

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI FRAKSI ETIL
ASETAT EKSTRAK ASETON KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao*
L.) TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN *Bacillus subtilis***

NASKAH PUBLIKASI



Oleh :

**NUR FATDLIYAH EKA YULIANTI
K 100 090 099**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2013**

PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI FRAKSI
ETIL ASETAT EKSTRAK ASETON KULIT BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN
*Bacillus subtilis***

Oleh :
NUR FATDLIYAH EKA YULIANTI
K 100 090 099

Telah disetujui dan disahkan pada :

Hari :
Tanggal :

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Dekan,

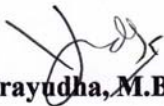

Dr. Muhammad Da'i, M.Si., Apt.

Penguji I



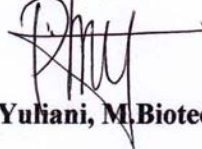
Ika Trisharyanti DK, M.Farm., Apt

Pembimbing Utama



Peni Indrayudha, M.Biotech., Apt

Penguji II



Ratna Yuliani, M.Biotech.St

Pembimbing Pendamping



Rima Munawaroh, M.Sc., Apt

Mahasiswa



Nur Fatdliyah Eka Yulianti

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI FRAKSI ETIL
ASETAT EKSTRAK ASETON KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao*
L.) TERHADAP *Streptococcus mutans* DAN *Bacillus subtilis***

***ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND BIOAUTOGRAPHY OF ETHYL
ACETATE FRACTION OF ACETONE EXTRACT OF POD'S CACAO
(Theobroma cacao L.) AGAINST Streptococcus mutans AND Bacillus subtilis***

Nur Fatdliyah Eka Yulianti, Peni Indrayudha, Rima Munawaroh

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
Jalan Ahmad Yani, Tromol Pos I, Pabelan Kartasura, Surakarta 57102

ABSTRAK

Tumbuhan kakao (*Theobroma cacao* L.) dapat digunakan sebagai obat. Kakao mengandung katekin, epikatekin, protoantosianidin, asam fenolat, tanin dan flavonoid lainnya. Ada tiga komponen utama polifenol pada kakao, yakni katekin (37%), antosianin (4%), dan proantosianidin (58%). Ekstrak aseton kulit buah kakao memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Ekstrak metanol kulit buah kakao mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis* serta senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas tersebut.

Kulit buah kakao dimaserasi dengan aseton sehingga didapat ekstrak aseton kulit buah kakao. Ekstrak difraksinasi menggunakan partisi cair-cair didapatkan fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao. Fraksi diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan parameter efektivitas antibakteri berdasarkan adanya diameter zona hambat di sekitar disk. Uji kandungan senyawa dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), fase diam menggunakan silika GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : metanol (1:9) v/v. Uji bioautografi dengan menempelkan lempeng KLT hasil elusi pada media yang diinokulasi suspensi bakteri, senyawa antibakteri ditunjukkan zona jernih.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 3,0-5,0 mg/disk. Pada konsentrasi minimum 3,0 mg/disk memberikan zona hambat 10,00±0,58 mm (irradikal) terhadap *Bacillus subtilis* serta 9,58±0,38 mm (radikal) terhadap *Streptococcus mutans*. Hasil KLT menunjukkan adanya flavonoid dan fenolik. Golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis* merupakan senyawa golongan fenolik dan flavonoid.

Kata kunci: *Theobroma cacao* L., antibakteri, etil asetat, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Cacao (Theobroma cacao L.) can be used as medicine. Cacao contain catechin, epicatechin, proanthocyanidin, phenolic acid, tannins, and other flavonoids. There are tree major compound of polyphenol in cacao, such as catechins (37%), anthocyanins (4%), and proanthocyanidins (58%). Acetone extracts of pod's cacao has antibacterial activity against Streptococcus mutans. Methanol extract of pod's cacao can inhibit the growth of Bacillus subtilis. This study aims to determine the antibacterial activity ethyl acetate fractions of acetone extracts pod's cacao against Bacillus subtilis and Streptococcus mutans also the compounds which responsible for the activity.

