir menjadi topik pembicaraan adalah infeksi nosokomial. Di Indonesia, organisme utama yang menyebabkan infeksi nosokomial adalah *Pseudomonas aeruginosa* (13%) [1]. Angka kematian akibat infeksi oleh bakteri ini sendiri diduga mencapai 18% - 60%, tergantung dengan jenis infeksinya [2]. Bakteri ini termasuk bakteri yang memiliki MDR (*Multi Drug Resistance*) tinggi terhadap beberapa golongan antibiotika [3]. Oleh karena itu diperlukan alternatif pengobatan, salah satunya adalah dengan menggunakan buah kakao. Telah ditemukan bahwa biji kakao mengandung senyawa polifenol cukup besar meliputi katekin 33- 42 %, leukosianidin 23- 25 %, dan antosianin 5 %. Senyawa polifenol biji kakao terbukti memiliki aktifitas antioksidan dan antibakteri yang bermanfaat bagi tubuh [4]. Selain itu menurut National Geographic Indonesia, Indonesia merupakan negara penghasil terbesar kakao ketiga di dunia dengan produksi yang terus tumbuh 3,5 persen setiap tahunnya.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ada tidaknya efek antibakteri dan Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol biji kakao terhadap *P. aeruginosa* secara *in vitro*.

## Metode Penelitian

Metode uji yang digunakan adalah metode *disk diffusion* (*Kirby Bauer*) dengan media agar *Muller Hinton*. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental semu (*Quasi Experimental Design*) dengan rancangan penelitian eksperimental sederhana (*Post test only Control Group Design*) [5]. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, pada September 2014. Sampel yang digunakan adalah koloni bakteri *P. aeruginosa* yang disesuaikan dengan standar 0,5 Mc Farland. Kontrol positif dengan suspensi sefepime dan kontrol negatif dengan larutan aquadest steril.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*), dengan konsentrasi 7,81; 15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; dan 1000 mg/ml. Variabel terikat adalah diameter zona hambat ekstrak etanol biji

kakao (*T. cacao*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Variabel terkontrol adalah pembuatan biakan bakteri dan ekstrak etanol biji kakao, media agar MH, autoklaf, inkubator, suspensi obat, aquadest steril, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengamatan pada Uji KHM dan prosedur penelitian.

Prosedur penelitian dilakukan dengan pembuatan konsentrasi ekstrak etanol biji kakao. Timbang 4000 mg ekstrak etanol biji kakao lalu campur dengan 4 ml aquades steril pada vial I. Vial I setara dengan konsentrasi 1000 mg/ml. Dari vial I diambil sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam vial II yang sudah diisi dengan 2 ml aquadest steril kemudian divortex selama 60 detik. Dengan metode yang sama dilakukan pengenceran bertingkat dengan kelipatan setengahnya sampai konsentrasi 7,81 mg/ml [6]. Setelah membuat seri pengenceran ekstrak, rendam kertas saring pada masing-masing pengenceran. Kemudian letakkan kertas saring pada media agar *Muller Hinton* yang sudah ditanami bakteri, sesuai konsentrasi. Inkubasi selama 18-24 jam dalam suhu 37° C lalu amati dan hitung zona hambat dengan jangka sorong untuk menentukan nilai KHM. Dengan metode yang sama, sebagai kontrol positif menggunakan bubuk antibiotik sefepime yang ditimbang 8 µg dan dilarutkan dengan 1 ml aquadest steril. Sebagai kontrol negatif, menggunakan aquadest steril. Metode pengamatan dilakukan dengan mengamati dan mengukur daerah zona hambat di sekitar kertas saring pada media agar *Muller Hinton* yang telah ditanami bakteri *P. aeruginosa* menggunakan jangka sorong.

Data kemudian dianalisis secara diskriptif dan statistik. Analisis statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk*, selanjutnya diuji dengan uji korelasi sederhana bivariat untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas terhadap variabel terikat dan dilanjutkan dengan uji regresi logaritmik untuk mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat. Data juga dianalisis dengan uji *one way anova*. Analisis statistik dilakukan dengan program SPSS versi 21.

