

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI
FRAKSI ETANOL-AIR EKSTRAK ASETON KULIT
BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) TERHADAP
Streptococcus mutans DAN *Escherichia coli***

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

EKA SEPTIANA IRAWATI

K100 090 100

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA

SURAKARTA

2013

PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI FRAKSI
ETANOL-AIR EKSTRAK ASETON KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) TERHADAP *Streptococcus mutans*
DAN *Escherichia coli***

Oleh :

EKA SEPTIANA IRAWATI

K 100 090 100

Telah disetujui dan disahkan pada :

Hari :

Tanggal :

Mengetahui,

Fakultas Farmasi

Universitas Muhammadiyah Surakarta

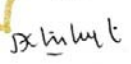
Dekan,


Dr. Muhammad Da'i, M.Si., Apt.

Penguji I


Dr. Muhtadi, M. Sc

Penguji II


Ika Trisharyanti DK, M.Farm., Apt

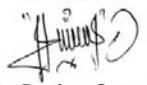
Pembimbing Utama


Peni Indrayudha, M.Biotech., Apt

Pembimbing Pendamping


Rima Munawaroh, M.Sc., Apt.

Mahasiswa


Eka Septiana Irawati

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI FRAKSI
ETANOL-AIR EKSTRAK ASETON KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma
cacao* L.) TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN *Escherichia coli***

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND BIOAUTOGRAPHY OF
ETHANOL-WATER FRACTION OF ACETON EXTRACT OF COCOA
POD HUSK (*Theobroma cacao* L.)
AGAINST *Streptococcus mutans* AND *Escherichia coli***

**Eka Septiana Irawati, Peni Indrayudha, dan Rima Munawaroh
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta**

ABSTRAK

Kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) kaya akan kandungan fenolik seperti tannin, epikatekin-3-galat dan asam sinamat, terdapat juga alkaloid dan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antibakteri, antioksidan, dan antiinflamasi. Fenolik merupakan senyawa polar yang dapat larut dengan penyari aseton. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao terhadap *S. mutans* dan *E. coli* serta mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri.

Kulit buah kakao di ekstraksi dengan aseton secara maserasi dan dilakukan fraksinasi dengan metode partisi cair-cair menggunakan n-heksan, etil asetat dan etanol-air. Fraksi etanol-air dilakukan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi disk dengan konsentrasi 3,0 mg/disk, 3,5 mg/disk, 4,0 mg/disk, 4,5 mg/disk dan 5,0 mg/disk. Selanjutnya dilakukan KLT untuk identifikasi senyawa aktif, dengan fase diam silika GF 254 dan fase gerak metanol:air (3:7) v/v. Uji bioautografi dengan metode bioautografi kontak.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao hingga konsentrasi 5,0 mg/disk tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, tetapi pada konsentrasi 3,5 mg/disk memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* dengan zona hambat $6,58 \pm 0,1$ mm. Hasil uji KLT dan hasil bioautografi fraksi etanol-air terhadap *S. mutans* menunjukkan golongan fenolik dan alkaloid yang memiliki aktivitas antibakteri.

Kata kunci: *Theobroma cacao* L., *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, antibakteri, fraksi etanol- air

ABSTRACT

Cocoa pod husk (Theobroma cacao L.) rich in phenolic content such as tannins, epicatechin-3-gallat and cinnamic acid are also alkaloid and flavonoid can be used as an antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory. Phenolic are polar compounds that can be dissolved with acetone. This study aims to determine the antibacterial activity of fractions of ethanol-water extract of acetone cocoa

pods to *S.mutans* and *E. coli* as well as knowing the compound has antibacterial activity.

Cocoa pods husk was extracted using acetone by maceration and fractionated by the method of liquid-liquid partition with n-hexane, ethyl acetate and ethanol-water. Fraction ethanol-water tested antibacterial activity using disc diffusion method with the concentration of 3.0 mg / disk, 3.5 mg / disk, 4.0 mg / disk, 4.5 mg / disk and 5.0 mg / disk. Further TLC for the identification of the active compounds, the GF 254 silica stationary phase and mobile phase of methanol: water (3:7). Test methods bioautografi contact.