Fresh pod's cacao was macerated with acetone, and then get the acetone extracts of pod's cacao. Extracts fractionated using liquid-liquid partition, ethyl acetate's fractions obtained by fractionation of acetone extracts pod's cacao. Antibacterial activity of ethyl acetate fractions was tested using solid diffusion method with parameters showed inhibitor zone surrounding the disk. To determine compounds performed by Thin Layer Chromatography (TLC), using silica GF₂₅₄ as stationary phase and ethyl acetate : methanol (1:9)v/v as mobile phase. Bioautography using TLC plate eluted was placed onto agar inoculated bacteria, antibacterial compounds indicated inhibition zones.

The results showed that ethyl acetate fractions of acetone extracts pod's cacao has antibacterial activity against Bacillus subtilis and Streptococcus mutans in concentration 3,0-5,0 mg/disk. In minimum concentration of 3,0 mg/disk provide inhibition zone 10,00±0,58 mm (radical) for Bacillus subtilis and 9,58±0,38 mm (irradical) for Streptococcus mutans. TLC results showed flavonoids and phenolic. Class of compounds that have antibacterial activity against Bacillus subtilis and Streptococcus mutans are phenolic and flavonoid.

Keywords: *Theobroma cacao L., antibacterial, ethyl acetate, Bacillus subtilis, Streptococcus mutans.*

PENDAHULUAN

Tanaman kakao berasal dari hutan–hutan tropis di Amerika Selatan dan bagian utara Amerika Selatan. Kakao di Indonesia diperkenalkan oleh bangsa Spanyol yakni pada tahun 1560 tepatnya di Minahasa. Indonesia merupakan pembudidaya tanaman kakao paling luas dan termasuk penghasil kakao terbesar ketiga setelah Ivory Coast dan Ghana (Wahyudi *et al.*, 2008). Biji kakao pertama

kali digunakan pada masa peradaban kuno suku Maya dan Aztec di Amerika Selatan untuk mengobati beberapa penyakit yang melibatkan sistem kardiovaskuler, gastrointestinal, dan sistem saraf (Abbey *et al.*, 2008).

Menurut Panganiban *et al.* (2012) daun 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, seperti: mempunyai kemampuan untuk memodulasi sistem imun, efek kemopreventif untuk pencegahan penyakit kanker dan jantung koroner (Sartini *et al.*, 2011). Buah kakao berkhasiat sebagai antikanker, antioksidan, dan antibakteri (Marsaban, 2007).

Biji kakao mengandung senyawa-senyawa fenolik, antara lain: katekin, epikatekin, protoantosianidin, asam fenolat, tanin dan flavonoid lainnya (Othman *et al.*, 2007). Selain menghasilkan biji, tanaman ini juga menghasilkan produk ikutan berupa kulit buah kakao yang belum banyak dimanfaatkan hanya sebagai limbah (Sartini *et al.*, 2011). Kulit buah kakao kaya akan senyawa fenolik, seperti asam sinamat, tanin, pirogalol, epikatekin-3-galat, kuersetin, dan resinol (Fapohunda & Alofayan, 2012). Ada tiga komponen utama polifenol pada kakao, yakni katekin (37%), antosianin (4%), dan proantosianidin (58%) (Hii *et al.*, 2009). Kandungan polifenol yang terdapat dalam biji kakao kemungkinan sama kandungan polifenolnya pada kulit buah kakao, sehingga diperkirakan dapat memberikan khasiat yang sama.