## Hasil Penelitian

Setelah dilakukan penelitian dan pengamatan dengan 4 kali pengulangan dari aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*, diketahui zona hambat mulai terbentuk pada konsentrasi 7,8 mg/ml hingga konsentrasi 1000 mg/ml. Hal

ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa*.

Tabel 1. Hasil interpretasi diameter zona bening daya penghambatan oleh berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*.

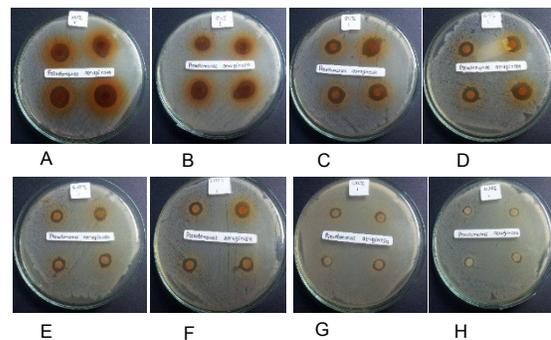
Serial Konsentrasi (mg/ml)	Diameter Zona Hambat (mm) Pengulangan				Rata-rata	Interpretasi (S/R)
	I	II	III	IV		
K (-)	0	0	0	0	0	R
7,81	6,70	7,60	8,00	7,00	7,30	S
15,26	8,40	7,70	8,40	7,60	8,00	S
31,25	8,30	8,30	7,60	10,00	8,50	S
62,50	8,50	9,00	8,30	8,80	8,70	S
125	10,00	10,90	12,10	12,30	11,30	S
250	10,90	11,60	11,90	13,50	12,00	S
500	11,00	13,10	12,30	14,00	12,60	S
1000	12,60	14,60	15,80	13,90	14,20	S
K (+)	18,00	17,50	20,80	19,00	18,80	S

S : sensitif  
R : resisten

Daya antibakteri ekstrak etanol dapat ditentukan dengan menetapkan nilai *breakpoint*. Nilai *breakpoint* merupakan nilai batas dimana suatu bakteri dinyatakan sensitif atau resisten. Secara umum, apabila diameter zona hambat  $\geq$  6mm, maka bakteri dinyatakan sensitif terhadap suatu ekstrak dan apabila diameter zona hambat  $<$  6 mm, bakteri dinyatakan resisten [7]. Sehingga didapatkan nilai *breakpoint* pada penelitian ini adalah 6 mm. Berdasarkan hasil rata-rata zona hambat dari tabel 1, *P. aeruginosa* menunjukkan hasil yang sensitif terhadap ekstrak etanol biji kakao pada semua konsentrasi. Oleh karena itu, KHM *breakpoint* ekstrak etanol biji kakao terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa* secara kualitatif adalah pada konsentrasi 7,81 mg/ml.

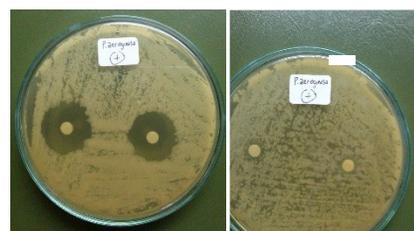
## Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) terbukti memiliki efek sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* secara *in vitro*. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat padapertumbuhan *P. aeruginosa* di sekitar kertas saring setelah kontak dengan ekstrak etanol biji kakao.



Gambar 1. Zona Hambat dari Ekstrak Etanol Biji Kakao (*T.cacao*) terhadap Pertumbuhan *P. aeruginosa*. A. Konsentrasi 1000 mg/ml B. Konsentrasi 500 mg/ml. C. Konsentrasi 250 mg/ml D. Konsentrasi 125 mg/ml. E. Konsentrasi 62,50 mg/ml. F. Konsentrasi 31,25 mg/ml. G. Konsentrasi 15,62 mg/ml. H. Konsentasi 7,81 mg/ml