*The results showed the fraction of ethanol-water extract of acetone cocoa pods have no antibacterial activity against *E.coli*, but at a concentration of 3.5 mg / disk (6.58 ± 0.1 mm) has antibacterial activity against *S.mutans*. The test results TLC and bioautografi fraction of ethanol-water on the *S.mutans* a phenolic and alkaloid group that has antibacterial activity.*

Key word: *Theobroma cacao* L, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, Antibacteri, Fraction ethanol- water

PENDAHULUAN

Tanaman yang dapat digunakan sebagai pengobatan salah satunya adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). Tanaman kakao sudah digunakan sejak dulu oleh suku Aztec, Olmecs, dan Mayans sebagai obat demam, cemas, batuk dan orang Eropa menggunakan sebagai obat batu ginjal dan luka bakar (Bagetta, *et al*, 2012). Kulit buah kakao mengandung senyawa fenolik seperti: tanin, kuersetin, epikatekin-3-galat, resorsinol, asam sinamat, dan pirogallol (Fopundan dan Afolayan, 2012), flavonoid, alkaloid, steroid (Pasiga, 2007). Kakao kaya akan manfaat diantaranya: daun berkhasiat sebagai antioksidan (Osman dan lee, 2004), buah sebagai antikanker dan mengurangi pembentukan plak gigi (Marshaban, 2007), biji sebagai antiaterosklerosis, antibakteri, antivirus (Sakagami *et al.*, 2008) dan kulit buahnya sebagai antioksidan dan antibakteri (Sartini *et al.*, 2011).

Penelitian Sartini *et al*, (2011) memberikan hasil bahwa ekstrak 70% v/v merupakan penyari yang optimal pada kulit buah kakao yang segar untuk mendapatkan komponen antibakteri dibandingkan ekstrak etanol 70% v/v pada kulit buah kakao kering terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. *Streptococcus mutans* merupakan flora normal pada saluran pernafasan atas

(Jawetz, 2001) yang dapat menyebabkan karies gigi (Pratiwi, 2008). *E.coli* merupakan flora normal yang memiliki faktor virulensi ekstra yang bersifat patogenik (Pratiwi, 2008). Infeksi *E.coli* sering kali berupa diare yang disertai darah, demam dan dapat menyebabkan gangguan pada ginjal (Radji, 2010).

Terdapatnya senyawa fenolik dari kulit buah kakao yang bersifat polar dan memiliki potensi antibakteri, maka digunakan pelarut aseton untuk ekstraksi. Pelarut aseton merupakan senyawa yang bersifat volatil, larut dalam air dan memiliki toksisitas yang rendah, khususnya tanaman yang banyak mengandung senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antibakteri (Tiwari *et al.*, 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao terhadap *S.mutans* dan *E.coli* serta mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini yaitu maserator, corong pisah, *rotary evaporator* (Heidolph), cawan Petri (Pyrex), mikropipet, inkubator (Memmert), *yellow tips*, *blue tips*, alat-alat gelas (Pyrex), Autoklaf, oven (Memmert), lampu UV, LAF (CV.Srikandi Laboratory), *incubator shaker* (Exella E24), mikroskop (Olympus), timbangan (Ohaus) dan seperangkat alat KLT.

2. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu: kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari daerah Kartasura, Sukoharjo, Jawa tengah, Aseton teknis (CV. GM MEDIKA). Bakteri *E.coli* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Surakarta dan Bakteri *S.mutans* yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Kedokteran Hewan UGM, silika GF 254 (Merck), DMSO (Oxoid), MH (Oxoid), *paper disc* (Oxoid CT-0998B), disk kloramfenikol (Oxoid CT-0013B), akuades, metanol p.a (Merck), cat Gram, pereaksi semprot yaitu FeCl_3 , Sitroborat dan Dragendrof.

B. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2. Penyiapan Bahan

Buah kakao yang sudah masak dipetik dan dipisah antara biji dan kulitnya. Kulit buah kakao dicuci dengan air mengalir, dihaluskan, dan ditimbang.

3. Pembuatan Fraksi Etanol-Air Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao segar yang telah dihaluskan diekstraksi dengan cara maserasi sehingga diperoleh ekstrak kental kemudian difraksinasi menggunakan partisi cair-cair. Fraksinasi dilakukan dengan cara ekstrak kental yang diperoleh dilarutkan dengan etanol : air (1:1) v/v, ditempatkan di corong pisah dan ditambahkan n-heksan sama banyak dengan etanol : air (1:1) v/v dan dipisahkan antara fraksi n-heksan dan etanol-air. Refraksinasi hingga fraksi n-heksan menjadi jernih (zat aktif telah habis tersari). Fraksi etanol-air yang diperoleh, difraksi kembali dengan menggunakan penyari etil asetat. Hasilnya diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air. Fraksi etanol-air dipisah dan ditampung, kemudian diuapkan kembali dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan *waterbath* sampai diperoleh fraksi larut etanol-air.