Sartini *et al.* (2011) membuktikan bahwa ekstrak aseton 70% dari sampel kulit buah segar menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Polifenol pada kakao dapat mengurangi pembentukan biofilm dan produksi asam pada *Streptococcus mutans* (Ferrazzano *et al.*, 2009). *Streptococcus mutans* merupakan flora normal mulut yang pada kondisi tertentu dapat bersifat patogenik dan dapat menyebabkan infeksi pada bagian mulut, jantung, sendi, kulit, otot, dan sistem saraf pusat (Forssten *et al.*, 2010). Fapohunda & Afolayan (2012) membuktikan bahwa ekstrak metanol kulit buah kakao mampu menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*. Komponen terbesar pada kulit buah kakao adalah fenol. Menurut Tiwari *et al.* (2011) fenol dapat

tersari pada pelarut metanol maupun aseton. *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan keracunan pada makanan karena memproduksi enzim subtilisin yang biasanya ditandai dengan terbentuknya lendir pada makanan (Sundaram *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan pelarut aseton untuk membandingkan aktivitas antibakteri pada ekstrak aseton dengan ekstrak aseton 70%. Dilakukan fraksinasi menggunakan etil asetat untuk mengetahui golongan senyawa yang terlarut dalam pelarut etil asetat yang mempunyai aktivitas antibakteri. Penelitian Pasiga (2007) menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kulit buah kakao memberikan zona daya hambat terhadap *Streptococcus mutans*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao terhadap *Streptococcus mutans* dan *Bacillus subtilis* sehingga kulit buah kakao tidak hanya sebagai limbah.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat: Alat yang digunakan yaitu seperangkat alat ekstraksi, *rotary evaporator* (Heidolph), *waterbath* WNB-14 (Memmert), peralatan gelas (Pyrex), obyek glass, deck glass, mikropipet akurat 825 (Socorex), autoklaf (MA 672), mikroskop CX21 (Olympus), LAF (Astari Niagara International dan CV.Srikandi Laboratory), inkubator (Memmert), inkubator shaker (Excella E24), oven (Memmert), seperangkat alat KLT, dan lampu UV (Phillips).

Bahan yang digunakan yaitu kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) yang diperoleh dari Kartasura, kabupaten Sukoharjo, aseton teknis (CV. GM MEDICA), media *Mueller Hinton* (Oxoid), BHI (Oxoid), media *Nutrient Agar* (Oxoid), salin (Merck), DMSO (Merck), *paper disc* (Oxoid CT-0998B), disk kloramfenikol (Oxoid CT-0013B), *Streptococcus mutans* (biakan dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM), *Bacillus subtilis* (biakan dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM), cat gram, metanol p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), FeCl₃ (Merck), sitroborat, Liebermann-Burchard, dan Dragendorf.

B. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

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

2. Persiapan Sampel

Buah kakao yang diambil sudah masak, ditandai dengan menguningnya kulit buah pada saat dipetik dan sudah terpisahnya kulit buah dengan daging buahnya. Kulit buah kakao dalam bentuk segar diblender untuk memperkecil ukuran dan ditimbang.

3. Pembuatan Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao

Simplisia kulit buah kakao segar sebanyak 1 kg dimasukkan ke dalam maserator dan ditambahkan 7,5 liter aseton sampai semua serbuk terbasahi dan terendam. Selanjutnya didiamkan selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, simplisia diperas dan disaring dengan corong Buchner, maserat yang diperoleh ditampung kemudian diremaserasi sebanyak 2 kali. Maserat dievaporasi dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental kulit buah kakao.

4. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Kakao

Fraksinasi ekstrak aseton kulit buah kakao menggunakan partisi cair-cair. Tiap 5 gram ekstrak kental diencerkan dengan etanol absolut : air (1:1) v/v sebanyak 25 mL, diaduk sampai homogen, kemudian dimasukkan dalam corong pisah. Fraksinasi dilakukan berturut-turut secara partisi cair-cair dengan pelarut heksan dan etil asetat. Tahapan awal ekstrak difraksinasi dengan penyari n-heksan (1:1) v/v dengan volume total 50 mL. Hasil fraksinasi diperoleh fraksi heksan dan fraksi air. Fraksi heksan dipisahkan, fraksi air difraksinasi dengan etil asetat (1:1) v/v dengan volume total 50 mL. Fraksi etil asetat dan fraksi air dipisahkan. Hasil fraksinasi diperoleh fraksi etil asetat. Refraksinasi dilakukan sampai fraksi n-heksan dan etil asetat jernih (zat aktif telah habis tersari). Fraksi yang diperoleh dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator* sampai didapatkan fraksi yang kental. Fraksi etil asetat selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

5. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Frakasi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao yang telah dibuat seri konsentrasi (30% b/v, 35% b/v, 40% b/v, 45% b/v, dan 50% b/v), masing-masing dimasukkan dalam disk kosong sebesar 10 μ L. DMSO juga dimasukkan dalam disk kosong sebagai kontrol negatif. Media MH dituang dalam cawan Petri sebanyak 20 mL, kemudian ditunggu sampai padat. Selanjutnya 200 μ L suspensi bakteri yang telah dibuat setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL diteteskan ke dalam media, kemudian diratakan dengan *spreader glass*. Disk yang telah diisi fraksi etil asetat 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.

6. KLT Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao

Uji kandungan senyawa dengan KLT. Larutan uji dibuat dengan stok sebesar 50% b/v dengan menimbang 500 mg ekstrak kulit buah kakao dilarutkan dalam 1 mL metanol. Fase diam yang digunakan adalah Silika gel GF₂₅₄ yang diaktifkan dulu dengan cara dipanasi pada suhu 105-110°C selama 1 jam. Fase gerak yang digunakan etil asetat : metanol (1:9) v/v. Hasil kromatogram diamati pada UV 254 nm dan UV 366 nm. Bercak dideteksi dengan pereaksi semprot FeCl₃ (polifenol), sitroborat (flavonoid) dan Liebermann Burchard (saponin) (Wagner & Bladt, 1996).

7. Bioautografi

Senyawa aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dideteksi menggunakan metode bioautografi dengan cara kromatogram diletakkan selama 20 menit pada permukaan media MH dalam petri yang masing-masing telah diinokulasi dengan 200 μ L suspensi bakteri *S. mutans* dan *B. subtilis* yang telah dibuat setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL, plat diangkat kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi yaitu merendam simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut, perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel menyebabkan larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel. Cairan penyari yang digunakan adalah aseton, karena diduga senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri pada ekstrak kulit buah kakao segar yakni golongan senyawa fenolik secara umum dapat terekstraksi dalam pelarut aseton. Salah satu komponen utama senyawa fenolik yang terkandung dalam kakao yakni proantosianidin dapat diekstraksi dengan aseton (Nacz & Shahibidi, 2004). Proses penyarian dilakukan pada bejana yang tertutup dan terhindar dari cahaya matahari agar senyawa-senyawa yang tersari tidak teroksidasi. Keuntungan cara maserasi adalah cara dan peralatan yang digunakan mudah. Kerugian cara ini adalah lama dan penyariannya kurang sempurna.

Maserat yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya dengan cara penguapan dengan *vacuum rotary evaporator* untuk menguapkan aseton. Hasil penguapan disebut ekstrak kental berair. Sisa air yang masih terdapat dalam ekstrak dihilangkan dengan menguapkan ekstrak di atas *waterbath* dengan suhu di bawah 60 °C agar zat aktif yang terdapat didalam ekstrak tidak rusak akibat pemanasan. Hasil ekstrak aseton kulit buah kakao dari 3 kg simplisia segar kulit buah kakao diperoleh 63,46 gram ekstrak sehingga diperoleh rendemen sebesar 2,11% b/b (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Maserasi Kulit Buah Kakao dari Ekstrak Aseton

Berat Simplisia Awal (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
3000	63,46	2,11