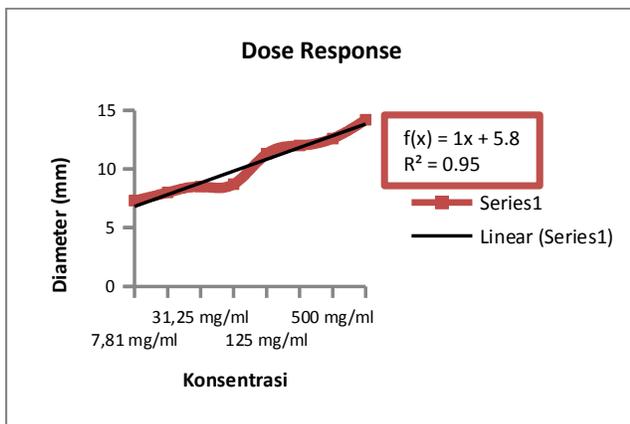
Pada kertas saring yang menyerapaquadest sebagai kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat karena aquadest tidak memiliki kemampuan antibakteri. Pada kertas saringyang menyerap larutan sefepime sebagai kontrol positif terdapat zona hambat. Halini mengindikasikan bahwa sampel bakteri yang digunakan adalah bakteri yangmasih hidup dan sensitif terhadap sefepime. Sefepime dipilih sebagai kontrol positif karena sefepime merupakan suatu pilihan terapi empiris yang digunakan dalam penatalaksanaan infeksi karena *P. aeruginosa*. Mekanisme kerja sefepime yaitu menghambat sintesis dinding sel mikroba dengan cara menghambat reaksi transpeptidase tahap ketiga dalam rangkaian reaksi pembentukan dinding sel [8]. Sejak ditemukan banyak kasus MDR-PA, sefepime terbukti masih dapat mengatasi banyak kasus resistensi antibiotik oleh *P. aeruginosa*.



Gambar 2. Kelompok Kontrol. A. Kontrol positif dengan larutan sefepime 8  $\mu$ g/ml. B.Kontrol negatif dengan aquadest steril

Diketahui bahwa *P. aeruginosa* sensitif terhadap ekstrak etanol biji kakao pada semua konsentrasi. Penurunan diameter zona hambat pertumbuhan *P. aeruginosa* seiring dengan penurunan konsentrasi ekstrak etanol biji kakao, hal terjadi karena pada pengenceran bertingkat ekstrak etanol biji kakao terjadi pengurangan zat aktif dari ekstrak etanol biji kakao sehingga efek antibakterinya pun berkurang

Hasil uji normalitas *Shapiro Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal karena didapatkan nilai  $p = 0,110$  ( $p > 0,05$ ). Dari uji korelasi didapatkan nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan antara variabel bebas (konsentrasi ekstrak etanol biji kakao) terhadap variabel terikat (diameter zona hambat pertumbuhan *P. aeruginosa*). Besar korelasi yaitu 0,943 menyatakan arah korelasi bersifat positif dan keamatan hubungan sangat kuat. Artinya, semakin tinggi konsentrasi (X) maka diameter zona hambat yang terbentuk (Y) cenderung semakin lebar.



Gambar 3. Grafik Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Kakao terhadap Diameter Zona Hambat Pertumbuhan *P. aeruginosa*

Uji regresi linear menunjukkan adanya pengaruh variabel terikat terhadap variabel bebas. Persamaan garis regresi yang terbentuk adalah  $Y = 0,48 + 0,794X$ . Dari persamaan garis regresi ini dapat diketahui KHM *breakpoint* kuantitatif, dengan memasukkan nilai  $Y = 6$  sehingga didapatkan nilai  $X = 6,95$ . Hal ini berarti pada konsentrasi 6,95 mg/ml ekstrak etanol biji kakao mulai mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* secara efektif. Pada uji regresi juga didapatkan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,890 yang artinya sebesar 89 % keragaman pertumbuhan *P. aeruginosa* ditentukan oleh besarnya

konsentrasi ekstrak etanol biji kakao, sedangkan 9 % sisanya disebabkan oleh faktor lain. Pada uji hipotesis *One Way Anova* yang dilakukan pada masing-masing kelompok, didapatkan perbedaan yang bermakna. Didapatkan data bahwa konsentrasi pada kelompok kontrol positif berbeda secara signifikan dengan seluruh kelompok lain.