4. Pembuatan Seri Konsentrasi Fraksi Etanol-Air

Pembuatan seri konsentrasi fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao, yaitu stok awal 50% masing-masing diambil 600 μL ; 700 μL ; 800 μL ; 900 μL , dan 1000 μL , kemudian ditambah DMSO sampai 1 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 30%, 35%, 40%, 45%, dan 50%.

5. Uji aktivitas antibakteri Fraksi Etanol-Air

Fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao yang telah dibuat seri konsentrasi (30% ,35%, 40%, 45% dan 50%), masing-masing dimasukkan ke dalam *paper disc* sebesar 10 μL . DMSO dimasukkan ke dalam disk yang lain sebagai kontrol negatif. Media MH dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL. Selanjutnya 200 μL suspensi bakteri yang telah dibuat setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL ditetaskan ke dalam media, diratakan dengan *spreader glass*. Disk yang

telah diisi fraksi etanol-air dengan berbagai seri konsentrasi, disk yang berisi DMSO (kontrol negatif), dan disk antibiotik kloramfenikol (kontrol positif) diletakkan di atas media. Setelah itu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya dengan melihat ada atau tidaknya zona hambat.

6. Kromatografi Lapis Tipis

Fraaksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao dilarutkan dengan metanol. Larutan sampel ditotolkan pada fase diam silika GF 254 yang telah diaktifkan pada suhu 110°C selama 1 jam kemudian dielusi dengan fase gerak hasil optimasi. Hasil kromatogram diamati pada UV 254 nm dan UV 366 nm. Bercak dideteksi dengan pereaksi semprot FeCl₃ (Fenol), sitroborat (Flavonoid) dan Dragendrof (Alkaloid) (Wagner and Bladt, 1996).

7. Uji Bioautografi

Bioautografi digunakan untuk mendeteksi senyawa aktif yang mempunyai aktifitas sebagai antibakteri. KLT yang telah dielusi diangin-anginkan dan diletakkan selama 20 menit pada permukaan media MH dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan 200 µL suspensi bakteri *S.mutans* dan *E.coli* yang telah dibuat setara dengan 1,5x10⁸ CFU/mL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Ekstraksi dan Fraaksi Etanol-Air Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao

Kulit buah kakao diperoleh dari daerah Kartasura, Kabupaten Sukoharjo. Hasil determinasi menunjukkan benar simplisia yang digunakan adalah kulit buah kakao dari tanaman *Theobroma cacao* L. Penyarian ekstrak kulit buah kakao dilakukan dengan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode yang umum digunakan karena mudah dilakukan dan peralatan yang digunakan sederhana meskipun dalam penyariannya lama (Anonim,1989). Kulit buah kakao mengandung senyawa fenolik (Fapohundan And Afolayan, 2012) yang dapat tersari dalam pelarut aseton (Mariana, 2011). Maserasi kulit buah kakao segar sebanyak 3 Kg, diperoleh ekstrak kental sebanyak 63,45 gram (randemen 2,11%).

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi cair-cair. Teknik pemisahannya dengan menggunakan dua pelarut dalam corong pisah, senyawa

didistribusikan dalam dua pelarut yang memiliki koefisien partisi yang berbeda (Otsuka, 2006). Fraksinasi dilakukan dengan gradien kepolaran bertingkat agar senyawa metabolit yang tersari lebih sederhana. Fraksinasi dimulai dengan pelarut n-heksan, kemudian etil asetat. Hasil fraksinasi didapatkan sebanyak 11,46 gram fraksi etanol-air dari simplisia 3000 gram (rendemen 0,38%).

B. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol-Air

Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi disk (Kirby & Bauer) sebagai metode yang paling sering digunakan untuk menentukan aktivitas agen antibakteri. Pada penelitian ini digunakan kontrol positif (kloramfenikol) dan kontrol negatif (DMSO).