B. Hasil Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak aseton kulit buah kakao menggunakan partisi cair-cair. Prinsip dari pemisahan dengan cara partisi adalah perbedaan kelarutan, dan syarat yang harus dipenuhi untuk melakukan cara ini adalah digunakan dua pelarut yang saling tidak bercampur. Tahap awal, ekstrak dilarutkan dengan etanol absolut : air (1:1) v/v, selanjutnya dipartisi menggunakan dua pelarut yang tidak saling bercampur yakni *n*-heksan dan etil asetat. Dengan partisi, kandungan kimia ekstrak dipisahkan ke dalam komponen yang terlarut dalam *n*-heksan, etil asetat, dan etanol-air. Hasil fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao dari 3000,00 gram simplisia segar kulit buah kakao diperoleh berat akhir fraksi etil asetat ekstrak kulit buah kakao sebesar 5,66 gram sehingga diperoleh rendemen sebesar 0,19 % b/b (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Fraksinasi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao

Berat simplisi (gram)	Berat Fraksi Etil asetat (gram)	Rendemen (%)
3000,00	5,66	0,19

C. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao terhadap *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans* dilakukan dengan metode difusi. Disk yang berisi agen antibakteri diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efektivitas antibakteri berdasarkan adanya diameter zona hambat di sekitar disk yang berisi fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada 37 °C.

Uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao dilakukan terhadap 5 seri konsentrasi fraksi yakni 3 mg/disk; 3,5 mg/disk; 4 mg/disk; 4,5 mg/disk; dan 5 mg/disk. Terdapat 2 kontrol validitas uji antibakteri yaitu kontrol positif (kloramfenikol), dan kontrol negatif (DMSO). Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao konsentrasi 3-5 mg/disk mampu memberikan zona radikal pada bakteri *Streptococcus mutans*, ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi tersebut. Sedangkan pada bakteri *Bacillus subtilis* pada konsentrasi 3–5 mg/disk hanya mampu menghambat pertumbuhannya, ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan yang

kurang subur atau jarang (irradikal) dibanding dengan daerah di luar pengaruh fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao tersebut.

Perbedaan aktivitas antibakteri disebabkan karena sensitivitas bakteri yang berbeda-beda di antara bakteri Gram positif terhadap zat antibakteri. Kematian bakteri atau pertumbuhan bakteri yang terhambat akibat suatu zat antibakteri dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap fungsi membran sel, sintesis dinding sel, penghambatan terhadap sintesis asam nukleat atau penghambatan terhadap sintesis protein (Jawetz *et al.*, 2001). Bakteri mempunyai struktur eksternal sel, dimana salah satu fungsinya adalah melindungi bakteri dari pengaruh lingkungan yang membahayakan, misalnya oleh antibakteri. Glikokaliks (kapsul) merupakan substansi yang mengelilingi sel yang memiliki struktur yang sangat terorganisasi dan tidak mudah dihilangkan. Bakteri *Bacillus subtilis* memproduksi kapsul asam D-glutamat. Selain struktur eksternal sel bakteri berupa glikokaliks (kapsul) ada juga yang disebut lapisan lendir (*slime*). Sebagian besar material kapsul diekskresikan oleh bakteri ke dalam media pertumbuhannya sebagai lapisan lendir (*slime*). Contoh bakteri yang memproduksi lapisan lendir untuk perlindungan terhadap antibakteri adalah *Streptococcus mutans*. Lapisan lendir pada bakteri relatif tidak terorganisasi dengan baik dan mudah dihilangkan (Pratiwi, 2008). Diperkirakan perbedaan struktur eksternal sel bakteri pada *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans* inilah yang menyebabkan *B. subtilis* lebih tahan terhadap zat antibakteri dibandingkan *S. mutans*. Hasil uji difusi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans*.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat (mm) Rata-rata dari Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans* dengan Metode Difusi

Konsentrasi Fraksi Etil Asetat (mg/disk)	Diameter Zona Hambat ($\bar{x} \pm SD$)	
	<i>S. mutans</i> (mm)	<i>B. subtilis</i> (mm)
3	9,58±0,38	10,33±0,58*
3,5	10,00±0,14	11,17±0,28*
4	10,92±0,14	11,67±0,76*
4,5	11,33±0,76	12,00±0,50*
5	12,00±0,50	12,33±0,29*
Kloramfenikol 30µg	15,17±1,04	16,33±1,15
DMSO	6	6