Ekstrak etanol biji kakao memiliki efek sebagai antibakteri karena mengandung senyawa polifenol seperti flavonoid, katekin, dan tannin. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bekerja dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri, mekanisme tersebut menyebabkan rusaknya susunan dan perubahan mekanisme permeabilitas dari dinding sel bakteri [9]. Flavonoid juga memiliki aktivitas antibakteri melalui hambatan fungsi DNA *gyrase* bakteri sehingga kemampuan replikasi dan translasi bakteri dihambat [4]. Katekin adalah senyawa polifenol alami, berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu. Gangguan integrasi sitoplasma berakibat pada lolosnya makromolekul, dan ion dari sel. Sel bakteri menjadi kehilangan bentuknya, dan terjadilah lisis [10]. Tanin akan menginaktivasi adhesi sel mikroba yang terdapat pada permukaan sel dan enzim yang terikat pada membran sel dan polipeptida dinding sel sehingga akan menyebabkan kerusakan pada dinding sel [4]. Mekanisme kerja tanin menyebabkan hilangnya sifat permeabilitas membran sel, sehingga keluar masuknya zat-zat seperti air, nutrisi, enzim tidak terseleksi. Apabila enzim keluar dari dalam sel, maka akan terjadi hambatan metabolisme sel sehingga mengakibatkan terhambatnya pembentukan ATP (*Adenosine Three Phosphate*) yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel.

## Simpulan dan Saran

Ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa* secara *in vitro*. Konsentrasi minimum ekstrak etanol biji kakao (*T. cacao*) yang mampu menghambat

pertumbuhan *P. aeruginosa* secara kualitatif adalah pada konsentrasi 125 mg/ml dan secara kuantitatif adalah di atas konsentrasi 6,95 mg/ml.

Perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji secara in vivo, uji toksisitas, dan uji klinis agar biji kakao dapat dimanfaatkan secara maksimal.

### Ucapan Terimakasih

Terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- [1] Sulistyaningsih. Uji Kepekaan Beberapa Sediaan Antiseptik Terhadap Bakteri *P.aeruginosa* Dan *P.aeruginosa* Multi Resisten (*Pamr*). Skripsi Fak. Farmasi, Unpad. J atinangor. 2010. [cited 2014 August 18]. Available from [http://pustaka.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2010/11/uji\\_kepekaan\\_beberapa\\_kesediaan\\_antiseptik\\_terhadap\\_bakteri\\_multi\\_resisten.pdf](http://pustaka.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2010/11/uji_kepekaan_beberapa_kesediaan_antiseptik_terhadap_bakteri_multi_resisten.pdf).
- [2] Bauer KA, West JE, O'Brien JM, Goff DA. Extended-Infusion Cefepime Reduces Mortality in Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 2013. 57(7): 2907-2912.
- [3] Siregar NPS. Uji Antimikroba Ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora Crispa L. Miers*) Terhadap *P.aeruginosa* Secara *In Vitro*. Skripsi Fakultas Kedokteran, UNIBRAW. Malang. 2010. [cited 2014 August 18]. Available from <http://share.pdfonline.com/04efd2daf1614e138daddf0043043e27/ekstrak%20batang%20brotowali.pdf>.
- [4] Wulandari P, Suswati E, Misnawi, Rianul A. Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Kakao (*T. cacao*) Terhadap Pertumbuhan *Shigella Dysentriae* Secara *In Vitro*. *Jurnal Medika Planta*; 2012. 1(5): 67-75.
- [5] Praktiknya AW. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada; 2008.
- [6] Suswati E dan Mufida D. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2009.
- [7] Bell SM, Pham JN, Nguyen TT. *Antibiotic Susceptibility Testing By The Cds Method Sixth Edition*. Australia : Department Of Microbiology, South Eastern Area Laboratory Services; 2012.
- [8] Istiantoro YH dan Gan VHS. Penisilin, Sefalosporin dan Antibiotik Betalaktam Lainnya. In : *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-5. Jakarta : Balai Penerbit FKUI; 2012 p. 678-687.
- [9] Paju N, Yamlean PVY, Kojong N. Uji Efektivitas Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis) pada Kelinci (*OryctolagusCuniculus*) yang Terinfeksi Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *PHARMACON. Jurnal Ilmiah Farmasi*; 2013. 2(1): 2302 – 2493.
- [10] Susanti ARY. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol daun Beluntas (*Pluchea indica less*) terhadap *Escherichia coli* secara in vitro. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga Surabaya; 2011.