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. mutans*. Konsentrasi fraksi etanol-air untuk kedua bakteri sama yaitu 3,0 mg/disk, 3,5 mg/disk, 4,0 mg/disk, 4,0 mg/disk dan 5,0 mg/disk. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao konsentrasi 3,0 mg/disk hingga 5,0 mg/disk tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat disekitar disk. Sedangkan pada bakteri *S. mutans* dengan konsentrasi yang sama memiliki aktivitas antibakteri mulai dari konsentrasi 3,5 mg/disk hingga 5,0 mg/disk. Diameter zona hambat dari masing-masing konsentrasi adalah 3,5 mg/disk ($6,58 \pm 0,1$ mm), 4,0 mg/disk ($7,08 \pm 0,4$ mm), 4,5 mg/disk ($7,5 \pm 0,25$ mm) dan 5,0 mg/disk ($8,42 \pm 0,4$ mm) (Tabel 1.). Kontrol positif pada bakteri *S. mutans* memiliki zona hambat $16,92 \pm 0,6$ mm. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri dari fraksi etanol-air lebih lemah dibandingkan dengan kontrol positifnya. Pada kedua bakteri DMSO sebagai kontrol negatif tidak terdapat zona hambat, sehingga zona hambat yang dihasilkan dari fraksi etanol-air ekstrak kulit buah kakao tersebut murni dari fraksi dan tidak dipengaruhi oleh pelarut.

Hasil penelitian ini menunjukkan fraksi etanol-air memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* pada konsentrasi terendah 3,5 mg/disk dengan diameter zona hambat $6,58 \pm 0,1$ mm, kurang poten jika dibandingkan dengan ekstrak aseton kulit buah kakao dengan konsentrasi 1,0 mg/disk ($6,5 \pm 0,0$ mm) (Hidayati, 2013) dan pada fraksi etil asetat kulit buah kakao dengan konsentrasi

3,0 mg/disk (Yulianti, 2013). Hal tersebut dikarenakan aseton merupakan senyawa yang bersifat semipolar, sehingga hanya sedikit senyawa yang tersari dalam fraksi etanol-air. Selain itu mungkin juga disebabkan karena efek sinergisme senyawa yang terkandung dalam fraksi semipolar sehingga dapat meningkatkan efek antibakteri yang dihasilkan.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etanol-Air Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*

Seri konsentrasi (mg/disk)	Diameter zona hambat (mm)±SD*	
	<i>E.coli</i>	<i>S.mutans</i>
3,0	6,0±0,0	6,0±0,0
3,5	6,0±0,0	6,58±0,1
4,0	6,0±0,0	7,08±0,4
4,5	6,0±0,0	7,5±0,25
5,0	6,0±0,0	8,42±0,4
K+	27,7±0,6	16,92±0,6
K-	6,0±0,0	6,0±0,0

*diameter zona hambat termasuk diameter disk 6 mm

Penelitian Sartini *et al*, (2011) pada ekstrak aseton 70% v/v kulit buah kakao segar pada konsentrasi 0,25 mg/disk, 0,50 mg/disk dan 1,00 mg/disk memiliki zona hambat terhadap *E. coli* masing-masing 7,25 mm, 7,35 mm dan 10,25 mm sedangkan terhadap *S. mutans* pada konsentrasi yang sama memiliki zona hambat 6,75 mm, 7,75 mm dan 10,20 mm. Hasil penelitian ini menunjukkan fraksi etanol-air ekstrak aseton kurang poten jika dibandingkan dengan ekstrak aseton 70% v/v. Hal tersebut terlihat dari besarnya konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Perbedaan tersebut dapat disebabkan karena perbedaan penyari yang digunakan. Pelarut aseton merupakan pelarut yang bersifat semipolar sehingga hanya dapat menyari senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar, sedangkan pada aseton 70% v/v adanya air dapat menyebabkan pelarut menjadi bersifat polar sehingga banyak senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dapat tersari.

Hasil penelitian ini menunjukkan fraksi etanol-air tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* hingga konsentrasi 5,0 mg/disk sedangkan pada *S. mutans* pada konsentrasi 3,5 mg/disk sudah mampu menunjukkan daya hambat. Perbedaan tersebut disebabkan karena perbedaan komposisi pada dinding

sel masing-masing bakteri. *S. mutans* (Gram positif) memiliki dinding sel yang mengandung banyak lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur kaku dan tebal sedangkan *E. coli* (Gram negatif) hanya mengandung sejumlah kecil peptidoglikan sehingga dinding sel bakteri Gram negatif relatif lebih tahan terhadap kerusakan mekanik (Pratiwi, 2008). Selain itu bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan dengan Gram positif. Membran luar Gram negatif memiliki saluran khusus yang terdiri dari molekul protein yang dapat meloloskan difusi pasif dari beberapa molekul hidrofilik yang memiliki berat molekul rendah. Antibakteri yang memiliki berat molekul besar menembus membran luar dengan sangat lambat, sehingga bakteri Gram negatif lebih relatif tahan terhadap antibakteri. (Jawetz, 2005).