Diameter zona hambat termasuk diameter disk (6 mm)

***Irradikal**

Pada Tabel 3 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao, rata-rata diameter zona hambat juga semakin besar. Hal ini berarti semakin tinggi konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak aseton semakin banyak kandungan kimia yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri sehingga aktivitas antibakterinya juga semakin tinggi. Bila dibandingkan dengan fraksi etanol-air, fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri lebih tinggi ditinjau dari konsentrasi minimum fraksi yang dapat memberikan zona hambat pada *S. mutans*. Fraksi etil asetat memberikan zona hambat sebesar $10,33 \pm 0,58$ mm pada konsentrasi minimum 3 mg/disk, sedangkan fraksi etanol-air pada konsentrasi minimum yakni 3,5 mg/disk dapat memberikan zona hambat sebesar $6,58 \pm 0,1$ mm (Irawati, 2013). Sartini *et al.* (2011) membuktikan bahwa ekstrak aseton 70% memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* pada konsentrasi minimum yakni 0,25 mg/disk dengan diameter 6,75 mm, sedangkan Hidayati (2013) membuktikan ekstrak aseton memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* pada konsentrasi minimum 1,0 mg/disk dengan diameter zona hambat $6,5 \pm 0,0$ mm. Perbedaan aktivitas antibakteri diperkirakan karena senyawa yang tersari pada setiap pelarut berbeda-beda. Senyawa polifenol lebih terlarut pada pelarut yang bersifat polar. Ekstrak aseton 70% lebih polar dibandingkan ekstrak aseton sehingga ekstrak aseton 70% mampu menyari dari senyawa yang bersifat polar sampai non polar, sedangkan penyari aseton yang bersifat semipolar hanya mampu menyari senyawa yang bersifat semipolar sampai non-polar. Polifenol yang tersari dalam pelarut aseton kemungkinan senyawa pembentuk polifenol (tanin) yakni proantosianidin (Neczk & Shahibidi, 2004).

D. Kromatografi Lapis Tipis

Analisis kualitatif fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao. Fraksi etil asetat dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 50% b/v. Larutan tersebut selanjutnya ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan fase gerak hasil optimasi yaitu etil asetat : metanol (1:9) v/v. Pereaksi semprot yang digunakan antara lain FeCl_3 , sitroborat, dan Liebermann Burchard (LB). Deteksi

dengan FeCl_3 menunjukkan bercak berwarna hijau kehitaman, merupakan senyawa fenolik. Deteksi dengan pereaksi sitroborat dan diamati pada UV 366 nm terlihat fluoresensi kuning kehijauan, merupakan senyawa flavonoid. Deteksi dengan pereaksi semprot LB pada pengamatan menggunakan sinar tampak terlihat warna kuning menunjukkan tidak terdapat saponin. Pada lempeng KLT (Gambar 4) terlihat bahwa bercak sampel belum terjadi pemisahan sehingga bercak tersebut masih terdiri dari beberapa senyawa. Hasil KLT menunjukkan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao adalah golongan senyawa flavonoid dan fenolik (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao Menggunakan Berbagai Pereaksi Semprot dengan Fase Gerak Etil Asetat-Metanol (1:9) v/v dengan Jarak Pengembangan 5 cm.

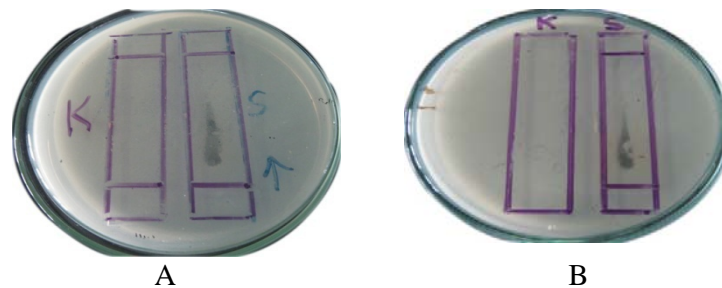
Warna bercak sebelum disemprot		Deteksi Pereaksi Semprot				Perkiraan Senyawa
Sinar UV (nm)		Sitroborat	FeCl_3	LB		
254	366	Visual	UV 366	Visual		
pemadaman	Tidak ada fluoresensi	Kuning	Floresensi kuning ke hijau	Kelabu ke hitam-hitaman	Kuning	Flavonoid, Fenolik

E. Uji Bioautografi

Uji bioautografi merupakan metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT pada fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao yang memiliki aktivitas antibakteri. Keuntungan metode ini adalah sifatnya yang efisien untuk mendeteksi adanya senyawa antibakteri karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks (Pratiwi, 2008). Pada uji dilakukan kontrol plat KLT untuk mengetahui apakah fase gerak yang digunakan mempunyai aktivitas antibakteri atau tidak. Hasil uji bioautografi pada *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans* didapatkan zona jernih pada media yang telah disuspensikan bakteri. Berdasarkan hasil deteksi kandungan senyawa pada fraksi etil asetat kulit buah kakao dengan Kromatografi Lapis Tipis, bercak tersebut merupakan golongan senyawa fenolik dan flavonoid.

Menurut Othman *et al.* (2012) kakao kaya akan senyawa fenolik, seperti katekin, epikatekin, protoantosianidin, asam fenolat, tanin, dan flavonoid lainnya. Ada tiga komponen utama polifenol pada kakao, yakni katekin (37%), antosianin

(4%), dan proantosianidin (58%) (Hii *et al.*, 2009). Mekanisme senyawa fenolik sebagai antibakteri yakni melakukan penghambat enzim yang merupakan suatu protein oleh senyawa pengoksidasi melalui reaksi dengan kelompok sulfhidril atau melalui reaksi non spesifik dengan protein, akibatnya aktivitas metabolisme sel bakteri terhenti. (Cowan, 1999). Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol yang terhidroksilasi, aktivitas senyawa flavonoid sebagai antibakteri diperkirakan karena kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri. Akibatnya, fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang mengakibatkan kematian sel bakteri (Cowan, 1999).



Gambar 1. Hasil Uji Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap *Bacillus subtilis* (A) dan *Streptococcus mutans* (B).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan:

1. Fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus mutans*, dengan zona hambat $9,58 \pm 0,38$ mm (irradikal) pada konsentrasi minimum yakni 3 mg/disk terhadap *Bacillus subtilis* serta memberikan zona hambat sebesar $10,33 \pm 0,58$ mm (radikal) pada konsentrasi minimum yakni 3 mg/disk terhadap *Streptococcus mutans*.
2. Golongan senyawa dari fraksi etil asetat ekstrak aseton kulit buah kakao yang memiliki aktivitas antibakteri baik terhadap *Bacillus subtilis* maupun *Streptococcus mutans* merupakan senyawa golongan fenolik dan flavonoid.

Saran : Perlu dilakukan optimasi fase gerak lebih lanjut dari senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri yang terdapat dalam fraksi etil aseta ekstrak aseton kulit buah kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbey, M. J., Patil, V. V., & Durham, P. L., 2008, Repression of calcitonin gene-related peptide expression in trigeminal neurons by a *Theobroma cacao* extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 115 (2), 238-248, (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410700503X>), diakses tanggal 21 Mei 2012).
- Astuti, K.W., 2012, Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Perolehan Kembali Cannabinoid Dari Daun Ganja, *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*, 2 (1), 21-23.
- Ardiningsih, P., Sumarni, Risa N., and Jayuska, A., Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Sub Fractions Asam Kandis (*Garcinia diocia* Blume), *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 12, 172-174.
- Bergey, D. H. & Boone, D. R., 2009, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, Ed. 2, 2, 3, 655, 656, New York, Springer Science-Business Media.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology)*, Edisi 1, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 224, 226, 235, 327, 335, 353, Jakarta, Penerbit Salemba Medika.
- Cowan, M. M., 1999, Plant Product as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564-582.
- Despal, 2005, *Nutritional Properties of Urea Treated Cocoa Pod for Ruminant*, 5, Cuvillier Verlag, Gottingen-Jerman.
- 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.
- Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Natale, A. D., & Pollio, A., 2009, Anti-Cariogenic Effects of Polyphenols From Plant Stimulant Beverages (Cocoa, Coffee, Tea), *Fitoterapia*, 80, 255-262.