C. Hasil Uji KLT Fraksi Etanol -A Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa kimia pada fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao. KLT merupakan metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Metode ini digunakan karena mudah, murah, cepat dan secara luas untuk evaluasi komponen organik pada metabolit antimikroba.

Fraksi etanol-air dilarutkan dalam metanol. Hasil optimasi berbagai fase gerak didapat metanol:air (3:7) v/v. Deteksi KLT dilakukan dengan menggunakan UV 254, UV 366, dan pereaksi-pereaksi semprot seperti FeCl_3 , sitroborat, LB, dan Dragendrof.

Deteksi dengan pereaksi semprot menunjukkan bahwa fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao mengandung senyawa fenolik dan alkaloid yang dilihat secara visual memberikan warna hitam dengan pereaksi FeCl_3 dan dengan pereaksi Dragendrof memberikan warna coklat setelah disemprot. Hal tersebut sesuai dengan teori Harbone (1996) yaitu untuk mendeteksi senyawa fenolik menggunakan pereaksi semprot FeCl_3 memberikan warna hitam sedangkan untuk deteksi alkaloid menggunakan pereaksi semprot Dragendrof menghasilkan warna coklat (Wagner and Bladt, 1995). Tabel 3 menunjukkan fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao mengandung alkaloid dan fenolik. Adanya dua senyawa dalam satu bercak disebabkan karena pemisahan yang belum baik.

Tabel 2. Hasil kromatografi Lapis Tipis Fraksi Etanol-Air Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao Fase Gerak Metanol : Air (3:7) v/v dengan jarak pengembangan 5 cm

UV		Pereaksi semprot			
254	366	FeCl ₃	Sitroborat	Dragendroff	Senyawa
Pemada man	Fluoresensi biru	Hitam	-	Coklat	Fenolik alkaloid

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa kulit buah kakao mengandung senyawa fenolik seperti tannin, resorsinol, epikatekin-3-galat dan quersetin (Fopundan and Afolayan, 2012) selain itu terdapat juga alkaloid, flavonoid dan steroid (Pasiga, 2007). Senyawa fenolik dan alkaloid memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antidiare dan antelmintika (Tiwari, *et al.*, 2011)

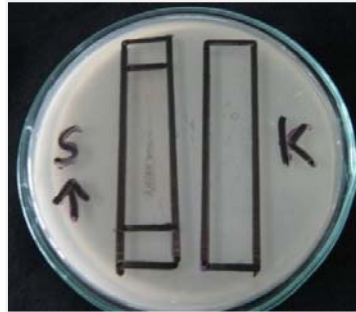
D. Hasil Uji Bioautografi Fraksi Etanol-Air

Uji bioautografi ini digunakan untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktifitas antibakteri pada fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao. Metode ini merupakan metode spesifik yang efisien untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktifitas antibakteri. Berdasarkan hasil uji aktifitas antibakteri fraksi etanol-air hanya memiliki aktifitas antibakteri terhadap *S. mutans* dan tidak memiliki aktifitas antibakteri terhadap *E. coli*, sehingga yang dilakukan uji bioautografi hanya terhadap *S. mutans*.

Fraksi etanol-air yang digunakan untuk uji bioautografi yaitu konsentrasi 50% sebanyak 3 µL sehingga tiap totolan mengandung 1,5 mg. Fase diam dan fase gerak yang digunakan sama dengan saat uji KLT. Selain itu juga digunakan kontrol negatif untuk mengetahui apakah fase gerak yang digunakan mempunyai aktivitas sebagai antibakteri atau tidak.

Hasil elusi mampu mengangkat senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dari totolan tetapi belum dapat memisahkan. Hasil uji bioautografi fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao menghasilkan *tailing* pada zona jernih. Hal tersebut disebabkan karena penggunaan fase gerak dan fase diam yang sama-sama polar, sehingga terjadi tarik menarik antara fase gerak dan fase diam.

Hasil bioautografi dibandingkan dengan hasil uji KLT menunjukkan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu senyawa alkaloid dan fenolik.



Gambar 1. Hasil Bioautografi Fraksi Etanol-Air Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao terhadap *Streptococcus mutans*. Zona hambat yang terlihat adalah senyawa fenolik dan alkaloid.

Hasil penelitian ini memiliki persamaan dengan penelitian Fopundan dan Afolayan (2012) yang menyatakan pada kulit buah kakao terkandung senyawa fenolik yaitu tanin, kuersetin, epikatekin-3-galat, resorsinol dan pirogalol. Penelitian Pasiga (2007) pada ekstrak etanol kulit buah kakao, mengandung tannin, polifenol, flavonoid dan alkaloid. Uji bioautografi dengan fase gerak heksan:etilasetat (5:1) v/v menunjukkan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* terdapat pada zona jernih dengan R_f 21, 27 dan 30. Hal tersebut memperlihatkan setidaknya ada 3 senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri.

Kulit buah kakao mengandung fenolik yang memiliki aktivitas antibakteri (Sartini, 2011). Mekanisme antibakteri pada fenolik yaitu penghambatan enzim oleh senyawa teroksidasi, melalui reaksi dengan sulfhidril atau melalui interaksi nonspesifik dengan protein. Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara interkalasi ke dinding sel dan DNA pada bakteri (Cowan, 1999).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan: Fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao memiliki aktivitas antibakteri dengan menghasilkan zona hambat terhadap *S. mutans* pada konsentrasi minimal 3,5 mg/disk ($6,58 \pm 0,1$ mm) tetapi hingga konsentrasi 5,0

mg/disk tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*. Senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri pada *S. mutans* yaitu fenolik dan alkaloid.

Saran: Perlu dilakukan pemilihan fase gerak dan fase diam yang sesuai agar dapat memisahkan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dengan baik pada fraksi etanol-air ekstrak aseton kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.)

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1998, *Sediaan Galenika*, 10-11, Depkes RI, Jakarta.
- Bagetta, G., Cosentino, M., & Corasaniti, M. T., 2011, *Herbal Medicine: Development and Validation of Plant-Derived Medicines for Human-Health*, 440, CRC Press, United States of America.
- Cowan, M. M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Review*, 12, 4, 564-582.
- Fapohunda & Afolayan, 2012, Fermentation of Cocoa Beans and Antimicrobial Potentials of the pod Husk Phytochemicals, *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*, 2(3), 158-164.
- Hidayati, C. D., 2013, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*, Surakarta, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A., 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi XXII, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 205,235, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi XXII, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 208,237, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Marsaban, 2007, Perbandingan Efek Antibakterial Ekstrak Buah Cacao (*Theobroma cacao*) pada Berbagai Konsentrasi Terhadap *Streptococcus mutans*, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Manning, S. D., & Edward, A. I., 2005, *Deadly Diseases And Epidemics: Escherichia coli Infections*, 15, 18, Chelsea House Publishers, USA.
- Mariani, L., 2011, Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Polifenol dalam Kulit Biji Kakao dan Potensinya sebagai Antioksidan, *Electronic Theses &*

- Dissertation Universitas Gadjah Mada*, (Online), (http://etd.ugm.ac.id/index.php?mod=penelitian_detail&sub=PenelitianDetail&act=view&typ=html&buku_id=53068&obyek_id=4, diakses tanggal 19 Februari 2013).
- Osman, H., Nasrudin, R., & Lee, S. L., 2004, Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential, *Food Chemistry*, 86, 41–46.
- Otsuka, H., 2006, Purification by Solvent Extraction Using Partition Coefficient, *In: Sarker, S., Latief, Z., & Gray, A., eds*, 269-270, *Natural Product Isolation*, Humana Press, New Jersey.
- Pasiga, B., 2007, Efikasi Klikik Obat Kumur Yang Mengandung Limbah Kulit Buah Kakao, *Laporan Penelitian*, (Online), (<http://pustaka2.ristek.go.id/katalog/indeks.php/searchkatalog/byld/52189>, diakses tanggal 28 Maret 2012).
- Pratiwi, S. T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, 174, 188, 190, 191-192, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Radji, M., 2010, *Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*, 125, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Sakagami, H., Satoh, K., Fukamachi, H., Ikarashi, T., Shimizu, A., Yano, K., & Kanamoto, T., 2008, Anti-HIV and Vitamin C-synergized Radical Scavenging Activity of Cacao Husk Lignin Fractions, *in vivo* 22, 327-332.
- Sartini, Djide, M. N., & Alam, G., 2011, Ekstraksi Komponen Bioaktif dari Limbah Kulit Buah Kakao dan Pengaruhnya Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Antimikroba, *Majalah Obat Tradisional*, (online), (http://mot.farmasi.ugm.ac.id/files//18kulit%20buah%20cacao_Pak%20Alam.pdf, diakses tanggal 13 Januari 2012).
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G. & Kaur H., 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Ed., 350, Springer, New York.
- Yulianti, N. F. E., 2013, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Etilasetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis*, Surakarta, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.