- Forssten, S. D., Bjorklund, M., & Ouwehand, A.C., 2010, *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models, *Nutrients Journal*, 2, 290-298.
- Hatmanti, A., 2000, Pengenalan Bacillus spp, *Oseana*, XXV, 31-41.
- Hidayati, C. D., 2013, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Hii, C. L., Law, C. L., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M., 2009, Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.), *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, 04, 702-722.
- Irawati, E. S., 2013, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Etanol-Air Ekstrak Aseton Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A., 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi XXII, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 224, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Marsaban, 2007, Perbandingan Efek Antibakterial Ekstrak Buah Cacao (*Theobroma cacao*) pada Berbagai Konsentrasi Terhadap *Streptococcus mutans*, *Artikel Penelitian*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Naczki, M. & Shahibidi, F., 2004, Extraction and Analysis of Phenolics in Food, *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111
- Osman, H., Nasrudin, R., & Lee, S. L., 2004, Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential, *Journal Food Chemistry*, 86, 41-46.
- Othman, A., Ismail A., Ghani N. A., & Adenan I., 2007, Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans, *Journal Food Chemistry*, 100 (4), 1523-1530.
- Panganiban, C. A., Reyes, R. B., Agojo, I., Arnedilla, R., Consul, J. Z., Dagli, H. F., & Esteba, L., 2012, Antibacterial Activity of Cacao (*Theobroma Cacao* Linn.) Pulp Crude Extract Against Selected Bacterial Isolates, *International Peer Reviewed Journal*, 1, 32-44.

- Pasiga, 2007, Efikasi Klinik Obat Kumur Yang Mengandung Limbah Kulit Buah Kakao, *Laporan Penelitian*, (<http://pustaka2.ristek.go.id/katalog/indeks.php/searchkatalog/byId/52139>), diakses tanggal 28 Maret 2012.
- Pratiwi, S. T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, 174, 188, 190, 191-192, Jakarta, Penerbit Erlangga.
- Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I., 2006, *Natural Products Isolation, Second edition*, 7, 8, 269, 270, New Jersey, Humana Press Inc.
- Sartini, Djide, Natsir, M., & Alam, G., 2011, Ekstraksi Komponen Bioaktif Dari Limbah Kulit Buah Kakao Dan Pengaruhnya Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Antimikroba, *Journal of Traditional Medicine*, 14 (47).
- Setiabudy, R., 2007, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi V, 585, 587, Jakarta, Departemen Farmakologi dan Terapi FKUI.
- Simanjuntak, M.R., 2008, Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Srikanth, R. K., Shashikiran, N. D., & Reddy, V. V. S., 2008, Chocolate mouth rinse: Effect on plaque accumulation and mutans *Streptococci* counts when used by children, *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 26 (2), 67-70.
- Sundaram, S., Dwivedi, P., & Purwar, S., 2011, *In vitro* Evaluation of Antibacterial Activities of Crude Extracts of *Withania somnifera* (Ashwagandha) to Bacterial Pathogens, *Asian Journal of Biotechnology*, 3 (2), 194-199.
- Wahyudi, T., Panggabean, T. R., & Pujiyanto, 2008, *Panduan Lengkap Kakao Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*, 12, 13, Depok, Penebar Swadaya.
- Wagner, H. & Bland, S., 1996, *Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas, second edition*, 22, 197, 306, 362, Berlin, Springer-Verlag.